



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y LA EFICACIA DE UNA VACUNA CONTRA
TENACIBACULUM DICENTRARCHI EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*SALMO
SALAR*)

Yazmin Valeria Donoso Fuentes

Memoria para optar al
Título Profesional de Médico veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: JOSÉ MANUEL YÁÑEZ

Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2021



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y LA EFICACIA DE UNA VACUNA CONTRA
TENACIBACULUM DICENTRARCHI EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*SALMO
SALAR*)

Yazmin Valeria Donoso Fuentes

Memoria para optar al
Título Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal

Nota Final*(número).....

*Esta nota la pone el Director de Escuela a partir del Acta de Memoria de Título.

Prof. Guía	José Manuel Yáñez López	(Firma).....
Profesor Corrector	Leonardo Sáenz Iturriaga	(Firma).....
Profesor Corrector	Pedro Smith Schuster	(Firma).....

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis abuelas, que, aunque hoy no están presentes conmigo ante la alegría de un nuevo comienzo, seguirán siendo los remos en esta canoa, especialmente a mi amada Donatila, que cobijó mi niñez y construyó gran parte de lo que soy y a quien quisiera seguir brindando alegrías.

Quiero agradecer a mi madre, que durante este largo proceso de tesis en pandemia me compartió cada día semillas de su fortaleza, y por supuesto a mi increíble hermana cuyo corazón y coraje para tomar la vida y ponerla de su lado, ha esperanzado a nuestra familia.

Agradecer a mi compañero Alejandro, que ha creído en mí, no ha dudado y ha sabido darme paz en aguas turbulentas.

Quisiera también agradecer a mi profesor José Manuel Yáñez por guiar este camino hacia mi título, a Paulina López y como no mencionar a David Tapia, quien me ofreció su ayuda en momentos claves.

Por último, dedicarle este logro a mi padre y a mi abuelo que ya no transitan este camino junto a mí, como también, a mi longevo y creativo abuelo Beno, que se ha esperanzado imaginándome como profesional de la acuicultura y no deja de preguntar si ya encontré trabajo en el sur.

No puedo no emocionarme, gracias por ayudarme a cumplir el sueño de ser una Médico Veterinaria.

Esta tesis fue realizada bajo la co-tutoría de la Dra. Paulina López.

El mundo cambia en un instante y nacemos en un día.

Gabriela Mistral

ÍNDICE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN..... 1 - 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....2 - 6

 Impacto de enfermedades en salmonicultura.....2 - 2

 Tenacibaculosis.....3 - 4

 Medidas de control y tratamientos.....4 - 4

 Vacunas contra *Tenacibaculum* en el salmón del Atlántico5 - 6

OBJETIVOS GENERALES.....7 - 7

MATERIALES Y METODOS.....8 -12

 Peces, vacuna y vacunación8 - 9

 Evaluación efectos secundarios.....10-11

 Desafío experimental.....11-11

 Análisis estadístico.....11-12

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....12- 25

 Objetivo 1: Evaluación de la seguridad.....12- 16

 Objetivo 2: Presencia de adyuvante mineralizado17- 18

 Objetivo 3: Evaluación eficacia.....18- 20

 Discusión.....21- 25

CONCLUSIÓN..... 26- 26

BIBLIOGRAFÍA..... 27 -32

ÍNDICE TABLAS

 Tabla 1. Descripción de los grupos experimentales.....pág. 9

ÍNDICE ANEXOS

 Anexo 1. Tabla 2. Clasificación de adherencia en cavidad abdominal.....pág. 33

 Anexo 2. Tabla 3. Clasificación de melanosis.....pág. 34

 Anexo 3. Tabla 4. Clasificación de granulomapág. 34

 Anexo 4. Carta de bioética.....pág. 35

RESUMEN

La tenacibaculosis es una enfermedad emergente que afecta a salmónidos de cultivo en todo el mundo, durante la fase de producción en agua de mar. Su presentación en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) está asociada principalmente a tres especies: *Tenacibaculum finnmarkense*, *T. dicentrarchi* y *T. maritimum*. En Chile, la tenacibaculosis fue incluida en la Lista 3 del *Reglamento chileno de enfermedades de alto riesgo de SERNAPESCA* en el 2018 y fue la tercera causa infecciosa de mortalidad en salmón del Atlántico en el año 2019.

En este contexto, se realizó la evaluación de un prototipo de autovacuna inyectable contra *T. dicentrarchi*, en términos de seguridad y eficacia en salmón del Atlántico. La autovacuna demostró niveles de seguridad adecuados, alcanzando los menores parámetros en la escala de Spielberg en cuanto a adherencias y melanosis, sin hallazgo de granuloma. Por otro lado, la autovacuna sola y en combinación con algunas vacunas comerciales presentó limitaciones en términos de la eficacia, mostrando una curva de supervivencia de 22,9% y 15,8% respectivamente.

A la fecha, los resultados de eficacia y seguridad obtenidos en el presente trabajo corresponden a los primeros descritos en la literatura para vacunas contra *T. dicentrarchi*, sin embargo, es necesario que un estudio futuro sea orientado en la reevaluación de la eficacia posterior al desafío, para que dicha vacuna pueda ser integrada en programas preventivos en la industria acuícola.

ABSTRACT

Tenacibaculosis is a new disease affecting salmonid farming throughout the world related with the production phase in seawater. The presence of *Tenacibaculosis* in Atlantic salmon is mainly related with three species of *Tenacibaculum*: *T. finnmarkense*, *T. dicentrarchi* and *T. maritimum*. In Chile, *tenacibaculosis* it was included in List 3 of the Chilean Regulation of high-risk diseases of SERNAPESCA in 2018 and it was the third infectious cause of mortality in Atlantic salmon in 2019.

In this context, an injectable vaccine prototype against *Tenacibaculum dicentrarchi* was created and evaluated during this investigation in terms of safety and efficacy in Atlantic salmon, where the administration of the autovaccine demonstrated adequate levels of safety, reaching the lowest points on Spielber's Scale, in terms of adhesions and melanosis, without findings of granuloma. However, the autovaccine by itself and in combination with commercial vaccines showed limitations in terms of efficacy showing a survival curve of 22.9% and 15.8% respectively.

To date, the efficacy and safety results obtained in the present work correspond to the first ones described in the literature, however, a future study needs to be oriented towards the reassessment of the efficacy after the challenge, so that the vaccine can be integrated into preventive programs in the aquaculture industry.

INTRODUCCIÓN

La demanda mundial por productos pesqueros ha crecido sostenidamente en las últimas décadas y la pesca extractiva se ha estancado, por lo que prácticamente todo aumento futuro en el consumo mundial de pescado tendrá que ser suministrado por la acuicultura. El año 2018, las exportaciones de salmón alcanzaron montos superiores a US\$5.000 millones anuales, representando un 6,8% de las exportaciones totales de Chile. De esta manera, la salmonicultura se sitúa como el tercer sector con mayores exportaciones en el país. Los principales países productores del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cultivado, que representan más del 90% del mercado del salmón de acuicultura en el mundo, son Noruega, Chile, Escocia y Canadá. Chile se caracterizó por su acelerado crecimiento y se convirtió en uno de los protagonistas del auge de la producción de salmón en el mundo. Las ventajas competitivas de Chile para la salmonicultura se relacionan al hecho de que posee una importante presencia de fiordos adecuadamente protegidos, con una mayor temperatura promedio y con una menor variación en el año, lo que reduce los ciclos de producción y los riesgos de enfermedades bajo un modelo sustentable en comparación con otras regiones a nivel mundial. Sin embargo, las enfermedades infecciosas son uno de los grandes desafíos para la industria, y las de mayor impacto son: piscirickettsiosis, como enfermedad bacteriana; y caligidosis, como enfermedad parasitaria. Adicional a estas patologías, encontramos las enfermedades emergentes, las que actualmente resultan de gran importancia en la industria nacional, y entre las cuales destaca la tenacibaculosis. La conciencia sobre el impacto de la tenacibaculosis como un problema en el cultivo de salmón parece estar aumentando y el desarrollo de la enfermedad clínica puede depender de un equilibrio complejo entre el huésped, el agente patógeno y los parámetros ambientales (Avendaño-Herrera, 2006). Una vacuna ayudaría considerablemente a controlar la tenacibaculosis y varios grupos han establecido programas de investigación con el objetivo de desarrollar una vacuna en países como España y Australia. Recientemente, en Chile, el Laboratorio FAV (Farmacología en Acuicultura Veterinaria FAV S.A.), desarrolló un prototipo de vacuna contra *Tenacibaculum dicentrarchi*, para lo que fue pertinente realizar pruebas experimentales que permitieran evaluar los posibles efectos secundarios de la vacuna. Ello es un paso clave para que esta pueda ser aplicada como medida profiláctica en la industria.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- Impacto de enfermedades en salmonicultura

Dentro del mercado mundial de salmón, Chile es el segundo productor y exportador con un 28,7% de la producción acuícola mundial, mientras que Noruega es el líder con un 43,7% de la producción total. En el año 2006, Chile llegó a producir 647 mil toneladas de salmón. Sin embargo, tras la crisis sanitaria del virus ISA, la industria aún no ha logrado alcanzar la producción de 1.000.000 de toneladas, algo logrado por Noruega el año 2012 (Cerde, 2019). Frente a lo anterior, la industria local presenta grandes desafíos para potenciar la competitividad de la industria. Una forma de mejorar los parámetros de la industria nacional sería generar procesos innovadores frente a todos los problemas que impacten en el proceso productivo, de los cuales uno de los más relevantes es la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias. Las enfermedades infecciosas y parasitarias se reconocen en todo el mundo como las principales causas de pérdidas económicas en la producción de salmón. *Piscirickettsia salmonis* y *Caligus rogercresseyi* son las principales enfermedades que afectan la acuicultura del salmón del Atlántico en Chile (Jakob *et al.*, 2014). Incluso recientemente se comprobó que ambas enfermedades presentan una relación sinérgica, al encontrarse que la abundancia media de adultos *C. rogercresseyi* se asocia significativamente con la mortalidad acumulada por piscirickettsiosis (Arriagada *et al.*, 2019). Actualmente, las enfermedades infecciosas emergentes, que se definen como “una nueva enfermedad, una nueva presentación de una enfermedad conocida o una enfermedad existente que aparece en una nueva área geográfica”, causan problemas y costos sustanciales para la industria a nivel mundial (Pettersen *et al.*, 2015). Dentro de las enfermedades emergentes que afectan a la acuicultura del salmón en Chile, encontramos: amebiasis branquial; inflamación del músculo esquelético y cardíaco (HSMI); síndrome icterico del salmón coho; y tenacibaculosis (SERNAPESCA, 2018). Según los datos estadísticos a nivel nacional, la causa de mortalidad más importante reportada para el salmón del Atlántico en el año 2019 fue infecciosa (22,9%), de cuyo total 47,6% de la mortalidad fue clasificada como piscirickettsiosis (SRS); 18,64% como enfermedad bacteriana del riñón (BKD); y 12,9% como tenacibaculosis, posicionándose esta última, como la tercera causa infecciosa de mortalidad en salmón del Atlántico en el año 2019 (Sernapesca, 2020).

2.- Tenacibaculosis

Es una enfermedad emergente que afecta a los cultivos de salmónidos en todo el mundo. Se asocia a los cultivos en agua de mar y está estrechamente relacionada con el género *Flavobacterium* (Kirchman, 2002). En 2018, fue incluida en la Lista 3 del *Reglamento chileno de protección, control y erradicación de enfermedades de alto riesgo para especies acuícolas de SERNAPESCA* (Subpesca, 2018). El agente causal de tenacibaculosis es conocido como *Tenacibaculum* (familia *Flavobacteriaceae*), el cual corresponde a una bacteria gram negativa, estrictamente aeróbica y filamentosa. La presentación de tenacibaculosis en el salmón del Atlántico está asociada principalmente a tres especies de *Tenacibaculum*: *T. finnmarkense*, *T. dicentrarchi* y *T. maritimum* (Avendaño-Herrera *et al.*, 2016; Bridel *et al.*, 2018). En la década de 1990 se propuso a *T. maritimum* como responsable de mortalidades significativas de peces en el cultivo chileno de *S. salar*, lo que fue corroborado entre 2013 y 2015 por el SERNAPESCA que informó 35 diagnósticos relacionados con *T. maritimum* (Apablaza *et al.*, 2017). Además, en 2016, Avendaño-Herrera y colaboradores confirmaron la presencia de *Tenacibaculum dicentrarchi*, a través de seis aislamientos obtenidos de dos brotes en el salmón del Atlántico que ocurrieron en un sitio de cultivo en Puerto Montt (Avendaño-Herrera *et al.*, 2016). La infección mixta entre *P. salmonis* y *T. dicentrarchi* es relativamente común. Generalmente se observa que *T. dicentrarchi* actúa como agente oportunista a nivel del tegumento en el salmón del Atlántico, de manera que dicho patógeno se ve favorecido en infecciones concomitantes con *P. salmonis* (PGSA, 2018).

Hasta la fecha, existe poca información referente a la fisiopatología de *Tenacibaculum spp*, sin embargo, estudios realizados en diferentes especies de peces, indican que corresponde a una bacteria que suele generar principalmente lesiones cutáneas, pero dependiendo de la especie de *Tenacibaculum* involucrada, también podría afectar otros tejidos e incluso presentarse como una infección sistémica (Olsen *et al.*, 2019). Las lesiones en el tegumento de los peces son causadas por la liberación de una toxina con alta actividad proteolítica que lleva a romper la integridad de esta barrera protectora (Van Gelderen, 2009). En conjunto a lo anterior y como respuesta a esta noxa se van liberando mediadores proinflamatorios (Sepulcre, 2007). El edema, la migración de fagocitos y el aumento de permeabilidad

vascular generados por la liberación de estas citoquinas se sumarán a los efectos generados por la toxina (Faílde *et al.*, 2013). Además se ha informado de erosión y necrosis en las branquias asociadas con *T. maritimum* en salmónidos (Van Gelderen *et al.*, 2010). Las especies *T. dicentrarchi* y *T. maritimum* provocarían lesiones principalmente en cabeza, abdomen, aletas y branquias, y en estas dos últimas zonas es donde se suelen observar ulceraciones (Avendaño-Herrera *et al.*, 2016; Smage *et al.*, 2016). También pueden ocurrir infecciones sistémicas donde las lesiones primarias actuarían como una puerta de ingreso de las bacterias al torrente sanguíneo (Frisch *et al.*, 2018).

3.- Medidas de control y tratamientos

Dado que las lesiones causadas por *Tenacibaculum spp.*, son mayoritariamente externas, es posible que el tratamiento con antibióticos no sea del todo exitoso. Una medida que sí podría tener un efecto positivo es la detección temprana y la consecuente extracción de los peces con lesiones macroscópicas, con lo cual se puede atenuar la transmisión de la infección (Olsen *et al.*, 2019). En cuanto a las medidas profilácticas, en el caso de *T. maritimum*, Avendaño-Herrera (2005) recomendó el uso de H₂O₂ a una concentración de 240 ppm solo como método de desinfección general para tratar el agua de cultivo y la superficie de los estanques antes de la introducción de peces. También se puede evitar la aparición de brotes o se puede reducir la incidencia de la enfermedad controlando la densidad de los peces, y en consecuencia, reduciendo las condiciones de estrés, las cuales probablemente han hecho que el salmón sea más susceptible a la infección por *T. dicentrarchi* (Klakegg *et al.*, 2019). Debido a la ascendencia común que comparten la mayoría de los aislados de las especies de *Tenacibaculum* –excluyendo a *T. maritimum* (Olsen *et al.*, 2017)–, existe la expectativa de que *Tenacibaculum spp.* podría compartir algunas características, incluida la virulencia o los determinantes antigénicos, lo cual podría facilitar el desarrollo de una vacuna de amplio espectro contra diferentes cepas de *Tenacibaculum* (Klakegg *et al.*, 2019). En la actualidad, existe una vacuna inactivada disponible para prevenir la mortalidad en rodaballo, causada por *T. maritimum*, comercializada por la empresa Hipra como IcthiavacTM. Sin embargo, la diversidad serológica observada indica que la vacuna desarrollada para rodaballo podría no ser efectiva para prevenir la tenacibaculosis en otras especies de peces (Avendaño- Herrera, 2005).

4.- Vacunas contra *Tenacibaculum* en el salmón del Atlántico

En los años 1990 se probó una vacuna contra la tenacibaculosis en el salmón del Atlántico con resultados inconsistentes (Sundell, *et al.*, 2014). En un estudio reciente se logró una protección eficiente (porcentaje relativo de supervivencia (RPS) = 80%) posterior a la inmunización intraperitoneal del salmón del Atlántico utilizando dicha vacuna (Van Gelderen *et al.*, 2009). Posteriormente, fue reportado un modelo de infección reproducible para el salmón del Atlántico utilizando una cepa virulenta de *T. maritimum* y un tiempo de desafío de 1 hora (Van Gelderen *et al.*, 2010). El modelo sugerido puede usarse para medir la eficacia de futuros programas de vacunación.

En el año 2018, se realizó la evaluación de una vacuna inactivada de células completas de *T. finnmarkense*. Se produjeron dos vacunas monovalentes: *T. finnmarkense* cepa HFJT con alto contenido de antígeno y *T. finnmarkense* cepa HFJT con bajo contenido de antígeno. No hubo diferencias en la mortalidad entre los peces vacunados y control en ninguno de los grupos. Aunque una vacuna inactivada de células completas induce una respuesta de anticuerpos, no parece ofrecer protección contra la tenacibaculosis inducida por una infección en baño (Smage *et al.*, 2018).

La vacuna administrada vía intraperitoneal puede inducir una variedad de efectos secundarios que incluyen cambios patológicos relativamente moderados en la cavidad abdominal, los cuales pueden persistir hasta el momento de la cosecha (Mutoloki *et al.*, 2004); además de una tasa de crecimiento deficiente, disminución de la calidad del canal, deformidades de la columna, uveítis y reacciones autoinmunes sistémicas (Midtlyng *et al.*, 1996; Koppang *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2006; Aunsmo *et al.*, 2008; Haugarvoll *et al.*, 2010; Bjørge *et al.*, 2011). En la publicación de Midtlyng *et al.* (1996) se presenta un sistema de puntuación para evaluar las lesiones causadas por la administración intraperitoneal de vacunas que contienen adyuvantes en peces (puntuación de Speilberg). Estos efectos secundarios pueden manifestarse en el pez como depósitos de melanina, granulación fibrosa y adherencias de leves a graves entre órganos internos o entre los órganos y la pared peritoneal (Mutoloki *et al.*, 2004). Es probable que la vacunación esté asociada con un grado de estrés y deterioro físico leve y del bienestar de los peces, sin embargo, constituye simultáneamente una alternativa para el control de enfermedades (Pettersen, 2013).

En el año 2019 el laboratorio FAV (Puerto Montt, Chile) generó un prototipo de vacuna inyectable contra *T. dicentrarchi*, la cual no ha sido evaluada en términos de su seguridad y eficacia. De esta forma, la evaluación de los efectos secundarios y el impacto en la mortalidad frente a la infección con la bacteria constituyen un paso clave para que dicha vacuna pueda ser aplicada como medida profiláctica en la industria.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la seguridad y eficacia de un prototipo de vacuna contra *Tenacibaculum dicentrarchi* en dosis simple y doble bajo un esquema de vacunación simultánea con otras vacunas comerciales aplicada en juveniles del salmón del Atlántico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la seguridad del prototipo de vacuna contra *T. dicentrarchi* en juveniles de salmón del Atlántico.
- 2.- Determinar la presencia de adyuvante mineralizado en juveniles del salmón del Atlántico bajo un esquema de vacunación.
- 3.-. Comparar la supervivencia entre distintos protocolos de vacunación en juveniles del salmón del Atlántico desafiados experimentalmente contra *T. dicentrarchi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Peces

Para el presente estudio, se realizó un ensayo experimental donde se utilizaron 948 peces juveniles, de la especie salmón del Atlántico, con un peso promedio de 50 grs., los cuales fueron suministrados por la empresa Cooke Aquaculture Chile. El total de peces se sometió a evaluación de los posibles efectos secundarios de un prototipo de vacuna contra *T. dicentrarchi*, el cual tuvo una duración de 90 días y fue realizado en las dependencias de Aquagestión S. A., en la sala experimental Clarkii, Puerto Varas, Chile. La vacuna fue aplicada por vía intraperitoneal como una solución inyectable, la cual ha sido fabricada en el Laboratorio FAV S.A. Los peces se mantuvieron en dos estanques de 2,5 m³, a una temperatura promedio de 15 °C, con un porcentaje de saturación de oxígeno entre un 80 - 120% y con un sistema de recirculación de agua dulce (0 ppt) e ingreso de agua fresca de 2 L/min.

Vacuna y vacunación

Se vacunó un total de 948 peces, en la unidad experimental. La vacuna contra *T. dicentrarchi* fue aplicada por vía intraperitoneal (IP) como una solución inyectable, la cual fue fabricada en el Laboratorio FAV S.A.

Además de la aplicación de la vacuna contra *T. dicentrarchi*, se aplicaron a los peces otros tratamientos (IP) diferentes con pistola auto recargable; con base en esto, los peces fueron divididos en ocho grupos experimentales. Los grupos fueron divididos en cuatro correspondientes a vacunación con dosis simple y cuatro con dosis doble (Tabla 1). Para los grupos inoculados con una dosis simple (0,1 ml/pez) se vacunaron 102 peces por cada grupo experimental. Para los grupos inoculados con una dosis doble (0,2 ml/pez), fueron vacunados 90 peces por cada grupo.

Tabla 1: Descripción de los grupos experimentales.

Grupo	Tratamiento/ Vacunas	Dosis ml/pez	Vía aplicación	Nº peces
VE ¹ Simple	0,1ml LiVac® + 0,1ml Alpha Ject® 5.1.	0,2	IP	102
VE ¹ Doble	0,2ml LiVac® + 0,2ml Alpha Ject® 5.1.	0,4	IP	90
AT ² Simple	0,1ml autovacuna contra <i>T. dicentrarchi</i> .	0,1	IP	102
AT ² Doble	0,2ml autovacuna contra <i>T. dicentrarchi</i> .	0,2	IP	90
C ³ Simple	0,1 ml PBS Control.	0,1	IP	102
C ³ Doble	0,2ml PBS Control.	0,2	IP	90
AT+VE ⁴ Simple	0,1ml LiVac® + 0,1ml Alpha Ject® 5.1 + 0,05ml autovacuna contra <i>T. dicentrarchi</i> .	0,25	IP	102
AT+VE ⁴ Doble	0,2 ml LiVac® + 0,2 ml Alpha Ject® 5.1 + 0,1 ml autovacuna contra <i>T. dicentrarchi</i> .	0,5	IP	90

¹ Vacunación estándar

² Autovacuna contra *Tenacibaculum dicentrarchi*

³ Control

⁴ Autovacuna contra *Tenacibaculum dicentrarchi* + Vacunación estándar

Para los grupos VE¹ simple y VE¹ doble, el tratamiento incluyó 2 vacunas en un mismo pez, la vacunación se realizó de forma tradicional, aplicando cada vacuna por separado tanto LiVac® como Alpha Ject® 5.1. Los grupos AT² simple y AT² doble, fueron inoculados con la autovacuna para *T. dicentrarchi* y los grupos C³ simple y C³ doble fueron inoculados con PBS. Posteriormente, fueron vacunados los peces correspondientes a los grupos AT+VE⁴ simple y AT+VE⁴ doble, cuyo tratamiento lleva 3 vacunas en un mismo pez. Esto se realizó aplicando cada vacuna por separado (LiVac®, Alpha Ject® 5.1 y autovacuna contra *T. dicentrarchi*).

Posterior a la vacunación de cada grupo experimental de peces, estos fueron marcados con elastómeros de colores en su mandíbula, para diferenciar a cada grupo vacunado dentro del mismo estanque.

Evaluación efectos secundarios

Para medir la seguridad de la vacuna, se realizaron las observaciones de los posibles efectos secundarios en los peces según el criterio de la escala de Speilberg, a través de tres muestreos realizados a las 450 UTAs, 900 UTAs y 1350 UTAs post vacunación. Para esto, se consideró un tamaño de muestra de treinta peces sacrificados por cada tratamiento en cada muestreo, el cual ha sido estimado considerando un intervalo de confianza de un 95% con una potencia $> 80\%$ y una diferencia de un 10% en la curva de mortalidad.

1. Adherencia. Para la adherencia se consideraron 3 parámetros:

1.1 Región de la adherencia y severidad de la lesión

1.2 Presencia de melanosis

1.3 Presencia de granuloma

1.1 La región en donde se localiza la adherencia en la cavidad abdominal, fue clasificada como: Región 1, dorso craneal; Región 2, caudal; y Región 3, ventrocraneal (incluye el sitio de la inyección). Luego, se evaluó la severidad de la lesión (adherencia) con un *score* del 0 al 6, siendo 0 ausencia de adherencia; 1, adherencias muy pequeñas; 2, adherencias menores; 3, adherencias moderadas; 4, adherencia mayor con granuloma; 5, extensas adherencias que afectan casi todos los órganos internos; 6, adherencia incluso mayor, que se grafica con un daño completo de la carcasa (Anexo 1, Tabla 2: Score de adherencias en cavidad abdominal).

1.2 Presencia de melanosis: Se clasificó mediante el examen macroscópico de los órganos abdominales, según el *score* de melanización en la región abdominal, adoptando valores del 0 al 3, siendo 0 ausente; 1 leve; 2 moderado y 3 severa (Anexo 2, Tabla 3: Clasificación de Melanosis).

1.3 Presencia de granuloma: se realizó un análisis macroscópico para su identificación. Granuloma, se definió según ictiopatología, como una lesión nodular tradicionalmente blanca o amarilla que podría tener una consistencia dura o hasta calcificada (Noga, 1989). Su formación se explica por la presencia local de un agente causal insoluble (Roberts, 1978) y también como una lesión de efectos secundarios frente a la aplicación de una vacuna (Midtlyng *et al.*, 1996). En caso de observar su presencia, se tomaron muestras para un

análisis histopatológico como acción confirmatoria. Se clasificó la presencia de un granuloma desde el 0 al 3, siendo 0 ausente; 1 pequeño; 2 moderado y 3 severo (Anexo 3, Tabla 4: Clasificación de granuloma).

Desafío experimental con *Tenacibaculum dicentrarchi*

Para medir la eficacia de la vacuna contra *T. dicentrarchi*, se llevó a cabo el siguiente desafío, en el cual se utilizaron 210 juveniles (130 gr) del salmón del Atlántico previamente vacunados, pertenecientes al grupo de dosis simple: AT² (n=35), C³ (n=35) y AT+VE⁴ (n=35). Con respecto a la dosis doble se desafió al grupo: AT² (n=35), C³ (n=35) y AT+VE⁴ (n=35). Treinta y cinco peces fueron distribuidos aleatoriamente en cada una de las seis unidades de estanques (600 L). Previo a realizar la infección experimental, los peces fueron aclimatados por 14 días bajo temperatura constante (12°C), salinidad agua de mar (32 ppt) y a una saturación de oxígeno mayor a 80%. Durante las 48 horas previas al desafío los peces fueron sometidos a ayuno. El día del desafío los ejemplares fueron anestesiados por medio de acuestrol (isogenol 50%) con una cantidad de 17mg/dl y se redujo el volumen del agua a la mitad, para realizar la infección mediante inmersión. Para ello se utilizó una concentración de 2×10^6 UFC/ml de la cepa *T. dicentrarchi* perteneciente al laboratorio FAV. Los peces permanecieron durante 5 horas a flujo estático con aire constante, para mantener el oxígeno en 80%. Posteriormente, pasaron a estanques en sistema recirculación en agua de mar con recambio en el estanque de 15 L/min por estanque. Por último, se realizó la realimentación de los ejemplares y se procedió a realizar el registro diario de las mortalidades en cada unidad de estanque hasta el día 7 post-desafío.

Análisis Estadístico

Se analizaron las variables adherencia y melanosis, utilizando la prueba de Fisher y Chi cuadrado, para comparar el comportamiento de los peces frente a las diferentes inoculaciones. Se consideró un valor de $\alpha < 0,05$ como significativo. Se comprobó, mediante un análisis separado de las vacunas dosis simple y de las vacunas dosis doble, a través de la prueba exacta de Fisher, si existen diferencias estadísticamente significativas para cada grupo

vacunado respecto del grupo control. Para evaluar la eficacia de la vacuna se realizó un análisis de curva de supervivencia utilizando la prueba estadística no paramétrica de Kaplan-Meier considerando los registros de mortalidades diarias registrados entre el día 0 y 8 días post infección contra *T. dicentrarchi* (prueba log-rank).

RESULTADOS

1. Objetivo 1: Evaluación de la seguridad

Se realizó la evaluación de los efectos secundarios: grado de adherencias, melanosis, granulomas y adyuvante mineralizado en la cavidad intra-abdominal posterior a la aplicación intraperitoneal de la autovacuna contra *T. dicentrarchi* y de los otros grupos de vacunación anteriormente detallados, en peces vacunados y controles. Los efectos secundarios fueron clasificados según la escala o criterio de Spielberg y se utilizó la Prueba exacta de Fisher aplicada a los datos de los efectos secundarios con un valor $p < 0,05$ como significativo.

1.1 Evaluación de adherencias

Las adherencias observadas en los grupos del ensayo estuvieron entre el rango de puntaje 0 y 2, en una escala de 0-6.

Durante el primer muestreo (450 UTAs) de los grupos vacunados con dosis simple, un 4% de los animales del grupo control presentó adherencias grado 1, cuyo resultado es similar al obtenido en el grupo de VE con un 7% de peces con adherencias grado 1. El mayor porcentaje de adherencias corresponde al grupo vacunado con AT, el cual presentó un 77% de peces con adherencia grado 1 y luego el grupo AT+VE con un 56%. En cuanto a las dosis dobles durante el primer muestreo, el grupo control no presentó adherencias, el grupo AT nuevamente tuvo los mayores porcentajes de peces con adherencias grado 1 con un 80% y de peces con adherencias grado 2 con un 10%. El grupo AT+VE presentó un 75% de peces con adherencias grado 1 y además se encontró un 4% de peces con adherencias grado 2.

En el segundo muestreo (900 UTAs), en los grupos vacunados con dosis simple, el grupo control no presentó adherencias, el grupo VE presenta un 12% de adherencias grado 1, el grupo AT presentó la mayor cantidad de peces con adherencias grado 1 con un 83% y un 3% de peces con adherencia grado 2 y el grupo AT+VE un 57% de adherencia grado 1. En cuanto a los grupos vacunados con dosis doble, el grupo control no presenta adherencias. El grupo VE presenta un 17% de adherencias grado 1 y el grupo AT muestra el mayor porcentaje de adherencia grado 1 con un 97% y el 3% de los peces con adherencias grado 2, el grupo AT+VE obtuvo el mismo porcentaje de adherencias grado 2 y un 80% de peces con adherencia grado 1.

En el tercer muestreo (1350 UTAs), en cuanto a las dosis simples, el grupo control no presentó adherencias y los demás grupos presentan adherencias grado 1 en los siguientes porcentajes: el grupo VE presenta un 13%, el grupo AT muestra el mayor porcentaje con un 59% y el grupo AT+VE presenta un porcentaje similar con un 53%. En cuanto a los resultados en las dosis dobles, muestran nuevamente al grupo control sin adherencias y los demás grupos presentan adherencias grado 1 en los siguientes porcentajes: grupo VE un 15%, el grupo que presenta el mayor porcentaje es AT con un 70%, cuyo porcentaje es similar al obtenido por el grupo AT+VE, el cual presentó un 69%.

Los análisis estadísticos sobre los resultados de adherencia indican valores p significativos durante los tres muestreos solo en las adherencias grado 1. El único valor de adherencia grado 1 que no muestra diferencias significativas respecto al grupo control, es el grupo de vacunación VE en la dosis simple durante el primer muestreo (450 UTAs), indicando que tuvo un nivel de adherencia similar al grupo control.

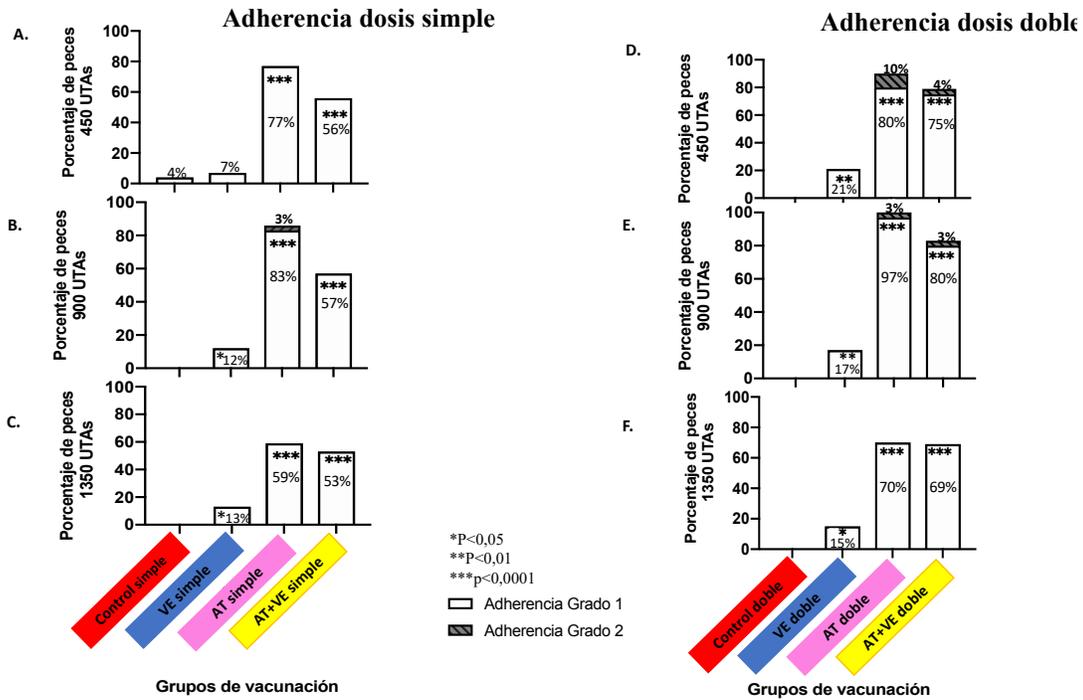


Figura 1. Los gráficos A, B y C corresponden a los grupos de vacunación dosis simple y los gráficos D, E y F corresponden a las dosis dobles, donde se muestran los porcentajes de peces con adherencia en la cavidad peritoneal de cada grupo de vacunación en los muestreos realizados a las 450, 900 y 1350 UTAs, respectivamente. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo de vacunación respecto del grupo control y denotan: * P <0,05; ** P <0,01 y *** P < 0,0001. Control, VE: Vacunación estándar, AT: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* y AT+VE: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* + Vacunación estándar.

1.2 Melanosis

Las melanosis observadas en los peces estuvieron entre el rango 0 y 1. En el primer muestreo (450 UTAs), en relación a los grupos con dosis simple, los grupos presentaron melanosis grado 1 en los siguientes porcentajes: el grupo control presentó un 41%, el grupo VE presentó el menor porcentaje con un 33%, el grupo AT+VE un 47% y por último el grupo AT fue el cual presentó el mayor porcentaje con un 54%. Los grupos

correspondientes a las dosis dobles presentaron melanosos grado 1 en los siguientes porcentajes: el grupo control presentó un 40%, el grupo VE presentó un 46%, el grupo AT presentó un 48%, por último, el grupo AT+VE presentó un 47%.

En el segundo muestreo (900 UTAs), en relación a los grupos dosis simple, los grupos presentaron melanosos grado 1 en los siguientes porcentajes: el grupo control presentó un 87%, el grupo VE un 86%, el grupo de vacunación AT+VE presentó un 90% y por último el grupo AT presentó el mayor porcentaje con un 97%. En los grupos dosis doble pertenecientes al segundo muestreo, los grupos presentaron melanosos grado 1 en los siguientes porcentajes: el grupo control un 83%, el grupo VE un 88%, el grupo AT+VE un 97% y el grupo AT presentó el mayor porcentaje con un 100% de melanosos grado 1.

En el último muestreo (1350 UTAs), en relación a los grupos con dosis simple, los grupos presentaron melanosos grado 1 en los siguientes porcentajes: el grupo control presentó un 65%, el grupo VE presentó un 74%, el grupo AT+VE y el grupo AT presentaron el mismo porcentaje con un 82%. De los resultados correspondientes a los grupos con dosis doble, los grupos presentaron melanosos grado 1 en los siguientes porcentajes: el grupo control presentó un 61%, el grupo VE y el grupo AT presentaron los mismos porcentajes con un 70%, el grupo AT+VE presentó el mayor porcentaje con un 96%.

Los análisis estadísticos para los resultados de melanosos indican valores $p > 0,05$ para las vacunas en el primer muestreo (450 UTAs), indicando que no hay diferencias significativas respecto al grupo control. En el segundo muestreo (900 UTAs) aparecen diferencias significativas en los grupos de vacunación AT donde la dosis doble presenta un valor $p < 0,0001$, obteniendo la mayor significancia y la dosis doble del grupo de vacunación AT+VE es el cual presenta el segundo valor p más significativo. En el tercer muestreo (1350 UTAs) aparecen diferencias significativas en la dosis simple del grupo de vacunación AT y en ambas dosis del grupo AT+VE, siendo la dosis doble la cual tiene un valor altamente significativo $p < 0,0001$, respecto del grupo control.

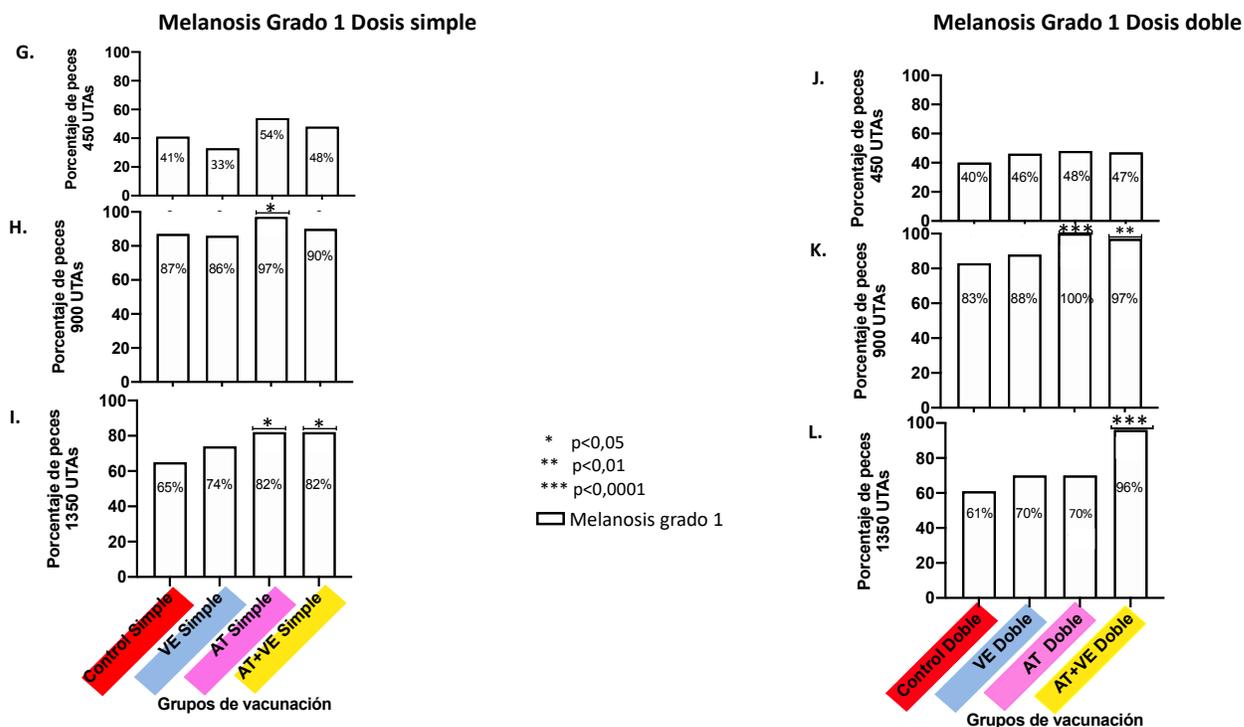


Figura 2. Los gráficos G, H y I corresponden a los grupos vacunados con dosis simple y los gráficos J, K y L a los grupos vacunados con dosis doble, muestran los porcentajes de peces con melanosis en la cavidad peritoneal de cada grupo de vacunación en los muestreos realizados a las 450, 900 y 1350 UTAs, respectivamente. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo de vacunación respecto del grupo control y denotan: * P <0,05; ** P <0,01 y *** P < 0,0001. Control, VE: Vacunación estándar, AT: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* y AT+VE: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* + Vacunación estándar.

1.3 Granuloma

No hubo hallazgos de granulomas en las necropsias realizadas durante los muestreos de los posibles efectos secundarios.

Objetivo 2: Presencia de adyuvante mineralizado

Existen valores significativos para el grupo AT y para el grupo AT+VE en comparación con el control y respecto al grupo VE, a las 450, 900 y 1350 UTAs, lo que se traduce en la existencia de diferencias significativas de dichas vacunas respecto del grupo control, como también del grupo VE.

En el primer muestreo (450 UTAs) los grupos vacunados con dosis simple que presentaron adyuvante mineralizado en la cavidad peritoneal fueron el grupo de AT con un 35% y el grupo AT+VE con un 22%. En relación a los grupos vacunados con dosis doble, el grupo AT+VE presentó un 39% y el grupo AT presentó un 37%.

En el segundo muestreo (900 UTAs) en relación a los grupos vacunados con dosis simple, el mayor porcentaje de peces con adyuvante mineralizado fue AT con un 83%, el grupo AT+VE presentó un 33%. De los grupos vacunados con dosis doble, el grupo AT vuelve a presentar el mayor porcentaje de adyuvante mineralizado con un 93% y el grupo AT+VE presentó un 73%.

En el último muestreo (1350 UTAs), de los grupos vacunados con dosis simple, AT presenta el mayor porcentaje de adyuvante mineralizado con un 21% y el grupo AT+VE un 5%. De los grupos vacunados con dosis doble, el único que presentó presencia de adyuvante mineralizado en la cavidad abdominal fue el grupo AT con un 18% del total de peces. El grupo VE presentó un 0% de adyuvante mineralizado durante el primer, segundo y tercer muestreo.

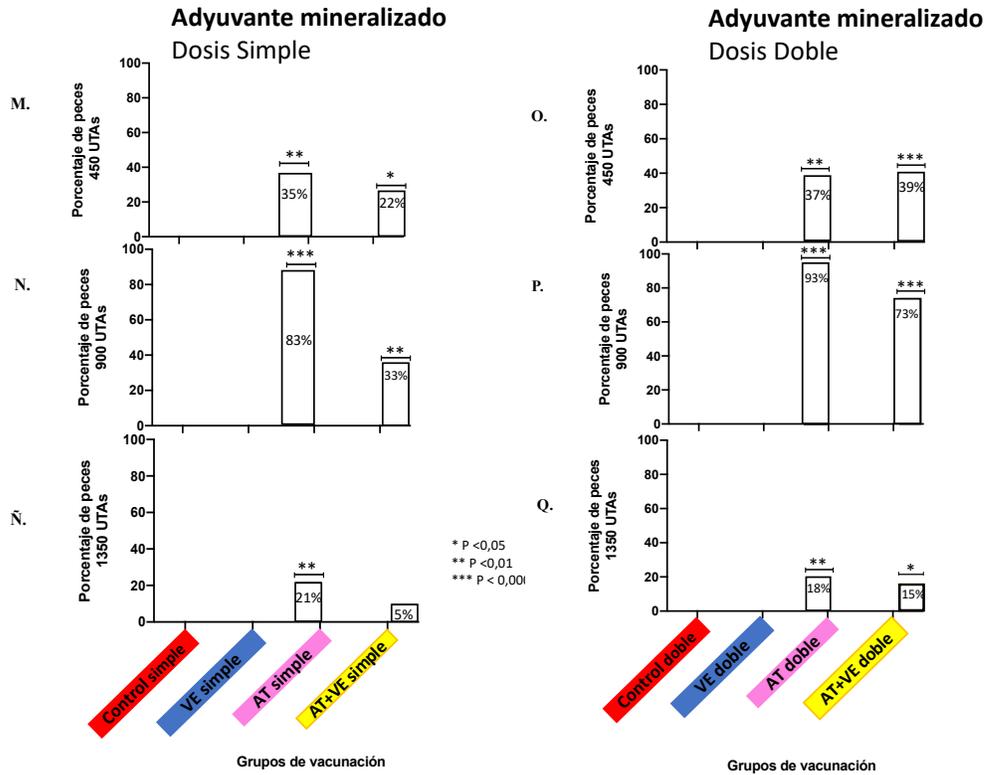


Figura 3. Los Gráficos M, N y Ñ correspondientes a las dosis simples, y los gráficos O, P y Q correspondientes a las dosis dobles, muestran los porcentajes de peces con adyuvante mineralizado en la cavidad peritoneal de cada grupo de vacunación en los muestreos realizados a las 450, 900 y 1350 UTAs, respectivamente. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo de vacunación respecto del grupo control y denotan: * P < 0,05; ** P < 0,01 y *** P < 0,0001. Control, VE: Vacunación estándar, AT: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* y AT+VE: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* + Vacunación estándar.

Objetivo 3: Evaluación Eficacia

3.1 Desafío experimental

Durante los 8 días del experimento se alcanzó un número máximo de 102 muertos/día y un promedio de 29 peces muertos por día. Las mayores mortalidades, ocurren el primer y segundo día del desafío con 65 y 102 peces, respectivamente.

El análisis de las curvas de supervivencia se realizó por el método de Kaplan-Meier y a través de la prueba log-rank se evaluaron las diferencias significativas entre la condición control (grupo control vacunado con PBS) en dosis simple 0,1ml y dosis doble 0,2 ml, en relación con los respectivos grupos de vacunación.

El análisis se realizó de forma separada, evaluando a la condición control simple, respecto a los grupos AT y AT+VE simple, los resultados muestran que la curva de supervivencia es de un 0% para el grupo control simple, 5,26% para el grupo AT simple y de 10,26% para el grupo AT+VE simple. Existen diferencias estadísticamente significativas para el grupo vacunado con AT+VE simple, respecto a la condición control simple.

Al considerar el análisis entre cada grupo de vacunación dosis doble respecto del grupo control doble, se obtiene una curva de supervivencia de 6.8% para el grupo control dosis doble, un 22,9% para el grupo de vacunación AT doble y un 15,8% para el grupo de vacunación AT+VE doble. Se observan diferencias estadísticamente significativas para el grupo de vacunación AT doble y para el grupo de vacunación AT+VE doble, respecto a la condición control dosis doble.

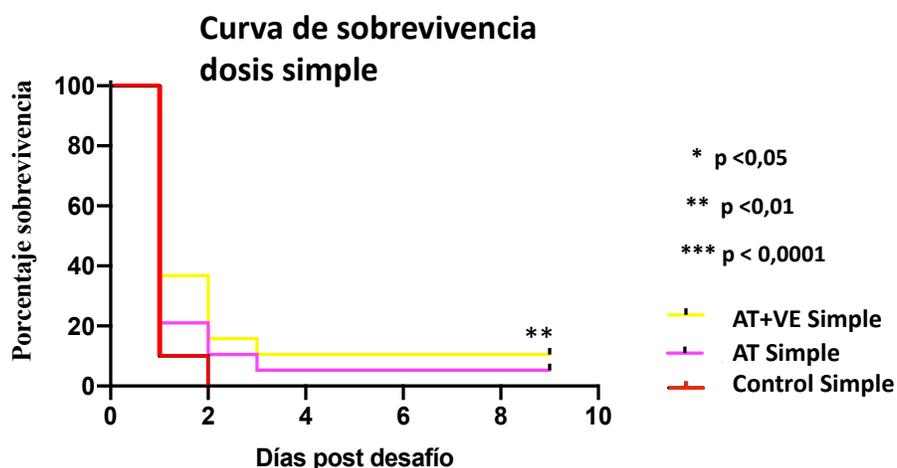


Figura 4. Curva de supervivencia de los grupos vacunados con dosis simple y desafiados contra *T. dicentrarchi*. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control simple y denotan * P < 0,05; ** P < 0,01 y *** P < 0,0001. Control,

VE: Vacunación estándar, AT: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* y AT+VE: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* + Vacunación estándar.

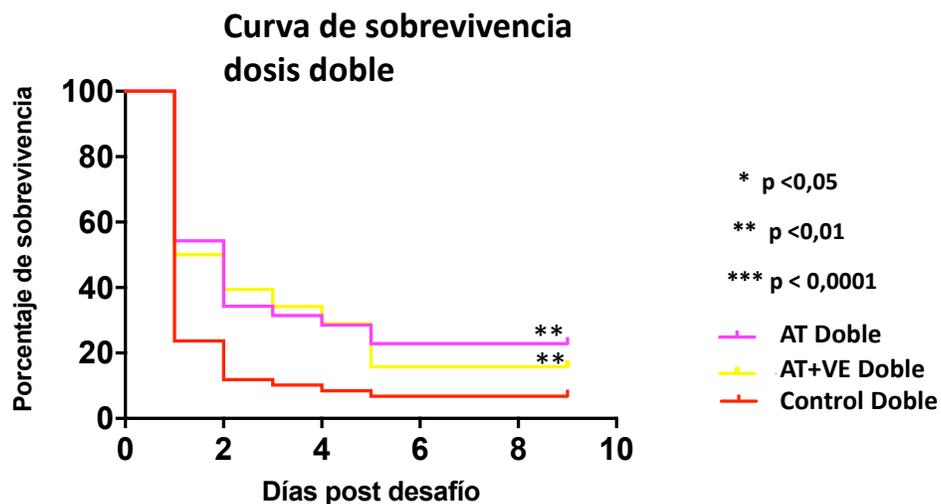


Figura 5. Curva de sobrevivencia de los grupos vacunados con dosis doble y desafiados contra *T. dicentrarchi*. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control doble y denotan * P < 0,05; ** P < 0,01 y *** P < 0,0001. Control, VE: Vacunación estándar, AT: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* y AT+VE: Autovacuna contra *T. dicentrarchi* + Vacunación estándar.

DISCUSIÓN

Actualmente en Chile la enfermedad emergente conocida como Tenacibaculosis ha cobrado gran relevancia situándose como la tercera causa de mortalidad para el salmón del Atlántico (Sernapesca, 2020). El control de enfermedades en la acuicultura se basa en la combinación de programas de prevención, uso de medicamentos aprobados y vacunas disponibles (Mukhtar *et al.*, 2016). Estas últimas, mejoran la respuesta inmune de los peces frente al patógeno y son la forma más efectiva de prevenir y controlar las enfermedades bacterianas en salmónidos, sin dejar residuos perjudiciales en el medio ambiente, ni la necesidad de utilizar un tiempo de resguardo (Ma *et al.*, 2019). Sin embargo, actualmente no existe una herramienta inmunoproláctica para esta enfermedad emergente, es por eso, que el laboratorio FAV elaboró una autovacuna de administración intraperitoneal, la cual por definición está preparada para las necesidades de una piscicultura específica a partir de cepas bacterianas aisladas en las mismas instalaciones. La eficacia satisfactoria de las autovacunas está documentada por estudios experimentales realizados en diferentes países del mundo (Pajdak *et al.*, 2017; Schulz *et al.*, 2020). En este estudio se evaluó la seguridad y eficacia de inmunización de una autovacuna contra *T. dicentrarchi*, así como la evaluación de dicha autovacuna en combinación con el esquema preventivo de vacunación más utilizado actualmente en condiciones comerciales “LiVac + Alphaject 5.1” (Flores-kossacka *et al.*, 2020), el cual es aplicado por la piscicultura que ha encargado el estudio, Cooke Aquaculture Chile S. A., teniendo como principal objetivo que dicha vacuna pueda ser incorporada y utilizada en la industria.

La seguridad de la vacunación tiene relación con la magnitud de la reacción que esta puede inducir en la cavidad abdominal. Los peces vacunados generan inflamación en el lugar de la inyección, produciendo adherencias y melanosis que se observan con frecuencia en los análisis macroscópicos *post mortem*. Sin embargo, se ha determinado en estudios anteriores que dichas lesiones deben ser leves, para evitar efectos adversos en el crecimiento a largo plazo de los peces (Mutoloki *et al.*, 2004; Jafelice, 2014).

Existe una correlación entre la magnitud de la respuesta inmune, adherencias y melanosis, ya que se sabe que después de la vacunación hay una afluencia de melanomacrófagos y de otras

células inmunes como resultado de una respuesta inmune normal (Haugarvoll *et al.*, 2006; Koppang *et al.*, 2008). Al momento de aplicar una vacuna se busca que exista un equilibrio entre el beneficio de la respuesta inmune y la aparición moderada de efectos secundarios.

Los resultados de seguridad de la vacuna contra *T. dicentrarchi* administrada por vía IP, revelaron la presencia de lesiones leves de adherencia y melanosis en el lugar de la inyección y regiones adyacentes en la cavidad peritoneal, sin hallazgos de granulomas en los muestreos realizados. Los resultados obtenidos determinan la seguridad de este prototipo de vacuna.

Refiriéndonos específicamente de las lesiones intraperitoneales asociadas a adherencias que se pueden encontrar entre órganos, o entre órganos y la pared abdominal, estas fueron leves en todos los grupos vacunados, correspondiendo a lesiones en su mayoría del grado 1, existiendo un pequeño porcentaje con lesiones grado 2 en los grupos AT y AT+VE. Todos los grupos de vacunación presentaron diferencias significativas en comparación al grupo control. Un resultado similar fue el publicado por Berg *et al.* (2012), en un estudio de efectos secundarios en salmón del Atlántico con la vacuna multivalente Norvax® Minova 6.

El grupo que presentó menores diferencias con el grupo control fue el grupo VE, siendo este resultado esperable al ser una vacuna probada y utilizada mayoritariamente en la acuicultura. Se identificó que el grupo de vacunación AT, presentó las mayores diferencias significativas respecto al control y en segundo lugar en el grupo de vacunación AT+VE, observando incluso, que en este grupo de vacunación simultánea hay una disminución del porcentaje de peces con adherencias. Estos resultados son consistentes con informes previos donde las vacunas de antígenos múltiples no mostraron desventajas sobre las vacunas menos complejas (Mutoloki *et al.*, 2004). Por último, es importante mencionar que la inyección IP de vacunas con dosis doble entregó mayores puntuaciones de Spielberg que la inyección de vacuna dosis simple, esta observación puede explicarse por la mayor cantidad de bacterinas y adyuvante en las dosis dobles (Midtlyng, 1996; Midtlyng *et al.*, 1996; Chalmers *et al.*, 2020), sin embargo, al ser lesiones leves estas no deberían ser visibles al momento de la cosecha.

El segundo efecto secundario analizado fue la melanosis, que corresponde a la pigmentación oscura en las vísceras y músculo como respuesta a los daños tisulares o condiciones inflamatorias locales producidas por la vacunación IP en salmónidos (Berg *et al.*, 2012), la

cual a sido sugerida como una de las causas principales que afecta a la calidad de los filetes (Koppang *et al.*, 2005; Fagerland *et al.*, 2013). En este estudio, la presencia de melanina en los órganos y en peritoneo llegó al grado 1, correspondiente a melanosis menormente visible y fácilmente removida. Cabe señalar que se observaron mayores porcentajes de peces con melanosis en los grupos inyectados con las vacunas que en el grupo de control con PBS, lo que coincide con investigaciones anteriores (Chalmers *et al.*, 2020). Además, solo se encontraron diferencias significativas durante el segundo y el tercer muestreo, entre los grupos vacunados y el grupo control. El grupo VE no presentó diferencias significativas respecto al grupo control y el grupo AT fue el que presentó las diferencias mayormente significativas, salvo en el último muestreo donde AT+VE presentó la mayor diferencia respecto al control. En este estudio, todos los grupos, incluido el control, aumentaron su porcentaje de peces con melanosis desde el primer al último muestreo y además no existieron diferencias marcadas entre los resultados obtenidos con las dosis simple y dosis doble. En consecuencia, podríamos sugerir que este efecto está asociado principalmente al proceso de inyección.

Cabe mencionar que el adyuvante utilizado en la vacunación tiene un rol fundamental, ya que es una sustancia que se agrega a la vacuna para potenciar y modular la inmunogenicidad del antígeno (Batista-Duharte *et al.*, 2014), requiriéndose la combinación adecuada entre antígeno y el adyuvante seleccionado para asegurar una respuesta inmune óptima. Existen diferentes tipos de adyuvantes como son las sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, agonistas de TLR4 y TLR9, virosomas y liposomas, que se incorporan en las formulaciones de vacunas autorizadas (Garçon *et al.*, 2018). Estos funcionan a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) activando a los receptores de reconocimiento de patógeno (PRR), un ejemplo de ellos son los TLR, los cuales unidos a estos ligandos del patógeno pueden desencadenar distintos tipos de respuesta inmune (Garçon *et al.*, 2018). En esta investigación no contamos con la información del adyuvante utilizado en la autovacuna al ser secreto comercial, no obstante, los adyuvantes de referencia para peces utilizados en las vacunas inyectables corresponden a emulsiones de

agua en aceite (aceite metabolizable), siendo los más comunes Montanide ISA 763 AVG, Montanide ISA 761 VG, pertenecientes a la empresa Seppic¹.

Los remanentes de adyuvante mineralizado encontrados en los grupos analizados posterior a la vacunación, indican diferencias significativas en el grupo AT y en el grupo de vacunación AT+VE, respecto del grupo control durante los tres muestreos realizados. No obstante, el grupo VE no presenta presencia de depósitos en la cavidad peritoneal. Estas observaciones sugieren que un adyuvante a base de aceite mineral ha sido utilizado en la formulación de la autovacuna, en vez de un aceite metabolizable o biodegradable. Aunque el porcentaje de peces con adyuvante mineralizado fue disminuyendo considerablemente desde el primer al último muestreo, su presencia en la cavidad peritoneal podría continuar generando efectos secundarios a medida que el pez continúa su crecimiento. Esto también ha sido observado en formulaciones de vacunas similares a base de aceite mineral en otros peces salmónidos (Villumsen *et al.*, 2017) y en estudios con adyuvante incompleto de Freund, donde se advierte que estos depósitos contribuyen a la reactogenicidad general de adyuvante (Garçon *et al.*, 2018), por lo que sería recomendable formular la autovacuna con los adyuvantes anteriormente mencionados.

Para evaluar la eficacia de los grupos vacunales AT y AT+VE se realizó un desafío experimental contra el patógeno y un posterior análisis de sobrevivencia, cuyos mejores resultados estuvieron en las dosis dobles con un 15,8% en el grupo AT+VE y 22,9% en la Autovacuna, demostrando de esta manera que la inmunización IP en ambos grupos, en dosis simple y doble, no proporcionó protección suficiente a las 1350 UTAs post vacunación.

La alta mortalidad del grupo control en las primeras 24 horas del desafío, podría estar subestimando la eficiencia de la vacuna y nos lleva a plantear las hipótesis de que la autovacuna fue evaluada con un aislado de alta letalidad o que se utilizó una concentración del inóculo más elevada que la óptima (por ejemplo, LD₅₀). Frente a lo anterior, Avendaño-Herrera *et al.*, 2016, describió un ensayo de virulencia, de desafío en baño con *T. dicentrarchi* cepa TdChD05 aislada en Chile, la cual causó 65% de mortalidad en el salmón del Atlántico

¹ Comunicación personal: Sergio Cabral. Representante Seppic, Brasil. 2021.

en 24 horas, concluyendo además que la enfermedad se reproduce en salmón del Atlántico después de sólo una hora de inmersión con *T. dicentrarchi*, mostrando su alto nivel de virulencia. Por otro lado, en un desafío realizado por Van Gelderen *et al.* (2009), contra *T. maritimum* en salmón del Atlántico se demostró una protección significativa en los peces inyectados con una vacuna en comparación con todos los demás grupos, donde los valores de RPS (porcentaje relativo de supervivencia) se calcularon en 79.6% en la dosis simple y 78.0% en la dosis doble, utilizando una dosis infectante en concentraciones similares que el estudio actual, 1.0×10^6 UFC/ml, calculada para generar una tasa de mortalidad del 60% en los grupos no vacunados en base a estudios previos de patogenicidad. Sin embargo, la comparación de resultados con otros trabajos presentes en la literatura es compleja, debido a que la gran mayoría de ellos realiza desafíos utilizando aislados noruegos, los cuales difieren de los nacionales tanto en su virulencia como en su componente genético y letalidad (Caruffo, 2012). A la fecha, no se ha encontrado en la literatura la evaluación de la eficacia de formulaciones vacunales frente a *T. dicentrarchi*, por lo que los resultados de eficacia obtenidos en el presente trabajo corresponden a los primeros descritos.

El trabajo futuro debe ir orientado en la reevaluación de la eficacia posterior al desafío, por lo que sería necesario un nuevo estudio que incluya un pre-desafío para el cálculo de una dosis letal 50. También se podría incorporar la determinación de la respuesta de anticuerpos y evaluar la respuesta inmune en el salmón vacunado a través de marcadores genéticos. Finalmente, la eficacia de la vacuna evaluada en el presente trabajo debería ser determinada en condiciones de cultivo en mar.

CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró que la autovacuna contra *T. dicentrarchi* presenta niveles de seguridad adecuados. La administración vía intraperitoneal de la autovacuna afectó levemente a los peces, alcanzando los menores parámetros en la escala de Spielberg. Sin embargo, la autovacuna sola y en combinación con las vacunas comerciales (LiVac® + Alpha Ject® 5.1), presentó limitaciones en términos de la eficacia, reflejada en una alta mortalidad durante un desafío de infección experimental.

A la luz de los resultados obtenidos en esta investigación, se desprende que para que dicha vacuna sea incorporada en los programas preventivos del país, sea necesario reevaluar la eficacia de la vacuna en condiciones experimentales, a través de un estudio futuro que incluya un pre-desafío y la evaluación de una dosis letal 50.

BIBLIOGRAFÍA

APABLAZA, P.; FRISCH, K.; BREVIK, Ø. J.; SMÅGE, S. B.; VALLESTAD, C.; DUESUND, H.; MENDOZA, J., NYLUND, A. 2017. Primary isolation and characterization of *Tenacibaculum maritimum* from Chilean Atlantic salmon mortalities associated with a *Pseudochattonella* spp. algal bloom. *J. Aquat. Anim. Health.* 29(3): 143–149.

ARRIAGADA, G.; HAMILTON-WEST, C.; NEKOUËI, O.; FOERSTER, C.; MÜLLER, A.; LARA, M.; GALLARDO-ESCÁRATE, C. 2019. *Caligus rogercresseyi* infestation is associated with *Piscirickettsia salmonis*-attributed mortalities in farmed salmonids in Chile. *Prev. Vet. Med.* 171: 104771.

AUNSMO, A.; GUTTVIK, A.; MIDTLYNG, P.J.; LARSEN, R.B.; EVENSEN, Ø.; SKJERVE, E.; 2008. Association of spinal deformity and vaccine-induced abdominal lesions in harvest-sized Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.* 31: 515-524.

AVENDAÑO-HERRERA R. 2005. Avances en el conocimiento del patógeno de peces *Tenacibaculum maritimum*: implicaciones en el diagnóstico y prevención de la enfermedad. Tesis doctor en ciencias biológicas. Santiago de Compostela, España. Universidad de Santiago de Compostela. 44 p.

AVENDAÑO-HERRERA, R.; TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B. 2006. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: A review. *Dis. Aquat. Org.* 71(3): 255-266.

AVENDAÑO-HERRERA, R., IRGANG, R., SANDOVAL, C., MORENO-LIRA, P., HOUEL, A., DUCHAUD, E., POBLETE-MORALES, M., NICOLAS, P., & ILARDI, P. 2016. Isolation, characterization and virulence potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid cultures in Chile. *Transbound Emerg Dis.* 63(2): 121-126.

BATISTA-DUHARTE, A.; LASTRE, M.; PÉREZ, O. 2014. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 32(2): 106–114.

BERG, A.; RØDSETH, O.M.; TANGERAS, A.; HANSEN, T. 2006. Time of vaccination influences development of adhesions, growth and spinal deformities in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms. Dis. Aquat. Org.* 69: 239-248.

BERG, A.; YURTSEVA, A.; HANSEN, T.; LAJUS, D.; FJELLDAL, P. G. 2012. Vaccinated farmed Atlantic salmon are susceptible to spinal and skull deformities. *J. Appl. Ichthyol.* 28: 446–452.

BRIDEL, S.; OLSEN, A.B.; NILSEN, H.; BERNARDET, JF.; ACHAZ, G.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; DUCHAUD, E. 2018. Comparative genomics of *Tenacibaculum dicentrarchi* and *Tenacibaculum finnmarkense* highlights intricate evolution of fish-pathogenic species. *Genome Biol. Evol.* 10(2): 452-457.

BJØRGE, M.H.; NORDGREEN, J.; JANCZAK, A.M; POPPE, T.; RANHEIM, B.; HORSBERG, T.E. 2011. Behavioural changes following intraperitoneal vaccination in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Appl. Anim. Behav. Sci.*133: 127-135.

CARUFFO, M. 2012. Evaluación de la inmunoprotección de una vacuna oral contra la anemia infecciosa del salmón y su efecto sobre la modulación del transcrito mx en salmón del atlántico (*Salmo salar*). Tesis de grado Médico Veterinario. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 30 pp.

CERDA, EDGARDO. 2019. Productividad y competitividad en la industria del salmón en Chile. Santiago, Chile. CIEPLAN-Universidad de Talca. CAF-Banco de Desarrollo de América Latina, 109; (978-956-204-086-0).

FAGERLAND, AS.; AUSTBØ, L.; FRITSVOLD, C.; ALARCON, M.; RIMSTAD, E.; FALK, K.; TAKSDAL, T.; KOPPANG, EO. 2013. Pathological pigmentation in cardiac tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with cardiomyopathy syndrome. *Vet Res.* 44: 107.

FAILDE, L.D.; LOSADA, A.P.; BERMÚDEZ, R.; SANTOS, Y.; QUIROGA, M. I. 2013. *Tenacibaculum maritimum* infection: Pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.) *Microb. Pathog.* 65: 82-88.

FLORES-KOSSACKA, C.; MONTERO, R.; KÖLLNER, B.; MAISEY, K. 2020. Chilean aquaculture and the new challenges: Pathogens, immune response, vaccination and fish diversification a Laboratorio de inmunología comparativa. *Fish Shellfish Immunol.* 98: 52–67.

FRISCH, K.; SMÅGE, S. B.; VALLESTAD, C.; DUESUND, H.; BREVIK, Ø. J.; KLEVAN, A.; OLSEN, R. H.; SJAATIL, S. T.; GAUTHIER, D.; BRUDESETH, B.; NYLUND, A. 2018. Experimental induction of mouthrot in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum maritimum* from Western Canada. *J. Fish Dis.* 41: 1247-1258.

GARÇON, N.; FRIEDE, M. 2018. Evolution of adjuvants across the centuries. In: Plotkin, S.; Orenstein, W.; Offit, P.; Edwards K. Plotkin's Vaccines (Seventh Edition). pp. 61-74.

HAUGARVOLL, E.; BJERKÅS, I.; SZABO, N.J.; SATOH, M.; KOPPANG, E. O. 2010. Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon. *Vaccine*. 28(31): 4961–4969.

HAUGARVOLL, E.; THORSEN, J.; LAANE, M.; HUANG, Q.; KOPPANG, E.O. 2006. Melanogenesis and evidence for melanosome transport to the plasma membrane in a CD83 teleost leukocyte cell line. *Pigment Cell Res.* 19(3):214-25.

JAFELICE, M.P. 2014. Effects of vaccination and dietary treatment on development and melanin deposition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Tesis magister en ciencias de la acuicultura. Universidad Noruega de Ciencias de la Vida. Oslo. 72p.

JAKOB, E., STRYHN, H., YU, J., MEDINA, M. H., REES, E. E., SANCHEZ, J., & ST-HILAIRE, S. 2014. Epidemiology of piscirickettsiosis on selected Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) saltwater aquaculture farms in Chile. *Aquaculture*. 433: 288-294.

KIRCHMAN, D. 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39(2): 91-100.

KLAKEGG, O.; ABAYNEH, T.; FAUSKE, A.K.; FULBERTH, M.; SORUM, H. 2019. An outbreak of acute disease and mortality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts in Norway caused by *Tenacibaculum dicentrarchi*. *J. Fish Dis.*:1-19.

KOPPANG, E. O.; HAUGARVOLL, E.; HORDVIK, I.; POPPE, T. T.; BJERKÅS, I. 2004. Granulomatous uveitis associated with vaccination in the Atlantic Salmon. *Vet. Pathol.* 41(2): 122–130.

KOPPANG, E. O.; SORUM, H.; THORSEN, J.; HUANG, Q.; RIMSTAD, E. 2008. Temperature and time induced expression of Tyr and Tyrp2/DCT in a salmon leukocyte cell line. *Pigm. Cell Melanoma R.* 21:253–253.

KOPPANG, E. O.; HAUGARVOLL, E.; HORDVIK, I.; AUNE, E.; POPPE, T. 2005. Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., white muscle. *J. Fish Dis.* 28: 13–22.

MA, J.; BRUCE, T.; JONES, E.; CAIN, K. 2019. A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms*. 7 (11): 569.

MIDTLYNG, P. J.; REITAN, L. J.; SPEILBERG, L. 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against furunculosis. Fish Shellfish Immunol. 6: 335–350.

MUKTAR, Y.; TESFAYE, S.; TESFAYE, B. 2016. Present status and future prospects of fish vaccination: A review. J. Veterinar Sci. Technol. 7: 2.

MUTOLOKI, S.; ALEXANDERSEN, S.; EVENSEN, O. 2004. Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. Fish Shellfish Immunol. 16: 633-644.

NOGA, E. J.; DYKSTRA, M. J.; WRIGHT, J. F. 1989. Chronic inflammation cells with epithelial cell characteristics in teleosts fish. Vet. Pathol. 26: 429-437.

OLSEN, A. B.; GULLA, A.; STEINUM, T.; COLQUHOUN, D.J.; NILSEN, H.K.; DUCHAUD, E. 2017. Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated with ulcers in sea-farmed fish in Norway. Vet Microbiol. 205: 39-45.

OLSEN, A. B.; POWELL, J.; SIAH, A.; COLQUHOUN, D.; AVENDAÑO-HERRERA, R. 2019. Tenacibaculosis. [en línea] 43-50 pp. In: Dale, O.B., Rodriguez, J.F., Macdonald, A. An overview of emerging diseases in the salmonid farming industry. Technical report. Elanco. <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2019/an-overview-of-emerging-diseases-in-the-salmonid-farming-industry-technical-report>>. [08-05-2020].

PAJDAK, J.; TERECH-MAJEWSKA, E.; PLATT-SAMORAJ, A.; SCHULZ, P.; KRZYSZTOF SIWICKI, A.; SZWEDA, W. 2017. Characterization of pathogenic *Yersinia ruckeri* strains and their importance in rainbow trout immunoprophylaxis. Med. Weter. 73: (9), 579-584.

PETTERSEN, J. M.; BRACKE, M. B.; MIDTLYNG, P. J.; FOLKEDAL, O.; STIEN, L. H.; STEFFENAK, H.; KRISTIENSEN, T. S. 2013. Salmon welfare index model 2.0: an extended model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon, based on a review of selected welfare indicators and intended for fish health professionals. Rev. Aquac. 6: 162–179.

PETTERSEN, J. M.; OSMUNDSSEN, T.; AUNSMO, A.; MARDONES, F. O.; RICH, K. M. 2015. Controlling emerging infectious diseases in salmon aquaculture. Rev. Sci.Tech. 34(3): 923-38.

PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA. 2019. Informe final. [en línea]. <<http://pgsa.sernapesca.cl/wp-content/uploads/2019/07/Informe-Final-coocurrencia.pdf>> [consulta: 07-04-2020].

SCHULZ, P.; TERECH-MAJEWSKA, E.; KRZYSZTOF, A.; KAZUN, B.; DEMSKA-ZAKES, K.; ROZYNSKI, M.; ZAKES, Z. 2020. Effect of different routes of vaccination against *Aeromonas salmonicida* on rearing indicators and survival after an experimental challenge of Pikeperch (*Sander lucioperca*) in controlled rearing. *Vaccines* (Basel). 8(3): 476.

SERNAPESCA. 2020. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sanitario_salmonicultura_en_centros_marinos_1deg_semestre_2020.pdf> [consulta: 08 -10-2020].

SERNAPESCA. 2018. Enfermedades de Alto Riesgo y emergentes de peces y moluscos. Ficha técnica. [en línea]. <<http://www.sernapesca.cl/informacion-utilidad/enfermedades-de-alto-riesgo-y-emergentes-de-peces-y-moluscos-fichas-tecnicas>> [consulta 07-02-2021]

SEPULCRE, M. P.; LÓPEZ-CASTEJÓN, G.; MESEGUER, J.; MULERO V. 2007. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Mol. Immunol.* 44(8): 2009-2016.

SUBPESCA. 2018. Res. Ex. N° 2574-2018 Modifica Resolución N° 1741 de 2013 Establece Clasificación de enfermedades de alto riesgo. [en línea]. <https://www.subpesca.cl/portal/615/articles-101155_documento.pdf>. [05-06-2020].

SMAGE, S.B.; FRISCH, K.; BREVIK, J.O.; WATANABE, K.; NYLUND, A. 2016. First isolation, identification and characterisation of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture.* 464:178-184.

SMAGE, S.; FRISCH, K.; VOLD, VIDAR.; DUESUND, HENRIK.; BREVIK, Ø.; OLSEN, R.; SJAATIL, S.; KLEVAN, A.; BRUDESETH, B.; WATANABE, K.; NYLUND, ARE. 2018. Induction of tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum finnmarkense* and the evaluation of a whole cell inactivated vaccine. *Aquaculture.* 495: 858-864.

SUNDELL, K.; HÖGFORS-RÖNNHOLM, E.; WIKLUND, T. 2014. Vaccination against diseases caused by Flavobacteriaceae species. **In:** Gudding, R.; Lillehaug A.; Evensen, Ø. Fish Vaccination. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 273-288.

VAN GELDEREN, R.; CARSON, J.; NOWAK, B.F. 2009. Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis. Aquaculture. 288: 7-13.

VAN GELDEREN, R.; CARSON, J.; GUDKOV, N.; NOWAK, B. 2010. Physical characterization of *Tenacibaculum maritimum* for vaccine development. J. Appl. Microbiol. 109(5): 1668-1676.

VILLUMSEN, K. R.; KOPPANG, E. O.; CHRISTENSEN, D.; BOJESEN, A. M. 2017. Alternatives to mineral oil adjuvants in vaccines against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in rainbow trout offer reductions in adverse effects. Sci Rep. 7 (1): 593

ANEXOS

Tabla 2: Clasificación de adherencia en cavidad abdominal (Anexo 1).

Score	Apariencia visual de la cavidad abdominal	Severidad de las lesiones
0	Sin lesiones visibles	Ninguna
1	Adherencias muy pequeñas, la mayoría frecuentemente localizadas próximas al sitio de inyección	Nula o menor opacidad del peritoneo después de eviscerar.
2	Adherencias menores. Estas pueden conectar el colon, bazo o porción caudal de ciegos pilóricos a la pared de la cavidad abdominal.	Solo permanece como remanente, una opacidad del peritoneo después de separar las adherencias.
3	Adherencias moderadas incluyendo una mayor parte de la región craneal de la cavidad abdominal, envolviendo parcialmente los ciegos pilóricos, el hígado y/o estómago; todos conectados con la pared de la cavidad abdominal. Puede ser notificado por el operario durante la evisceración.	Lesiones menormente visibles luego de la evisceración, las cuales pueden ser removidas manualmente.
4	Mayores adhesiones con granuloma, órganos internos interconectados extensamente, los cuales de ese modo aparecen como una sola unidad. Resulta un hallazgo evidente para el operario durante la evisceración.	Lesiones moderadas, las cuales pueden ser más difíciles de remover manualmente.
5	Extensas lesiones que afectan a casi todos los órganos internos de la cavidad abdominal. En grandes áreas el peritoneo es espeso y opaco, el filete puede llevar lesiones prominentes, de ubicación focalizada con presencia de lesiones pigmentadas o granulomas.	Existe daño visible de la carcasa luego de la evisceración y remoción de las lesiones.
6	Mucho más acentuado que el <i>score</i> 5, frecuentemente con considerable cantidad de melanina. La evisceración es imposible de realizar sin dañar la integridad del filete.	Resulta un gran daño de la carcasa.

Tabla 3: Clasificación de Melanosis (Anexo 2).

Score de Melanina	Apariencia visual de la cavidad abdominal	Severidad de las lesiones
0	Ausente	Ninguna
1	Leve	Regiones menormente visibles de melanina después de la evisceración, “Puntos de alfiler”, las cuales pueden ser fácilmente removidas.
2	Moderado	Cantidad considerable de melanina; Estas pueden ser removidas con mayor dificultad.
3	Severo	Melanina que cubre grandes áreas de la pared abdominal, daño de la carcasa. Dificultad o imposibilidad de remover las lesiones de melanina sin dañar el filete.

Tabla 4: Clasificación de granuloma (Anexo 3).

Score Granuloma	Apariencia visual de la cavidad abdominal	Severidad de las lesiones
0	Ausente	Ausencia de Granuloma
1	Pequeño	Granuloma(s) evidente(s) de tamaño pequeño, focalizado(s), ubicado(s) generalmente directo sobre el punto de inyección. Compromete principalmente grasa y puede comprometer una pequeña porción de los ciegos pilóricos.
2	Moderado	Granuloma(s) evidente(s), de tamaño moderado, su extensión es mayor que grado 1 y hay compromiso de parte importante de los ciegos pilóricos. No hay compromiso de estómago, puede llegar a él, pero sin envolverlo
3	Severo	Granuloma severo, la totalidad de los ciegos pilóricos están comprometidos. El granuloma envuelve al menos una porción del estómago pudiendo disminuir el diámetro del lumen del estómago.

Anexo 4: Carta de bioética.

11 de junio de 2021

Estimados académicos,
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile

A quien corresponda,

Mediante la presente, certificamos que los procedimientos llevados a cabo durante el ensayo experimental realizado para el desarrollo de la memoria de título: "Evaluación de la seguridad y eficiencia de una vacuna contra *T. dicentrarchi* en Salmón del Atlántico (*Salmo Salar*)", el cual se realizó en conjunto a la empresa Cooke Aquaculture Chile S.A, y realizado bajo las dependencias del Laboratorio FAV, Puerto Montt, se llevaron a cabo bajo estándares internacionales de bioética y manejo animal. Específicamente, los procedimientos se han desarrollado bajo los principios de la American Veterinary Medical Association (AMVA) y la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" del Instituto de Investigación de Animales de Laboratorio (EE.UU).

Se extiende la presente frente a la petición de la estudiante Yazmin Donoso F., para ser presentada a la comisión revisora de su memoria de título.

Javier Rivera
Laboratorio FAV

