



Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Biomédicas

Evaluación de la respuesta inmune adaptativa y la protección de una vacuna oral experimental contra Síndrome Rickettsial del salmón (SRS), Necrosis pancreática Infecciosa (IPN) y Vibriosis causada por *Vibrio ordalii* en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

Tesis para optar al grado de:

**Magíster en Ciencias Biomédicas Mención Biología
Molecular y Celular**

CATALINA ANDREA BRAVO COLLAO

Tutor de Tesis: Dr. Jaime Tobar

Santiago-Chile

2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Jaime Tobar, por su ayuda y enseñanzas durante el trabajo de tesis.

Quiero agradecer a Verónica Vera, por su amistad, constante apoyo y colaboración con la elaboración de la vacuna, desafío de peces y con los estudios de Elisa.

Agradezco también a Iván Tobar por su ayuda con los estudios de Elisa, a Felipe Ángel y Constanza Meza por su colaboración con los estudios de citometría de flujo.

También quiero agradecer a Ingrid Fuentes por todo su apoyo para la búsqueda y obtención de literatura científica para la elaboración de esta tesis.

En forma especial, quiero agradecer a mi esposo y a mi hijo Luciano por todo el apoyo, ayuda y amor entregado durante este proceso de tesis.

INDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Síndrome Rickettsial del Salmón.....	3
2.3 Necrosis Pancreática Infecciosa.....	4
2.4 Vibriosis producida por <i>Vibrio ordalii</i>	5
2.5 Inmunidad en peces.....	6
2.6 Vacunación oral.....	7
III. Hipótesis	10
IV. Objetivo General	10
IV. Objetivos Específicos	10
V. Materiales y Métodos	11
VI. Resultados	20
6.1 Chequeo sanitario.....	20
6.2 Evaluación de la respuesta inmune específica de anticuerpos séricos contra cada patógeno.....	20
6.2.1 Título de anticuerpos séricos específicos contra <i>P.salmonis</i>	20
6.2.2 Título de anticuerpos séricos específicos contra <i>Vibrio ordalii</i>	21
6.2.3 Título de anticuerpos séricos específicos contra Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa.....	22
6.3. Evaluación de protección de la vacuna contra la enfermedad.....	24
6.3.1 Protección de la vacuna oral experimental contra SRS.....	24
6.3.2 Protección de la vacuna oral experimental contra Vibriosis.....	25
6.4 Evaluación de la protección de la vacuna contra la infección por IPNV.....	26
VII Discusión	28
VIII Conclusiones	33
IX Bibliografía	34

I RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la protección y la respuesta inmune específica de anticuerpos séricos en *Salmo salar* vacunados con una vacuna oral experimental desarrollada en el laboratorio Centrovét contra *P.salmonis*, IPNV y *Vibrio ordalii* en condiciones experimentales.

Para este propósito, se utilizaron 260 peces de 25 grs promedio, de los cuales 130 fueron vacunados con la vacuna oral experimental mediante alimento medicado durante 10 días y 130 peces fueron alimentados con alimento comercial (grupo control).

Para la evaluación de la respuesta de anticuerpos, se determinó y comparó el título de anticuerpos séricos específicos en peces vacunados y controles en dos puntos post vacunación (300 y 600 UTA) utilizando la técnica de Elisa.

Para evaluar la protección otorgada por la vacuna, a las 300 UTA post vacunación se realizó la infección experimental de los peces (grupo vacunado y grupo control) en ambiente controlado SRS y Vibriosis, y se compararon las curvas de sobrevivencia. Para la fracción IPNV, la protección de la vacuna fue evaluada in vitro mediante un ensayo de seroneutralización viral contra IPNV, se determinó y comparó el título de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de peces vacunados y controles en dos tiempos post vacunación (300 y 600 UTA) .

La vacunación oral con la vacuna experimental indujo un alza de anticuerpos específicos contra *P.salmonis*, IPNV y *Vibrio ordalii* tan pronto como a las 300 UTA post vacunación.

En relación a SRS, la vacunación oral resultó ser protectora contra la enfermedad y otorgó inmunidad específica de anticuerpos séricos contra *P.salmonis* que se mantuvo constante entre las 300 UTA y las 600 UTA post vacunación. Se sugiere que al utilizar la vacuna experimental en peces la

respuesta de anticuerpos séricos tendría un rol importante en la protección contra SRS.

Para la fracción *Vibrio ordalii*, la vacunación oral resultó no ser protectora contra Vibriosis e indujo una respuesta inmune de anticuerpos específicos a las 300 UTA que decayó en el tiempo.

Para la fracción IPNV, la vacunación oral con la vacuna experimental indujo una respuesta de anticuerpos sistémicos específicos que se mantuvo constante en el tiempo y que además fue capaz de neutralizar la infección por el virus in vitro. Por otra parte, resultó ser protectora contra la infección por IPNV in vitro en ambos tiempos de muestreo (300 y 600 UTA) ya que indujo un aumento de anticuerpos neutralizantes que fue estadísticamente distinto al grupo control.

II INTRODUCCIÓN

2.1) Generalidades

La acuicultura es un sector productor de alimento de rápido crecimiento [1]. Esta industria ha crecido drásticamente en los últimos 50 años, representando alrededor del 50% del suministro de peces para alimentación a nivel mundial [2].

Chile es uno de los principales productores de salmón a nivel mundial. En la última década se ha expandido rápidamente el cultivo de especies salmonídeas, exportando en el año 2013 un total de 527.770 toneladas de truchas y salmones, lo que equivale a 3517 millones de US\$. La especie más producida y exportada corresponde al Salmón del Atlántico, representando el 58% de las exportaciones.[3]

El incremento en los niveles productivos ha llevado a la intensificación del cultivo de peces lo que conlleva al aumento de las densidades productivas y al stress, trayendo consigo como consecuencia mayores brotes de enfermedades y mortalidades de peces. Esto ha llevado al uso masivo de antibióticos, sin embargo, el desarrollo de resistencia bacteriana y la acumulación de antibióticos en el ambiente ha llevado a la necesidad del desarrollo de vacunas [4]. La producción de peces en condiciones de crecimiento en altas densidades requiere de vacunas efectivas para controlar las enfermedades persistentes y emergentes [5].

Actualmente en Chile se vacuna peces contra patologías como SRS (Síndrome Rickettsial del Salmón), ISA (Anemia Infecciosa del Salmón), Vibriosis (*Vibrio ordalii*), Aeromona e IPN (Necrosis Pancreática Infecciosa) [5]

2.2) Síndrome Rickettsial del Salmón

Piscirickettsia salmonis es el agente etiológico de Piscirickettsiosis, una enfermedad severa que ha causado las mayores pérdidas a la industria de la acuicultura [6]. Es una bacteria gram negativa, generalmente no móvil, aeróbica, no encapsulada, pleomórfica, usualmente cocoide, tiene un diámetro

aproximado entre 0.5 a 1.5 μm , replica por fisión binaria dentro de células de peces susceptibles o en líneas celulares de peces, posee estructuras similares a ribosomas cerca de la membrana plasmática y DNA fibrilar [7, 8] . Taxonómicamente *P.salmonis* pertenece al grupo de las Gamma-Proteobacterias y es una de las pocas especies que pertenece a la familia Piscirickettsiaceae. De hecho no está relacionada a la familia Rickettsiaceae como se había descrito previamente [9, 10].

En Chile, está presente desde el año 1989 [11] y representa la mayor amenaza sanitaria para el cultivo de salmones en Chile. La enfermedad ha sido difícil de controlar, la falla de los tratamientos con antibióticos es común y las vacunas que se usan actualmente han demostrado una eficacia variable [6].

El efecto de la enfermedad se refleja en las pérdidas asociadas a la presentación clínica de la enfermedad, mortalidades masivas y reducción del valor de los productos finales, debido a lesiones macroscópicas y a la disminución del rendimiento productivo [12].

La enfermedad corresponde a una condición septicémica por lo cual se pueden encontrar lesiones en numerosos órganos y tejidos [7, 13-16]. Los signos externos más consistentemente observados durante las infecciones son branquias pálidas, distensión abdominal, y hemorragias petequiales y equimóticas en la base de las aletas y en la zona periorcular y perianal [6]. Internamente las lesiones más diagnósticas se observan en el hígado y corresponden a focos subcapsulares grises o amarillos que miden aproximadamente 1 mm de diámetro [7, 13-17].

La enfermedad se ha descrito principalmente en agua de mar y estuario [7, 11, 13-16], y muy ocasionalmente en agua dulce [18, 19].

2.3) Necrosis Pancreática infecciosa

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), es causada el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) que pertenece al género Aquabirnavirus de la familia *Birnaviridae* [20, 21]. Los viriones son no envueltos, el genoma del virus consiste en 2 segmentos de RNA de doble cadena (A, B) que están incluidos

dentro de una cápside proteica icosaédrica que mide aproximadamente 60 nm de diámetro. El segmento A, es el mayor de los 2 y codifica para VP2 y VP3, las dos principales proteínas estructurales del virus. [22-24]. El segmento B codifica la proteína VP1 que es la RNA polimerasa RNA dependiente asociada al virión [25]. El virus replica en líneas celulares de peces, resultando en un efecto citopático característico [26]

Es una enfermedad altamente contagiosa que causa altas mortalidades en salmónidos juveniles [27]. Cepas altamente virulentas pueden causar mortalidades superiores al 70% en pisciculturas en un período de dos meses y puede ser tan alta como un 90% en alevines muy jóvenes [20, 28]. La intensificación del cultivo de salmónes a raíz de la expansión de la acuicultura ha resultado en un aumento de los brotes no sólo en alevines sino que también en postsmolts [29].

El impacto de la enfermedad en la producción de Salmón del Atlántico es muy serio ya que a pesar de los programas de vacunaciones, los brotes de IPN son frecuentes [30, 31].

En peces que padecen la enfermedad se han observado signos como oscurecimiento de la piel, abdomen abultado anteriormente, nado superficial y cese de la alimentación. En la necropsia, se han observado lesiones como hígado pálido y muy friable, hemorragias en el ciego pilórico, intestino sin alimento con exudado catarral [20].

2.4) Vibriosis producida por *Vibrio ordalii*

Vibrio ordalii es el agente causal de la Vibriosis Atípica, y tiene el potencial de causar pérdidas severas en la acuicultura de salmónidos [32] Microscópicamente son bacilos gram negativos, móviles, anaerobios facultativos y no esporulados [33]. Pertenece a la clase Gammaproteobacteria, familia *Vibrionaceae*. [34] Inicialmente, fue descrito como *Vibrio anguillarum* biotipo 2 [35]. Posteriormente, fue reclasificado como *Vibrio ordalii* debido a diferencias fenotípicas y genotípicas con respecto a *V.anguillarum* [36]. Se ha

demostrado que cepas de *Vibrio ordalii* aisladas desde brotes de salmones del Atlántico de la X región del país son genéticamente homogéneas [37].

Estudios in vivo han demostrado que *Vibrio ordalii* es capaz de infectar variadas especies, dentro de las que se encuentran Salmón chum, Salmón chinook, Salmón del Atlántico, Salmón coho y Trucha Arcoiris [33].

La Vibriosis es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de peces marinos y de estuario y se caracteriza por una septicemia hemorrágica [37], la Vibriosis Atípica, se caracteriza por la presencia de lesiones en la piel, úlceras hemorrágicas y mortalidad, mientras que los signos internos incluyen pericarditis, peritonitis, múltiples focos necróticos en el hígado y signos de septicemia sistémica [32].

Desde el año 2004, este patógeno ha sido reportado desde las poblaciones de salmones del atlántico cultivados en el sur de Chile. Para Chile, *Vibrio ordalii* constituye un problema serio para la industria del salmón [33] y destaca entre las enfermedades emergentes de etiología bacteriana que tienen repercusión económica en los cultivos de salmónidos en nuestro país [38].

2.5) Inmunidad en peces

Los peces poseen sistemas de defensa inmune innato y adaptativos que están estrechamente relacionados [39, 40].

El sistema inmune innato se compone de barreras físicas, componentes humorales y celulares, defiende al organismo de las infecciones de una manera no específica, la respuesta innata generalmente precede a la respuesta adaptativa [40, 41].

El sistema inmune adaptativo está compuesto de células altamente especializadas dentro de las que se incluyen los linfocitos y las inmunoglobulinas y tiene un rol vital en la protección contra infecciones recurrentes [40]. Los peces poseen la habilidad de producir una respuesta de anticuerpos a la mayoría de los antígenos [42], siendo inmunoglobulina M (IgM) el isotipo predominante en el suero de teleósteos [43].

Para evaluar la respuesta de anticuerpos en los peces existen técnicas dentro de las cuales se incluyen neutralización viral y el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) [42].

Se ha descrito que la respuesta adaptativa en los peces es un factor clave en el éxito de la vacunación [39] y que las inmunoglobulinas o anticuerpos son los principales indicadores de inmunidad adquirida a los patógenos [40].

2. 6) Vacunación oral

El desarrollo de una industria de acuicultura industrializada sustentable depende del desarrollo y la implementación de vacunas y de regímenes de vacunación que permitan que en la producción intensiva las enfermedades sean predecibles y manejables [5].

Existen 3 métodos para llevar a cabo la inmunización de peces: vacunación inyectable, vía inmersión y vía oral [44]. La vacunación inyectable se refiere a la inmunización de peces mediante la inyección intraperitoneal, la inmersión consiste en sumergir a los peces en una solución que contenga la vacuna, la vía oral se refiere a la administración de alimento que contenga la vacuna.

En la actualidad cobran cada vez más importancia el uso de vacunas orales en acuicultura, ya que estas presentan varias ventajas con respecto al uso de vacunas inyectables, es por esta razón que la administración oral de vacunas ha sido extensamente estudiada en los recientes años, ya que para especies acuáticas representan el método más atractivo de entrega de vacuna [4, 45]

Las vacunaciones inyectables son laboriosas ya que los peces son inmunizados uno por uno y es un proceso estresante para los peces ya que éstos deben ser removidos del agua y anestesiados. Por otra parte, las vacunaciones inyectables ofrecen la desventaja de que al utilizar adyuvantes en base a aceites pueden producir efectos adversos indeseables que resultan en una disminución de la calidad de la carcasa, debido al desarrollo de adherencias internas y melanosis, estos efectos indeseables no se producen con la inmunización mediante vacunas orales. En la vacunación oral no es

necesaria la manipulación de los peces, lo cual reduce el stress, su administración es sencilla y adecuada para lograr una inmunidad de masa. Las desventajas de las vacunas orales son que necesitan una mayor cantidad de antígeno para provocar una respuesta inmune [4] y que, a diferencia de la vacunación por inyección es difícil de determinar exactamente cuánto comió cada pez y por lo tanto la dosis de antígeno recibida [46].

Para la administración adecuada de una vacunación oral, los antígenos entregados oralmente deben ser capaces de evitar la hidrólisis digestiva, para esto es necesario proteger al antígeno contra el pH ácido del estómago de los peces y deben llegar a los enterocitos para ser traslocados hacia los compartimentos del sistema inmune [4]. Para este propósito se han desarrollado varias tecnologías de encapsulación del antígeno para vacunación oral para protegerlo, estas van desde un transportador de antígeno biológico como el *Artemia nauplii* para entregar *Vibrio anguillarum* a carpas [47] hasta la tecnología de MicroMatrix [45].

Actualmente nuestro país, cuenta sólo con 4 vacunas comerciales orales para peces, ninguna con más de dos antígenos, una contra SRS desarrollada por *Tobar et al* [45], dos contra IPN, una de ellas desarrollada por el laboratorio Schering- Plough, otra contra ISA [48] y otra bivalente contra SRS-ISA. No existen todavía vacunas orales contra Vibriosis en Chile, pese a que esta enfermedad es un problema importante en salmónidos en nuestro país. En otros países, como Reino Unido, existe una vacuna comercial bivalente para truchas contra *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalii*, esta corresponde a una vacuna inactivada con formalina del tipo bacterina.

En relación a las vacunas orales con respecto a *Vibrio*, se ha demostrado que la vacunación oral de peces contra *Vibrio anguillarum* protege contra el desafío [49-52] e induce título de anticuerpos sistémicos [49-51].

Con respecto a vacunas orales contra SRS, se demostró que al vacunar peces con vacuna oral contra SRS usando la tecnología de Micromatrix se logró una respuesta inmune específica a nivel sistémico detectando anticuerpos

específicos tan pronto como a las 300 unidades térmicas acumuladas post vacunación. Además esta vacuna fue capaz de proteger a los peces contra un desafío experimental contra el patógeno [45].

Para el caso de vacunas orales contra IPN, se ha demostrado la inducción de anticuerpos específicos contra el virus post vacunación en la circulación sistémica [28] [53] [54] y de anticuerpos neutralizantes contra el virus [53-56]. Se ha demostrado protección contra el desafío en los trabajos en los cuales se ha producido una respuesta de anticuerpos neutralizantes luego de una vacunación oral contra IPN y se ha realizado un desafío in vivo de los peces vacunados, [55] [56].

Si bien algunos trabajos establecen que las vacunas contra IPN basadas en virus muerto no son completamente efectivas [28], estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio aún no publicados, demuestran que peces vacunados con vacuna oral contra IPN del tipo virina formulada con la tecnología de Micromatrix producen anticuerpos específicos contra el agente.

Por todo lo expresado anteriormente, es que en el presente proyecto se buscó desarrollar y evaluar en condiciones experimentales la protección y la respuesta de anticuerpos de una vacuna oral trivalente inactivada contra SRS, IPN y Vibriosis producida por *Vibrio ordalii* en *Salmo salar* vacunados durante 10 días.

III HIPÓTESIS

La vacunación oral de los peces con la vacuna experimental contra *P.salmonis*, Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa y *Vibrio ordalii* producirá respuesta inmune específica y protección contra estas patologías.

IV OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune específica de anticuerpos séricos y la protección de una vacuna oral experimental contra SRS, IPN y Vibriosis producida por *Vibrio ordalii* en *Salmo salar* vacunados durante 10 días.

IV .1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1) Determinar y comparar el título de anticuerpos séricos específicos en peces vacunados y controles en dos puntos de muestreo post vacunación.

4.2) Analizar la protección que otorga la vacuna contra SRS y Vibriosis realizando una infección experimental de los peces vacunados y controles

4.3) Analizar la protección que otorga la vacuna contra IPN determinando y comparando el título de anticuerpos neutralizantes contra IPNV en suero de peces vacunados y controles en dos puntos de muestreo post vacunación.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1) Lugar: Laboratorio Centrovét Ltda (Unidad Experimental Acuarios y Laboratorio de Investigación y Desarrollo).

5.2) Peces: Se utilizaron peces de la especie *Salmo salar* de un peso promedio de 25 grs provenientes de Piscicultura Peñaflor de la empresa Landcatch, ubicada en la Región Metropolitana. Cuando llegaron los peces estos fueron mantenidos en estanques de 1 metro cúbico durante 2 semanas para su aclimatación. Se realizó un chequeo sanitario para evaluar que estos fueran libres de los patógenos que contenía la vacuna, para esto se realizó PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de riñones de peces para IPNV según Información confidencial del laboratorio Centrovét y para *P.salmonis* según un protocolo modificado de lo descrito por Marshall, et al 1998 [57] Para el caso de *Vibrio* se enviaron muestras de los mismos órganos para que fueran analizadas por un laboratorio externo. Además, se obtuvo suero desde el stock de peces prevacunación para verificar el nivel de anticuerpos contra *P.salmonis*, *Vibrio ordalii* e IPNV, utilizando el test de ELISA. Tanto para PCR como para Elisa se muestrearon 25 peces al azar, este número fue definido de acuerdo a lo establecido en el punto 5.5 para los estudios de anticuerpos. Los análisis se realizaron antes del desarrollo del estudio.

Durante el desarrollo del experimento, los peces fueron mantenidos con una temperatura promedio de 17°C en estanques de recirculación de 100 Lts con una densidad de 11 kg/m³. Fueron alimentados ad libitum hasta que se inició la vacunación.

5.3) Vacuna

5.3.1) Producción de los antígenos

Para la fabricación de la vacuna se utilizaron cepas de *P.salmonis*, IPNV y *Vibrio ordalii* disponibles en el laboratorio, las cuales correspondieron a

aislados de peces que murieron a causa de la enfermedad correspondiente en distintas empresas salmoneras del sur del país.

a) Fracción *P.salmonis*: esta bacteria fue cultivada en línea celular SF21 a 18°C, para esto se inocularon frascos de cultivo T150 con 1 mL de cultivo celular inoculado con *P.salmonis*, luego de 10 días post inoculación, cuando se obtuvo un efecto citopático (ECP) del 100%, se realizó su recuento mediante la técnica de qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) utilizando un protocolo modificado a lo descrito por Olivares y Marshall, 2010 [58] y posteriormente se realizó la inactivación. Se centrifugaron a 9000 rpm, durante 10 min para recuperar el pellet, luego se descartó el sobrenadante y el pellet fue congelado a -20 grados hasta su uso. Para realizar los recuentos por qPCR, se utilizó un equipo PCR Real Time marca Stratagene, modelo Mx 3000 P.

b) Fracción IPNV: El virus IPNV fue cultivado en células CHSE 214 mantenidas en medio esencial mínimo (MEM) (GIBCO, EE.UU.), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, EEUU) a 18°C, una vez que se observó un 100% de ECP (7 días post inoculación), se procedió a realizar la titulación del virus, mediante el procedimiento descrito por Reed & Muench 1938 [59] y luego fue inactivado de acuerdo a metodología estandarizada en el laboratorio (información confidencial de Centrovét Ltda.).

c) Fracción *Vibrio ordalii*:

Para la elaboración de la vacuna, la bacteria fue cultivada en un caldo triptona soya suplementado con sal 2% a 25 grados por 48 horas. A partir de un vial de *Vibrio ordalii* se inoculó un matraz de 2 Lts con 1,4 Lts de medio TSB suplementado con un 2% de sal. Se incubó en agitador a 200 rpm y 25 °C durante 2 días, al cabo de este tiempo y cuando se obtuvo un cultivo saturado se procedió a su inactivación, luego fue centrifugado del mismo modo que para *P.salmonis* y se congeló el pellet a -20°C.

El recuento se realizó mediante citometría de flujo y posteriormente la bacteria fue inactivada utilizando la misma metodología que para *P.salmonis*.

El citómetro de flujo utilizado correspondió a un equipo marca BD, modelo FacsCalibur. Se utilizó un kit de recuento de bacterias con Sytobc como fluoróforo (Invitrogen). Para realizar el recuento, las muestras fueron diluídas, teñidas con Sytobc, mezcladas con un número fijo de microesferas y adquiridas en el citómetro de flujo para su análisis de acuerdo al protocolo del kit (anexo 2).

5.3.2) Formulación y elaboración de la vacuna

Los títulos de antígenos que contuvo la vacuna fueron definidos en base a la experiencia del laboratorio considerando título de vacunas inyectables y literatura relevante.

Con el objetivo de encapsular los antígenos y de preservarlos en el estómago de los peces vacunados estos fueron incorporados en un vehículo de entrega oral que contenía una formulación de un polisacárido bioadhesivo catiónico (Micromatrix).

5.4) Vacunación

Los peces fueron vacunados durante 10 días con mezcla de alimento comercial pellet número 2 y la vacuna desarrollada, ésta correspondió a una vacuna oral del tipo bacterina/virina trivalente contra *P.salmonis*, IPNV y *Vibrio ordalii*. Los peces fueron alimentados al 1% de su peso vivo recibiendo una dosis de vacuna de 6 mg/pez/día durante 10 días consecutivos.

5.5) Diseño experimental

Para el desarrollo del experimento se consideraron 260 peces en total, de los cuales 130 fueron alimentados con la vacuna experimental (grupo vacunado) y 130 fueron alimentados con alimento comercial (grupo control). El número de peces utilizados fue definido en base a los programas estadísticos de epidemiología Win Episcopo 2.0 y WinPepi. En anexo 1 se demuestran los cálculos realizados por el programa WinPepi para la estimación de tamaño muestral tanto para los estudios de anticuerpos (comparación de medias) = 19 peces como para los estudios de sobrevivencia (comparación de proporciones) = 21 peces. Como se disponía de una mayor cantidad de peces, se decidió

utilizar 25 animales por grupo por cada tiempo de muestreo para los estudios de anticuerpos (50 peces en total considerando 2 tiempos de muestreo), 40 peces por grupo para los estudios de sobrevivencia para SRS y 30 peces por grupo para los estudios de sobrevivencia de Vibriosis. Adicionalmente, se consideraron 10 peces más por grupo por cualquier pérdida de animales que pudiera ocurrir durante el desarrollo del estudio, utilizando de este modo 130 peces por grupo.

Desde ambos grupos de peces se obtuvieron muestras de suero a las 300 y 600 UTA post vacunación para evaluar la respuesta de anticuerpos séricos para cada patógeno contenido en la vacuna y anticuerpos neutralizantes contra IPNV. Además a las 300 UTA post vacunación, se realizó la infección en forma experimental de los peces vacunados y controles contra SRS y Vibriosis. El esquema general de las actividades realizadas en el presente estudio se presenta a continuación en la figura 1.

Esquema general del proyecto

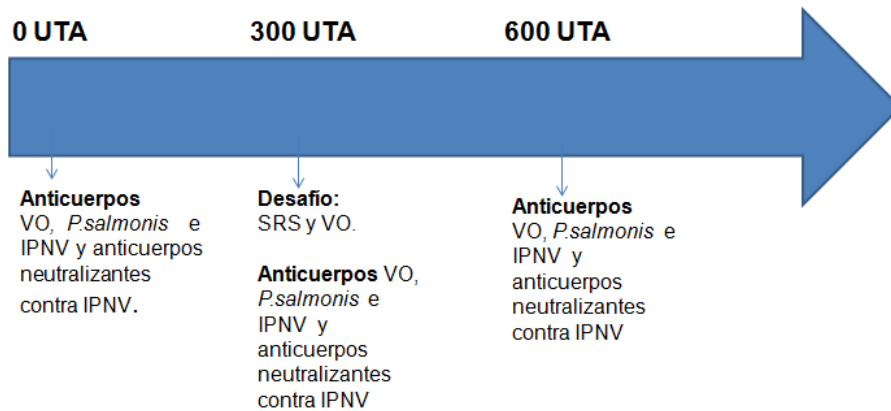


Fig1. Esquema general de las actividades ejecutadas durante el proyecto.

5.5.1) Evaluación de la respuesta inmune específica de anticuerpos séricos contra cada patógeno

Con el fin de evaluar la respuesta de anticuerpos séricos específicos otorgada por la vacuna, para cada patógeno contenido en esta (*P.salmonis*, IPNV y

Vibrio ordalii), se determinó y comparó el título de anticuerpos séricos en peces vacunados y controles en dos puntos de muestreo post vacunación mediante la técnica de Elisa indirecto. Este análisis también fue realizado en el stock de peces que sería utilizado en el estudio (prevacunación).

Para el desarrollo de la técnica, se activaron placas con antígeno *P.salmonis*, *Vibrio ordalii* ó IPNV, provenientes de cultivo celular o líquido según correspondiera, en buffer bicarbonato. Posteriormente, las placas fueron bloqueadas con PBS/leche descremada al 2%. Se realizaron diluciones seriadas de los sueros y se incubaron toda la noche. Al día siguiente las placas fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti salmón IgM isotipo IgG1 (Bios Chile, IGSA, Chile) por 1 hora a 30 °C. Luego las placas fueron lavadas nuevamente e incubadas con antiG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma). Los títulos de anticuerpos se determinaron usando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma, Sigma Aldrich) como sustancia cromogénica y Acido sulfúrico 95-98% (Winkler, Winkler Ltda) para detener la reacción. Inicialmente se obtuvieron los valores de absorbancia medidos a 450 nm y posteriormente estos valores fueron transformados a IgM específica, utilizando una curva estándar generada a partir de diluciones seriadas de IgM.

Las muestras de sangre desde ambos grupos de peces, se obtuvieron en 2 tiempos de muestreo distintos (300 y 600 UTA post vacunación). Para la obtención de las muestras, se seleccionaron al azar 25 peces de cada grupo (vacunados y controles) por tiempo de acuerdo a lo explicado en el punto 5.5. Estos fueron debidamente anestesiados y de cada pez se extrajo sangre desde la vena caudal utilizando una jeringa de tuberculina. Una vez obtenida la sangre esta fue procesada para la obtención de suero, es decir, mantenida a 4°C por 24 horas, luego fue centrifugada durante 2 min a 5000 rpm con lo que se obtuvo el suero que fue congelado a -20 grados hasta su utilización. De un mismo suero, se analizó el título de anticuerpos para los distintos patógenos en estudio.

El esquema del análisis realizado se presenta a continuación en tabla 1:

Tabla 1. Esquema utilizado para evaluación de la respuesta de anticuerpos mediante Elisa según tiempo de muestreo.

Tratamiento	Peces totales	Peces muestreados 300 UTA	Peces muestreados 600 UTA	Elisa
Vacuna	130	25	25	<i>P.salmonis</i> IPNV <i>V.ordalii</i>
Control	130	25	25	<i>P.salmonis</i> IPNV <i>V.ordalii</i>

5.5.2) Evaluación de la protección de la vacuna contra la enfermedad (Sobrevivencia al desafío)

Con el objetivo de evaluar la protección de la vacuna contra *P.salmonis* y *Vibrio ordalii*, a las 300 UTA post vacunación se realizó la infección en forma experimental (desafío) de los peces (grupo vacunado y grupo control) en ambiente controlado contra estos patógenos. Cada pez fue debidamente anestesiado e inoculado intraperitonealmente con 0,2 mL de un inóculo de desafío que contenía al patógeno.

Para todos los patógenos el desafío se realizó con las mismas cepas presentes en la vacuna.

Para *P.salmonis* se desafiaron 40 peces por grupo y para *Vibrio ordalii* 30 peces por grupo, de acuerdo a lo explicado en el punto 5.5, el esquema se demuestra en tabla 2.

Tabla 2. Esquema utilizado para evaluación de la protección de la vacuna contra la enfermedad según tratamiento y patógeno.

Tratamiento	Peces totales	Peces desafiados contra <i>P.salmonis</i>	Peces desafiados contra <i>V.ordalii</i>
Vacuna	130	40	30
Control	130	40	30

Para todos los patógenos en estudio, utilizó la técnica de citometría de flujo, para realizar el recuento de la dosis necesaria a inocular por pez. Una vez obtenida la concentración del cultivo, se realizaron los cálculos para que 0,2 mL del inóculo de desafío tuviera la concentración necesaria para producir un 70% de mortalidad en los peces controles.

a) Desafío contra *P.salmonis*

La cepa de *P.salmonis* utilizada para el desafío correspondió a cepa aislada desde un pez enfermo con SRS en un brote de un centro de cultivo en la Región de Los Lagos, ésta fue mantenida en la línea celular CHSE-214 y en el sexto pasaje fue congelada en nitrógeno líquido obteniéndose un stock de viales para el desafío.

Para la preparación del inóculo de desafío se descongelaron viales desde el nitrógeno líquido, se centrifugaron durante 10 min a 10.000 rpm a 4 grados, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con 1 mL de Medio Esencial Mínimo (MEM) (Gibco, EEUU), suplementado al 10%, con esto se inocularon células CHSE en una placa de cultivo T25 que fue mantenida a 18 °C y fue cosechada una vez que se alcanzó un 100% de ECP (12 días post inoculación). El desafío fue realizado de acuerdo a los protocolos del laboratorio (información confidencial de Centrovét Ltda.)

b) Desafío contra *Vibrio ordalii*

La cepa de desafío correspondió a un aislado de *Vibrio ordalii* obtenido desde peces enfermos provenientes de un centro de cultivo con brote de Vibriosis de la Región de Los Lagos. Se generaron viales que se mantuvieron congelados a -80 grados hasta su uso.

Para la elaboración del inóculo de desafío se inoculó un vial en un matraz de 250 ml con 100 mL de caldo triptona soya suplementado con sal 2% a 25 °C con agitación 200 revoluciones por minuto hasta que se obtuvo un cultivo saturado OD 600 nm= 0,4 (18 horas), luego se realizó un subcultivo a partir de este, para lo cual se tomó 1 mL de cultivo saturado y se inoculó en un matraz de 250 mL que contuvo 100 mL de caldo triptona soya (TSB) (BD, EEUU) suplementado al 2% de sal hasta que se obtuvo un nuevo cultivo saturado OD

600 nm= 0,4, a partir de este subcultivo se obtuvieron muestras para realizar el recuento mediante citometría de flujo. Al igual que para SRS, el desafío fue realizado de acuerdo a los protocolos del laboratorio.

Análisis de los resultados

Diariamente, se registró la mortalidad a causa de las enfermedades en estudio (*P.salmonis* y *Vibrio ordalii*) de los peces vacunados y controles hasta el día 52 post desafío, verificando la muerte a causa de la enfermedad mediante necropsia, identificando las lesiones internas para cada cuadro.

Para describir la sobrevivencia de ambos grupos, para cada patógeno, se confeccionaron las curvas de Kaplan Meier utilizando los datos generados de los registros de la mortalidad. Con el fin de establecer si existían diferencias significativas en la sobrevivencia de los grupos controles y vacunados se utilizó el test de Long Rank. Adicionalmente, para cuantificar la magnitud del efecto de la vacunación, se calculó Hazard Ratio (HR) (Mantel-Haenszel) con un intervalo de confianza de un 95%.

5.5.3) Evaluación de la protección de la vacuna contra la infección por IPNV (Determinación de Anticuerpos neutralizantes contra IPNV)

Con el objetivo de determinar si la respuesta humoral inducida por la vacuna era capaz de neutralizar la infección viral por IPNV y evaluar la protección que la vacuna otorgaba contra la fracción IPNV en los peces tratados, se determinó y comparó el título de anticuerpos neutralizantes en suero de peces vacunados y controles en dos puntos de muestreo post vacunación (300 y 600 UTA). Se utilizó la técnica de seroneutralización in vitro, exponiendo cantidades conocidas de virus (concentración de 100 partículas virales) a diluciones seriadas del suero (1:2) en busca de la inhibición en la aparición de efecto citopático en células susceptibles al virus si es que el suero tuviera capacidad neutralizante.

Para esto, las placas de cultivo celular con el virus y las diluciones de los sueros fueron incubadas por 15°C por 7 días. Se monitoreó la monocapa celular para determinar la presencia de efecto citopático'. Los pocillos que no

presentan ECP poseen niveles de anticuerpos que logran neutralizar la acción del virus IPNV sobre la línea celular.

El título de anticuerpos neutralizantes se estimó a partir de la dilución más alta que no presenta efecto citopático y correspondió a la inversa de la dilución.

Este análisis también fue realizado en el stock de peces que sería utilizado en el estudio (prevacunación)

La obtención de sangre desde los peces debidamente anestesiados se realizó desde la vena caudal, en ambos tiempos de muestreo se obtuvo sangre de 25 peces al azar de ambos grupos experimentales (vacunados y controles) como se indica en tabla 3. Este análisis fue realizado por un laboratorio de diagnóstico externo.

Tabla3. Tiempos de muestreo y número de peces usados para el ensayo de seroneutralización contra IPNV in vitro según tratamiento.

Tratamiento	Total peces	Muestreo 300 UTA	Muestreo 600 UTA
Vacunado	130	25	25
Control	130	25	25

Análisis estadístico

Antes de realizar el análisis estadístico, la normalidad de la distribución de los datos cuantitativos se evaluó mediante la prueba de Shapiro Wilk.

Para evaluar diferencias estadísticas en los títulos de anticuerpos entre los grupos se utilizaron los test de Kruskal Wallis y Mann-Whitney. Estos análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa STATA /SE 10.0.

La comparación de la sobrevivencia de grupos vacunados y controles, se realizó utilizando el test de Long Rank y se calculó el Hazard Ratio mediante el programa Graph pad 6.04

La significancia estadística se consideró con un $p < 0.05$.

VI RESULTADOS

6.1) Chequeo sanitario

El chequeo sanitario realizado al stock de peces utilizados en el estudio resultó satisfactorio ya que el análisis de PCR de riñón de los peces reveló que todos eran negativos a todos los patógenos contenidos en la vacuna a (*P.salmonis*, IPNV y *Vibrio ordalii*). Por otra parte, el nivel de anticuerpos específicos para todos los patógenos en estudio resultó satisfactorio para realizar el ensayo (los resultados de títulos de anticuerpos se presentan en las tablas 4, 5, 6, 7 y corresponden a los grupos prevacunación).

6.2) Evaluación de la respuesta inmune específica de anticuerpos séricos contra cada patógeno

6.2.1) Título de anticuerpos séricos específicos contra *P.salmonis*

A las 300 UTA post vacunación, la vacuna indujo un aumento de anticuerpos específicos contra *P.salmonis* que tuvo significancia estadística al compararlo con el grupo control ($p < 0.05$), aumentando en un 57% el título de anticuerpos promedio en relación al grupo control. Esta respuesta del grupo vacunado se mantuvo constante entre las 300 y 600 UTA no siendo significativo el leve descenso observado entre ambos tiempos de muestreo ($p > 0.05$). Además, a las 600 UTA también se obtuvo diferencia significativa entre vacunados y controles ($p < 0.05$), aumentando en un 29% el título de anticuerpos promedio respecto al control.

El peak del título de anticuerpos en el grupo tratado se obtuvo a las 300 UTA post vacunación.

A lo largo del experimento, el título de anticuerpos de peces que no recibieron vacuna permaneció constante, no registrándose diferencias significativas entre los valores de los peces prevacunación y controles en ambos tiempos de muestreo analizados ($p > 0.05$ para ambos casos).

Los resultados se presentan a continuación en tabla 4 y figura 2.

Tabla 4. Título de anticuerpos contra *P.salmonis* en suero de peces según tratamiento y tiempo de muestreo

Grupo	Título de anticuerpos contra <i>P.salmonis</i> ^a (UTA post vacunación)		
	0	300	600
Prevacunación	926.4474± 301.9378		
Vacunado		1327.755±376.3755 ^b	1249.951 ± 581.7837 ^b
Control		845.5063± 239.3005	969.5686 ± 208.861

^aProm. ± DS (n=25), ^bEstadísticamente diferentes del grupo control (p<0.05).

Título de anticuerpos contra *P.salmonis* según tratamiento y tiempo de muestreo

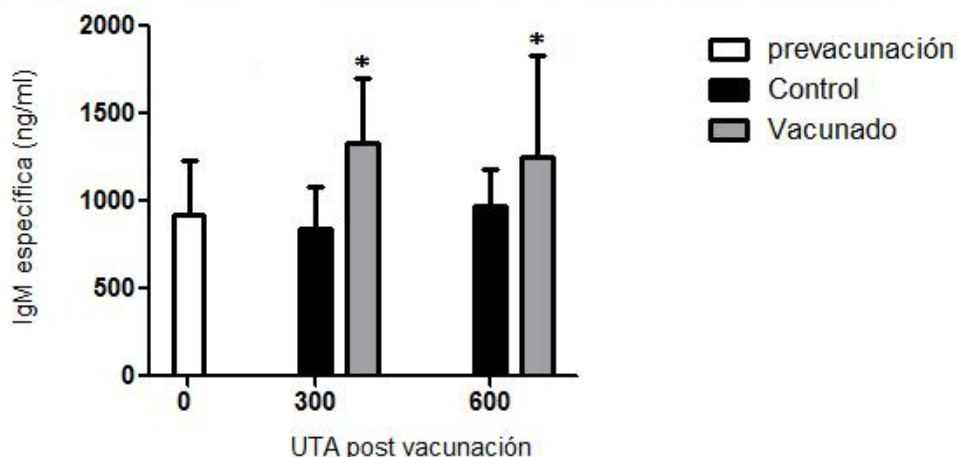


Figura 2. Título de anticuerpos contra *P.salmonis* en suero de peces según tratamiento y tiempo de muestreo. Los valores corresponden a promedio ± DS (n=25), * Estadísticamente diferentes del grupo control (p<0.05).

6.2.2) Título de anticuerpos séricos específicos contra *Vibrio ordalii*

La vacunación oral produjo en los peces tratados un alza de anticuerpos significativo con respecto a los peces no tratados, tan temprano como a las 300 UTA post vacunación (p<0.05) y aumentó en un 42,6% el título de anticuerpos promedio con respecto al grupo control, luego a las 600 UTA esta respuesta descendió en forma significativa (p<0.05) no registrándose diferencias significativas entre los peces vacunados y los controles (p>0.05).

Durante el período de estudio, el título de anticuerpos de peces no vacunados permaneció constante, no observándose diferencias significativas entre los

peces prevacunación y controles en ambos tiempos de muestreo analizados ($p > 0.05$) para todos los casos.

Los resultados se presentan a continuación en tabla 5 y figura 3.

Tabla 5. Título de anticuerpos contra *Vibrio ordalii* en suero de peces según tratamiento y tiempo de muestreo

Grupo	Título de anticuerpos contra <i>Vibrio ordalii</i> ^a (UTA post vacunación)		
	0	300	600
Prevacunación	1223.348 ± 259.56		
Vacunado		1746.505 ± 396.1934 ^b	1349.993 ± 413.4133 ^c
Control		1224.307 ± 356.4056	1325.3616 ± 261.77284

^a Prom. ± DS (n=25) ^b Estadísticamente diferentes del grupo control ($p < 0.05$).

^c Estadísticamente diferentes del grupo vacunado muestreado a las 300 UTA

Título de anticuerpos contra *Vibrio ordalii* según tratamiento y tiempo de muestreo

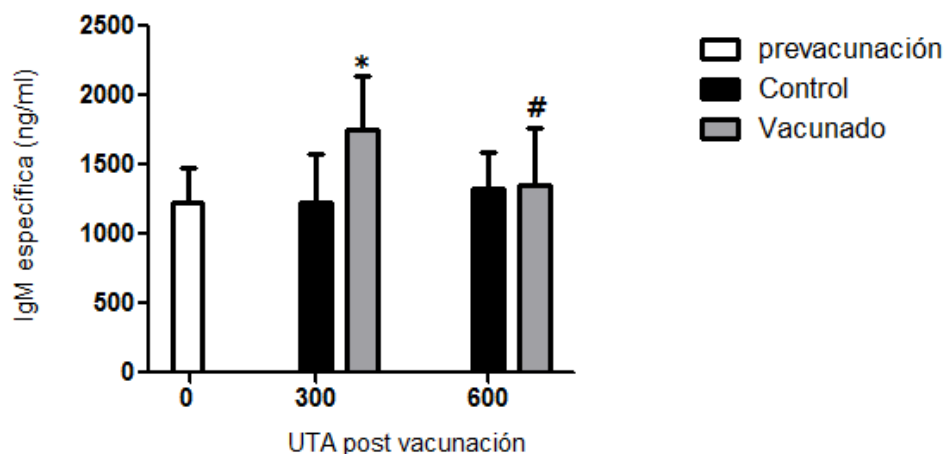


Figura 3. Título de anticuerpos contra *Vibrio ordalii* en suero de peces según tratamiento y tiempo de muestreo. Los valores corresponden a promedio ± DS (n=25), * Estadísticamente diferentes del grupo control ($p < 0.05$), # Estadísticamente diferentes del grupo vacunado muestreado a las 300 UTA ($p < 0.05$).

6.2.3) Título de anticuerpos séricos específicos contra Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa

La vacunación oral produjo en los peces tratados un alza de anticuerpos significativo con respecto a los peces controles solamente a las 300 UTA post vacunación ($p < 0.05$) y aumentó en un 37,6,% el título de anticuerpos promedio con respecto al grupo control. El título de anticuerpos del grupo vacunado

aumentó a las 600 UTA con respecto al tiempo de 300, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). Tampoco fue significativa la diferencia observada a las 600 UTA entre grupo vacunado y control ($p > 0.05$).

Al comparar los títulos de anticuerpos de los peces prevacunación con los de los controles no se registraron diferencias significativas para todas las comparaciones realizadas ($p > 0.05$).

Los resultados se presentan a continuación en tabla 6 y figura 4.

Tabla 6. Título de anticuerpos contra Virus de la Necrosis Pancreática infecciosa en suero de peces según tratamiento y tiempo de muestreo

Grupo	Título de anticuerpos contra IPNV ^a (UTA post vacunación)		
	0	300	600
Prevacunación	1233.464 ± 428.68		
Vacunado		1490.344 ± 627.4864 ^b	1772.841 ± 1156.23
Control		1082.864 ± 799.1433	1147.058 ± 300.5568

^a Prom. ± DS (n=25), ^b Estadísticamente diferentes del grupo control ($p < 0.05$).

Título de anticuerpos contra IPNV según tratamiento y tiempo de muestreo

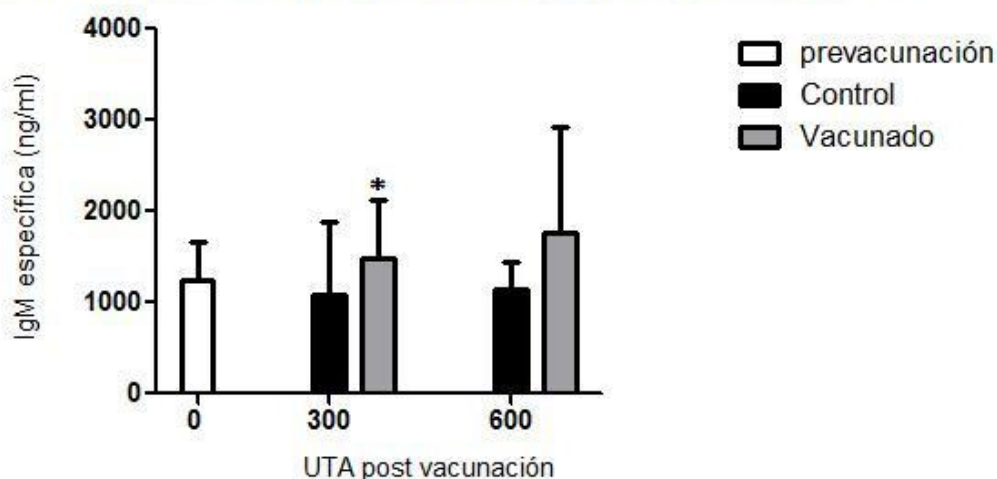


Figura 4. Título de anticuerpos contra virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en suero de peces según tratamiento y tiempo de muestreo. Los valores corresponden a promedio ± DS (n=25), * Estadísticamente diferentes del grupo control ($p < 0.05$).

6.3) Evaluación de protección de la vacuna contra la enfermedad (Sobrevivencia al desafío)

6.3.1) Protección de la vacuna oral experimental contra SRS

Mediante el desafío realizado fue posible reproducir la enfermedad, es decir, producir mortalidad a causa del agente y observar en la necropsia lesiones atribuibles a SRS tanto en peces vacunados como en controles.

La mortalidad acumulada al final del período de estudio por SRS resultó de un 55% para el grupo vacunado y de un 77,5 % para el grupo control.

La comparación de las curvas de supervivencia entre los peces vacunados (45%) y los controles (22,5%) demostró una diferencia significativa luego del desafío con *P.salmonis* ($p < 0.05$) y se obtuvo un HR de 0.5004 (IC 95% 0,2718 – 0,9215), es decir, la probabilidad de morir en el grupo vacunado es la mitad que en el grupo control., por lo que la vacunación oral resultó ser protectora contra SRS (figura 5).

Sobrevivencia al desafío con *P.salmonis* según tratamiento

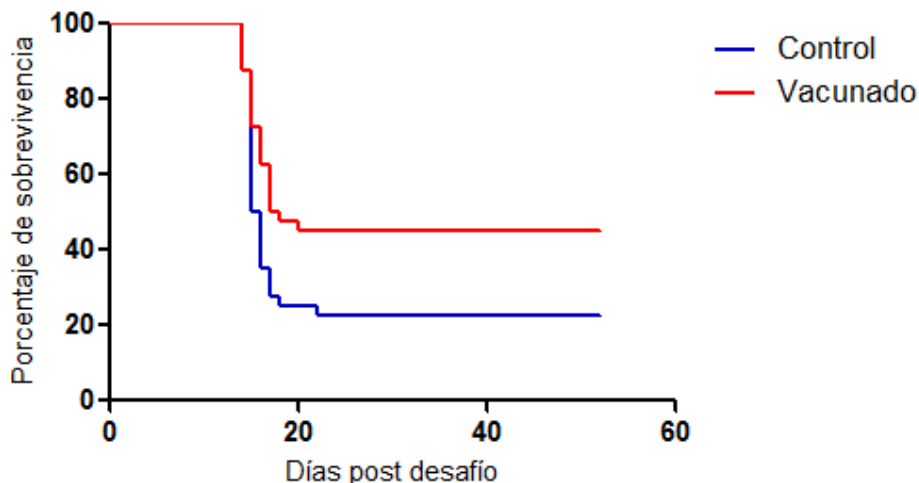


Figura 5. Curvas de supervivencia al desafío con *P.salmonis* en peces vacunados y controles. La figura muestra el porcentaje de supervivencia de peces vacunados y controles que fueron desafiados con *P.salmonis* a las 300 UTA post vacunación mediante inyección intraperitoneal. El grupo vacunado tuvo significativamente mayor supervivencia que el grupo control ($p < 0.05$).

6.3.2) Protección de la vacuna oral experimental contra Vibriosis

Al igual que para SRS, tanto en los peces vacunados como en los controles fue posible inducir la enfermedad, producir mortalidad a causa del agente y observar en la necropsia lesiones atribuibles a Vibriosis.

Luego de concluir el período de seguimiento post desafío, la mortalidad acumulada del grupo vacunado resultó de un 60%. Los porcentajes de sobrevivencia finales resultaron en 40% y 26,6% para el grupo vacunado y control respectivamente.

La comparación de las curvas de sobrevivencia de ambos grupos demostró que éstas no eran significativamente distintas ($p > 0.05$) (Fig 6), Se obtuvo un HR de 0.5675 (IC 95% 0.2957 – 1.089), por lo que la vacunación oral no resultó ser protectora contra Vibriosis.

Sobrevivencia al desafío con *Vibrio ordalii* según tratamiento

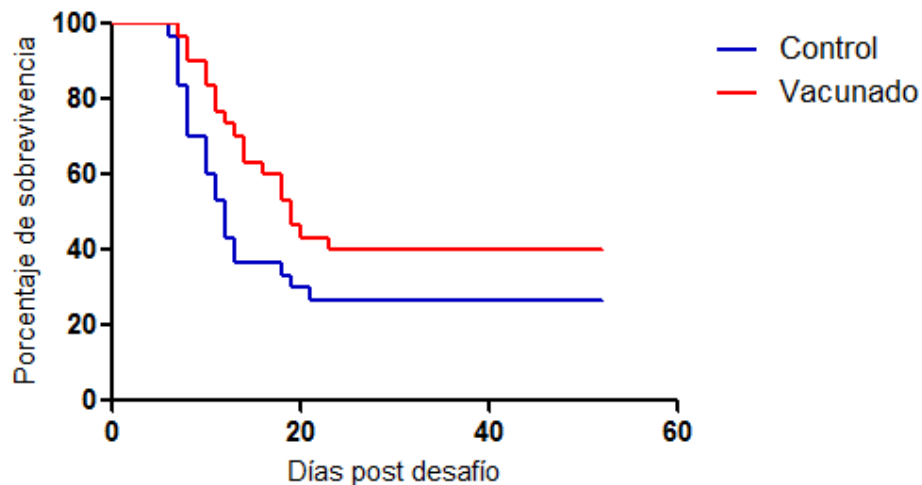


Figura 6. Curvas de sobrevivencia al desafío con *Vibrio ordalii* en peces vacunados y controles. La figura muestra el porcentaje de sobrevivencia de peces vacunados y controles que fueron desafiados con *Vibrio ordalii* a las 300 UTA post vacunación mediante inyección intraperitoneal. No existió diferencia significativa en la sobrevivencia de ambos grupos ($p > 0.05$).

6.4) Evaluación de la protección de la vacuna contra la infección por IPNV (Determinación de Anticuerpos neutralizantes contra IPNV)

Los resultados indican que la vacuna indujo un aumento de anticuerpos neutralizantes que tuvo significancia estadística al compararlo con el grupo control tanto a las 300 como a las 600 UTA ($p < 0.05$ para ambas comparaciones). Esta respuesta se mantuvo constante entre ambos tiempos de muestreo analizados, no siendo significativo el leve aumento de título de anticuerpos seroneutralizante observado a las 600 UTA post vacunación ($p > 0.05$).

A lo largo del experimento, el título seroneutralizante de los peces no tratados fue el mismo para todos los grupos (prevacunación y controles a las 300 y 600 UTA) ($p > 0.05$).

Por los resultados anteriormente expuestos, se concluyó que la vacunación oral indujo en los peces tratados una respuesta de anticuerpos neutralizantes y resultó ser protectora contra la infección por IPNV in vitro, aumentando el título de anticuerpos neutralizantes promedio con respecto al control en un 44% y en un 77% a las 300 y 600 UTA respectivamente.

Los resultados se presentan a continuación en tabla 7 y figura 7.

Tabla 7. Título de anticuerpos contra Virus de la Necrosis Pancreática infecciosa en suero de peces según tratamiento y tiempo de muestreo.

Grupo	Título de anticuerpos Neutralizantes ^a (UTA post vacunación)		
	0	300	600
Prevacunación	57.6 ±13.06365		
Vacunado		83.2 ± 39.19184 ^b	102.4 ± 32 ^b
Control		57.6 ±13.06395	57.6±13.06395

^a Prom. ± DS (n=25), ^b Estadísticamente diferentes del grupo control ($p < 0.05$).

Título seroneutralizante contra IPNV según tratamiento y tiempo de muestreo

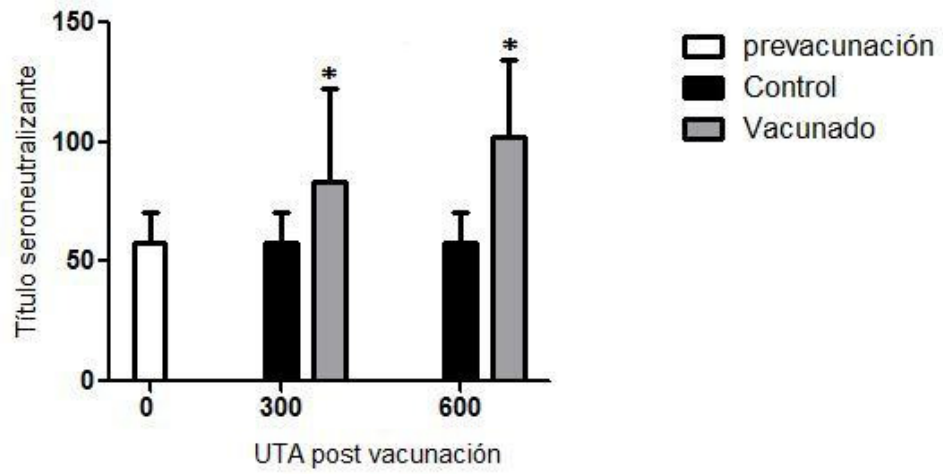


Figura 7. Título de anticuerpos seroneutralizantes contra Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en suero de peces según tratamiento y tiempo de muestreo. Los valores corresponden a promedio \pm DS (n=25), * Estadísticamente diferentes del grupo control ($p < 0.05$).

VII DISCUSIÓN

No existen a la fecha trabajos publicados sobre vacunas orales con más de un antígeno en salmónidos. Este trabajo es la primera descripción de la respuesta inmune de anticuerpos y de protección generada por una vacuna oral triple en salmones.

La vacunación es uno de los métodos más importantes utilizados en la prevención de enfermedades infecciosas en acuicultura [45]. La vacunación oral ofrece una serie de ventajas sobre las vacunaciones por inmersión o inyección: fácil administración sin inducir estrés ya que los peces no son manipulados, es un buen método para la inmunización de masa [4]. Una vacuna oral multivalente sería de importancia para la industria.

En el presente estudio, la vacunación oral indujo un alza de anticuerpos séricos específicos significativo tan tempranamente como a las 300 UTA post vacunación para todos los patógenos contenidos en la vacuna (*P.salmonis*, *Vibrio ordalii* y Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa), al compararlo con su grupo control correspondiente ($p < 0.05$), lo que es indicativo de que la vacuna indujo inmunidad sistémica. La inducción de anticuerpos específicos en la circulación sistémica al corto tiempo post vacunación oral ha sido demostrada en vacunas orales contra IPN [28], *P.salmonis* [45] y *Vibrio anguillarum* [49] [60] [61]. En la literatura no se han descrito a la fecha publicaciones sobre vacunas orales contra *V.ordalii*.

A pesar de que previo al desarrollo del experimento (grupo prevacunación) se detectaron anticuerpos contra todos los patógenos contenidos en la vacuna (*P.salmonis*, ambas variantes de *Vibrio ordalii* e IPNV) durante todo el desarrollo del experimento, para todos los patógenos el título de anticuerpos de peces sometidos al ensayo que no recibieron la vacuna (grupo control) permaneció constante y sin diferencias significativas con los peces antes de ser sometidos al estudio (prevacunación) ($p > 0.05$), esto demuestra que el alza de anticuerpos observados en los grupos vacunados se debe a la vacunación.

Una de las limitantes importantes para lograr éxito en la vacunación oral es obtener un sistema de entrega que proteja el antígeno de las condiciones hidrolíticas en el estómago, que asegure que los antígenos permanezcan en el tracto intestinal un tiempo suficiente para ser tomados por las células del sistema inmune y que asegure que cada pez reciba la vacuna [62]. Micromatrix preserva el antígeno en el estómago, permite un contacto entre la mucosa intestinal y los elementos inmunológicos reclutados como macrófagos y linfocitos, al mismo tiempo que entrega el antígeno encapsulado en la mucosa intestinal [45]. En el presente estudio, la vacunación oral logró producir una respuesta inmune específica sistémica para todos los patógenos en estudio, por lo que se demuestra que el método de encapsulación utilizado (Tecnología de Micromatrix) para formular la vacuna resultó exitoso y fue capaz de contener a los 3 antígenos. En experimentos preliminares no publicados se había demostrado que podía contener hasta 2 antígenos.

En este trabajo, los peces fueron vacunados en forma masiva, alimentándose por su propia voluntad mediante el alimento mezclado con vacuna no siendo inoculados en forma forzada. Esta vía de administración concuerda con las condiciones naturales de alimentación y por lo tanto es más representativo de lo que ocurriría al vacunar peces en condiciones de campo. La eficiencia de las vacunaciones orales mediante esta vía de administración había sido demostrada anteriormente [63] [28] [45] [56].

Los peces poseen la habilidad de producir una respuesta de anticuerpos a la mayoría de los antígenos. Sin embargo, una respuesta significativa de anticuerpos a un antígeno no siempre se correlaciona con protección. Por el contrario, se puede lograr protección sin una respuesta significativa de anticuerpos [42]. Muchos estudios relacionan la presencia de anticuerpos humorales de vacunas bacterianas directamente con protección [64]. Para SRS, se ha descrito que las vacunas en peces producen una respuesta de anticuerpos séricos y protección al desafío [65] [66] [45] y que existe una correlación entre los niveles de IgM séricos y el porcentaje relativo de sobrevivencia al desafío (RPS) [67]. La vacunación oral resultó ser protectora contra SRS y otorgó inmunidad específica de anticuerpos séricos contra

P.salmonis que se mantuvo constante entre las 300 UTA y las 600 UTA. Estos resultados coinciden con la inducción de anticuerpos específicos hasta las 900 UTA post vacunación y la protección de la única vacuna oral contra SRS descrita hasta ahora en la literatura [45].

En relación a la Vibriosis, se ha demostrado la importancia de los anticuerpos en la protección contra la enfermedad [68] [69] [70] y que existe una correlación positiva entre anticuerpos y protección contra la enfermedad [68]. Se ha descrito que la vacunación oral de peces contra *Vibrio anguillarum* protege contra el desafío in vivo [49] [71] [72] [63] [52] [50] [51] e induce título de anticuerpos sistémicos [49] [50] [51]. En otras experiencias, se ha obtenido protección contra la enfermedad con una leve inducción de anticuerpos sugiriendo que hay más de un mecanismo involucrado en la protección [63]. En este estudio, para Vibriosis la vacuna no resultó protectora al realizar el desafío in vivo ($p>0.05$). Considerando los antecedentes anteriormente expuestos los resultados obtenidos podrían deberse a 3 probables causas: la vacuna no logró inducir un nivel lo suficientemente alto de anticuerpos para proteger contra la enfermedad a pesar de que a las 300 UTA hubo una diferencia significativa de título de anticuerpos con los controles ($p<0.05$) ó el nivel de anticuerpos alcanzado a las 300 UTA era potencialmente protector pero como decayó en el tiempo resultó no proteger contra la enfermedad ó la protección contra *Vibrio ordalii* al utilizar la vacuna experimental estaría dado por otro mecanismo.

En relación a IPNV, si bien la evidencia acumulada muestra que la respuesta inmune humoral, es muy importante en la protección de los salmónidos contra IPN [73] y que la IgM en suero se correlaciona con protección al desafío contra esta enfermedad [29] [73], en otros trabajos se establece que la estimulación de los anticuerpos mediante la vacunación en los peces no es necesariamente indicativo de la habilidad de la vacuna de proteger contra el patógeno, sugiriendo que la magnitud de los anticuerpos totales estimulados por la vacuna no están necesariamente relacionados al nivel de protección contra IPN por lo que las vacunas contra este virus buscan estimular la respuesta inmune produciendo anticuerpos neutralizantes [74].

La protección de la vacuna contra IPN no pudo ser evaluada in vivo ya que pese a que la literatura describe infecciones exitosas, el lograr un desafío exitoso contra IPNV es bastante complicado en condiciones experimentales. Por lo tanto, para determinar si la respuesta humoral inducida por la vacuna era capaz de neutralizar la infección viral por IPNV y evaluar la protección que la vacuna otorgaba contra la fracción IPNV en los peces tratados, se determinó y comparó el título de anticuerpos neutralizantes en suero de peces vacunados y controles, en dos puntos de muestreo post vacunación mediante un ensayo de seroneutralización viral contra IPNV. Se ha demostrado que el virus IPNV puede ser neutralizado mediante anticuerpos en el suero de peces infectados [75] y que vacunas orales contra IPN inducen en los peces vacunados anticuerpos neutralizantes contra el virus [53-56]. La vacuna evaluada en este estudio indujo un aumento de anticuerpos neutralizantes que se mantuvo constante y que fue estadísticamente distinto al grupo control ($p < 0.05$) en ambos tiempos analizados, resultando protectora contra la infección por IPNV in vitro. En los trabajos en los cuales se ha producido una respuesta de anticuerpos neutralizantes luego de una vacunación oral contra IPN y se ha realizado un desafío in vivo de los peces vacunados, se ha demostrado protección contra el desafío [55] [56] y disminución de la carga viral post desafío en órganos de peces infectados [53] [54].

En los trabajos de vacunas orales contra IPN en los cuales se ha medido el título de anticuerpos neutralizantes en más de un punto post vacunación, se han detectado diferencias significativas con los controles en todos los tiempos de muestreo manteniendo una respuesta hasta las 8 semanas post vacunación (840 UTA aproximadamente) [55] y 90 días post vacunación (1350 UTA aproximadamente) [56].

En el presente estudio, la vacuna indujo una respuesta de anticuerpos específicos sistémicos contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa que se mantuvo constante hasta las 600 UTA y que además resultó ser protectora contra la infección viral por IPNV.

Los peces poseen sistemas de defensa inmunes innato y adaptativo, ambas respuestas inmunes están estrechamente relacionadas [39] [40], mientras más

se conoce sobre el sistema inmune de los peces más se da cuenta de cuan complejo es [39]. A pesar de que la naturaleza precisa de la respuesta inmune protectora de los peces resultante de la vacunación no está clara [64], se conoce que uno de los roles de los anticuerpos específicos es matar/neutralizar los agentes infecciosos [43] y que muchos estudios relacionan la presencia de anticuerpos humorales de vacunas bacterianas directamente con protección [64]. Con los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere que al utilizar la vacuna trivalente en peces la respuesta de anticuerpos séricos tendría un rol importante en la protección contra SRS.

El presente trabajo representa la primera exploración de la posibilidad de administrar vacunas orales triples en salmónidos, y es el primer trabajo donde se evalúa una vacuna oral que contenga la fracción *Vibrio ordalii*. La respuesta de anticuerpos evaluada correspondió solamente a la respuesta sistémica al cuantificar anticuerpos séricos. Se ha demostrado que vacunas orales monovalentes contra IPN y SRS inducen una respuesta local en mucosa intestinal, estimulando la producción de linfocitos en el tracto digestivo de peces vacunados oralmente [76] [45] y que vacunas orales contra *Vibrio anguillarum* estimulan la producción de anticuerpos en mucus [49].

Para futuros trabajos sería interesante evaluar esta respuesta y evaluar el efecto que tendría la vacuna sobre la inmunidad innata ya que el sistema inmune innato en peces tiene un rol más importante que en los mamíferos [77] y es de primera importancia en combatir las infecciones en peces [41] siendo la primera barrera de defensa contra los patógenos [78].

Considerando que la tecnología de Micromatrix® utilizada para producir la vacuna oral contra SRS es potencialmente aplicable para otros antígenos de administración oral [45]. Tomando como base los resultados de este estudio para futuras investigaciones sería interesante evaluar una vacuna oral trivalente que contuviera otros patógenos importantes para la industria acuícola por ejemplo al virus de la anemia infecciosa del salmón (ISA)

VIII CONCLUSIONES

1. La vacunación oral con la vacuna experimental indujo un alza de anticuerpos específicos contra *P.salmonis*, IPNV y *Vibrio ordalii* tan pronto como a las 300 UTA post vacunación.
2. La vacunación oral con la vacuna experimental resultó ser protectora contra SRS y otorgó inmunidad específica de anticuerpos séricos contra *P.salmonis* que se mantuvo constante entre las 300 UTA y las 600 UTA post vacunación.
3. La vacunación oral con la vacuna experimental resultó no ser protectora contra Vibriosis e indujo una respuesta inmune de anticuerpos específicos a las 300 UTA que decayó en el tiempo.
4. Para la fracción IPNV, la vacunación oral con la vacuna experimental indujo una respuesta de anticuerpos sistémicos específicos que se mantuvo constante en el tiempo y que además fue capaz de neutralizar la infección por el virus in vitro.
5. La vacunación oral con la vacuna experimental resultó ser protectora contra la infección por IPNV in vitro en ambos tiempos de muestreo (300 y 600 UTA) ya que indujo un aumento de anticuerpos neutralizantes que fue estadísticamente distinto al grupo control.
6. Se sugiere que al utilizar la vacuna experimental en peces la respuesta de anticuerpos séricos tendría un rol importante en la protección contra SRS.

IX BIBLIOGRAFÍA

1. Rombout, J.H.W.M., Y. Guiwen, and K. Virwanath, Adaptative immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014. **40**: p. 634-643.
2. Bostock, J., B. McAndrew, R. Richards, K. Jauncey, T. Telfer, K. Lorenzen, D. Little, L. Ross, N. Handisyde, I. Gatward, and R. Corner, Aquaculture:global status and trends. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. **365**(1554):p. 2897-912.
3. SalmónChile. Exportaciones. <http://www.salmonchile.cl/es/exportaciones.php> 2013 [cited 15 de Agosto 2014].
4. Vandenberg, G.W., Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? *Anim Health Res Rev*, 2004. **5**(2): p. 301-4.
5. Brudeseth, B.E., R. Wiulsrod, B.N. Fredriksen, K. Lindmo, K.E. Lokling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan, and K. Gravningen, Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol*, 2013. **35**(6): p. 1759-68.
6. Rozas, M. and R. Enriquez, Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J Fish Dis*, 2014. **37**(3): p. 163-88.
7. Fryer, J.L., C. Lannan, L. Garcés, J. Larenas, and P. Smith, Isolation of a rickettsia-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathology*, 1990. **25**(2): p. 107-114.
8. Fryer, J.L.L., C; Giovannoni, S.J;Wood, N.D., *Piscirickettsia salmonis* gen. nov.;sp.nov.the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992. **42**: p. 120-126.
9. Mauel, M.J.G., S J; Fryer, J L, Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms.*, 1999. **35**: p. 115-123.
10. Gómez, F.H.V.M., S., Additional evidence of the facultative intracellular nature of the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 2009. **41**: p. 261-267.
11. Bravo, S. and M. Campos, Coho salmon syndrome in Chile. *American Fisheries Society Newsletter*, 1989. **17**: p. 3.
12. Sernapesca. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos. http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdow&id=8014 2013 [cited 6 de Agosto 2014].
13. Cvitanich, J., O. Gárate, and C.E. Smith, Etiological agent in a Chilean coho disease isolated and confirmed by Kochs postulates. *American Fisheries Society Newsletter*, 1990. **18**: p. 1-2.
14. Cvitanich, J., O. Gárate, and C.E. Smith, The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Kochs postulate. *Journal of Fish Diseases* 1991. **14**(2): p. 121-145.
15. Schäfer, J.W., V. Alvarado, R. Enríquez, and M. Monrás, The coho salmon syndrome (CSS): A new disease in Chilean salmon, reared in sea water. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1990. **10**: p. 130.
16. Branson, E.J. and D. Nieto Díaz-Muñoz, Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) in South America. *Journal of Fish Diseases*, 1991. **14**: p. 147-156.

17. Cvitanich, J., O. Gárate, and C.E. Smith, Isolation of a new rickettsia-like organism from Atlantic salmon in Chile. . American Fisheries Society Newsletter, 1995. **23**: p. 1-2.
18. Bravo, S., Piscirickettsiosis in fresh water. Bulletin of the European Association of Fish Pathology, 1994. **14**: p. 137-138.
19. Gaggero, A., H. Castro, and A.M. Sandino, First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. Journal of Fish Diseases, 1995. **18**(3): p. 277-280.
20. Roberts, R.J. and M.D. Pearson, Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis, 2005. **28**(7): p. 383-90.
21. Fauquet, C., Double stranded RNA virus., in Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. 2005, Elsevier Academic Press.: 2nd Ed. London. p. 561-570.
22. Dobos, P., Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. Nucleic Acids Res, 1976. **3**(8): p. 1903-24.
23. Dobos, P., The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Annual Review of Fish Diseases., 1995. **5**: p. 25-54.
24. Duncan, R. and P. Dobos, The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(14): p. 5934.
25. Duncan, R., C.L. Mason, E. Nagy, J.A. Leong, and P. Dobos, Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. Virology, 1991. **181**(2): p. 541-52.
26. Malsberger, R.G. and C.P. Cerini, Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. Ann N Y Acad Sci, 1965. **126**(1): p. 320-7.
27. Munang'andu, H.M., B.N. Fredriksen, S. Mutoloki, B. Brudeseth, T.Y. Kuo, I.S. Marjara, R.A. Dalmo, and O. Evensen, Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a cohabitation challenge model. Vaccine, 2012. **30**(27): p. 4007-16.
28. Allnutt, F.C., R.M. Bowers, C.G. Rowe, V.N. Vakharia, S.E. LaPatra, and A.K. Dhar, Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. Vaccine, 2007. **25**(26): p. 4880-8.
29. Munang'andu, H.M., B.N. Fredriksen, S. Mutoloki, R.A. Dalmo, and O. Evensen, Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Vet Res, 2013. **44**: p. 7.
30. Ellis, A.E., A. Cavaco, A. Petrie, K. Lockhart, M. Snow, and B. Collet, Histology, immunocytochemistry and qRT-PCR analysis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts following infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). J Fish Dis, 2010. **33**(10): p. 803-18.
31. Skjesol, A., I. Skjaveland, M. Elnaes, G. Timmerhaus, B.N. Fredriksen, S.M. Jorgensen, A. Krasnov, and J.B. Jorgensen, IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. Virol J, 2011. **8**: p. 396.
32. Avendano-Herrera, R., J.P. Maldonado, D. Tapia-Cammas, C.G. Feijoo, F. Calleja, and A.E. Toranzo, PCR protocol for detection of *Vibrio ordalii* by

- amplification of the *vohB* (hemolysin) gene. *Dis Aquat Organ*, 2014. **107**(3): p. 223-34.
33. Bohle, H., F. Kjetil, P. Bustos, A. Riofrío, and C. Peters, Fenotipo Atípico de *Vibrio ordalii*, bacteria altamente patogénica aislada desde salmón del Atlántico cultivado en las costas marinas del sur de Chile. . *Archivos de Medicina Veterinaria*, 2007. **39**(1): p. 43-52.
 34. NCBI. Taxonomy Browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> 2008 [cited 2014 12 Diciembre].
 35. Schiewe MH, C.J., Ordal EJ, Deoxyribonucleic acid relationships among marine vibrios pathogenic to fish. *Canadian Journal of Microbiology*, 1977. **23**: p. 954-958.
 36. Schiewe, M.H.T., T; Crosa J H., *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish. *Current Microbiology*, 1981. **6**(6): p. 343-348.
 37. Silva-Rubio, A., C. Acevedo, B. Magarinos, B. Jaureguiberry, A.E. Toranzo, and R. Avendano-Herrera, Antigenic and molecular characterization of *Vibrio ordalii* strains isolated from Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Dis Aquat Organ*, 2008. **79**(1): p. 27-35.
 38. Colquhoun, D.J., I.L. Aase, C. Wallace, A. Baklien, and K. Gravnigen, First description of *Vibrio ordalii* from Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.*, 2004. **24**: p. 185-188.
 39. Secombes, C.J. and C. Wang, The innate and adaptive immune system of fish., in *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control.*, B. Austin, Editor. 2012, Woodhead Publishing.: University of Aberdeen, UK. p. 3–68.
 40. Rauta, P.R., B. Nayak, and S. Das, Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology Letters*, 2012. **148**: p. 23-33.
 41. Magnadottir, B., Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*, 2006. **20**(2): p. 137-51.
 42. Morrison, R.N. and B.F. Nowak, The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2002. **11**(1): p. 46-54.
 43. Ye, J., I.M. Kaattari, C. Ma, and S. Kaattari, The teleost humoral immune response. *Fish Shellfish Immunol*, 2013. **35**(6): p. 1719-28.
 44. Dhar, A.K. and F.C.T. Allnut, Challenges and Opportunities in developing oral vaccines against viral diseases of fish. *Journal of Marine Science Research & Development*, 2011. **S:1**: p. 1-6.
 45. Tobar, J.A., S. Jerez, M. Caruffo, C. Bravo, F. Contreras, S.A. Bucarey, and M. Harel, Oral vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against salmonid rickettsial septicaemia. *Vaccine*, 2011. **29**(12): p. 2336-40.
 46. Plant, K.P. and S.E. Lapatra, Advances in fish vaccine delivery. *Dev Comp Immunol*, 2011. **35**(12): p. 1256-62.
 47. Joosten, P.H.M., M. Aviles-Trigueros, P. Sorgelost, and J.H.W.M. Rombout, Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish & Shellfish Immunology*, 1995. **5**: p. 289-299.
 48. Tobar, J., F.C. Contretras, Y. Betz, C. Bravo, M. Caruffo, S. Jerez, T. Goodrich, and A.K. Dhar, Oral vaccination against Infectious Salmon Anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*) induces specific immunity and provides protection against infectious salmon anemia virus challenge. 2011, Centrovet and Advanced BioNutrition.

49. Wong, G., S.L. Kaattari, and J.M. Christensen, Effectiveness of an oral enteric coated vibrio vaccine for use in salmonid fish. *Immunol Invest*, 1992. **21**(4): p. 353-64.
50. Kumar, S.R., V.P.I. Ahmed, V. Parameswaran, V. Sudhakaran, V.S. Babu, and A.S.S. Hameed, Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio (Listonella) anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 2008. **25**: p. 47-56.
51. Yu, L.P., Y.H. Hu, B.G. Sun, and L. Sun, C312M: an attenuated *Vibrio anguillarum* strain that induces immunoprotection as an oral and immersion vaccine. *Dis Aquat Organ*, 2012. **102**(1): p. 33-42.
52. Bowden, T.J., D. Menoyo-Luque, I.R. Bricknell, and H. Wergeland, Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 2002. **12**(3): p. 283-5.
53. Min, L., Z. Li-Li, G. Jun-Wei, Q. Xin-Yuan, L. Yi-Jing, and L. Di-Qiu, Immunogenicity of *Lactobacillus*-expressing VP2 and VP3 of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol*, 2012. **32**(1): p. 196-203.
54. Zhao, L.L., M. Liu, J.W. Ge, X.Y. Qiao, Y.J. Li, and D.Q. Liu, Expression of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2-VP3 fusion protein in *Lactobacillus casei* and immunogenicity in rainbow trouts. *Vaccine*, 2012. **30**(10): p. 1823-9.
55. De las Heras, A.I., S. Rodriguez Saint-Jean, and S.I. Perez-Prieto, Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish Shellfish Immunol*, 2010. **28**(4): p. 562-70.
56. Ballesteros, N.A., S. Rodriguez Saint-Jean, and S.I. Perez-Prieto, Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, *Walbaum*). *Fish Shellfish Immunol*, 2014. **37**(2): p. 220-8.
57. Marshall, S., S. Heath, V. Henriquez, and C. Orrego, Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonids via the PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1998. **64**(8): p. 3066-9.
58. Olivares, J. and S.H. Marshall, Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. *J Fish Dis*, 2010. **33**(3): p. 261-6.
59. Reed, L.J. and H. Muench, A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 1938. **27**(3): p. 493-497.
60. Vervarcke, S., F. Ollevier, R. Kinget, and A. Michoel, Oral vaccination of African catfish with *Vibrio anguillarum* O2: effect on antigen uptake and immune response by absorption enhancers in lag time coated pellets. *Fish Shellfish Immunol*, 2004. **16**(3): p. 407-14.
61. Vervarcke, S., F. Ollevier, R. Kinget, and A. Michoel, Mucosal response in African catfish after administration of *Vibrio anguillarum* O2 antigens via different routes. *Fish Shellfish Immunol*, 2005. **18**(2): p. 125-33.
62. Quentel, C. and M. Vigneulle, Antigen uptake and immune responses after oral vaccination. *Dev Biol Stand*, 1997. **90**: p. 69-78.
63. Agius, C., M.T. Horne, and P.D. Ward, Immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. *Journal of Fish Diseases*, 1983. **6**: p. 129-134.

64. Austin, B., Developments in vaccination against fish bacterial disease, in *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control*, B. Austin, Editor. 2012, Woodhead Publishing: University of Aberdeen, UK. p. 218-243.
65. Miquel, A., I. Muller, P. Ferrer, P.D. Valenzuela, and L.O. Burzio, Immunoresponse of *Coho salmon* immunized with a gene expression library from *Piscirickettsia salmonis*. *Biol Res*, 2003. **36**(3-4): p. 313-23.
66. Wilhelm, V., A. Miquel, L.O. Burzio, M. Roseblatt, E. Engel, S. Valenzuela, G. Parada, and P.D. Valenzuela, A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* based on recombinant proteins. *Vaccine*, 2006. **24**(23): p. 5083-91.
67. Wilda, M., M.A. Lavoria, A. Giraldez, O.L. Franco-Mahecha, F. Mansilla, M. Erguiz, M.E. Iglesias, and A.V. Capozzo, Development and preliminary validation of an antibody filtration-assisted single-dilution chemiluminometric immunoassay for potency testing of *Piscirickettsia salmonis* vaccines. *Biologicals*, 2012. **40**(6): p. 415-20.
68. Harrel, L.W., H.M. Etlinger, and H.O. Hodgins, Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease.I. Serum antibody protection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis. *Aquaculture*, 1975. **6**: p. 211-219.
69. Velji, M.I., T.P.T. Evelyn, and J.L. Albright, Nature of the immune response in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* following vaccination with *Vibrio ordalii* lipopolysaccharide by two different routes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1991. **11**: p. 79-84.
70. Estévez, J., J. Leiro, A.E. Toranzo, J.L. Barja, and F.M. Ubeira, Role of serum antibodies in protection of vaccinated turbot (*Scophthalmus maximus*) against vibriosis. *Aquaculture*, 1994. **123**(3-4): p. 197-204.
71. Lillehaug, A., Oral immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis with vaccines protected against digestive degradation. *Journal of Fish Diseases*, 1989. **12**: p. 579-584.
72. Johnson, K.A. and D.F. Amend, Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 1983. **6**(5): p. 473-476.
73. Munang'andu, H.M., S. Mutoloki, and O. Evensen, Acquired immunity and vaccination against infectious pancreatic necrosis virus of salmon. *Dev Comp Immunol*, 2014. **43**(2): p. 184-96.
74. Rivas-Aravena, A., M. Cortez-San Martin, J. Galaz, M. Imarai, D. Miranda, E. Spencer, and A.M. Sandino, Evaluation of the immune response against immature viral particles of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): a new model to develop an attenuated vaccine. *Vaccine*, 2012. **30**(34): p. 5110-7.
75. Jorgensen, P.E., The nature and biological activity of IPN virus neutralizing antibodies in normal and immunized rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Arch Gesamte Virusforsch*, 1973. **42**(1): p. 9-20.
76. Ballesteros, N.A., R. Castro, B. Abos, S.S. Rodríguez Saint-Jean, S.I. Pérez-Prieto, and C. Tafalla, The pyloric caeca area is a major site for IgM(+) and IgT(+) B cell recruitment in response to oral vaccination in rainbow trout. *Plos One*, 2013. **8**(6): p. 1-14.
77. Watts, M., B. Munday, and C.M. Burkey, Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*, 2001. **79**(8): p. 570-574.
78. Whyte, S.K., The innate immune response of finfish--a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol*, 2007. **23**(6): p. 1127-51.

Anexo 1: Determinación de tamaño muestral con programa WinPepi.

Compare2

Compare Misclass Sample size Power Note View Saving Help Manual Finder F9
WinPepi Quit

Sample sizes needed to test a difference between 2 independent samples

FIRST CLICK ON TYPE OF COMPARISON

COMPARISON OF..

- S1. Proportions (comparison)
- S2. Proportions (equivalence)
- S3. Proportions (stratified data)
- S4. Proportions (multiple logistic regression)
- S5. Ordered categories
- S6. Means (comparison)
- S7. Means (equivalence)
- S8. Means (multiple linear regression)
- S9. Numbers of events, e.g. disease onsets/spells
- S10. Survival (time to event)
- S11. Change (using before-after ratings)

Back to "Comparison of" menu

The groups are A and B. In a case-control study or trial, call the controls "B". In a cohort study, call the unexposed "B".

Significance level %: Power %:

Ratio of sample sizes B:A

Using cluster samples

Enter (known or assumed):

Pooled variance: or Two SDs: SD in A: SD in B:

TO DETECT: Difference:

REQUIRED SAMPLE: Total 38 (19 in A, 19 in B)

EXPECTED PRECISION:
Approx. 95% CI for difference between means (D) =
D - 10.564 to D + 10.564

Compare2

Compare Misclass Sample size Power Note View Saving Help Manual Finder F9
WinPepi Quit

Sample sizes needed to test a difference between proportions

FIRST CLICK ON TYPE OF COMPARISON

COMPARISON OF..

- S1. Proportions (comparison)
- S2. Proportions (equivalence)
- S3. Proportions (stratified data)
- S4. Proportions (multiple logistic regression)
- S5. Ordered categories
- S6. Means (comparison)
- S7. Means (equivalence)
- S8. Means (multiple linear regression)
- S9. Numbers of events, e.g. disease onsets/spells
- S10. Survival (time to event)
- S11. Change (using before-after ratings)

Back to "Comparison of" menu

The groups are A and B. In a case-control study or trial, call the controls "B". In a cohort study, call the unexposed "B".

Significance level %: Power %:

Ratio of sample sizes B:A

Using cluster samples

Enter (known or assumed): Proportion in B:

OPTION: Compute the sample size needed to test the null hypothesis that the proportion in ONE SAMPLE ("group B") does not differ from a chosen value. Chosen value:

TO DETECT: Odds ratio A:B or Ratio A:B or Proportion in A:

REQUIRED SAMPLE: Total 42 (21 in A, 21 in B)
Continuity-corrected: Total 52 (26 in A, 26 in B)

EXPECTED PRECISION:
Approx. 95% CI for difference between proportions (D) =
D - 0.308 to D + 0.308

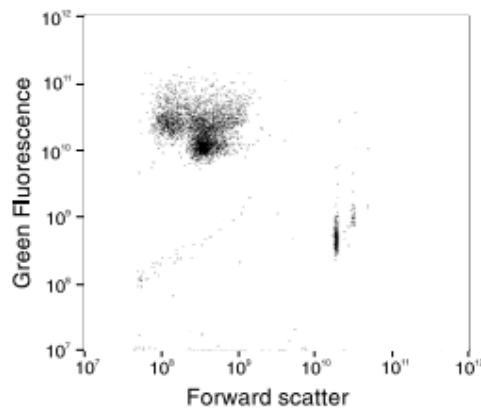
Anexo 2: Protocolo para la cuantificación de bacterias mediante citometría de flujo

Preparación de la muestra:

1. Cultivar la bacteria en medio filtrado.
2. Diluir el cultivo bacteriano, para obtener una densidad de 10^6 células/mL. Para cada ensayo se utilizará un volumen de 1.0 mL.
3. Agregar 1uL de la tinción bacteriana SYTO® BC (Componente A) a 1 mL de las células diluídas. Incubar a temperatura ambiente o hasta 37°C, por al menos 5 minutos.
4. Resuspender la suspensión standard de microesferas (componente B) por sonicación en baño de agua por 5 minutos. Agregar 10 uL de la suspensión de microesferas a la preparación con las células teñidas, mezclar bien y analizar por citometría de flujo.

Análisis por citometría de flujo

1. Aplicar una muestra experimental (bacteria teñida más microesferas) y procesar los datos de las regiones en el forward scatter versus citograma de fluorescencia como se demuestra a continuación:



Recuento mediante citometría de flujo de *Bacillus cereus* usando Bacterial Counting Kit. En este plot de forward scatter versus fluorescencia, las señales en la zona superior izquierda representan las bacterias teñidas con la tinción bacteriana de SYTO® BC. Las señales en el extremo inferior derecho representan las partículas de microesferas.

El número de señales en el sector de la bacteria (superior izquierdo) dividido por número de señales del sector de microesferas proporciona el número de bacterias por 10^{-6} mL de la muestra.