

Indicadores histológicos

cuantitativos y predictivos con aplicación productiva

M. Rozas¹, R. Ildefonso¹, G. Arriagada, C. Arcos², A. Peña¹, A. Lisperguer¹, J. Mancilla²

¹ Laboratorio Pathovet, Puerto Montt, Chile

² Marine Harvest Chile, Puerto Montt, Chile

Autor correspondencia: marco.rozas@pathovet.cl

Antecedentes generales

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) es una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en la acuicultura mundial (Wolf y col., 1960). El IPN es una enfermedad infecciosa de salmónidos en agua dulce y en *post-smolts* de salmón Atlántico después de 6 a 10 semanas de transferencia al mar (Roberts y Pearson 2005). En *post-smolts*, los brotes de IPN son considerados una reactivación de una infección asintomática mediada por estrés (Bootland y col., 1991), por lo que, el resultado final de la infección es determinado por factores que dependen del virus y del hospedero, los que son afectados por el ambiente (Jarp y col., 1996). En Chile, el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) fue aislado por primera vez en 1983 desde un *stock* de ovas de trucha arcoíris (McAllister y Reyes, 1984), posteriormente, caracterizado como serotipo A1 (VR299) (Espinoza y col., 1985). Según el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca), IPN fue la segunda enfermedad infecciosa más frecuente en la salmicultura chilena en 2014, representando un 32,7% de los casos reportados por los laboratorios de diagnóstico (376/1.150) (Sernapesca, 2014).

El salmón Atlántico sobreviviente a los brotes de IPN podría generar portadores asintomáticos que se mantienen persistentemente infectados, eliminando virus al ambiente e infectando peces sanos (Munro y col., 2006). El residuo 221 de la proteína VP2 parece ser el “*hot spot*” para la mutación adaptativa del genoma de IPNV-Sp, afectando las características de virulencia y persistencia *in vitro* e *in vivo* del virus (Santi y col., 2004; Song y col., 2005). Mutoloki y col. (2013) confirmaron que la forma clínica y subclínica de la infección por IPNV detectadas durante la etapa de agua dulce y mar en salmón Atlántico, son codificadas por T²¹⁷A²²¹ y P²¹⁷T²²¹, respectivamente. Además, demostraron que las cepas virulentas (T²¹⁷A²²¹) no logran establecer una infección persistente de manera tan eficiente como las cepas avirulentas (P²¹⁷T²²¹). Gadan y col. (2013) demostraron la reversión de la virulencia de IPNV inducida por estrés en alevines de salmón Atlántico persistentemente infectados.

El alto potencial de IPNV para generar peces persistentemente infectados determina que la presencia/ausencia del virus, establecida mediante RT-qPCR, no sea suficiente para un mejor control. Esto, básicamente, porque persiste el desafío

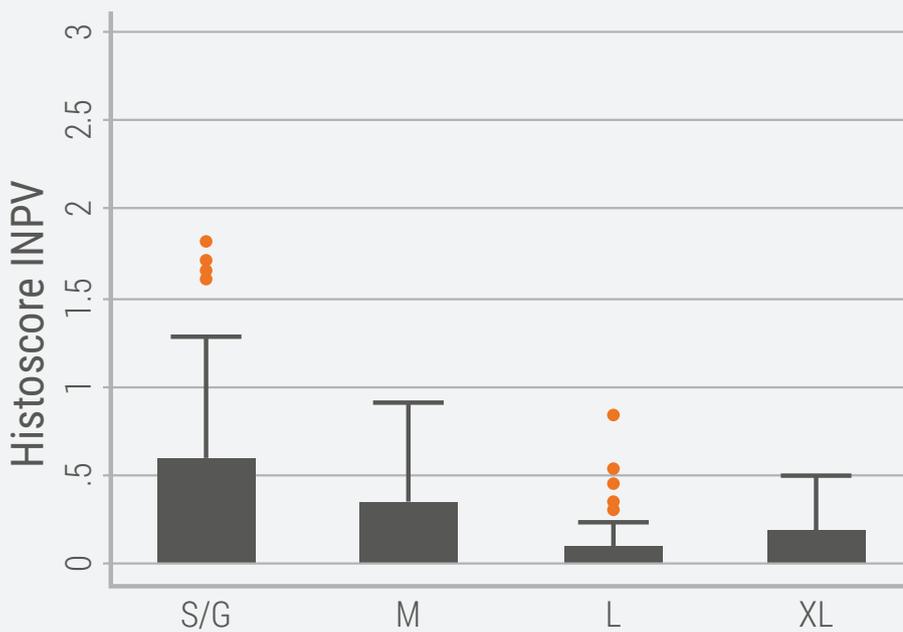


Figura 1. Gráfico de cajas para hslPN y talla (S/G=pequeño; M=mediano; L=grande; XL= muy grande).

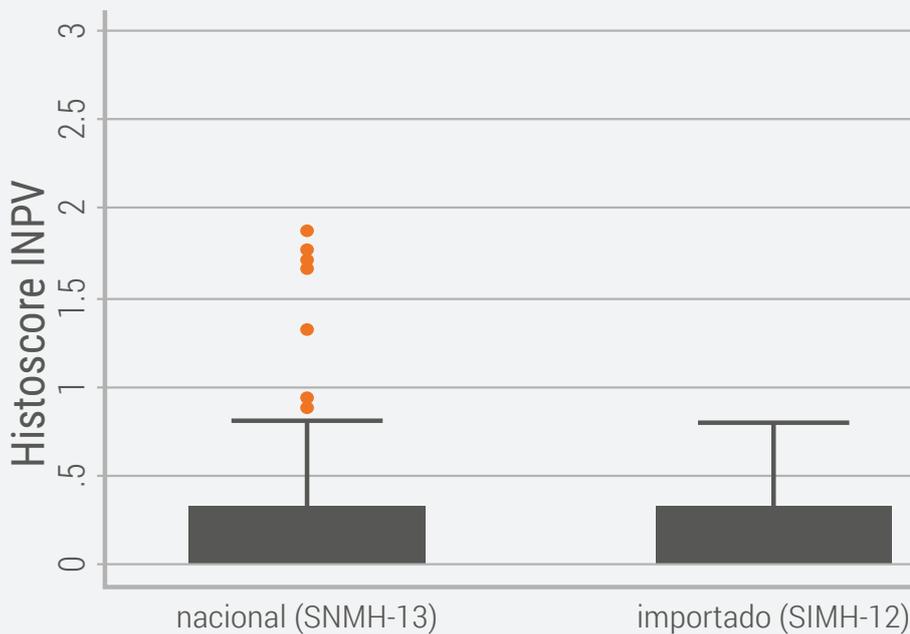


Figura 2. Gráfico de cajas para hslPN según cepa de salmón Atlántico (nacional o importada).

respecto del real valor biológico de los resultados respecto de su asociación con presencia/ausencia de secuelas tisulares, signos clínicos, mortalidad, etc. Entonces, nos propusimos desarrollar y validar indicadores histológicos cuantitativos (*histoscore*, hs) predictores del daño tisular y mortalidad atribuible a IPN (hslPN) y de la condición general

de los órganos (hsCGO) en peces aparentemente sanos, con la finalidad de aplicarlos complementariamente con otros indicadores en la optimización de la gestión productiva. Específicamente, buscamos determinar la correlación entre hslPN y RT-qPCR IPNv, evaluar la capacidad predictiva de hslPN y RT-qPCR respecto de mortalidad atribuible a IPN y evaluar la capacidad predictiva de hsCGO respecto de la mortalidad asociada con peces desadaptados.

Metodología

Grupos de peces: Se estudiaron dos grupos de salmón Atlántico, *Salmo salar*, uno importado (SI-12) y otro nacional (SN-13). El grupo SI-12 fue monitoreado a partir de noviembre del 2013 en Piscicultura A; luego, en enero del 2014 en la Piscicultura B; finalmente, dos muestreos en el centro de engorda C, en mayo y noviembre del 2014, respectivamente. El grupo SN-13 fue monitoreado en octubre del 2013 y enero del 2014 en la Piscicultura A; luego en el centro de lago D, en mayo del 2014; y en el centro de engorda E en noviembre del 2014. Los muestreos fueron aleatorios en la población de peces sanos, considerando siete peces por talla (XL, L y M).

Muestreo de órganos y análisis de laboratorio: Muestras de ciegos pilóricos y páncreas (CPP), hígado (H) y riñón (R) medio de aprox. 1 cm³ fueron colectadas y dispuestas en tubos Falcon de 10 ml con formalina *buffer* 10% (1:10). Luego, los tejidos fueron procesados para análisis histopatológico de rutina (H&E). El hslPN y hsCGO fueron obtenidos utilizando algoritmos desarrollados por Laboratorio Pathovet en el 2013. El hslPN y hsCGO de cada pez fue utilizado para calcular el promedio del hslPN (hsCGO) ± Desviación Estándar (DE) en cada punto de muestreo, talla, etc. Para el análisis RT-qPCR IPNv se colectaron muestras de riñón y se dispusieron en RNA Later para posterior cuantificación relativa de material genético de IPNv, según lo descrito por Orpetveit y col. (2010).

Análisis estadístico: Se realizó un análisis descriptivo univariado de las variables hslPN y hsCGO respecto de su asociación

con la talla, estadio y cepa de los peces, además de estimar la relación entre hslPN y RT-qPCR-IPNv. Se realizó un análisis multivariado para la variable hslPN en función de la talla y estadio de los peces mediante un modelo lineal multi-nivel. Se mantuvieron en el modelo sólo las variables con valores de $p < 0,05$. Para evaluar la capacidad predictiva de hslPN y RT-qPCR IPNv respecto de mortalidad atribuible a IPN y de hscGO para predecir mortalidad asociada a desadaptados, se construyeron modelos logísticos. Todos los análisis fueron realizados con los programas estadísticos Stata versión 13 y R versión 3.0.1.

Resultados

Asociación del hslPN con RT-qPCR, talla, estadio y cepa de los peces

La media de hslPN en peces RT-qPCR IPNv negativos fue de 0,099, mientras que en peces RT-qPCR positivos, el hslPN promedió 0,304, lo que corresponde a un ratio de 1:3. La media de hslPN promedió 0,354 en los peces pequeños (S/G), 0,174 en peces medianos (M) y 0,090 en peces grandes y muy grandes (L y XL) (**Figura 1**), determinando una asociación entre el hslPN y la talla de los peces. Del mismo modo, la media de hslPN fue 0,281 en alevines, 0,204 en peces de engorda y 0,038 en *smolts* (**Figura 2**). Este resultado también determina la asociación entre hslPN y el tipo de centro de cultivo. Finalmente, los peces de cepa nacional presentaron una media de hslPN igual a 0,217, levemente mayor que la media de los peces de cepa importada (0,175) (**Figura 3**) pero sin diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,420$).

Los resultados del modelo de regresión lineal para el análisis multivariado de hslPN, demostró una asociación positiva y significativa ($p = 0,001$) entre hslPN y RT-qPCR IPNv. Así, valores hslPN en peces RT-qPCR IPNv positivos fueron alrededor de dos veces más altos que en peces RT-qPCR negativos. Del mismo modo, la talla ($p = 0,001$) y estadio ($p < 0,001$) de los peces presentaron un efecto significativo sobre hslPN, mientras que la cepa de origen no presentó efecto en hslPN ($p = 0,991$).

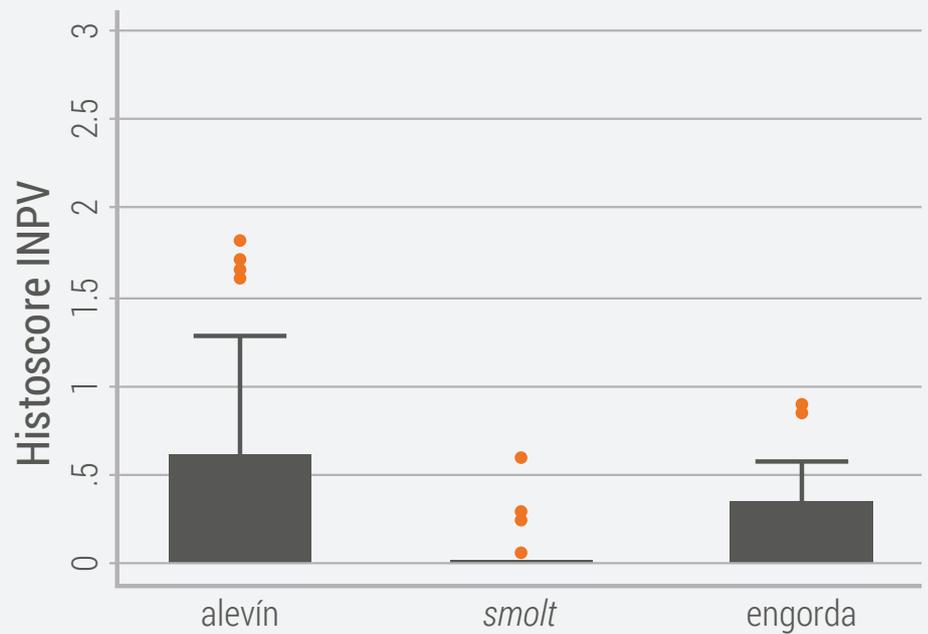


Figura 3. Gráfico de cajas para hslPN según el estadio de desarrollo.

Capacidad predictiva de hslPN y RT-qPCR para mortalidad atribuible a IPN

La variable mortalidad atribuible a IPN fue dicotomizada en el punto de corte 0, es decir, se conformó un grupo sin mortalidad IPN (mortalidad=0; etiqueta=0) y otro con mortalidad IPN (mortalidad>0; etiqueta=1). Los grupos de peces que presentaron mortalidad atribuible a IPN mostraron un hslPN promedio más alto que los grupos que no presentaron mortalidad, lo que sugiere una asociación positiva entre ambas variables.

Adicionalmente, el modelo multivariado confirma una significativa asociación entre hslPN y mortalidad atribuible a IPN ($p = 0,002$). En la práctica, por cada incremento de hslPN en una unidad (hslPN=1), la probabilidad de presentar mortalidad por IPN aumenta ocho veces. La **Figura 4** muestra el incremento de la probabilidad (*odds ratios*, OR) de presentar mortalidad atribuible a IPN por cada unidad que aumenta hslPN (entre 0 y 1). Por lo tanto, el hslPN es un buen predictor de mortalidad atribuible a IPN y puede ser aplicado para evaluar grupos de peces que serán sometidos a algún manejo de importancia económica, p.e., traslados de mar, vacunaciones, selecciones, entre otros.

Del mismo modo, el análisis univariado demostró una asociación entre los resultados RT-qPCR IPNv y la mortalidad atribuible a IPN, puesto que el 50% de los peces RT-qPCR positivos presentó mortalidad por IPN y sólo el 10,8% de los peces negativos presentó mortalidad por IP. Estos resultados fueron confirmados por el modelo multivariado, el cual demostró que la positividad RT-qPCR IPNv se asocia significativamente con la mortalidad atribuible a IPN ($p < 0,001$). Sin embargo, los peces RT-qPCR positivos presentaron una probabilidad 5,5 veces (OR= 5,5) mayor de presentar mortalidad por IPN que los peces negativos. Esta probabilidad es menor que la observada para hslPN (OR=8), por lo que el *histoscore* mostraría un mejor valor predictivo de la mortalidad atribuible a IPN que la detección del patógeno mediante RT-qPCR.

Capacidad predictiva de hscGO para peces desadaptados

La variable de mortalidad asociada a peces desadaptados fue dicotomizada para utilizar regresión logística y el punto de corte fue 0,005% (etiqueta 0: mortalidad<0,005; etiqueta 1: mortalidad>0,005). El análisis univariado

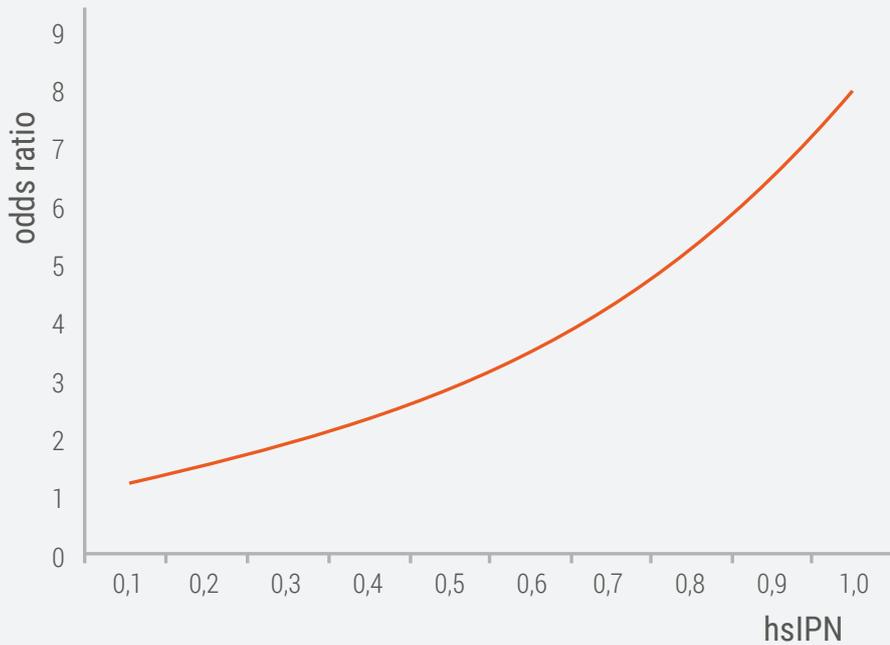


Figura 4. Odds ratio indican la probabilidad del grupo de peces de presentar mortalidad atribuible a IPN por cada unidad (0,1) de incremento de hslPN (0,1 a 1). Si hslPN= 0,1 los peces tienen una probabilidad 23% mayor de presentar mortalidad IPN en comparación con peces hslPN=0. Si hslPN= 1, la probabilidad aumenta a ocho veces (~ 800%).

demonstró que los peces con mayor mortalidad asociada con desadaptados (> 0,005%), presentaron hsCGO más altos que los peces con baja mortalidad asociada con desadaptados (<0,005%). La comparación de medias indica que los peces con baja mortalidad por desadaptados presentaron un hsCGO promedio de 0,383, mientras que peces con alta mortalidad presentaron un hsCGO promedio de 0,675.

El análisis multivarado confirmó la asociación positiva y significativa entre hsCGO y la mortalidad por desadaptados >0,005%. El modelo indica que por cada incremento de una unidad de hsCGO (hsCGO=1), la probabilidad de presentar mortalidad por desadaptados >0,005% aumenta en 2,5 veces (**Figura 5**). Si hsCGO= 2 ó hsCGO= 3, entonces la probabilidad de presentar mortalidad por desadaptados >0,005% sería 6,5 y 16,5 veces más alta que peces con hsCGO= 0, respectivamente •

Conclusiones

Bajo las condiciones de campo consideradas en el presente estudio, se puede concluir que:

- 1.El hslPN se asocia positiva y significativamente con el RT-qPCR IPNV.
- 2.El hslPN se asocia significativamente con la talla, estadio y tipo de centro de cultivo, pero no con la cepa de los peces.
- 3.El hslPN se asocia significativamente con la mortalidad atribuible a IPN. Así, peces hslPN= 1 presentan una probabilidad ocho veces mayor de presentar mortalidad atribuible a IPN que peces hslPN= 0.
- 4.El hsCGO se asocia significativamente con la mortalidad por desadaptados >0,005%. Así, peces hsCGO= 1 presentan una probabilidad 2,5 veces mayor de presentar mortalidad por desadaptados que peces hsCGO= 0.
- 5.Cada empresa puede definir el hslPN y hsCGO que determine el umbral de riesgo productivamente aceptable para cada uno de sus grupos de peces.
- 6.El valor predictivo de hslPN y hsCGO en todas las fases de cultivo, permiten proyectar parcialmente el rendimiento productivo de los peces y apoyar la toma de decisiones productivas, tales como, graduaciones, vacunación, traslados, eliminaciones, etc.
- 7.El hslPN y hsCGO podrían ser aplicados como indicadores complementarios de calidad de smolt.

Referencias

- Bootland LM, Dobos P, Stevenson RMW: The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 1991, 10: 13–21.
- Gadan K, Sandtro A, Marjara IS, Santi N, Munang'andu HM, Evensen O: Stress-induced reversion to virulence of infectious pancreatic necrosis virus in naive fry of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One* 2013, 8(2): e54656.
- Jarp J, Taksdal T, Tørud B: Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon *Salmo salar* in relation to specific antibodies, smoltification, and infection with erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS). *Diseases of Aquatic Organisms* 1996, 27; 81-88.
- McAllister PE, Reyes X: Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *Journal of Fish Diseases* 1984, 7: 319-322.
- Munro ES, Gahlawat SK, Acosta F, Ellis AE: In infectious pancreatic necrosis virus carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts, almost all kidney macrophages ex vivo contain a low level of non-replicating virus. *Journal of Fish Diseases* 2006, 29(1): 43-48.
- Mutoloki S, Munang'andu HM, Evensen O: Clinical and subclinical forms of infectious pancreatic necrosis virus infections show specific viral genetic fingerprints that link differences in virulence to immunogenicity. *Fish and Shellfish Immunology* 2013, 34: 1667.
- Orpetveit I, Mikalsen AB, Sindre H, Evensen O, Dannevig BH, Midtlyng PJ. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in subclinically infected Atlantic salmon by virus isolation in cell culture or real time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22: 886–895.
- Roberts RJ, Pearson MD: Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 2005, 28: 383-390.
- Santi N, Vakharia VN, Evensen O: Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic

necrosis virus. *Virology* 2004, 322(1): 31-40.

Sernapesca 2014. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Informe Sanitario de Salmonicultura de Centros Marinos 2014. [on line] http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=8946 [acceso 15 enero 2015]

Song H, Santi N, Evensen O, Vakharia VN: Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *Journal of Virology* 2005, 79(16): 10289-10299.

Wolf K, Sniesko SF, Dunbar CE, Pyle E: Virus nature of Infectious Pancreatic Necrosis in trout. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1960, 104: 105-108.

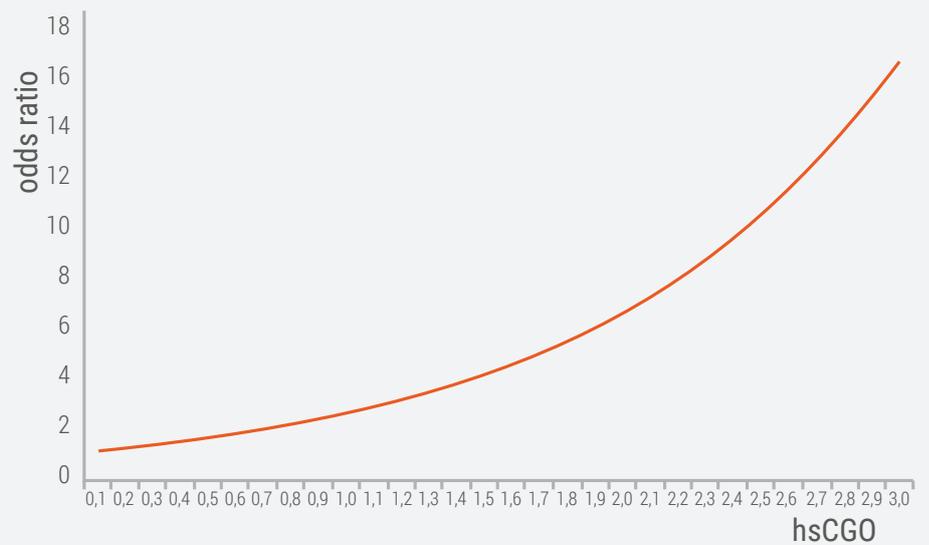


Figura 5. Odds ratio indican la probabilidad del grupo de peces para presentar mortalidad por desadaptados $>0,005\%$ por cada unidad (0,1) de incremento del hsCGO (0,1 a 3). Si hslPN=1, los peces tienen 255% más de probabilidad de presentar mortalidad por desadaptados $>0,005\%$ en comparación con peces hsCGO=0. Si hslPN= 2, la probabilidad aumenta a 6,5 veces (~650%).