

TESIS DE MAGISTER

**CARACTERIZACION DEL PERFIL BIOQUÍMICO DEL
SALMON DEL ATLÁNTICO “*Salmo salar*” SANOS, Y
SEROVARIACIÓN ANTE DESAFÍO CON VIRUS ISA Y
*Piscirickettsia salmonis***

GIOVANNA PATRICIA CÁCERES CRUZ

**Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Medicina Patología Animal**

DIRECTOR TESIS: DR. JURIJ WACYK GONZALEZ

Financiamiento: CORFO Sanitario (2009-6682)

**SANTIAGO-CHILE
2018**

*Esta memoria de título está dedicada a mis padres Pedro y Rosy, mi hermano por ser un pilar fundamental en la persecución de mis metas y apoyo a lo largo de todos los desafíos
Para Amaya, Gaspar, Pepe, Ambrosio, Lucia, Blanca, Cleo y Niña por ser mi motivación
A mi abuela Berta y Sebastián*

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
Principales patologías que afectan los sistemas de cultivo del salmón	11
Generalidades <i>Piscirickettsia salmonis</i>	11
Generalidades Anemia infecciosa del salmón	12
Generación de nuevas estrategias para conocer la condición sanitaria de los peces	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y METODOS	15
Diseño experimental desafío con <i>Piscirickettsia salmonis</i>	15
Diseño experimental desafío con la Anemia Infecciosa del salmón.	17
Toma de muestras	19
Análisis y procesamientos de muestras_	19
Análisis estadístico	20
RESULTADOS	21
Ensayo con <i>Piscirickettsia salmonis</i>	21
Descripción del perfil bioquímico del salmón del Atlántico sanos.....	21
Comparación de las variaciones de los parámetros del perfil bioquímico entre peces sanos y desafiados con <i>Piscirickettsia salmonis</i>	23
Porcentaje de mortalidad de cohabitantes y troyanos para el desafío con <i>Piscirickettsia salmonis</i>	26
Descripción de la variación en el tiempo del perfil bioquímico del salmón del Atlántico desafiados con <i>Piscirickettsia salmonis</i>	27
Ensayo con el virus de la Anemia Infecciosa del salmón	34
Descripción del perfil bioquímico del salmón del Atlántico sanos.....	34
Comparación de las variaciones de los parámetros del perfil bioquímico entre peces sanos y desafiados con el virus de la Anemia infecciosa del salmón	35
Porcentaje de mortalidad de cohabitantes y troyanos para el desafío con la Anemia infecciosa del salmón	38
Descripción de la variación en el tiempo del perfil bioquímico del salmón del Atlántico desafiados con Anemia infecciosa del salmón.....	39
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIÓN	53
BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1: Describe los parámetros bioquímicos analizados junto a la metodología, reactivo que se utilizó y su expresión en unidades	19
TABLA N°2: Parámetros bioquímicos sanguíneos de 45 ejemplares de salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) sanos expresados en la Media, Desviación estándar (D.S), Coeficiente variación (CV), Mediana y Rango para cada parámetro	21
Tabla N°3. Comparación de los niveles plasmáticos de los parámetros bioquímicos sanguíneos del salmón del Atlántico sanos con cada tiempo de desafío con <i>Piscirickettsia salmonis</i> , expresados en la mediana obtenido de cada	23
Tabla N°4. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con <i>Piscirickettsia salmonis</i> , para los parámetros de albúmina, proteínas totales, colesterol y triglicéridos expresados en el rango (máximo – minino), coeficiente de variación (C.V.)	26
Tabla N°5. Parámetros bioquímicos de Calcio, Fósforo, Magnesio y Glucosa de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con <i>Piscirickettsia salmonis</i> , expresados en el rango (máximo – minino), coeficiente de variación (C.V.)	28
Tabla N°6. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con <i>Piscirickettsia salmonis</i> , para los parámetros de bilirrubina, creatinina y urea expresados en el rango (máximo – minino), coeficiente de variación (C.V.)	29
Tabla N°7. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con <i>Piscirickettsia salmonis</i> , para los paramtros ALP, AST, LDH y CK expresados en el rango (máximo–minino), coeficiente de variación (C.V.)	30
TABLA N°8: Parámetros bioquímicos sanguíneos de 40 ejemplares de salmón del Atlántico sano expresados en la Media, desviación estándar (D.S), coeficiente variación (CV), Mediana y Rango (valores máximo y mínimo) para cada parámetro bioquímico.....	33
Tabla N°9. Parámetros bioquímicos sanguíneos del salmón del Atlántico sanos y el grupo de peces desafiados con el virus de la anemia infecciosa del salmón expresados en la mediana de cada parámetro en ambos grupos.....	34
Tabla N°10. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con <i>Piscirickettsia salmonis</i> , para los parámetros de triglicéridos, glucosa, magnesio, creatinina y urea expresados en el rango (máximo – minino), coeficiente de variación (C.V.)	36
Tabla N°11. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con el virus de la anemia infecciosa del salmón, expresados en el rango (máximo – minino), coeficiente de variación (C.V.)	38

ABREVIATURAS

ALT	Fosfatasa Alcalina
AST	Aspartato amino transferasa
CK	Creatina quinasa
C.V.	Coefficiente de variación
D.S.	Desviación estándar
IFAT	Técnica microscópica inmunofluorescencia indirecta
ISAv	Virus Anemia infecciosa del salmón
LDH	Lactato deshidrogenasa
P. totales	Proteínas Totales
P. salmonis	<i>Piscirickettsia salmonis</i>
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
SRS	Septicemia Rickettsial Salmonídea
T1	Tiempo 1 del desafío
T2	Tiempo 2 del desafío
T3	Tiempo 3 del desafío
T4	Tiempo 4 del desafío
T5	Tiempo 5 del desafío

RESUMEN

La producción acuícola ha crecido a un ritmo acelerado en las últimas décadas, pero este rápido crecimiento ha facilitado el incremento de la prevalencia e incidencia de enfermedades infectocontagiosas en acuicultura. Si consideramos que una de las mayores amenazas para la industria acuícola nacional son las pérdidas producidas principalmente por enfermedades, disponer de herramientas complementarias a las de rutina, que puedan detectar precozmente alteraciones en la condición sanitaria de los peces que están siendo cultivados.

La exploración de bioquímica sanguínea es una herramienta que nos permite detectar alteraciones tempranas, ya que revela cambios que son previos a un deterioro orgánico, siendo un excelente predictor del estado fisiológico del pez, alteraciones del metabolismo y la presencia o ausencia de una condición patológica.

Este trabajo tuvo por objetivo determinar rangos de referencia normales para los parámetros bioquímicos sanguíneos en el salmón del Atlántico. También de pesquisar las variaciones en los niveles circulantes de los analitos contemplados en este estudio, cuando los peces cursan con enfermedades como, por ejemplo, virus de la anemia infecciosa del salmón y la bacteria de la *Piscirickettsia salmonis*.

Las variables bioquímicas consideradas en este estudio fueron proteínas totales, albúmina, colesterol, triglicéridos, glucosa, urea, creatinina, calcio, fósforo, magnesio, aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), creatina quinasa (CK). Para su determinación se utilizó un auto analizador Metrolab 2300 de Wiener Lab.

A través de este estudio se pudo establecer variaciones en los niveles circulantes de los parámetros bioquímicos sanguíneos entre peces sanos y enfermos. Por lo tanto, la evaluación de los perfiles bioquímicos entrega información valiosa sobre el estado de salud de los peces y permite pesquisar cambios en los niveles circulantes de los analitos previos a un deterioro clínico evidente

ABSTRACT

Aquaculture production has grown at an accelerated rate in recent decades, but this rapid growth has facilitated the increase in the prevalence and incidence of infectious and contagious diseases in aquaculture. If we consider that one of the greatest threats for the national aquaculture industry are the losses produced mainly by diseases, to have complementary tools to those of routine, that can detect early alterations in the sanitary condition of the fish that are being cultivated.

The exploration of blood biochemistry is a tool that allows us to detect early alterations, since it reveals changes that are previous to an organic deterioration, being an excellent predictor of the physiological state of the fish, alterations of the metabolism and the presence or absence of a pathological condition.

The objective of this work was to determine normal reference ranges for blood biochemical parameters in Atlantic salmon. Also, to investigate the variations in the circulating levels of the analytes contemplated in this study, when the fish deal with diseases such as, for example, infectious anemia virus of the salmon and the bacterium of the *Piscirickettsia salmonis*.

The biochemical variables considered in this study were total proteins, albumin, cholesterol, triglycerides, glucose, urea, creatinine, calcium, phosphorus, magnesium, aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), creatine kinase (CK). A Wiener Lab Metrolab 2300 auto-analyzer was used for its determination.

Through this study it was possible to establish variations in the circulating levels of blood biochemical parameters between healthy and sick fish. Therefore, the evaluation of the biochemical profiles provides valuable information on the health status of the fish and allows to investigate changes in the circulating levels of the analytes prior to an evident clinical deterioration.

INTRODUCCIÓN

La producción acuícola moderna está asociada a sistemas de producción, que se caracterizan por su alto grado de intensidad, por lo que siempre es necesario contar con herramientas que nos permitan monitorear el estado sanitario de los individuos que forman parte de este. El control de los agentes etiológicos, las enfermedades y los factores que contribuyen a su presentación como el hacinamiento, agentes estresores, nutrición y manejo, permiten que los animales puedan crecer y desarrollarse logrando sus máximos potenciales genéticos en términos productivos acorde a su bienestar fisiológico.

El control y detección de los problemas sanitarios en la salmonicultura debe abordarse de forma temprana, ya que una acción tardía mantendrá altas tasas de mortalidad, retrasos en la tasa de crecimiento de los peces, reducciones en la eficiencia de conversión del alimento y daños en la calidad del producto final.

En la actualidad existen diversas metodologías que se usan para obtener información relacionada con el estado sanitario de los peces en cultivo intensivo. Estos procedimientos, están circunscritos a necropsias y toma de muestras de órganos para histopatología, los que están aceptados y validados. Sin embargo, contemplan el sacrificio del pez. Adicionalmente involucra mucho tiempo en ser analizadas y no puede detectar enfermedades hasta cuando se genera un daño tisular evidente. A pesar de esto la necropsia ha sido habitualmente la metodología de elección. El poder diagnóstico de esta herramienta ha estimulado su amplio uso a nivel industrial. Sin embargo, no cuenta con poder predictivo ni tampoco permite evaluar la condición sanitaria del pez. Junto con esta herramienta, son de uso habitual las técnicas basadas en la bacteriología, pero la sensibilidad de estas pruebas puede depender del tejido muestreado, viabilidad del agente patógeno y medio de cultivo. Igualmente se han implementado técnicas como el PCR, para monitorear el estado sanitario de los peces, con la ventaja de presentar una alta sensibilidad y especificidad, pero con la desventaja de ser a veces de mayor costo económico, ya que requiere múltiples marcadores para poder emitir un juicio. Además, es un método que presenta mayor sensibilidad a la contaminación en su etapa de procesamiento.

Por lo tanto, es importante contar con nuevas estrategias que sean complementarias a las disponibles actualmente para obtener información de la condición sanitaria de los peces en forma preventiva, para disminuir el ingreso y propagación de enfermedades, el control de agentes etiológicos, nutrición, un eventual deterioro de los índices de crecimiento y potenciales productivos de la industria acuícola. Además de evitar los grandes gastos y las pérdidas económicas asociadas.

En medicina humana y veterinaria, la exploración de bioquímica sanguínea ha sido utilizada ampliamente durante muchos años como método de diagnóstico, para conocer la evolución de la enfermedad y la utilidad del tratamiento en forma rutinaria lo que es de gran valor para conocer el estado sanitario de un individuo y establecer la presencia o ausencia de una condición patológica (Weiser *et al.*, 2007; Bellier, 2010; Washington y Van Hoosie, 2012). Esta técnica puede proporcionar información sobre el estado fisiológico del animal, detectar desórdenes fisiológicos y enfermedades causadas por diversos factores como agentes patógenos o tóxicos (Bellier, 2010; Washington y Van Hoosie, 2012), debido a que la sangre desempeña funciones en el transporte de compuestos biológicos en el organismo, en ella es posible detectar alteraciones tempranas, ya que permite pesquisar cambios que son previos al deterioro orgánico y daño tisular evidente, siendo los cambios en el perfil bioquímico un excelente predictor del estado fisiológico del animal. Además, ofrece la ventaja de ser un método, de baja invasividad, que no requiere el sacrificio del animal, permite el monitoreo de una población o de un mismo individuo en repetidas veces y es posible detectar alteraciones en la fisiología del individuo de forma temprana (Kaneko 1997; Bellier, 2010; Washington y Van Hoosie, 2012).

En humanos y animales domésticos se ha logrado estandarizar la técnica de bioquímica sanguínea, y se cuenta con una base para comenzar a trabajar en la aplicación del análisis de bioquímica sanguínea en peces, el cual se encuentra escasamente descrito. De hecho, la estructura química de la mayoría de las moléculas de interés diagnóstico y su determinación de concentración en los fluidos biológicos es casi idéntica en seres humanos y animales, por lo tanto, ha sido posible estandarizar las mismas técnicas analíticas desarrolladas en laboratorios, ya sea para humanos o animales domésticos (Bellier, 2010).

La aplicación de la bioquímica sanguínea en acuicultura presenta diferentes desafíos entre los que se encuentran el contar con rangos de referencia, tanto en peces sanos como en peces enfermos, de manera de poder comparar y poder sentar las bases de una estrategia preventiva de evaluación de la condición sanitaria de los peces.

Para la obtención de marcadores bioquímicos sanguíneos, se debe tener presente la influencia de factores fisiológicos como la especie, edad, sexo, el estrés, ciclo reproductivo, nutrición (Hunn *et al.*, 1992; Hrubec y Smith, 1999; Chen *et al.*, 2003; De Pedro *et al.*, 2004), condiciones de cultivo o medio ambiente, por ejemplo, temperatura, el fotoperiodo, saturación de oxígeno, salinidad (Cotant, 1999; Hrubec y Smith, 1999; Chen *et al.*, 2003; De Pedro *et al.*, 2004). También son de relevancia el tipo de anestésico usado, sitio de punción para la obtención de la muestra, condiciones de centrifugación, grado de hemólisis (Hunn *et al.*, 1992; De Pedro *et al.*, 2004), los cuales tendrán incidencia en los resultados de laboratorio. Debido a esto, el poder controlar algunos de estos factores determina y define la validez de los indicadores sanguíneos para la generación de “rangos de referencia” de una población de peces, que pueda ser utilizada para un sistema de evaluación de la condición sanitaria y perfil bioquímico (Li *et al.*, 2011).

La literatura asociada a rangos de referencia sanguínea para la salmonicultura, esta principalmente basada en determinaciones realizadas en los basadas los años 90, donde se describen rangos de perfil bioquímico para trucha arcoíris, salmón del Atlántico (Stoskopf, 1993) y algunos estudios nacionales de perfil bioquímico sanguíneo de salmónidos (Fernández-Niño, 2004; Herrera, 2004; LPCV-Universidad Austral de Chile, 2004; Pérez, 2005). Por lo tanto, es necesario generar nuevos antecedentes para complementar la información que se dispone hasta ahora y establecer rangos más robustos y representativos de la realidad nacional.

REVISION BIBLIOGRÁFICA

Dentro de la ictiopatología, la exploración de bioquímica sanguínea constituye una herramienta que aporta al diagnóstico y pronóstico de una enfermedad dentro de una población de peces (Chen *et al.*, 2003; De Pedro *et al.*, 2004; Congleton, 2006; Rehuelka y Minark, 2007; Qiu *et al.*, 2009; Sudova *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011).

Se sabe que en sangre se presentan generalmente los primeros cambios patológicos antes de la presentación de cualquier signo y síntoma de enfermedad (Hrubec y Smith, 1999; De Pedro *et al.*, 2004; Congleton, 2006; Weiser *et al.*, 2007; Coz-Rakovac *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2009; Talas *et al.*, 2009; Bellier, 2010; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Washington y Van Hoosie, 2012). Considerando esta temprana respuesta el análisis y evaluación de las variaciones de los parámetros bioquímicos de plasma sanguíneo han sido usados como indicadores en la determinación del estado de salud, daño tisular debido a los procedimientos de manejo y estados patológicos, estado nutricional y reproductivo de los peces cultivados y como indicador de la salud del medio ambiente acuático (Congleton, 2006; Agrahari *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011; Kavitha *et al.*, 2012).

Dentro de las pruebas bioquímicas se encuentra la determinación de actividad de enzimas plasmáticas, las cuales están contenidas normalmente dentro de las células que las sintetizan o unidas a la membrana plasmática de estas (Center, 2007; Bellier, 2010). Los aumentos de los niveles circulantes de enzimas plasmáticas han sido asociadas con daño celular (Bellier, 2010; Washington y Van Hoosie, 2012).

La enzima aspartato aminotransferasa (AST), en mamíferos está presente en todos los tejidos excepto en los huesos (Washington y Van Hoosie, 2012). En animales domésticos una elevación de los niveles de AST está relacionada con lesión muscular (miositis, traumatismo) y enfermedad hepática (Kaneko, 1997; Bellier, 2010).

Otro parámetro plasmático es la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Las mayores concentraciones plasmáticas en el caso de los mamíferos se encuentran en músculo esquelético, corazón, riñones (Center, 2007). Las concentraciones plasmáticas elevadas de

LDH en animales domésticos se han reportado en lesiones hepáticas como necrosis, alteraciones músculo esqueléticas (Center, 2007; Ferri *et al.*, 2011; Washington y Van Hoosie, 2012).

La creatina quinasa (CK), la concentración plasmática de CK en animales domésticos se encuentra en las mismas ubicaciones descritas para los seres humanos (músculo esquelético, el miocardio y el cerebro) (Bellier, 2010; Center, 2007; Kaneko, 1997). En animales domésticos un aumento moderado de la CK se puede observar después de un ejercicio físico intenso, postración prolongada, inyección intramuscular (Bellier, 2010).

La fosfatasa alcalina (ALP), está presente en la mayoría de los tejidos, pero se encuentra mayormente en intestino, riñón, hueso e hígado (Kaneko, 1997; Center., 2007; Washington y Van Hoosie, 2012). En animales en general los aumentos en sangre para esta enzima se describen en colestasis, alteraciones o lesiones en el epitelio intestinal, raquitismo y animales jóvenes debido al crecimiento óseo. (Kaneko, 1997; Center, 2007; Bellier, 2010). Por otro lado, se informan niveles bajos de ALP en ayuno, hipotiroidismo, anemia (Washington y Van Hoosie, 2012).

La componente proteica del nitrógeno plasmático corresponde a diferentes proteínas que desempeñan diversas funciones. Las más importantes son las referidas al mantenimiento de la presión oncótica en el plasma, el transporte de sustancias a través del cuerpo, por ejemplo, la ferritina, drogas, hormonas y también componentes de la inmunidad humoral (Bellier, 2010).

En mamíferos las proteínas plasmáticas se sintetizan en forma predominante en el hígado, aunque también contribuyen en su producción las células plasmáticas. Cuantitativamente la proteína más importante es la albúmina que responde al 30-50% de la concentración total de proteínas plasmáticas, al resto se les conoce como globulinas (Kaneko, 1997).

En mamíferos, cambios en los niveles circulantes de las proteínas totales permiten evaluar el curso de diversas patologías entre ellas, trastornos inmunes, disfunción hepática y riñón (Kaneko, 1997; Bellier, 2010). Disminuciones de los niveles de proteína total bajo rangos

descritos como normales en mamíferos están asociados a ayuno, desnutrición, y disfunción hepática.

Otro componente de interés son los triglicéridos circulantes que corresponden a los lípidos más abundantes del organismo (Kaneko, 1997; Washington y Van Hoosie, 2012). En mamíferos las concentraciones de triglicéridos aumentan posterior a la ingesta de una dieta rica en lípidos (Kaneko, 1997). Por otro lado, un descenso en los triglicéridos si bien no está necesariamente relacionada a una enfermedad específica, una disminución en los niveles circulantes ha sido reportadas en varios casos insuficiencia hepática aguda y crónica en animales domésticos (Kaneko, 1997; Herrera, 2004; Bellier, 2010).

La glucosa es un sustrato que todas las células de los mamíferos utilizan como combustible para sus funciones básicas (Polakof *et al.*, 2011). Su concentración plasmática puede variar por diversos factores, como la nutrición, niveles hormonales, periodos de hibernación, ayuno. (Bellier, 2010; Kaneko, 1997; Washington y Van Hoosie, 2012).

La fracción mineral es otro importante componente del plasma, son aportados por la dieta y también se absorben del medio acuático por el intercambio de estos con el agua a través de las branquias. Los minerales tienen un papel estructural en el organismo formando parte del esqueleto, cartílagos, además de participar en la regulación del metabolismo, como activadores enzimáticos (estructura de enzimas), formar parte de la actividad neuromuscular, en el balance ácido-básico y formando parte de enzimas, hormonas y vitaminas (Fernández Niño, 2004).

Los compuestos nitrogenados son un grupo de compuestos que también circulan y son distribuidos por la sangre vía plasma. Dentro de estos compuestos están los no proteicos, como urea y creatinina. En mamíferos el nivel de urea en sangre varía dependiendo de la función hepática, absorción intestinal de nutrientes y la composición de la dieta. La concentración de urea se incrementa por dietas ricas en proteína o ejercicio vigoroso, mientras que puede disminuir en episodios de insuficiencia hepática y baja ingesta de proteínas (Bellier., 2010)

La creatinina en peces al igual que en mamíferos es producida a nivel muscular a una tasa relativamente estable y es excretada a nivel renal (Bellier., 2010; Washington y Van Hoosie., 2012). En animales domésticos los niveles de la creatinina y urea son utilizadas como indicadores para medir la tasa de filtración glomerular a nivel renal (Herrera, 2004; Bellier, 2010).

Se puede considerar que la aplicación de bioquímica sanguínea en peces permitirá evaluar la condición sanitaria de peces bajo distintas condiciones. Además, genera la posibilidad de determinar y cuantificar los cambios que se producen a nivel de bioquímica sanguínea en dos patologías de interés en la industria acuícola chilena, debido a las pérdidas productivas y económicas de estas dos enfermedades. Si bien son conocidas ampliamente en su patogenia, tipo de lesiones, existe escasa información de las variaciones bioquímicas sanguíneas que estas enfermedades pueden generar en los peces.

Principales patologías que afectan los sistemas de cultivo del salmón del Atlántico

Generalidades *Piscirickettsia salmonis*

La piscirickettsiosis es una enfermedad septicémica infectocontagiosa que puede tener un curso agudo o crónico y sus hospedadores principales corresponden a especies salmónidas. Su agente causal es una bacteria intracelular facultativa gram negativa, cocoide, aeróbica llamada *Piscirickettsia salmonis* (Fryer y Hedrick, 2003; Rozas y Enríquez, 2014). Esta patología ha causado daños económicos muy importantes en la acuicultura chilena. Así, desde el surgimiento de los primeros brotes de piscirickettsiosis, los cuales ocurrieron a finales de la década de 1980 hasta la actualidad, se estima que las pérdidas para la salmonicultura en Chile superarían con creces los dos mil millones de dólares (Smith, 2015). La piscirickettsiosis ocurre en la etapa de mar y su transmisión se produce principalmente de manera horizontal. El ingreso de la bacteria es a través de la piel intacta, pero también se ha descrito por branquias, llegando finalmente al parénquima de distintos órganos. Los signos clínicos incluyen oscurecimiento externo, inapetencia, letargia, úlceras superficiales y palidez branquial causada por anemia. Internamente se presenta aumento de volumen y decoloración del riñón y aumento de volumen del bazo, pudiéndose presentar ascitis y hemorragias de la grasa visceral, estómago, vejiga natatoria y musculatura (Godoy, 2007).

El diagnóstico confirmatorio se realiza a través de aislamiento en cultivos celulares, inmunofluorescencia, ELISA o PCR (Fryer y Hedrick, 2003).

Generalidades Anemia infecciosa del salmón

El agente etiológico pertenece a la familia Orthomyxoviridae y al género Isavirus, el virus se compone de una envoltura, nucleocápside y un core. El diámetro de la partícula viral puede ser desde 90-140 nm. El virus pierde la capacidad de infección cuando es expuesto a una temperatura de 56 ° C por 5 minutos y a pH 4 o más ácido, alcanza su máxima replicación a una temperatura de 15 ° C, pero esta se anula a los 25 ° C (Hellebo *et al.*, 2004). El virus es transmitido de manera horizontal, cuando los animales susceptibles entran en contacto directo con salmones infectados, o con sus secreciones o excreciones (contenido intestinal, orina y heces) o con restos de animales muertos y contagiados, aguas contaminadas con el virus o también por intercambio con vectores como el piojo del salmón. La sangre y mucus de la epidermis contienen grandes cantidades de virus y transmiten más efectivamente el virus que la orina y heces (Jiménez, 2010; Cottet *et al.*, 2011).

Los peces infectados transmiten el virus semanas antes de mostrar sinología clínica, aquellos que sobreviven a la enfermedad actúan como reservorios y eliminan el virus por más de un mes (Cottet *et al.*, 2011). El diagnóstico de ISA se basa en hallazgos clínicos y patológicos, en combinación con pruebas de laboratorio que confirman la presencia del virus. Estos incluyen el aislamiento del virus en cultivo celular seguido por su identificación inmunológica, RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa), e IFAT (prueba de inmunofluorescencia indirecta).

Generación de nuevas estrategias para conocer la condición sanitaria de los peces

Si consideramos que una de las mayores amenazas para la industria acuícola nacional son las pérdidas producidas principalmente por enfermedades infectocontagiosa (Figuroa *et al.*, 2011). Disponer de nuevas y más robustas herramientas diagnosticas como el uso del perfil bioquímico sanguíneo permitiría conocer en forma oportuna, temprana y objetiva la condición sanitaria de los peces.

Los reportes de algunos estudios donde se muestra que los cambios en determinados parámetros bioquímicos se correlacionan con la calidad del agua, enfermedades infecciosas o exposición a tóxicos (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; De Pedro *et al.*, 2004; Agrahari

et al., 2007) y teniendo como referencia el uso de la bioquímica sanguínea en medicina humana y veterinaria de animales domésticos, se puede considerar que la aplicación de la bioquímica sanguínea en peces tiene un gran potencial para la evaluación de la condición sanitaria de peces bajo distintas condiciones.

Teniendo esto en cuenta el presente estudio apunta a la generación de una estrategia de evaluación del estado sanitario de los peces usando como herramienta mediciones de perfil bioquímico en salmón del Atlántico de cultivo.

HIPÓTESIS

El uso de parámetros de perfil bioquímico permite evaluar la condición sanitaria en salmón del Atlántico, permitiendo identificar parámetros que se diferencian significativamente entre peces sanos y desafiados.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el perfil bioquímico del salmón del Atlántico de peces sanos y desafiados.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Describir el perfil bioquímico de peces de la especie *Salmo salar* sanos.
- 2.- Describir el perfil bioquímico de peces de la especie *Salmo salar* desafiados con el virus de la Anemia infecciosa del salmón y la bacteria de la Piscirickettsiosis.
- 3.-Comparar las variaciones de los parámetros del perfil bioquímicos de peces sanos y desafiados.
- 4.-Describir las variaciones que experimenta cada parámetro del perfil bioquímico durante el curso y evolución de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Individuos:

Los peces para este estudio fueron obtenidos del Centro Chaqueihua II, comuna de Hualaihue, Chile. El ensayo se realizó en la piscicultura experimental ubicada en la localidad de Lenca, comuna de Puerto Montt, Región de los Lagos perteneciente al Consorcio de Investigación Aquainnovo S.A. Se utilizaron peces de la especie salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y fueron considerados para este estudio solo peces sanos y negativos a patógenos (*Piscirickettsia salmonis*, *Renibacterium salmoninarum*, Virus de Necrosis Pancreática Infecciosa, Virus de la Anemia Infecciosa del salmón) y fueron controlados mediante exámenes de laboratorio como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), ELISA (Ensayo por Inmuno absorción Ligado a Enzimas) y IFAT (Técnica de inmunofluorescencia indirecta). Estos antecedentes fueron reportados y certificados por el médico veterinario a cargo de la sanidad del recinto.

2.- Diseño Experimental:

2.1.- Etapa desafío con *Piscirickettsia salmonis*

2.1.1- Etapa de aclimatación

Los peces provenientes desde el Centro Chaqueihua II, comuna de Hualaihue, Chile fueron sometidos a un período de cuarentena por 3 semanas en la piscicultura experimental de Lenca.

Posterior al período de cuarentena, los peces fueron distribuidos en un estanque de cultivo de 7 m³ a una densidad de 29 kg/m³ (peces de 258 g. aprox.). Este período de aclimatación tuvo una duración de 21 días, donde los peces estuvieron a una temperatura de 13°C, porcentaje de saturación de oxígeno de 113,5%, salinidad 30%. Todos los peces fueron alimentados con el alimento Golden Rc proporcionada por la empresa Biomar Chile ®, tres veces al día, por medio de alimentadores automáticos.

Al finalizar esta etapa se extrajeron 45 peces para la extracción de sangre. Estas muestras se utilizaron para caracterizar el perfil bioquímico del salmón de Atlántico sanos. Estas muestras posteriormente se contrastaron con las muestras de sangre obtenidas de los peces desafiados con *Piscirickettsia salmonis* para determinar diferencias entre ambos grupos de peces.

2.1.2.- Etapa desafío con *Piscirickettsia salmonis* por cohabitación

Una vez finalizado el período de aclimatación, se procedió a extraer al azar 324 peces desde el estanque donde cursaron esta etapa. De estos 216 peces fueron distribuidos en 4 estanques de cultivo de 0,5 m³, con una biomasa de 30,2 kg/m³ (54 peces/Tk), con un peso promedio estimado de 280 gr. aproximadamente, a una temperatura de 13°C, porcentaje de saturación de oxígeno de 113,5% y salinidad del 30,2%.

Como control sano de los peces desafiados se conformó en otra sala de la estación experimental, 2 estanques de 0,5 m³ con una biomasa de 30,2 kg/m³ (54 peces/Tk), con un peso promedio de 280 gr., bajo las mismas condiciones ambientales descritas para los peces desafiados.

2.1.3.- Inoculación con *Piscirickettsia salmonis* en peces troyanos

Al día siguiente después de conformar y distribuir los peces para el desafío, los peces fueron sometidos a un ayuno de 24 horas para posteriormente ser inoculados con 0,22 ml de la suspensión del cultivo del patógeno *Piscirickettsia salmonis* (cepa LF-89) con una dilución de 1×10^6 , inyectando vía intraperitoneal al 30% de los peces contemplados en este bioensayo (16 peces/tk). Los peces inoculados fueron identificados mediante el corte de su aleta adiposa. El inóculo fue adquirido de la empresa ADL diagnostics Ltda.

Previo a la inyección intraperitoneal del inóculo los peces fueron anestesiados con una dosis de inducción rápida de 120 mg/L de metasulfonato de tricaina disuelto (Dolical 80%®, Centrovét). Este grupo de peces tuvo sus respectivos controles negativos inoculados vía intraperitoneal con una solución estéril de "buffer" fosfato salino (PBS) a pH 7.0. El desafío tuvo una duración de 30 días.

2.1.4.-Confirmación infección por *Piscirickettsia salmonis*

Para confirmar la infección de los peces desafiados por cohabitación a los cuales se les extrajo muestra de sangre. Se procedió también a extraer muestras de tejido de estos peces, estas muestras fueron enviadas al laboratorio de Aquainnovo S.A., para realizar el análisis de necropsia y la técnica molecular de Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR), para confirmar la causa de muerte por *Piscirickettsia salmonis*. En este estudio no se evaluaron las lesiones macroscópicas presentadas por los peces desafiados.

2.1.5.- Muestreos en el desafío

Para evaluar los parámetros bioquímicos sanguíneos durante el desafío y conocer el poder predictor de esta herramienta diagnóstica se extrajeron y analizaron muestras sanguíneas de los peces desafiados por cohabitación a los 3, 6, 9, 15 y 30 días después de la inoculación de los peces troyanos. Cada pez muestreado que se extrajo sangre también se extrajo tejido renal para confirmada mediante PCR la infección por *Piscirickettsia salmonis*. Por cada tiempo de muestreo se extrajeron un total de 15 muestras.

2.2.- Diseño Experimental Etapa desafío con el virus de la Anemia infecciosa del salmón

2.2.1.- Etapa de aclimatación

Esta etapa se realizó bajo las mismas condiciones descritas y detalladas en el punto 2.1.1 para la etapa de aclimatación en el desafío con *Piscirickettsia salmonis*. Al finalizar esta etapa se extrajeron un total de 40 peces para la extracción de sangre. Las muestras sanguíneas de estos peces fueron utilizadas para caracterizar el perfil bioquímico del salmón del Atlántico sanos. Estas muestras posteriormente se contrastaron con las muestras de sangre obtenidas de los peces desafiados con el virus de la anemia infecciosa del salmón para determinar diferencias entre ambos grupos analizado.

2.2.2.- Etapa desafío con virus de anemia infecciosa del salmón (ISAv) por cohabitación

Una vez finalizado el período de aclimatación, se procedió a extraer al azar 240 peces del estanque de cultivo, los cuales fueron distribuidos en 4 estanques de 0,5 m³, con una biomasa de 17,6 kg/m³ (40 peces/Tk), con un peso promedio estimado de 220 gr., aproximadamente a una temperatura de 13°C, porcentaje de saturación de oxígeno de 113,5% y salinidad del 30,2%.

Como control sano para el desafío con el virus de la anemia infecciosa del salmón fueron conformados en otra sala de la estación experimental 2 estanques de 0,5 m³ con una biomasa de 17,6 kg/m³ (40 peces/Tk), con un peso promedio de 220 gr., bajo las mismas condiciones ambientales.

2.2.3.- Inoculación con Anemia Infecciosa del Salmón de los troyanos

Los peces fueron sometidos al desafío con el virus de la anemia infecciosa del salmón por cohabitación (70% cohabitación y 30% peces inoculados). Se inocularon un total de 12 peces/Tk con 0,1 ml del inóculo de ISA (cepa HPR 7b) con una dilución de 10³, el cual fue

adquirido de la empresa Novartis. Los peces inoculados se identificaron mediante el corte de la aleta adiposa.

Previo a la inyección del inóculo los peces tuvieron un ayuno de 24 horas y fueron anestesiados con una dosis de inducción de 120 mg/L de metasulfonato de tricaina disuelto (Dolical 80%®, Centrovét), antes de aplicar la inyección intraperitoneal. Este grupo de peces tuvo sus respectivos controles negativos inoculados vía intraperitoneal con una solución estéril de "buffer" fosfato salino (PBS) a pH 7.0

2.2.4.-Confirmación mortalidad por el virus de la Anemia infecciosa del salmón

La confirmación de la infección de los peces desafiados con el virus de la anemia infecciosa por cohabitación a los cuales se les extrajo muestra de sangre se efectuó mediante análisis de necropsia y la técnica molecular de Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), estos exámenes fueron realizados por el laboratorio de Aquainnovo S.A. En este estudio no se evaluaron las lesiones macroscópicas presentadas por los peces desafiados.

2.2.5.- Muestreos en el desafío

Para evaluar las variaciones que experimentan los parámetros bioquímicos sanguíneos durante el desafío con el virus de la anemia infecciosa del salmón y conocer el poder predictor de esta herramienta diagnóstica se extrajeron y analizaron muestras sanguíneas de los peces desafiados por cohabitación a los 3, 7, 15 y 36 días después de la inoculación de los troyanos. Por cada tiempo de muestreo se extrajeron un total de 5 peces. Adicionalmente a cada salmón del Atlántico que se extrajo sangre en los diferentes tiempos del desafío se le efectuó RT-PCR para confirmar su infección con el virus de la anemia infecciosa del salmón

3.-Toma de Muestras de Sangre

La metodología que se implementó para extraer las muestras de sangre fue la misma en todas las instancias de extracción de sangre que contemplo este estudio. Los peces fueron elegidos al azar de los estanques de cultivo, extraídos mediante una red y cada uno fue anestesiado con una dosis de inducción de 120 mg/L de metasulfonato de tricaina disuelto (Dolical 80%®, Centrovét). Una vez que el pez evidenció disminución de su frecuencia opercular (aproximadamente dos minutos) fue trasladado hasta la zona de trabajo destinada a la toma

y preparación de las muestras. A cada ejemplar se le extrajeron 2 ml., de sangre mediante punción de la vena caudal, con jeringas de 5 ml., y agujas de 21 G, en la zona ubicada por detrás de la aleta anal.

El volumen de sangre obtenido fue depositado en tubos de heparina litio (BD Vacutainer®), la cual fue homogenizada suavemente con el anticoagulante y centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos para proceder a la separación del plasma. El plasma fue almacenado en tubos eppendorf de 3 ml, los cuales fueron rotulados y almacenados a -20°C. El transporte se realizó en un contenedor refrigerado (cooler) que en su interior contenía nieve carbónica hasta dependencias del laboratorio de nutrición de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile para el análisis de bioquímica sanguínea.

4.- Análisis y Procesamientos de las muestras

Este bioensayo contemplo el análisis de los siguientes parámetros bioquímicos Glucosa, Colesterol, Triglicéridos, Lactato deshidrogenada (LDH), Fosfatasa Alcalina (ALP), Proteínas totales, Albúmina, Fósforo, Calcio, Magnesio, Urea, Creatinina, Creatina quinasa (CK), Bilirrubina, Aspartato aminotransferasa (AST).

El análisis de estos parámetros se llevó a cabo en un analizador clínico automático modelo Metrolab 2300 (Wiener lab. ®). Las enzimas, sustratos, metabolitos y minerales fueron analizados mediante métodos estandarizados y adaptados al equipo metrolab 2300, utilizando kits de reactivos del laboratorio Wiener lab.

Por cada muestra se debió utilizar 500 ul., de plasma para evaluar la batería de parámetros contemplados en este estudio.

TABLA N°1: Describe los parámetros bioquímicos analizados junto a la metodología, reactivo que se utilizó y su expresión en unidades.

PARÁMETRO	UNIDAD	MÉTODO	REACTIVO
Proteínas Totales	g/L	Método colorimétrico	WIENER (Proteínas Totales AA)
Albumina	g/L	Método colorimétrico	WIENER (Albumina AA)
Glucosa	mg/dl	Test enzimático	WIENER (Glicemia enzimática AA líquida)
Magnesio	mg/dl	Método colorimétrico directo	WIENER (Mg-color AA)
Fósforo	mg/dl	Test UV cinético	WIENER (Fosfatemia UV AA)
Calcio	mg/dL	Método colorimétrico directo	WIENER (Ca-color arsenazo III AA)
Colesterol	mg/dl	Método enzimático	WIENER (Colestat enzimático AA líquida)
Triglicéridos	mg/dL	Método enzimático	WIENER (TG Color GPO/PAP AA líquida)
Creatinina	mg/dl	Método cinético	WIENER (Creatinina cinética AA líquida)
Bilirrubina Total	mg/dl	Método DPD	WIENER (Bilirrubina Total AA líquida)
Urea	mg/dl	Test UV cinético	WIENER (Urea UV cinética AA líquida)
CK-NAC EC	U/L a 37°C	IFCC	WIENER (CK-NAC UV AA)
ALP EC	U/L a 37°C	Método cinético (DGKC Y SSCC)	WIENER (ALP 405 AA líquida)
LDH EC	U/L a 37°C	Método UV (SFBC)	WIENER (LDH-P UV AA líquida)
AST EC	U/L a 37°C	IFCC	WIENER (GOT (AST) UV AA líquida)

5.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico R. A los datos se les efectuó en una primera instancia un análisis exploratorio de datos, determinado las medidas de tendencia central (promedio, mediana) y medidas de dispersión (rango, desviación estándar, coeficiente de variación), para cada uno de los parámetros de bioquímica sanguínea contemplados en este estudio. Adicionalmente se efectuó la prueba de normalidad (test *Shapiro-Wilk*) para evaluar la distribución de los datos. Una vez evaluada esta distribución se observó que los datos no presentaron una distribución normal, por lo tanto, los datos fueron analizados mediante análisis no paramétrico utilizando la prueba de *Kruskal-Wallis* para establecer diferencias estadísticas significativas entre los peces sanos y desafiados a través de la comparación de las medianas para los distintos parámetros analizados en este estudio. Además, se utilizó esta misma prueba estadística de *Kruskal-Wallis* para establecer comparaciones entre los tiempos de muestreo para el grupo de peces desafiados en cada una de las patologías.

RESULTADOS

Los valores obtenidos para los parámetros del perfil bioquímico del salmón del Atlántico *Salmo salar* sanos y desafiados con el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAv) y la bacteria de la *Piscirickettsia salmonis* (SRS), determinados en este estudio se presentan a continuación:

Ensayo con *Piscirickettsia salmonis*.

Descripción del perfil bioquímico del salmón del Atlántico sanos.

TABLA N° 2: Parámetros bioquímicos sanguíneos de 45 ejemplares de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), sanos expresados en la Media, Desviación estándar (D.S), Coeficiente variación (CV), Mediana y Rango para cada parámetro bioquímico.

Parámetro	Unidad	N	Media	Rango	D.S	C.V	Mediana
Albúmina	g/dl	45	1,61	0,9 - 2,1	0,299	0,18	1,7
P. Totales	g/dl	45	3,86	2,2 - 7,9	0,87	0,22	3,9
Glucosa	mg/dl	45	88,59	17,7 - 125,3	19,57	0,22	90,8
Colesterol	mg/dl	45	272,2	141,4 - 386,7	48,53	0,17	273
Triglicéridos	mg/dl	45	184,8	71,9 - 503,3	84,86	0,45	183,3
Bilirrubina	mg/dl	45	0,336	0 - 2,4	0,616	1,83	0,05
Calcio	mg/dl	45	16,09	1,5 - 26,9	5,49	0,34	16,1
Fósforo	mg/dl	45	14,3	7,9 - 20	2,759	0,19	14,5
Magnesio	mg/dl	45	2,68	1,3 - 4,4	0,73	0,27	2,4
Urea	mg/dl	45	8,258	3,6 - 13,7	6,93	0,83	7,1
Creatinina	mg/dl	45	0,68	0,2 - 2,1	0,571	0,83	0,4
APL	U/L	45	788,8	16 - 1523	278,4	0,35	774
AST	U/L	45	126,4	4 - 317	104,1	0,82	132
LDH	U/L	45	742,9	119,3 - 1694	400,15	0,53	673
CK	U/L	45	452,59	0,008 - 3673	651,17	1,43	200,5

En la tabla N°2 se muestran los resultados obtenidos de 45 muestras de ejemplares de la especie *Salmo salar* sanos, para cada parámetro de bioquímica sanguínea analizado en este estudio. Se puede observar que los parámetros bioquímicos sanguíneos como bilirrubina, creatina quinasa, lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y creatinina presentaron una mayor variabilidad en su rango de distribución de valores. Mientras, en los parámetros de proteínas totales, glucosa, fósforo, colesterol exhiben rangos de valores con menor

variabilidad en la distribución de sus datos. Adicionalmente se observó que en los parámetros con menor variabilidad las medidas de posición media y mediana presentan valores prácticamente iguales, pero aquellos parámetros con mayor coeficiente de variación como en el caso bilirrubina, creatina quinasa, creatinina ambas medidas de posición son diferentes.

Los rangos obtenidos en este estudio para los parámetros bioquímicos sanguíneos del salmón del Atlántico sanos no difieren de los rangos reportados por otros autores (Sadnes *et al.*, 1993; Fernández-Niño, 2004; Herrera, 2004; Wittner, 2009). Igualmente se evidenció que los parámetros con un alto y bajo coeficiente de variación eran los mismos descritos en otros estudios para salmón del Atlántico y otros salmónidos como trucha arcoíris, salmón coho (Stoskopf, 1993; Herrera, 2004).

Comparación de las variaciones de los parámetros del perfil bioquímicos entre peces sanos y desafiados con *Piscirickettsia salmonis*.

Tabla N°3. Comparación de los niveles plasmáticos de los parámetros bioquímicos sanguíneos del salmón del Atlántico sanos con cada tiempo de desafío con *Piscirickettsia salmonis*, expresados en la mediana obtenido de cada grupo.

PARAMETRO	UNIDAD	SANOS	SRS					
			T0	T1	T2	T3	T4	
Albúmina	g/dl	1,7 a	1,8ab	1,6 a	2,1 b	2,1 b	2,1 b	****
P. Totales	g/dl	3,9 a	3,8 ab	3,3 d	4,4 bc	4,7 c	4,5 bc	****
Glucosa	mg/dl	98,8 a	79,6 bc	55,6 d	74,6 c	86,3 ab	90,6 a	****
Colesterol	mg/dl	273 ^a	218,1 ab	156,4 d	193,1 cd	209,6 bc	270,6 a	****
Triglicéridos	mg/dl	183,3 a	120,8 ab	53,1 d	106,4 bc	84,3 cd	133,5 b	****
Bilirrubina	mg/dl	0,05 a	0,01 a	0,4 b	0,6 b	0,03 a	0,03 a	****
Calcio	mg/dl	16,1 a	9,2b	10 b	7,2 b	13 a	13,89 a	****
Fósforo	mg/dl	14,5 a	9,5 bc	8,7 c	8,3 c	11,1 b	11,7 b	****
Magnesio	mg/dl	2,4 a	2,2 b	2,3 ab	2,7 c	3,3 cd	4,1 d	****
Urea	mg/dl	7,1 a	7,0 a	6,6 a	7,6 a	7,3 a	7a	
Creatinina	mg/dl	0,4 a	0,2 b	0,2 b	0,3 b	0,2 b	0,2 b	****
CK	U/L	205,7 a	564 c	86 b	192,4 ab	398,3 ac	1050 c	****
AST	U/L	132 a	243 c	122 a	151,8 ab	245,3 c	239,7 bc	****
LDH	U/L	673 a	607 a	591 a	1218 b	1372 b	2171 b	****
ALP	U/L	774 a	650 ab	300 d	372,4 d	450,8 cd	610,2 bc	****

Medianas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En la Tabla N°3 se presentan los resultados para cada parámetro de bioquímica sanguínea del salmón del Atlántico expresados en la mediana, tanto para el grupo de peces sanos y desafiados, este último grupo se subdivide en cinco subgrupos, los que corresponden al tiempo en el cual las muestras de plasma fueron extraídas durante el desafío, posterior a la inoculación con *Piscirickettsia salmoni*.

Se estableció que en la mayoría de los parámetros contempladas en este estudio para el perfil bioquímico del salmón del Atlántico presentan diferencias estadísticas significativas entre el grupo de peces sanos y desafiados a excepción de la variable urea.

En el caso de la albúmina y proteínas totales los niveles plasmáticos presentaron variaciones en su concentración principalmente en los estadios más avanzados del desafío, registrándose hiperproteinemia e hiperalbuminuria en los peces desafiados. Para los niveles circulantes de proteínas totales las diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos están en los tiempos T2, T3, T4, y T5 (muestras extraídas los días 6, 9, 15 y 30 respectivamente). Mientras para la albúmina fueron en los tiempos T3, T4 y T5.

En el caso de la glucosa se observó una marcada baja de los niveles circulantes de este sustrato en el grupo de peces desafiados en las primeras etapas del desafío. Las diferencias estadísticas significativas entre peces sanos y desafiados se registraron en los tiempos T1, T2 y T3 del desafío.

Para los parámetros de colesterol y triglicéridos se evidencio una disminución de los niveles plasmáticos de estos parámetros en el grupo de peces desafiados. Las diferencias significativas entre ambos grupos de peces, para el parámetro colesterol están dadas por los tiempos T2, T3 y T4. En tanto, para los triglicéridos se reportan en los tiempos T2, T3, T4 y T5 para el grupo de peces desafiados, donde se registraron los valores significativamente menores en comparación con el control.

La concentración de bilirrubina medida en el plasma de los peces en general fue más baja en comparación con los otros parámetros analizados en este estudio. Para este parámetro se observó variaciones significativas de los niveles circulantes de bilirrubina en el grupo de peces desafiados en relación con los peces sanos en las etapas intermedias de este desafío (T2 – T3), donde fueron medidos los niveles circulantes más altos cuando se compara con los peces sanos.

Con relación a la concentración de urea plasmática, no se observaron diferencias estadísticas entre peces sanos y desafiados durante el transcurso del estudio. Por otro lado, la concentración plasmática de creatinina en el grupo de peces desafiados fue significativamente más baja a la determinada en el grupo de peces sanos.

Para el calcio circulante se observó una baja significativa de los niveles circulantes en los tiempos T1, T2 y T3 del desafío, cuando fueron comparados con los peces sanos. De manera similar en los peces desafiados se observó niveles significativamente más bajo de fósforo en comparación a los peces sanos, en este caso, en todos los tiempos de muestreo del desafío.

Para los niveles circulantes de magnesio se observa una leve, pero significativa disminución de este parámetro al inicio del ensayo (T1), para luego en las etapas intermedias y finales del estudio (T3, T4 y T5), registrarse niveles plasmáticos significativamente más elevadas con relación a los medidos en peces sanos.

Se observó una alta variabilidad en las concentraciones de creatina quinasa (CK), circulante en los distintos tiempos del bioensayo. Esta enzima presentó niveles significativamente más bajos en los peces desafiados al tiempo T2. Adicionalmente, al inicio (T1) y final del desafío (T5), las concentraciones plasmáticas medidas en los peces desafiados fueron significativamente más elevadas en relación con el control sano.

La concentración de aspartato amino transferasa (AST), presento un aumento significativo al inicio del estudio (T1) en el plasma de los peces desafiados para luego disminuir a niveles circulantes similares al observado en los peces sanos (T2 y T3). Al final del período experimental (T4 y T5) se observó niveles significativamente más altos de AST en el plasma de los peces desafiados con SRS en comparación con el control sano. Por otro lado, para la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH), se observó niveles significativamente más elevados en los peces desafiados en los tiempos (T3, T4 y T5).

Para la enzima Fosfatasa alcalina las concentraciones plasmáticas siempre fueron más bajas en los peces desafiados, pero los niveles significativos más bajos fueron medidos en los tiempos T2, T3, T4 y T5 del desafío.

Porcentaje de mortalidad de cohabitantes y troyanos para el desafío de *Piscirickettsia salmonis*

El desafío con *Piscirickettsia salmonis*, tuvo una duración de 30 días. Una vez iniciado el desafío, a los 6 días se registraron las primeras mortalidades en los peces inoculados. Mientras para el grupo de peces desafiados por cohabitación las primeras mortalidades se registraron el día 10 tras el inicio del desafío.

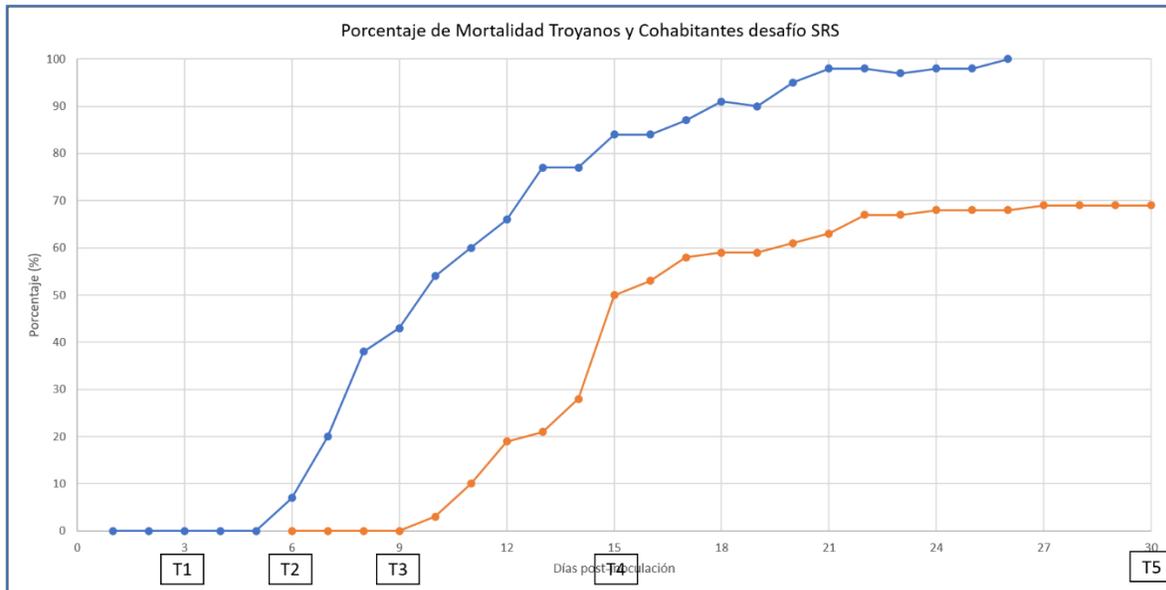


Gráfico N°1. Curva del porcentaje de mortalidad de troyanos y cohabitantes en el desafío con *Piscirickettsia salmonis*: la línea de color azul expresa la curva de mortalidad para los troyanos, mientras la línea naranja representa la curva de mortalidad para los cohabitantes. Además, en el eje horizontal se señalan los días post inoculación de los troyanos e indica los días de los diferentes muestreos durante el desafío.

Se observa que al día 14 post-inoculación los peces desafiados por cohabitantes alcanzaron una mortalidad acumulada del 50%. En el caso de los troyanos la mortalidad acumulada al día 14 fue del 88%.

Al finalizar el ensayo los cohabitantes obtuvieron un porcentaje de mortalidad acumulada de un 65%. Sin embargo, los troyanos no lograron sobrevivir todo el desafío registrándose el 100% de mortalidad al día 26 post-inoculación.

Descripción de la variación en el tiempo del perfil bioquímico del salmón del Atlántico desafiados

Tabla N°4. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con *Piscirickettsia salmonis*, por tiempo de muestreo para los parámetros de albúmina, proteínas totales, colesterol y triglicéridos expresados en el rango (máximo – mínimo), coeficiente de variación (C.V.).

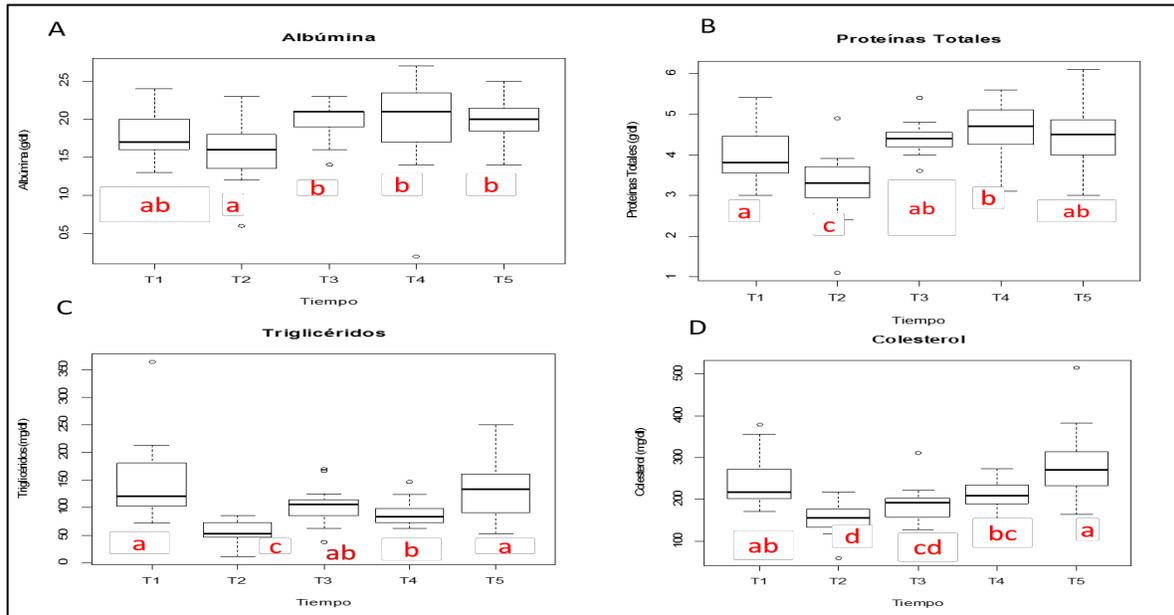
Parámetro	Unidad	T1		T2		T3		T4		T5	
		Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.
Albúmina	g/dl	1,30 - 2,40	17,5	0,6 - 2,30	25,3	1,40 - 2,30	12,3	0,2 - 2,7	31,5	1,4 - 2,5	14,8
P. Totales	g/dl	3,0 - 5,40	18,1	1,10 - 4,9	26,2	2,8 - 5,4	13,3	3,1 - 5,6	15,1	3,0 - 6,1	18,3
Colesterol	mg/dl	171,3 - 379,2	25,3	60,2 - 217,0	25,4	126,9 - 310,9	24,4	120 - 273,7	20	163,8 - 514,6	31,2
Triglicéridos	mg/dl	72,3 - 365,5	50,5	11,6 - 86,0	35,7	37,6 - 169,9	33,7	62,4 - 146,7	26,6	52,7 - 249,6	39,6

En la Tabla N°4, se presentan los rangos máximo y mínimo, junto al coeficiente de variación de los parámetros bioquímicos de Albúmina, Proteínas totales, Colesterol y Triglicéridos, para cada tiempo de muestreo en los peces desafiados donde el tiempo T1 corresponde al día al día 3 post-infección con *Piscirickettsia salmonis*, T2, T3, T4 y T5 corresponden al día 6,9,15 y 30 post inoculación.

Albúmina: este parámetro presentó un rango que vario entre 0,2 a 2,7 g/dl., en los peces desafiados. La albúmina en el plasma de estos peces presentó valores relativamente estables durante el transcurso del desafío. Si bien se observó una leve baja al día 6 (T2), en el resto de los tiempos de muestreo se observan valores similares a los observados al inicio del estudio. Los tiempos T2 y T4 son los tiempos que presentaron un mayor coeficiente de variación en la distribución de sus rangos (Figura N°2).

Proteínas Totales: El rango para este parámetro fluctuó entre 1,1- 6,1 g/dl en el grupo de peces desafiados. Similar a lo observado en albúmina, las proteínas totales circulantes presentan valores relativamente estables con un descenso significativo al día 6 post infección, para luego presentar valores más altos ($p < 0,05$) a los 9 y 15 días con relación al inicio del ensayo (Figura N°2).

Figura N°2: Gráfico de caja, presenta la distribución de rangos para cada parámetro bioquímico sanguíneo de (A) Albúmina, (B) Proteínas Totales, (C) Triglicéridos y (D) Colesterol, que informan las variaciones en la concentración plasmática de estos parámetros sanguíneos durante el curso de la enfermedad. (Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p > 0.05$).



Colesterol: El rango para el colesterol fue entre 69,15 a 514,6 mg/dl. Se detectaron niveles significativamente más bajos para este parámetro a los tiempos T2 y T3 en comparación con el resto de los tiempos del desafío. Adicionalmente se observó que en los tiempos T1 y T5 son los que presentan mayor coeficiente de variación en los niveles plasmáticos para el colesterol y es donde se observó los valores más elevados para el colesterol (Figura N°2).

Triglicéridos: Los niveles plasmáticos encontrados para este parámetro fueron entre 11,6 y 363,5 mg/dl. Se observó dos descensos significativos para este parámetro los días 6 (T2) y 9 (T4). En el resto de los tiempos de muestreo no se registró diferencia estadística significativa respecto a los otros tiempos analizados (Figura N°2).

Tabla N°5. Parámetros bioquímicos de Calcio, Fósforo, Magnesio y Glucosa de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con *Piscirickettsia salmonis*, por tiempo de muestreo expresados en el rango (máximo – mínimo), coeficiente de variación (C.V.).

Parámetro	Unidad	T1		T2		T3		T4		T5	
		Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.
Calcio	mg/dl	6,70 - 15,0	23,8	2,7 - 14,3	39,4	2,60 - 10,8	27,8	9,6 - 18,8	16,2	10,5 - 17,5	15,6
Fósforo	mg/dl	5,60 -13,10	17,8	2,1 - 14,3	40,1	6,2 - 13,5	24,6	8,8 - 16,3	18,3	8,5 -16,2	16,89
Magnesio	mg/dl	1,1 - 3,0	19,8	0,7 - 3,8	36,2	1,6 - 4,7	24,3	2,4 - 6,0	25,7	2,2 - 6,8	28,76
Glucosa	mg/dl	66,6 - 106,6	13,3	22,3 -85,4	25,7	6,9 - 95,4	29,4	49,8 - 340,8	64,4	82,3 - 146,7	17,8

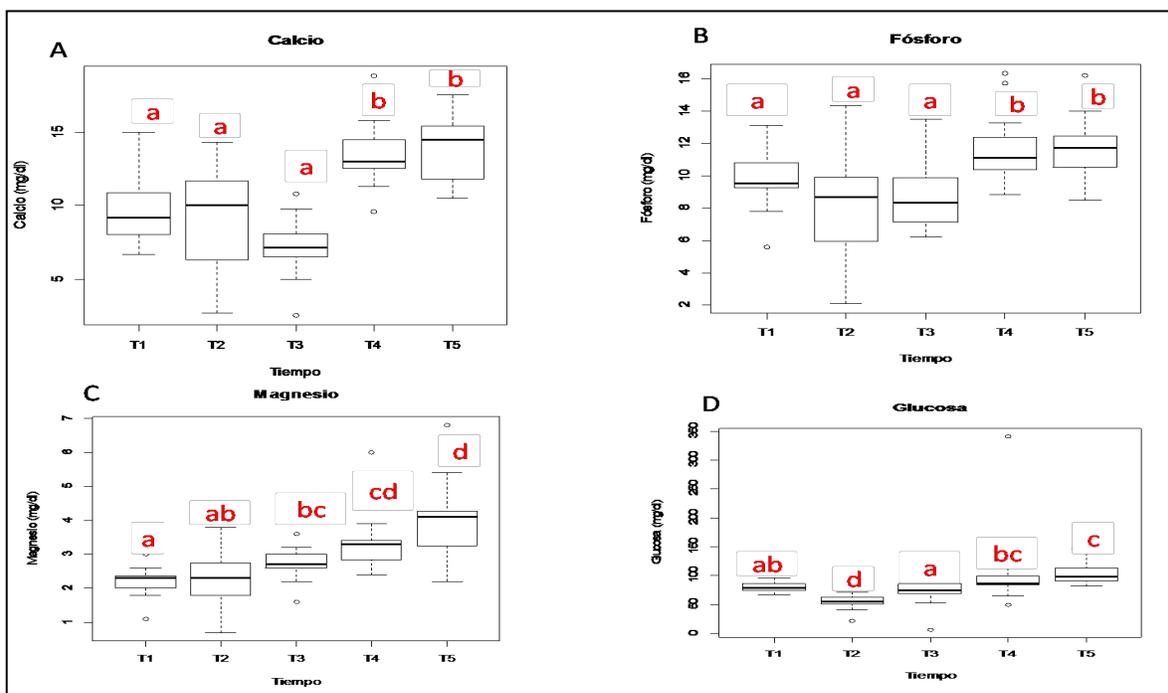
En la Tabla 5, se presentan los rangos máximo y mínimo, junto al coeficiente de variación de los parámetros bioquímicos de Calcio, Fósforo, Magnesio y Triglicéridos, para cada tiempo de muestreo en los peces desafiados.

Calcio: El rango para este parámetro fluctuó entre 2,6 - 18,8 mg/dl. En las etapas iniciales e intermedias (T1, T2 y T3) del desafío las concentraciones circulantes fueron similares. Sin embargo, en los estadios finales del desafío los niveles plasmáticos son significativamente más elevados en relación con el T1 del desafío (Figura N°3).

Fósforo: similar ha lo observado en calcio, el fósforo circulante presenta valores relativamente estables al inicio del desafío, para luego presentar valores significativamente elevados a los 9 y 15 días con relación al inicio del ensayo. El rango para este parámetro fluctuó entre 2,1 - 16,3 mg/dl (Figura N°3).

Magnesio: El rango medido para el magnesio fluctuó entre 0,7 - 6,8 mg/dl. Este parámetro en el plasma de los peces desafiados presentó valores relativamente estables al inicio del desafío a los tiempos T1, T2 y T3, pero en las etapas finales del desafío se observó un marcado aumento de las concentraciones plasmáticas de este mineral con respecto al T1 (Figura N°3).

Figura 3: Gráfica de caja, presenta la distribución de rangos para cada parámetro bioquímicos sanguíneos de (A) Calcio, (B) Fósforo, (C) Magnesio y (D) Glucosa, que informan las variaciones en los niveles circulantes de estos parámetros sanguíneos durante el curso de la enfermedad (Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p > 0.05$).



Glucosa: Los niveles plasmáticos reportados para este parámetro fueron entre 6,9 - 340,8 mg/dl. Los niveles circulantes para este sustrato en los peces desafiados no registraron variaciones durante el transcurso del desafío. Sin embargo, al día 6 (T2), se observó los valores significativamente más bajos para este parámetro (Figura N°3).

Tabla N°6. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con *Piscirickettsia salmonis*, por tiempo de muestreo para los parámetros de bilirrubina, creatinina y urea expresados en el rango (máximo – mínimo), coeficiente de variación (C.V.).

Parámetro	Unidad	T1		T2		T3		T4		T5	
		Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.
Bilirrubina	mg/dl	0,0 - 0,70	306,6	0,0 - 2,8	121,9	0,0 - 2,9	109,3	0,0 - 0,03	240,7	0,0 - 0,4	339,5
Creatinina	mg/dl	0,2 - 0,3	20,9	0,2 - 0,4	25,2	0,2 - 0,5	29,2	0,09 - 0,40	31,7	0,2 - 0,31	18,8
Urea	mg/dl	5,40 - 13,9	32,3	3,9 - 13,76	33,9	0,4 - 15,1	52,2	0,2 - 2,10	60,9	3,0 - 12,1	33,6

En la Tabla 6, se presentan los rangos máximo y mínimo, junto al coeficiente de variación de los parámetros bioquímicos de bilirrubina, creatinina y urea, para cada tiempo de muestreo en los peces desafiados.

Bilirrubina: Los niveles plasmáticos medidos para este parámetro fueron entre 0 a 2,9 mg/dl. Se observó dos alzas significativas para este parámetro los días 6 (T2) y 9 (T3) con respecto al día 3 (T1) (Figura N°4).

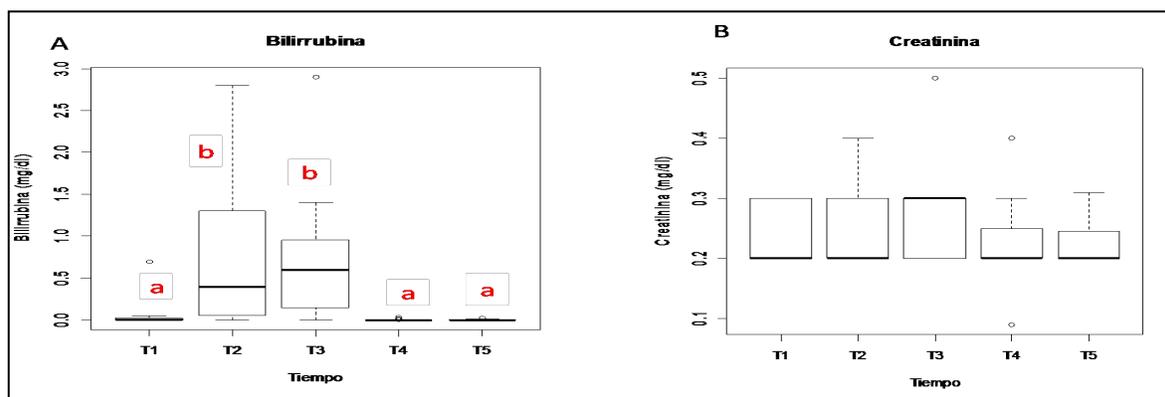


Figura N°4: Gráfica de caja, presenta la distribución de rangos para cada parámetro bioquímicos sanguíneos de (A) Bilirrubina, (B) Creatinina, que informan las variaciones en la concentración plasmáticas de estos parámetros sanguíneos durante el curso de la enfermedad (Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p > 0,05$).

Creatinina y Urea: para estos parámetros no se registraron variaciones en los niveles circulantes durante el desarrollo del ensayo. Para la creatinina se observó un rango entre 0,09 a 0,5 mg/dl. Mientras para la urea 0,2 – 15,1 mg/dl., (Figura N°4).

Tabla N°7. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con *Piscirickettsia salmonis*, por tiempo del desafío para las enzimas ALP, AST, LDH y CK expresados en el rango (máximo – mínimo), coeficiente de variación (C.V.).

Parámetro	Unidad	T1		T2		T3		T4		T5	
		Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.
ALP	U/L	448 - 1215	30,8	103,5 - 183,0	42,7	45,1 - 649,3	36,9	208,5 - 599,6	25,1	295,8 - 1233	46,2
AST	U/L	147,3 - 348,0	29,2	33,6 - 183,0	35,5	411,4 - 358,1	52,8	42,7 - 658,2	58,5	59,9 - 382,0	41,2
LDH	U/L	354 - 921	24,9	246,9 - 1523	47,2	463,8 - 2560	47,3	657,9 - 15309	131,1	598 - 9375	84,7
CK	U/L	148 - 1773	63,6	16,0 - 344,0	89,1	9,9 - 2262	145,8	51,9 - 15093	181,1	19,1 - 4419	89,6

En la Tabla 7, se presentan los rangos máximo y mínimo, junto al coeficiente de variación de las enzimas fosfatasa alcalina. Aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa y creatina quinasa.

Fosfatasa Alcalina (ALP): Los niveles plasmáticos obtenidos para los peces desafiados para este parámetro fluctuaron entre 45,06 - 1233 U/L. En las etapas intermedias del desafío los días 6(T2), 9(T3) y 15(T4) se observó un descenso significativo con respecto al día 3(T1) (Figura N°5).

Aspartato aminotransferasa (AST): Los niveles plasmáticos de AST presentaron un rango entre 33,6 - 658,2 U/L. Al tiempo T2 y T3 del desafío fueron medidos los niveles plasmáticos significativamente más bajos para este parámetro c respecto al T1 (Figura N°5)

Lactato deshidrogenasa (LDH): Los niveles circulantes de LDH fluctuó entre 246,9 - 15309 U/L. Los niveles de esta enzima en las etapas iniciales del desafío no presentaron grandes variaciones. Sin embargo, al tiempo T3, T4 y T5 se registró un alza significativa en los niveles circulantes para este parámetro en comparación con las etapas iniciales del ensayo (Figura N°5).

Creatina quinasa (CK): El rango reportado para este parámetro fluctuó entre 9,9 a 15093 U/L. Se registró un descenso significativo de esta enzima los días 6 (T2) y 9 (T3) con respecto al día 3 (T1) (Figura N°5).

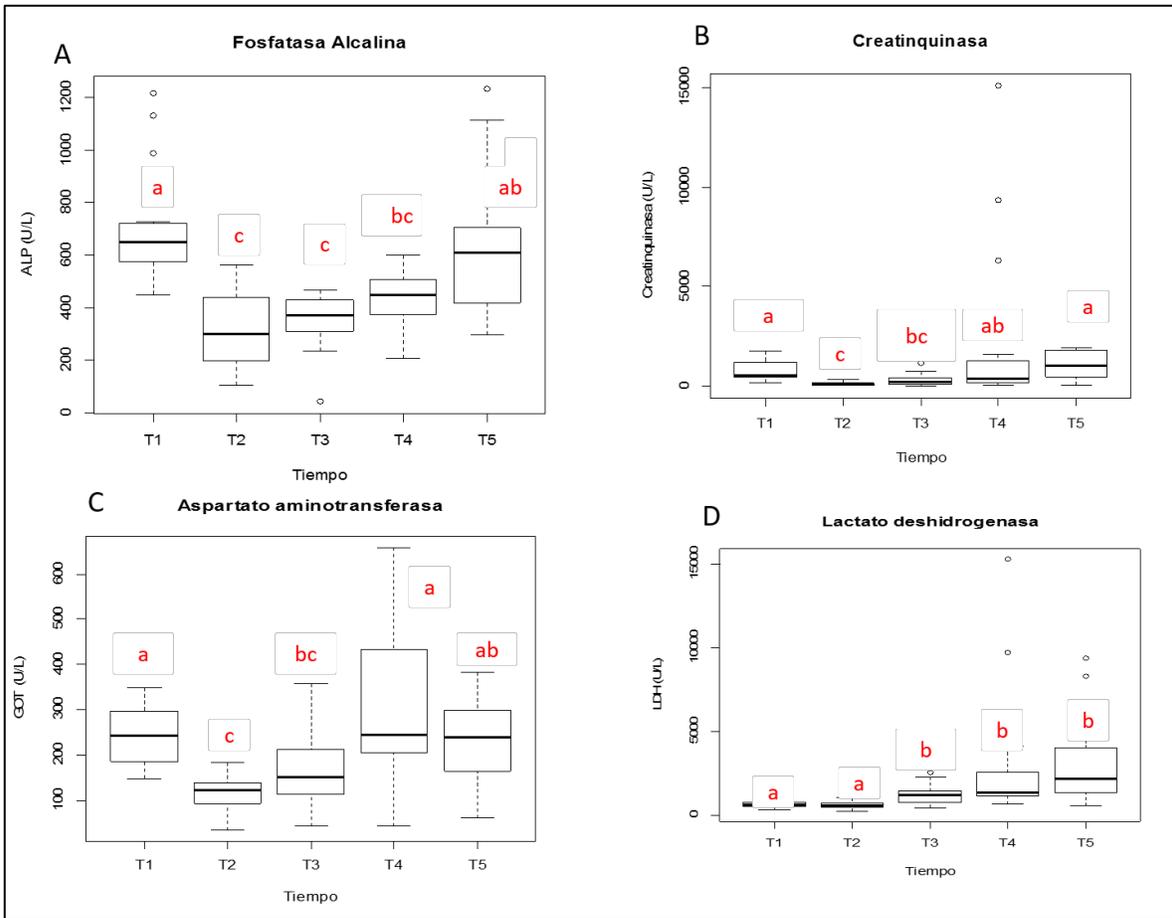


Figura 5: Gráfica de caja, informa la distribución de rangos para parámetro bioquímicos sanguíneos de (A) Fosfatasa Alcalina, (B) Creatina quinasa, (C) Aspartato aminotransferasa y (D) Lactato deshidrogenasa, que informan las variaciones en la concentración séricas de estos parámetros sanguíneos durante el curso de la enfermedad (Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p > 0.05$).

Ensayo con el virus de la Anemia Infecciosa del Salmón

Descripción del perfil bioquímico del salmón del atlántico (*Salmo salar*) sanos.

TABLA N°8: Parámetros bioquímicos sanguíneos de 40 ejemplares de salmón del Atlántico sano expresados en la Media, desviación estándar (D.S), coeficiente variación (CV), Mediana y Rango (valores máximo y mínimo) para cada parámetro bioquímico.

Parámetro	Unidad	N	Media	Rango	D.S	C.V	Mediana
Albúmina	g/dl	40	2,49	1,12 - 3,12	0,38	15,28	2,54
P. Totales	g/dl	40	5,69	2,98 - 6,9	0,77	13,55	5,75
Glucosa	mg/dl	40	75,95	50,1 - 124,1	18,82	24,78	76,8
Colesterol	mg/dl	40	344,1	210,1 - 473,9	63,8	18,55	332,55
Triglicéridos	mg/dl	40	253,38	66,05 - 602,1	103,16	40,71	233,95
Bilirrubina	mg/dl	40	0,1	0 - 2,65	0,43	437,6	0
Calcio	mg/dl	40	9,05	1,18 - 16,4	2,67	29,49	8,72
Fósforo	mg/dl	40	11,72	8,27 - 16,32	2	17,09	11,35
Magnesio	mg/dl	40	1,34	0,7 - 2,35	0,37	27,97	1,35
Urea	mg/dl	40	15,7	7,38 - 25,64	3,85	25,39	14,7
Creatinina	mg/dl	40	0,12	0 - 0,8	0,2	163,5	0,05
ALP	U/L	40	693,1	0 - 1487	398,7	57,53	799,45
AST	U/L	40	88,53	0 - 327,1	75,96	85,8	71,03
LDH	U/L	40	1266,7	38,32 - 2944	892,6	70,46	1816,5
CK	U/L	40	1942,4	3,44 - 5631	1007,9	87,57	1776,6

En la Tabla N°8 se muestran los resultados obtenidos de 40 muestras de plasma de la especie *Salmo salar* sanos, para cada parámetro de bioquímica sanguínea analizado en este estudio. Al igual que en el ensayo de *Piscirickettsia salmonis* en el grupo de peces sanos se observó un patrón similar en la distribución de valores para cada parámetro de bioquímica sanguínea analizado para este estudio. Los parámetros como la bilirrubina, creatina quinasa, lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y creatinina, tuvieron un coeficiente de variación más alto, mientras que en los parámetros como proteínas totales, glucosa, fósforo, colesterol registraron una distribución con menor variabilidad.

Los resultados obtenidos en este estudio para los parámetros bioquímicos sanguíneos concuerdan con los reportados por otros autores para el salmón del Atlántico (Sandnes, 1988; Herrera, 2004; Wittner, 2009). También se observó que los parámetros bioquímicos sanguíneos son similares a los rangos determinados para otras especies acuícolas como la

trucha arcoíris (Herrera, 2004), tilapia (Hrubec *et al*, 2000), Lenguado (Coz-Rakovac *et al.*, 2005), Esturión (Di Marco *et al.*, 2011).

Comparación de las variaciones de los parámetros del perfil bioquímicos entre peces sanos y desafiados con el virus de la Anemia Infecciosa del salmón.

Tabla N°9. Parámetros bioquímicos sanguíneos del salmón del Atlántico sanos y el grupo de peces desafiados con el virus de la anemia infecciosa del salmón expresados en la mediana de cada parámetro en ambos grupos.

Variable	Unidad	Sanos	ISA				
			T0	T1	T2	T3	
Albúmina	g/dl	2,54 a	2,11 b	2,08 b	1,78 b	1,85 b	****
P. Totales	g/dl	5,75 a	4,68 b	4,91 b	3,66 b	3,82 b	****
Glucosa	mg/dl	75,95d	157,16ab	165,11 a	112,72c	126,67bc	****
Colesterol	mg/dl	332,55 a	273 ab	288,7 ab	224,3 b	234,5 ab	****
Triglicéridos	mg/dl	233,95 a	210 abc	225 ab	78,72 c	180,7 bc	****
Bilirrubina	mg/dl	0,01a	0,02a	0,01 ^a	0,01a	0,02a	
Calcio	mg/dl	8,72 a	11,75 b	12,16 b	11,27 b	10,55 ab	****
Fósforo	mg/dl	11,35 a	8,07 b	10,49 ab	10,08 ab	8,82 ab	****
Magnesio	mg/dl	1,34 a	1,99 b	2,38 b	2,55 b	2,47 b	****
Urea	mg/dl	14,7 a	3,19 b	3,09 b	5,28 b	2,29 b	****
Creatinina	mg/dl	0,05 ab	0,15 a	0,002 ab	0,16 ab	0,003 b	
CK	U/L	2776 a	56,17 b	94,17 b	71,51 b	54,08 b	****
GOT	U/L	71,03 a	33,37 b	51,77 ab	32,56 b	19,12 b	****
LDH	U/L	1816,5 a	520,1 b	407,7 b	508 b	876,5 b	****
ALP	U/L	799,45 a	873,8 a	872,1 a	521,9 a	420 a	

Medianas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En la Tabla N°9 se reportan los resultados determinados para cada parámetro de bioquímica sanguínea del salmón del Atlántico en el grupo de peces sanos y desafiados con el virus de la anemia infecciosa del salmón. Este último subdividido en 4 grupos, los cuales corresponden a los tiempos en que fueron extraídas las muestras de plasma post inoculación del virus de la anemia infecciosa del salmón. Los resultados se informan en base a la mediana de cada parámetro para el grupo de salmón del Atlántico sano y desafiado.

Se pudo observar que en solo 12 de las 15 variables contempladas en este estudio para el perfil bioquímico del salmón del Atlántico, presentaron diferencias estadísticas significativas entre el grupo de peces sanos y desafiados. Para las variables bilirrubina, creatinina y fosfatasa alcalina no registraron diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos.

En el caso de la albúmina y proteínas totales se observó hipoalbuminemia e hipoproteinemia en los peces desafiados. Los niveles circulantes de albúmina y proteínas totales en los peces desafiados fueron significativamente más bajos en todos los tiempos del desafío en comparación con el control sano. En las etapas más avanzada de desafío para ambos parámetros se registraron los niveles circulantes más bajos.

Los niveles plasmáticos de glucosa medidos en los peces desafiados siempre fueron significativamente más altos en relación con los peces sanos.

Para los niveles circulantes del colesterol solo al tiempo T3 del desafío fueron significativamente más bajos con relación a los medidos en peces sanos. En el caso de los triglicéridos en las etapas finales (T3 y T4) del desafío se registraron las concentraciones plasmáticas significativamente más bajas en comparación a las medidas en los peces sanos.

En las concentraciones circulantes para el calcio se registró un aumento significativo de los niveles plasmáticos en el grupo de peces desafiados en los tiempos T1, T2 y T3 del desafío en comparación con los peces sanos. De manera similar en los peces desafiados se observó niveles significativamente más altos de magnesio en comparación a las concentraciones plasmáticas medidas en los peces sanos, en este caso, en todos los tiempos de muestreo.

En tanto para el fósforo, si bien se registró un descenso de los niveles plasmáticos en el grupo de peces desafiados, solo los niveles medidos al tiempo T1 son significativamente más bajos en relación con los peces sanos. Sin embargo, en el resto de los tiempos de muestreo no se observó diferencias significativas entre ambos grupos analizados, pero los niveles circulantes mediados en los peces desafiados fueron siempre menores.

En la variable urea se pudo apreciar una marcada disminución de las concentraciones plasmáticas en el grupo de peces desafiados, siendo los valores obtenidos para estos peces

estadísticamente menores a los determinados en el grupo de peces sanos en todos los tiempos de muestreo.

En las enzimas creatina quinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH), se evidenció un drástico descenso de los niveles circulantes de estas enzimas en el grupo de peces desafiados. Estos niveles plasmáticos son estadísticamente diferentes a las encontradas en el grupo de peces sanos. En el caso de las enzimas CK y AST los niveles plasmáticos más bajos fueron observados en las etapas más avanzadas del desafío, mientras que para la LDH se registraron en los estadios intermedios del desafío.

Promedio del porcentaje de mortalidad de cohabitantes y troyanos para el desafío con el virus de la anemia infecciosa del salmón del Atlántico.

El desafío con ISA tuvo una duración de 35 días, observándose que al día 11 se registraron las primeras mortalidades en troyanos, mientras en los peces desafiados por cohabitación se registraron al día 14 post-inoculación de troyanos.

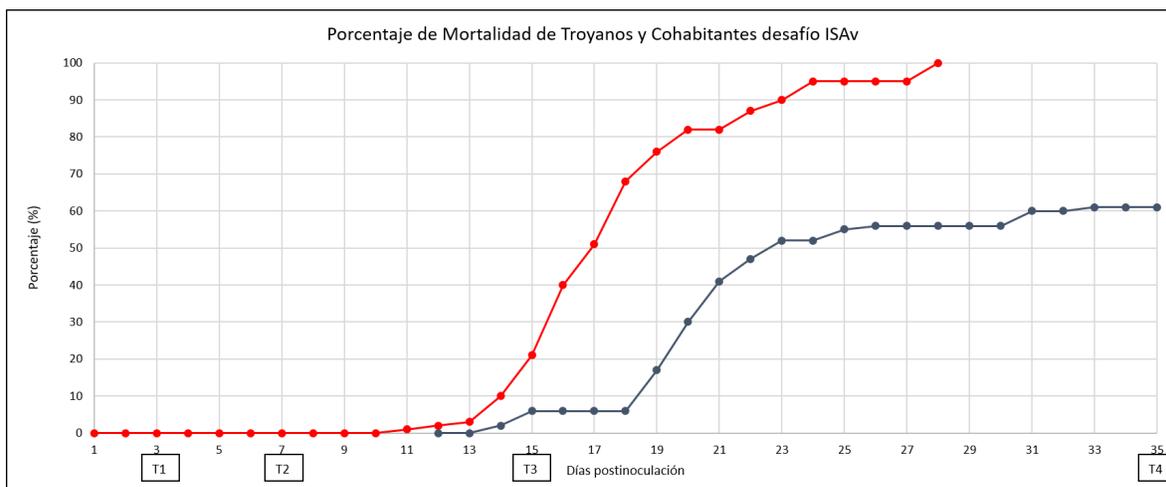


Gráfico N°6. Curva del porcentaje de mortalidad de troyanos y cohabitantes en el desafío con el virus de la anemia infecciosa del salmón: la línea de color rojo expresa la curva de mortalidad para los troyanos, mientras la línea azul representa la curva de mortalidad para los cohabitantes. Además, en el eje horizontal se señalan los tiempos de muestreo durante el desafío.

La tasa de mortalidad no considera a los peces que fueron eliminados en cada muestreo para el estudio de la bioquímica sanguínea de los peces desafiados con el virus de la anemia

infecciosa del salmón. Los peces troyanos al día 28 post-inoculaciones obtuvieron una mortalidad acumulada del 100%. Por otro lado, el porcentaje de mortalidad acumulada del 50% para los cohabitantes fue al día 23 post-inoculación.

Al finalizar el ensayo los cohabitantes obtuvieron un porcentaje de mortalidad acumulada de un 60,7%.

Variación en el tiempo del perfil bioquímico del salmón del Atlántico desafiados.

Tabla N°10. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con el virus de la anemia infecciosa del salmón, por tiempo de muestreo para los parámetros triglicéridos, glucosa, magnesio, creatinina y urea expresados en el rango (máximo – mínimo), coeficiente de variación (C.V.).

Parámetro	Unidad	T1		T2		T3		T4	
		Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.
Triglicéridos	mg/dl	106 -302,2	33,3	182,3 - 301,7	17,69	17,9 - 211	63,8	41,3 - 273	64,3
Glucosa	mg/dl	136,8 - 173,4	8,4	140,0 -195,5	11,14	80,0 - 183,2	34,6	97,8 - 172,7	25,6
Magnesio	mg/dl	1,77 - 2,42	11,9	2,03 - 2,51	8,52	2,02 - 2,69	11,5	2,30 - 3,23	13,8
Creatinina	mg/dl	0,08 - 0,58	82,4	0,00 - 0,25	126,9	0,00 - 0,56	89,3	0,00 - 0,10	131,7
Urea	mg/dl	0,70 - 4,58	49,4	2,03 - 4,80	30,6	4,09 - 6,48	19,1	1,96 - 4,86	44,8

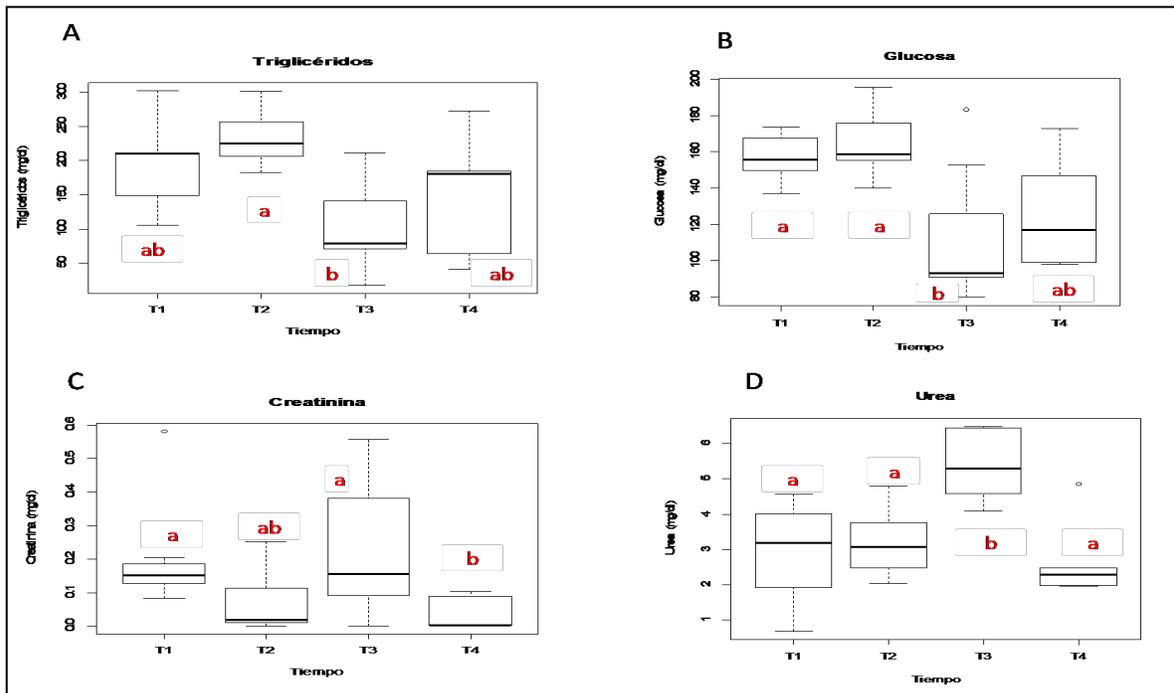
En la Tabla 10, se presentan los rangos máximo y mínimo, junto al coeficiente de variación de los parámetros bioquímicos de triglicéridos, glucosa, magnesio, creatinina, urea para cada tiempo de muestreo en los peces desafiados, donde el tiempo T1 corresponde al día 3 post-infección con ISAv T2, T3, T4 y T5 corresponden al día 7, 15 y 35 post inoculación.

Triglicéridos: el rango registrado para los triglicéridos fue entre 17,93 - 302,2 mg/dl. Los niveles circulantes de triglicéridos en los peces desafiados presentaron variaciones significativas entre los días 7 (T2) y 15 (T3) del desafío registrándose una fuerte caída de los niveles circulantes para este parámetro (Figura N°7).

Glucosa: Los niveles plasmáticos presentaron variación durante el curso del desafío, se observó un descenso significativo de este parámetro el día 15 (T3) con respecto al resto de los tiempos del desafío. Los rangos para este sustrato fluctuaron entre 80,01 – 195,5 mg/dl (Figura N°7).

Magnesio: se estableció un rango para este parámetro entre 1,77 – 3,23 mg/dl. Se midió niveles significativamente más elevados de este parámetro en los estadios finales de este ensayo los días 15 (T3) y 35 (T4) cuando se comparan con el resto de los tiempos del desafiados analizados en este estudio.

Figura N°7: Gráfica de caja, presenta la distribución de rangos para cada parámetro bioquímicos sanguíneos de (A) Triglicéridos, (B) Glucosa, (C) Creatinina y (D) Urea, que informan las variaciones en la concentración séricas de estos parámetros sanguíneos durante el curso de la enfermedad (Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p > 0.05$).



Creatinina: el rango establecido para la creatinina fue entre 0,003 – 0,16 md/dl. Al día 35 (T4) de desafío se registró una baja significativa de los niveles circulantes con respecto al T1 (Figura N°7).

Urea: los niveles plasmáticos medidos para este parámetro fluctuaron entre 0,7 – 6,48 mg/dl. Se observó un alza significativa para este parámetro el día 15 (T3), con respecto al T1 del desafío.

Tabla N°11. Parámetros bioquímicos sanguíneos de ejemplares salmón del Atlántico desafiados con el virus de la anemia infecciosa del salmón, expresados en el rango (máximo – mínimo), coeficiente de variación (C.V.).

Parámetro	Unidad	T1		T2		T3		T4	
		Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.	Rango	C.V.
Albúmina	g/dl	1,90 - 2,23	5,5	1,70 - 2,54	17,3	0,64 - 2,72	37,2	0,69 - 2,74	41,7
P. Totales	g/dl	4,04 - 5,05	7,8	4,16 - 5,85	14,17	1,34 - 6,78	44,52	1,46 - 6,28	46,6
Colesterol	mg/dl	246,1 - 335,8	12,6	242,8 - 339,0	12,58	80,36 - 409,6	48,7	66,1 - 492,7	66,6
Calcio	mg/dl	10,76 - 12,11	4,5	8,69 - 12,39	11,5	9,38 - 18,23	25,5	7,13 - 14,62	25,6
Fósforo	mg/dl	6,69 - 10,35	16,4	7,29 - 13,54	20,28	5,75 - 16,02	37,5	5,01 - 13,28	35,1
Bilirrubina	mg/dl	0,00 - 0,07	76,8	0,00 - 0,06	153,4	0,00 - 0,03	126,1	0,00 - 0,06	126,1
ALP	U/L	557,2 - 1019	17,7	432,4 - 1043	23,44	54,2 - 979,1	53,7	86,8 - 1287	92,4
AST	U/L	30,14 - 68,15	35	5,03 - 98,6	62	0,00 - 129,5	120,3	7,40 - 51,84	77,7
LDH	U/L	229,1 - 1739	72,8	274,7 - 1135	58,2	156,9 - 2687	120	210 - 1331	66,1
CK	U/L	27,6 - 448,1	124,3	15,38 - 432,2	94,9	3,29 - 1563	206	15,04 - 765,4	125,6

Albúmina y Proteínas Totales: los niveles circulantes para estos sustratos no presentaron variaciones en el transcurso del ensayo. Sin embargo, se registró una disminución gradual de los niveles plasmáticos desde los estadios iniciales a los tardíos en el desafío. Para la albúmina se registró rangos de entre 0,62 - 2,74 mg/dl. En tanto para las proteínas totales 1,34 – 6,78 mg/dl en los peces desafiados.

Colesterol: los rangos plasmáticos para esta variable fluctuaron entre 66,1 – 492,7 mg/dl. Si bien los niveles circulantes no registraron variaciones durante el curso del ensayo se observó que en las etapas iniciales los niveles circulantes fueron más elevados con relación a los medidos en las etapas avanzadas del desafío.

Calcio y Fósforo: para las concentraciones plasmáticas de estos parámetros se estableció un rango para el calcio entre 10,55 a 11,75 mg/dl. Mientras para el fósforo el rango fluctuó entre 5,01 – 16,02 mg/dl.

Bilirrubina: los niveles circulantes de bilirrubina no presentaron grandes variaciones entre los diferentes tiempos analizados. Los rangos de concentración plasmática fluctuaron entre 0 – 0,07 mg/dl.

Creatina quinasa (CK), Aspartato aminotransferasa (AST): No se observó variación en los niveles circulantes de estas enzimas entre los peces desafiados. Sin embargo, en los estadios intermedios entre los tiempos T2 y T3 se reportaron los niveles más elevados. Mientras que en los tiempos T1 y T4 se observa los niveles circulantes más bajos para estas enzimas. Para la CK se establecieron rangos entre 3,29 – 1563 U/L. En tanto, la AST presentó un rango de concentraciones séricas entre 0-129,5 U/L.

Lactato deshidrogenasa: presentó un rango de distribución entre 156,9 -2687 U/L. Las concentraciones plasmáticas no presentaron diferencias significativas. Solo se observó que al T4 se reportaron las concentraciones más elevadas y al T2 los niveles más bajos para esta enzima en el grupo de peces desafiados.

Fosfatasa Alcalina: las concentraciones plasmáticas no presentaron grandes fluctuaciones, pero se observó que los niveles séricos fueron bajando desde el T1 (873,8 U/L), hasta el T4 (420 U/L). Además, se pudo determinar un rango de concentraciones séricas que osciló entre 54,2 a 1287 U/L.

DISCUSIÓN

La bioquímica sanguínea es un reflejo de los procesos fisiológicos que ocurren en los diferentes tejidos de los animales. En general la desnutrición, el estrés y las enfermedades pueden afectar los niveles de los parámetros plasmáticos, los que entregan información valiosa respecto de los peces que están siendo cultivados. El objetivo del presente estudio fue caracterizar el perfil bioquímico del salmón del Atlántico de peces sanos y peces desafiados con SRS e ISAv de manera de establecer valores de referencia para la evaluación clínica de los peces.

En este estudio los valores plasmáticos medidos en el salmón del Atlántico sanos son consistente con los rangos reportados para esta especie en otros estudios previamente (Fernández-Niño, 2004; Herrera, 2004; Pérez, 2005; Wittner, 2009). Al analizar los rangos obtenidos en el presente ensayo para los parámetros plasmáticos de albúmina, proteínas totales, colesterol, glucosa, triglicéridos se observan valores con menor variabilidad en comparación a parámetros como CK, LDH, AST, ALP, bilirrubina, creatinina (Sandnes *et al.*, 1988; Fernández-Niño, 2004; Herrera, 2004; Pérez, 2005; Wittner, 2009). Igualmente, este patrón de comportamiento (de mayor o menor variabilidad) de los rangos de referencia se ha reportado en otras especies de salmónidos como la trucha arcoíris, salmón coho (Sandnes *et al.*, 1988; Stoskopf, 1993; Herrera, 2004; Winter, 2009).

Al comparar los rangos del presente estudio con otras especies de cultivo acuícola como Tilapia (Hrubec *et al.*, 2000); Esturión (Knowles *et al.*, 2006; Di Marco *et al.*, 2011); Dorada (Peres *et al.*, 2013); Lengüado (Coz-Rakovac *et al.*, 2005), se observan patrones similares de variación en los parámetros bioquímicos, donde las enzimas plasmáticas junto a la bilirrubina tiende a presentar mayor coeficiente de variación, mientras que los parámetros como albúmina, proteínas totales, glucosa su variación es menor. Adicionalmente se puede observar que, en la fracción mineral, las proporciones relativas en orden decreciente son calcio, fósforo y magnesio tanto en este estudio como en otras especies acuícolas (Hrubec *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Coz-Rakovac *et al.*, 2005; Knowles *et al.*, 2006; Di Marco *et al.*, 2011; Peres *et al.*, 2013).

Este estudio permitió describir las variaciones que experimentan los parámetros bioquímicos sanguíneos entre peces sanos y desafíos con *Piscirickettsia salmonis* y con el virus de la anemia infecciosa del salmón. Ambos desafíos se efectuaron por separado

En el caso de los peces desafiados con SRS se observó un aumento significativo de los niveles circulantes tanto de proteínas totales como de albúmina en los estadios más avanzados del desafío. Este aumento específico de proteínas totales podría estar relacionado con aumentos de proteínas del tipo globulinas durante la infección producida por esta bacteria, en respuesta a fenómenos de inflamación, daños tisulares ocasionados por la infección con la bacteria *P. salmonis*. Bahamonde (2012) informa que en peces infectados con bacterias intracelulares existe una rápida producción de interleuquina (IL12) por las células dendríticas y macrófagos. Esta citoquina favorece la respuesta de tipo celular. También se genera un aumento de interferón gamma (IFN-g). Además, debido a la capacidad de esta bacteria de sobrevivir y multiplicarse en células macrófagos y escapar de la respuesta inmune desarrollada contra esta bacteria (Soto, 2007). Por lo tanto, el sistema inmune del animal con el fin de eliminar y contrarrestar los efectos de esta bacteria al interior del organismo vuelve a generar otra respuesta inmune la que conlleva la generación nuevamente de elementos celulares como citoquinas, interleuquinas, con la finalidad de eliminar a esta bacteria.

Para los aumentos de los niveles plasmáticos de albúmina en los peces desafiados esto estaría gatillado por alteraciones en el epitelio branquial ocasionadas por *Piscirickettsia salmonis*. Las alteraciones pueden abarcar desde hiperplasia, necrosis de las células interlaminares (Larenas *et al.*, 1995; Godoy *et al.*, 2008; Rozas-Serri *et al.* 2017). Por lo tanto, al existir una lesión en el tejido branquial puede resultar en un engrosamiento del epitelio branquial y una mayor distancia para la difusión de la sangre al agua. A su vez, esto puede conducir a una mayor concentración plasmáticos de los analitos excretados vía branquias generando fenómenos de deshidratación (Müller *et al.*, 2018).

Este aumento de los niveles circulantes de proteínas totales y albúmina ha sido reportado en trucha arcoíris naturalmente infectadas con las bacterias como *Serratia liquefaciens* o *Aeromonas spp* (Aydin *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2014).

Por otro lado, al evaluar los resultados en los peces desafiados con ISAv para ambos parámetros (proteína totales y albúmina), se encontró que los peces cursan con una

disminución en ambos analitos durante el desarrollo del desafío cuando se comparan con los peces sanos. Las bajas concentraciones plasmáticas de proteínas totales y albúmina en este caso podrían estar asociadas a un escaso consumo de alimentos. Sin embargo, en este estudio no se evaluó el consumo dietario de los peces desafiados con ISA_v. Algunos autores como Müller *et al.*, (2018), han asociado la disminución de los niveles circulantes de proteínas totales en salmónidos a un bajo aporte de proteínas en la dieta por ayuno prolongado.

Siegel (2011), evaluó 4 dietas en salmón del Atlántico desafiados experimentalmente con el virus de la anemia infecciosa del salmón del Atlántico y pudo concluir que los peces presentaban una disminución en los parámetros de ganancia de peso y registro una drástica disminución del consumo de alimentos en los peces con ISA_v.

También se podría asociar la hipoproteinemia a las múltiples hemorragias internas en diversos órganos que han sido descritas para esta patología (Simko *et al.*, 2000; Jiménez, 2010).

La disminución en la concentración plasmática de la fracción proteica también fue reportada por Jiménez (2010), en salmón del Atlántico infectados naturalmente con el virus de la anemia infecciosa del salmón. Además, se han informado de niveles bajos de proteínas y albúmina en infecciones producidas por *Streptococcus*, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas caviae* en trucha arcoíris dado por hemorragias hepáticas y esplenomegalia (Rehulka, 2002), en septicemia hemorrágica viral en trucha arcoíris (Rehulka, 2005), y en infecciones concomitantes por las bacterias *Aeromonas* y *Streptococcus*

En otras especies de peces como lubina y dorada se ha reportado una reducción significativa de ambos parámetros cuando eran privadas de alimentación durante un período de una semana (McCue, 2010; Peres *et al.*, 2014).

Los niveles de lípidos en el plasma, particularmente de colesterol y triglicéridos son dependientes de muchos factores entre ellos el estado nutricional y fisiológico de los peces. En patologías como SRS y ISA_v se observa escaso consumo de alimentos y malnutrición (Godoy *et al.*, 2008; Jiménez, 2010), junto a lesiones hepática e intestinales provocadas por estas patologías (Larenas *et al.*, 1995; Godoy *et al.*, 2008; Cottet *et al.*, 2011; Rozas *et al.*, 2014), las que por separado o en su conjunto pueden generar una disminución de los niveles circulantes de lípidos.

Una parte importante del colesterol y los triglicéridos circulantes se producen en el hígado. Rozas-Serri *et al.*, (2017), describió para SRS un patrón de lesiones desde el día 7 al 30 post inoculación, donde pudo observar que las lesiones en hígado tenían una progresión en cuanto a la intensidad y la frecuencia de su presentación en la medida que se desarrollaba la enfermedad, encontrando que al día 14 post-inoculación se observada alteración significativa en distintos órganos (hígado, riñón, corazón). Entre las alteraciones que se reportan son un infiltrado mononuclear perivascular, mientras que a partir del día 19 post inoculación este infiltrado mononuclear era más intenso y se evidenciaron trastornos celulares de crecimiento (atrofia de hepatocitos), degenerativos, circulatorios (hemorragias focales) y trastornos necróticos (necrosis endotelial y perivascular), los que fueron aumentando en su severidad (Olsen *et al.*, 1997; Rozas *et al.*, 2014).

Por lo tanto, la disminución de los niveles circulantes de lípidos y colesterol detectadas en este estudio en los peces desafiados con SRS se explicaría debido a las múltiples alteraciones en el hígado que han sido reportadas por diferentes autores. Las alteraciones en el hígado estarían limitando la capacidad de este órgano de producir o este no es capaz de formar colesterol y triglicéridos, y esta producción se compromete aún más en las etapas avanzadas por un mayor daño hepático. Adicionalmente la disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos se podría deber a la falta de lipoproteínas necesarias para que los triglicéridos sean transportados al resto del organismo. Estas lipoproteínas son producidas en el hígado e intestino, pero como se mencionó anteriormente ambas patologías producen alteraciones y lesiones en estos órganos.

Rehulka (2002), reporto que truchas arcoíris infectadas con *Aeromonas* presentaban bajas concentraciones de la fracción lipídica a causa de las alteraciones hepáticas producidas por *Aeromonas*

En el caso de Isavirus la disminución de los niveles igualmente estaría asociado a una baja de consumo de lípidos de origen dietario.

En este estudio en ambos desafíos en las etapas finales se observa un aumento de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos. Este aumento en los niveles circulantes se podría relacionar con la movilización de las reservas de lípidos al resto del organismo con el fin de cumplir con los requerimientos y funciones básicas para mantener las homeostasis del organismo (Heath, 1995; McCue, 2010 Peres *et al.*, 2013).

Al evaluar la fracción mineral (calcio, fósforo, magnesio), la concentración plasmática para el calcio fue diferente en ambas patologías analizadas en este estudio con respecto a su control sano. En el caso de SRS se registró una baja significativa en la concentración circulante de calcio en los tres primeros tiempos del desafío. Esta baja de calcio podría estar dada por un daño renal generada por las alteraciones que produce *P. salmonis* en este órgano como renomegalia, atrofia glomerular y tubular, estas lesiones están presente a la primera semana posterior a la infección, las que aumentan en severidad y frecuencia en el desarrollo de la enfermedad (Rozas-Serri *et al.*, 2017). Larenas (1995), informa que al examen histológico de peces positivos a *P. salmonis*, pero que no presentaron signos clínicos de enfermedad se encontró necrosis glomerular, tubular, endotelial. Además, reporta que en peces con signos leves y moribundos positivos a *P. salmonis* la intensidad y frecuencia de las lesiones encontradas a nivel renal aumentaban. Estas alteraciones pueden explicar el aumento de la pérdida de calcio a nivel de la filtración renal. Mientras que para los peces desafiados con el virus de la anemia infecciosa se observó hipercalemia.

Para los minerales fósforo y magnesio se observó el patrón de hipocalcemia e hipofosfatemia que ha sido reportado en carpas infectadas con *Pseudomonas fluorescen*, y en trucha arcoíris que cursan cuadros bacterianos (Yildiz, 2006; Rehulka, 2002). La hipofosfatemia al igual que la hipocalcemia se puede explicar esta condición por el bajo consumo dietario de estos minerales, ya que estos minerales son principalmente incorporados de la dieta, aunque una proporción puede ser absorbida de algunos nutrientes inorgánicos del medio ambiente acuático (Lall 2002). Por lo tanto, la malnutrición puede provocar descensos agudos de los niveles de minerales en la sangre de los peces (Peres *et al.*, 2013). Por otro lado, la hipermagnesia se debería a un daño renal por cambios en la electronegatividad en la pared capilar del glomérulo, dificultando la capacidad de excreción del magnesio. Este cambio obedece a la pérdida de la funcionalidad normal del riñón de mantener la función de filtración adecuada de forma que el organismo pueda eliminar los productos tóxicos y evitar perder macromoléculas.

Para los niveles circulantes de bilirrubina se observó un marcado aumento ($p < 0,05$) en los tiempos T2 y T3 de los peces desafiados con SRS en relación con el control sano, estos

aumentos podrían estar asociados a alteraciones hepáticas producida por SRS. Rozas-Serri *et al.*, (2017), reporto que a partir del día 14 post infección se evidencia un infiltrado periportal mononuclear y alteraciones de crecimiento en los hepatocitos y hemorragia las que aumentan en frecuencia en las etapas avanzadas de la enfermedad (Godoy, 2012). Estas alteraciones condicionan la capacidad del hígado para conjugar la bilirrubina y de esta forma poder ser eliminada del organismo (Jee *et al.*, 2004; Ziskowski *et al.*, 2008). Mientras para ISAv no se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de bilirrubina entre peces sanos y enfermos. Es probable que las variaciones plasmáticas de bilirrubina se puedan registrar posterior al periodo evaluado en este ensayo, ya que en patologías como ISAv se esperaría un aumento de los niveles plasmáticos de bilirrubina por los daños inducidos por este virus a nivel hepático y los múltiples focos hemorrágicos en diferentes órganos (Godoy *et al.*, 2008).

Para la creatinina en la patología de ISAv no se observó diferencias en los niveles circulantes entre los peces sanos y desafiados. Mientras en SRS se observó una disminución significativa de la creatinina en los peces desafiados. Esta baja podría estar dada por la disminución de la masa muscular, la cual es secundaria a la malnutrición debido al escaso consumo de alimentos que presentan los peces enfermos con SRS. Adicionalmente la disminución de la masa muscular estaría dada por las alteraciones a nivel de la musculatura esquelética presentes en los peces que cursan con *p. salmonis* (Olsen *et al.*, 1997; Godoy, 2012).

En el caso de la urea solo se registraron variaciones significativas entre peces sanos y desafiados con ISAv, observándose un descenso significativo en los niveles circulantes de urea en los peces enfermos. Esta baja se podría explicar por la reducida cantidad de alimentos consumidos por los peces enfermos (McCue, 2010; Peres *et al.*, 2014)

Al analizar las variaciones que experimentan las enzimas en ambas enfermedades, sus patrones de comportamiento difieren completamente. Para el caso de SRS, las enzimas CK, AST, y LDH presentan un aumento significativo en sus niveles circulantes en los estadios más avanzados del desafío. Sin embargo, en ISAv se observa un descenso importante en todo el desafío de las concentraciones plasmáticas de estas tres enzimas respecto al control sano.

En el caso de SRS, se debe considerar que el desarrollo de esta patología genera diferentes tipos de presentaciones clínica y morfológica, se pueden agrupar en tempranas (gastrointestinal, visceral), y más tardía (cardiaca y muscular) (Godoy, 2012).

Los aumentos observados en este estudio para las enzimas AST y LDH en peces desafiados con SRS pueden en un inicio estar asociadas con la presentación visceral de SRS, donde se observa múltiples focos circunscritos, de color blanco o amarillo en hígado y, ocasionalmente, en riñón, bazo y grasa visceral, asociado a hepatomegalia, renomegalia y esplenomegalia. En las etapas finales del desafío se observó un aumento significativo de estas enzimas plasmáticas, lo que puede estar asociado a aumento de las lesiones antes mencionadas. Rozas-Serri *et al.*, (2017) reportó que a partir del día 20 post infección el grado de alteración histopatología comienza a ser más severo y generar un mayor compromiso de los diferentes órganos afectados lo que se condice con la evolución observada para estas enzimas en el presente estudio.

En las etapas más tardías del desafío se observó aumentos de los niveles circulantes de CK, este aumento se explicaría por las alteraciones que induce la presentación cardiaca y muscular en SRS. Godoy (2012), reportó que la presentación cardiaca en SRS genera signos de dilatación cardiaca, epicarditis, pericarditis y hemorragias en el miocardio lo que se condice con altos niveles de CK en las etapas más avanzadas de la patología. Al igual que la presentación muscular donde afecta la musculatura esquelética, generándose muerte y desintegración celular, erosiones y ulceraciones en la piel. Estas lesiones se correlacionan con niveles plasmáticos elevados de CK y LDH encontrados en las muestras de las etapas más crónicas del desafío analizadas en este estudio. Yousaf *et al.*, (2012), reportó esta correlación para estas enzimas en salmón del Atlántico que cursan inflamación del músculo esquelético y cardiaco (HMSI).

Por otro lado, la baja observada para estas enzimas en los peces desafiados con ISAv podría ser generada por la escasez de factores o coenzimas necesarias para generar la funcionalidad de las enzimas. Los factores o coenzimas son adquiridos a través de la dieta principalmente, pero los peces que cursan con ISAv el consumo de alimentos es escaso y presentan mala absorción intestinal. Peres *et al.*, (2013, 2014) informo que en dorada y lubina tras mantenerla

sin consumo de alimentos por una semana los niveles plasmáticos de estas enzimas se redujeron significativamente. La sensibilidad de estas enzimas plasmáticas durante episodios de inanición ha sido informada para otras especies (McCue, 2010). Los niveles de actividad enzimática plasmática son proporcionales a la concentración intracelular, actividad específica y reducción del nivel de proteína tisular, que en conjunto o por separado explican los niveles reducidos de las enzimas en el plasma (Tripathi y Verma, 2003; Evans y Watterson, 2009).

En el caso de la enzima ALP para la patología de SRS los niveles plasmáticos son menores en los peces enfermos. La baja de ALP es producto de una mala nutrición. Esto se podría explicar por malnutrición y deficiencia del aporte nutricional de proteínas de origen dietario como ha sido descrito en animales domésticos (Ducan *et al.*, 1994). La fosfatasa alcalina es la enzima más sensible a episodios de ayuno o mal nutrición, donde sus niveles se reducen significativamente (Peres *et al.*, 2014). Se han descrito bajos niveles de fosfatasa alcalina en peces que cursan con vibriosis en salmón del Atlántico y en salmón coho (Rehulka *et al.*, 2007). En el caso de ISAv no se observó diferencias en los niveles circulantes de esta enzima con los peces sanos, pero en las etapas tempranas del desafío se evidencio un leve aumento de ALP. Estos aumentos se pueden deber a daño hepático e intestinal que ocasiona esta enfermedad en los peces.

Analizando el conjunto de parámetros bioquímicos sanguíneos, las variaciones en los niveles circulantes de los analitos en los peces desafiados y junto a los antecedentes disponibles nos permiten sugerir que los parámetros bioquímicos sanguíneos afectados en SRS estarían dado por un patrón de daño hepático preferentemente por el aumento de enzimas plasmáticas y disminución en la síntesis de algunos parámetros como el colesterol, triglicéridos y secundariamente se ven afectados por un trastornos a nivel de epitelio branquial que dificultaría la excreciones de los analitos vía epitelio branquial.

Para ISAv las variaciones presentadas en los peces desafiados estarían gatilladas por la falta de consumo de nutrientes de origen dietario, ya que existe una baja constante de una gran cantidad de parámetros analizados en este estudio.

Con respecto al desafío con *Piscirickettsia salmonis*, hemos observado que al tiempo T2 fueron medidos los niveles circulantes más bajos de los analitos contemplados en este estudio. Por lo tanto, la disminución de la concentración plasmática de estos parámetros bioquímicos sanguíneos podría explicarse por qué al día 6 post inoculación de la bacteria (T2), *p. salmonis* ha sido capaz de diseminarse, colonizar, penetrar y multiplicarse en los diversos órganos y tejidos blanco de *Piscirickettsia salmonis*, provocando un intenso daño y alteración del funcionamiento de los órganos.

En el caso se ISAv las mayores variaciones de las concentraciones plasmáticas en los peces desafiados por cohabitación se registraron al día 15 post exposición al agente viral, donde una gran cantidad de parámetros evaluados en este estudio experimentan una baja con respecto a los peces sanos. Adicionalmente se observa que al día 15 comienzan a aumentar las mortalidades en los peces inoculados y registrarse las primeras mortalidades en los peces desafiados por cohabitación.

Las diferencias de alzas y bajas producidas para las concentraciones plasmáticas de los parámetros bioquímicos entre ambas enfermedades se podrían deber a los diferentes mecanismos de infección y blancos que presentan estas enfermedades en los distintos tejidos, órganos.

CONCLUSIONES

1. La metodología del perfil bioquímico sanguínea puede ser utilizada como una herramienta para monitorear la salud de los peces, pudiendo detectar variaciones en los analitos previos a un deterioro orgánico evidente de los peces.
2. Este estudio permitió caracterizar el perfil bioquímico sanguíneo para peces sanos y enfermos con *Piscirickettsia salmonis* y el virus de la anemia infecciosa del salmón.
3. El perfil bioquímico sanguíneo de peces enfermos es dinámico durante el curso y la evolución de la enfermedad, y esta evolución dependerá de cada enfermedad.
4. Los parámetros principalmente alterados del perfil bioquímico de los peces enfermos con *Piscirickettsia salmonis*, corresponden a un fuerte aumento en los niveles circulantes de albúmina, proteínas totales, creatinina, las enzimas GOT, LDH, CK y una disminución en los niveles de calcio y la enzima ALP.
5. Los parámetros del perfil bioquímico de los peces enfermos de ISAv, corresponden a una marcada disminución en los niveles de albúmina, proteínas totales, urea, enzimas GOT, LDH, y CK y aumentos en los niveles de calcio y glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrahari, S.; Pandey, K.; Gopa, K.** 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of Wsh, *Channapunctatus* (Bloch). Pesticide Biochemistry and Physiology 88, 268–272.
- Aydin, S.; Erman, Z.; Bilgin, O.** 2001. Investigations of Serratia liquefaciens Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Turk Journal Vet. Anim. Scien. 25, 643-650.
- Bahamonde, M.** 2012. Un Nuevo desafío para la acuicultura. [citado 15 de diciembre 2017]. Disponible world wide web://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/ contribuciones/article/download/880/832.
- Bellier, S.** 2010. Interprétation et valeur susuelles des paramètres sanguins en Biochimie clinique vétérinaire. Revue des Laboratoires francófonos 420, 43-56.
- Bruno, D.; Poppe, T.** 1996. A colour atlas of Salmonid Diseases. Capítulo 4 (Viral disease), 30-32. Ed U nited States Academic Press INC. San Diego, CA 92101.
- Center, S.** 2007. Interpretation of Liver Enzymes. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Volume 37, 297-333.
- Chen, C.; Wooster, G.; Getchell, R.; Browser, P.; Timmons, M.** 2003. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. Aquaculture 218, 89–102.
- Chen, C.; Wooster, G.; Browser P.** 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptoco ccusinia*e or exposed to carbontetra chloride, gentamicin, or copper sulfate. Aquaculture 239, 421–443.
- Congleton, J.** 2006. Stability of some commonly measured blood-chemistry variables in juvenile salmonids exposed to a lethal dose of the anaesthetic MS-222. Aquaculture Research, 37, 1146 – 1149.
- Cotant, C.** 1999. A Blood Chemistry Profile for Lake Trout. Journal of Aquatic Animal Health 11, 81–86.
- Cottet, L.; Rivas-Aravena, A.; Cortez, M.** 2011. Infectious salmon anemia virus— Genetics and pathogenesis. Virus Research 155, 10–19
- Coz-Rakovac, R.; Strunjak-Perovic, I.; Hacmanjek, M.; Popovic, N. T.; Lipej, Z.; Sostaric, B.** 2005. Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. Vet. Res. Commun. 29, 677– 687.

- Coz-Rakovac, R.; Strunjak-Perovic, I.; Popovic, N.; Hacmanjek, M.; Smuc, T.; Jadan, M.; Lipej, Z.; Homen, Z.** 2008. Cage culture effects on mullets (*Mugilidae*) liver histology and blood biochemistry profile. *Journal of Fish Biology* 72, 2557-2569.
- De Pedro, N.; Guijarro, A.; López-Patiño, M.; Martínez-Álvarez, R.; Alonso-Bedate, M.; Delgado, M.** 2004. Parámetros hematológicos y bioquímicos en la Tenca (*Tinca tinca*). *Comunicación Científica CIVA 2004* (<http://www.civa2004.org>), 173-190.
- Di Marco, P.; Priori, A.; Finoia, M. G.; Petochi, T.; Longobardi, A.; Donadelli, V.; Marino, G.** 2011. Assessment of blood chemistry reference values for cultured sturgeon hybrids (*Acipenser naccarii* female 9 *Acipenser baerii* male). *J. Appl. Ichthyol.* 27, 584–590.
- Duncan, J.; Prasse, K.; Mahaffey, E.** 1994. Erythrocytes In: *Veterinary Laboratory Medicine* (ed. by J.R. Duncan, K.W. Prasse & E.A. Mahaffey). 3-36 Iowa State University Press, Ames.
- Evans, G.; Watterson, C.** 2009: General enzymology. In: *Animal clinical chemistry, a practical guide for toxicologists and biochemical researchers*, 2nd edn. G. O. Evans (Ed.). CRC Press, New York, pp. 17–36.
- Fernández-Niño, E.** 2004. Tesis Determinación de perfiles metabólicos en turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus, 1758) de cultivo en Chile. Universidad Austral de Chile.
- Ferri, J.; TopicPopovic, N.; Coz-Rakovac, R.; Beer-Ljubic, B.; Strunjak-Perovic, I.; Skeljo, F.; Jadan, M.; Petric, M.; Barisic, J.; Simpraga, M.; Stanic, R.** 2011. The effect of artificial feed on blood biochemistry profile and liver histology of wild saddled bream, *Oblada melanura* (Sparidae). *Marine Environmental Research* 71, 218-224.
- Figueroa, J.; Jara, M.; Rojas, C.; Haussmann, D.; Romero, A.** 2011. Genómica de los subtipos de *Piscirickettsia salmonis* presentes en la salmonicultura nacional. Universidad Austral de Chile.
- Fryer, J.; Hedrick, R.** 2003. *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracelular bacterial pathogen of fish. *J Fish Dis.* 26(5): 251-262.
- Fryer, J.; Lannan, C.; Garcés, L.; Larenas, J.; Smith, P.** 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *J. Fish Pathol.* 25, 107–114.
- Godoy, M.; Aedo, A.; Kibenge, M.; Groman, D.; Yason, C.; Grothusen, H.; Lisperguer, A.; Calbucura, M.; Avendaño, F.; Imilán, M.; Jarpa, M.; Kibenge, F.** 2008. First detection, isolation and molecular characterization of infectious salmon anaemia virus

associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *BMC Vet Res.* 4:28, 1-13.

Heath, A. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology.* CRC Press, Boca Ratan. 359.

Hellebo, A.; Vilas, U.; Falk, K.; Vlasak R. 2004. Infectious salmon anaemia virus specifically binds to and hydrolyzes 4-O-acetylated sialic acids. *J Virol* 78, 3055-3062.

Herrera, E. 2004. Tesis Perfil metabólico del Salmon Atlántico *Salmo salar* y Trucha Arcoíris *Oncorhynchus mykiss* de tres pisciculturas en fase de agua dulce en el sur de Chile. Universidad Austral de Chile.

Hoffmann, R.; Lommel, R. 1984. Haematological studies in proliferative kidney disease of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases.* 7,323-326.

Hrubec, T.; Cardinale, J.; Smith, S. 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). *Vet Clin Pathol.* 29, 7-12.

Hrubec, T.; Smith, S. 1999. Differences between Plasma and Serum Samples for the Evaluation of Blood Chemistry Values in Rainbow Trout, Channel Catfish, Hybrid Tilapias, and Hybrid Striped Bas. *Journal of Aquatic Animal Health,* 11:2, 116-122.

Hunn, J.; Wiedmeyer, R.; Greer, A. 1992. Blood Chemistry of Laboratory-Reared Golden Trout *Journal of Aquatic Animal Health* 4, 218-222.

Jee, J.; Kim, S.; Kang, J. 2004. Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 304, 123–136.

Jiménez, D. 2010. Tesis de grado Descripción clínica y anatomopatológica de la anemia infecciosa del salmón (ISA) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) naturalmente infectados. Universidad Austral de Chile.

Kavitha, C.; Ramesh, M.; SenthilKumaran, S.; Lakshmi, S. 2012. Toxicity of Moringaoleifera seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 681–687.

Kaneko, J. 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5th ed., Academic Press, San Diego, California.

Knowles, S.; Hrubec, T.; Smith, S.; Bakal, R. 2006. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Veterinary Clinical Pathology.* 35, 434-440).

- Larenas, J.; Hidalgo, L.; Garcés, H.; Fryer, J.; Smith, P.** 1995. Piscirickettsiosis: Lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. Av. Cs. Vet. 10:53-58.
- Lall, S.** 2002. The minerals. In: Halver JE, Hardy RW (eds) Fish nutrition, 3rd edn. Academic Press, London, pp 259–308.
- Li, Z.H.; Velisek, J.; Zlabek, V.; Grabic, R.; Machova, J.; Kolarova, J.; Randak, T.** 2010. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. Chem.-Biol. Interact. 183, 98–104.
- Li, ZH.; Velisek, J.; Grabic, R.; Li, P.; Kolarova, J.; Randak, T.** 2011. Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. Chemosphere 83, 572–578.
- LPCV.** 2004. Valores de referencia para salmón y trucha en fase de engorda. Boletín de difusión técnica, Laboratorio patología clínica veterinaria. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- McCue, M. D.** 2010: Starvation physiology; reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. Comp. Biochem. Physiol. 156, 1–18.
- Müller, A.; Bittencourt, P.; Rozas, M.; Walker, R.** 2018. Manual de Patología Clínica de Peces Salmónidos.
- Olsen, A.; Melby, H.; Speilberg, L.; Evensen, Ø.; Håstein, T.** 1997. Piscirickettsia salmonis infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway. Epidemiol. Pathol. Microbiol. Find. 31, 35–48.
- Peres, H.; Santos, S.; Oliva-Teles, A.** 2013. Selected plasma biochemistry parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Journal of Applied Ichthyology. 29, 630-636.
- Peres, H.; Santos, S.; Oliva-Teles, A.** 2014. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). 40, 1339-1347.
- Polakof, S.; Mommsen, T.; Soengas, J.** 2011. Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 160 123–149.
- Pérez, J.** 2005. Tesis Perfil metabólico de salmón coho *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792) y salmón del atlántico *Salmo salar* (Linnaeus, 1758), en la fase terminal de su cultivo.
- Qiu, T.; Xie, P.; Guo, L.; Zhang, D.** 2009. Plasma biochemical responses of the planktivorous filter-feeding silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp

(*Aristichthys nobilis*) to prolonged toxic cyanobacterial blooms in natural waters. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 350–356.

Rehulka J. 2002. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Veterinaria Brno* 71, 351–360.

Rehuelka, J.; Minark, B. 2007. Blood parameters in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1815), affected by columnaris disease *Aquaculture Research*, 38, 1182 – 1197.

Rehulka, J.; Minarik, B.; Adamec, V.; Rehulkova, E. 2005. Investigations of physiological and pathological levels of total plasma protein in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 36, 22–32

Rozas, M.; Enríquez, R. 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of Fish Diseases*. 37, 163–188.

Rozas-Serri, M.; Hdefonso, R.; Peña, A.; Eneíquez, R.; Barrientos, S.; Maldonado, L. 2007. Comparative pathogenesis of piscirickettsiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt experimentally challenged with LF-89-like and EM-90-like *Piscirickettsia salmonis* isolates. *J Fish Dis.* 40, 1451–1472.

Sandnes, K.; Lie, Ø.; Waagbø, R. 1988. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Biol.*, 32, 129–136.

Simko, E.; Brown, L.; MacKinnon, A.; Byrne, P.; Ostland, V.; Ferguso, H. 2000. Experimental infection of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. with infectious salmon anaemia virus: a histopathological study. *J Fish Dis* 23, 27–32.

Smith, P. 2015. Tesis doctoral Patogenia de piscirickettsiosis: estudio sobre la infectividad de *Piscirickettsia salmonis* y el efecto de sus productos extracelulares. Universidad de Córdoba España.

Soto, E. 2007. Tesis Evaluación de la respuesta inmune de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) a complejos inmunes con *Piscirickettsia salmonis*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile

Stoskopf, M. 1992. *Fish Medicine*. W.B. Saunders Company. United States. 882 pp.

Sudova, E.; Piackova, V.; Kroupova, H.; Pijacek, M.; Svobodova, Z., 2009. The effect of praziquantel applied per os on selected haematological and biochemical indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 35, 599–605.

- Talas, Z.S.; Gulhan, M.F.;** 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1994–1998.
- Tripathi, G.; Verma, P.** 2003: Starvation-induced impairment of metabolism in a freshwater catfish. *Z. Naturforsch.* 58c, 446–451.
- Washington, I.; Van Hoosie, G.** 2012. Chapter 3 -Clinical Biochemistry and Hematology. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.* Pages 57-116.
- Weiser, M.; Vap, L.; Thrall, M.** 2007. Perspectives and Advances in In-Clinic Laboratory Diagnostic Capabilities: Hematology and Clinical Chemistry. *Vet Clin Small Anim*3, 221–236.
- Wittner, F.;** 2009. *Hematología y Bioquímica Clínica.* Instituto de Cs. Clínicas. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile.
- Yildiz H.; Aydin S.** 2006. Pathological effects of *Arcobacter cryaerophilus* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Acta Veterinaria Hungarica* 54,191-199.
- Yousaf, M.; Powell, M.** 2012. The Effects of Heart and Skeletal Muscle Inflammation and Cardiomyopathy Syndrome on Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Levels in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *The ScientificWorld Journal*, Article ID 741302, 9 pages doi:10.1100/2012/741302.
- Ziskowski, J.; Mercaldo-Allen, R.; Pereira, J.; Kuropat, C.; Goldberg, R.**2008. The effects of fin rot disease and sampling method on blood chemistry and hematocrit measurements of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* from New Haven Harbor (1987–1990). *Marine Pollution Bulletin* 56, 740–750.