

INFORME SANITARIO

**ANÁLISIS DE RIESGO DE LA DISEMINACIÓN
DE ENFERMEDADES
A TRAVÉS DE LOS TALLERES DE REDES**

**PROYECTO FDI CORFO
TRATAMIENTO Y MANEJO DE RESIDUOS EN TALLERES
DE LAVADO DE REDES:
UNA ESTRATEGIA COMPETITIVA Y SUSTENTABLE
PARA LA SALMONICULTURA CHILENA**

(01CR3PT-04)

- Agosto 2003 -

INDICE

	<i>Pág.</i>
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
PRIMERA CAMPAÑA MUESTREO (ABRIL 2002)	6
- Estudio de riesgo	6
- Manejo de riesgo	22
- Conclusiones	38
- Comunicación de riesgo	47
SEGUNDA CAMPAÑA MUESTREO (MAYO 2003)	51
- Resultados	56
- Conclusiones	60
- Análisis laboratorio	62

INTRODUCCIÓN

Fundación Chile en conjunto con la Unidad de Desarrollo Tecnológico de la Universidad de Concepción y con el apoyo del Fondo de Desarrollo e Innovación FDI de la Corporación de Fomento de la Producción CORFO, la Asociación de Talleres de Lavado de Redes y Servicios Afines, Atared AG, empresas de pintura Ceresita, Bayer y Hempel y la empresa salmonera Marine Harvest Chile S.A. llevan a cabo el proyecto “*Tratamiento y Manejo de Residuos en Talleres de Lavado de Redes: Una Estrategia Competitiva y Sustentable para la Salmonicultura Chilena*”.

El objetivo general de este proyecto es desarrollar un Sistema de Tratamiento de los residuos generados por las empresas de lavado de redes, basado en una tecnología innovativa e integral, y un Sistema de Certificación ambiental / sanitario para talleres de redes de la X Región.

El presente documento corresponde a un informe sanitario que incluye las actividades y resultados obtenidos en la Etapa 2 del proyecto, cuyo objetivo fue realizar el Análisis de Riesgo de la Diseminación de Enfermedades a través de los Talleres de Lavado de Redes. Para ello se describieron y evaluaron los riesgos asociados a la transmisión de enfermedades de los principales patógenos que afectan la industria salmonera en Chile a través de vectores inanimados, en los talleres de lavado de redes.

Para la identificación de posibles patógenos presentes en los talleres de lavado de redes, y entorno relacionado, se realizaron dos campañas de muestreo (abril 2002 y mayo 2003); recolectando muestras en centros de cultivo de salmónidos de la zona, en redes, en *fouling*, en riles y en camiones de transporte de redes.

ANTECEDENTES

Los notables logros conseguidos por la acuicultura nacional, han hecho percibir la importancia de las enfermedades las cuales representan uno de las principales causas que producen pérdidas en la industria atribuidas a mortalidades, tratamientos y rendimientos no alcanzados.

En Chile existen una serie de patologías infecciosas y no infecciosas que afectan a los salmónidos en cultivo. Entre las enfermedades infecciosas y agentes etiológico, de importancia que afecta a los cultivos en agua dulce se encuentra la Flavobacteriosis (*Flavobacterium sp.*), Yersiniosis (*Yersinia ruckeri*), Saprolegniasis (*Saprolegnia sp.*), Renibacteriosis (*Renibacterium salmoninarum*) y Necrosis pancreática infecciosa (Virus de la Necrosis Pancreática infecciosa). En estuario son importante entre otras la presencia de Furunculosis atípica (*Aeromonas salmonicida* achromogenes), Síndrome por cocáceas gram positivas (Cocáceas gram positivas) junto a Piscirickettsiosis (*P. salmonis*) y Necrosis pancreática infecciosa (Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa). En agua de mar la principal enfermedad que afecta a los cultivos de salmónidos es la Piscirickettsiosis (*P. Salmonis*), aunque no de menor impacto son las pérdidas infecciones producidas por la Necrosis Pancreática infecciosa (IPNV), Caligiasis (*Caligus sp.*) y Renibacteriosis (*R. salmoninarum*).

Es de suma importancia en este último tiempo la aparición en agua de mar del síndrome icterico del Salmón coho (*O. kisutch*) (de etiología aún no aclarada) el cual produce cuantiosas mermas en la producción de engorda de esta especie.

El conocimiento epidemiológico de cada una de las enfermedades, tanto de las conocidas como de las emergentes, es un factor de relevancia para el diseño de programas de prevención y control de enfermedades específicos y generales.

Uno de los factores importantes a considerar en la transmisión de enfermedades son las fuentes de infección, definidas como aquellas que sirven de ambiente natural y sitio de multiplicación de una agente, y de la cual por una u otra ruta este puede infectar a un individuo susceptible. La fuente de infección más común es el huésped infectado, tanto clínica como subclínicamente, sin embargo no es menor el rol de los reservorios que son todos los individuos o elementos inanimados capaces de mantener un agente infeccioso.

Otro de los aspectos relevantes relacionados con la epidemiología de las enfermedades son los mecanismos de transmisión, esto se refiere a todas las formas por las cuales un agente infeccioso se transporta desde una fuente de infección hasta un nuevo huésped.

Esta puede ser en forma vertical, que se transmiten de una generación a otra; o en forma horizontal, que son aquellas que se transmiten, dentro de una misma población o de una población a otra. Entre los mecanismos de transmisión horizontal se pueden diferenciar la forma directa, que corresponde a la transferencia inmediata del agente infeccioso a la puerta de entrada del huésped susceptible y la forma indirecta, dentro de esta se destacan los vectores animados.

Los talleres de redes en la industria de salmónidos en Chile tienen como función el procesamiento (lavado e impregnación) y reparación de estas.

En el proceso se incluye la recopilación de las redes provenientes de centros de cultivo donde en forma común se presenta *fouling* adherido a la superficie de las redes, el cual representa una fuente de infección y constituye un vehículo de transmisión.

Debido los distintos orígenes de las redes y por lo tanto los distintos estatus sanitarios de los centros que confluyen en los centros de acopio de las redes para su lavado, esto puede representar una fuente de contaminación mecánica que juega un rol epidemiológico desconocido en el sistema. Por otro lado los vehículos de transporte (camiones, embarcaciones) y las propias redes pueden constituir vectores de transmisión horizontal de patógenos.

El impacto sanitario de este tipo de actividad y su rol en la epidemiología de las enfermedades es desconocido, por lo cual un estudio del impacto de esta actividad es de suma importancia ya que no está exento de riesgo.

PRIMERA CAMPAÑA DE MUESTREO (ABRIL 2002) PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS DE IMPORTANCIA SANITARIA, PROCEDENTES DE TALLERES DE REDES EN LA X REGION

ESTUDIO DE RIESGO

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Entregar una descripción y evaluación de los riesgos asociados a la transmisión de enfermedades de los principales patógenos que afectan la industria salmonera en Chile a través de vectores inanimados, en talleres de lavado de redes, pertenecientes a Atared A.G.

1.2 Objetivos específicos

Evaluar evidencia de la presencia probable de agentes patógenos para los peces o vectores en las redes provenientes de los centros de cultivo.

Evaluar evidencia en relación con la probabilidad de los patógenos que puedan sobrevivir a los procedimientos operacionales utilizados en la industria impregnadora de redes:

- Determinar la sobrevivencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa expuesto a pintura *antifouling* en base a solvente orgánico y solvente acuoso por medio de la técnica de cultivo celular en CHSE-214 y confirmación por *dot-blot*.
- Determinar la actividad viricida de 4 productos desinfectantes de uso común en la industria acuícola nacional.
- Determinar la actividad viricida *in vitro* del óxido cuproso; compuesto activo de las pinturas *antifouling*

2. METODOLOGÍA

2.1 Estudio de riesgo de transmisión de enfermedades

Se realizó un estudio de los riesgos asociados a la transmisión de los principales patógenos que afectan a la industria salmonera en Chile a través de vectores inanimados. Se recabaron antecedentes de cual es el riesgo de diseminar patógenos mediante los procedimientos utilizados en la industria impregnadora de redes.

Se realizaron visitas a los talleres de lavado e impregnación de redes. Se elaboró un diagrama de flujo del proceso que representó todos los pasos operacionales del manejo del producto, desde el retiro de las redes en los centros de cultivo hasta el despacho post tratamiento.

2.1.1 Identificación de los peligros

Se enumeraron los insumos y los pasos operacionales del proceso, para realizar una identificación organizada de los riesgos.

2.1.2 Valoración de los peligros

Una vez establecidos los puntos de control del proceso y, con la finalidad de analizar cada uno de los riesgos identificados, se determinaron para cada uno de éstos la probabilidad de ocurrencia, el efecto y la incidencia.

2.2 Metodología de muestreo

2.2.1 Obtención de las muestras.

Fouling: Las muestras de fouling se obtuvieron de dos formas:

a) A partir de talleres de redes:

El *fouling* se obtuvo a partir de redes en espera a ser lavadas (redes sucias). Las muestras de *fouling* fueron colectadas asépticamente de diferentes zonas de las redes. Una vez extraídas fueron puestas en bolsas plásticas estériles debidamente rotuladas. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de Ictiopatología de Aquagestión - Fundación Chile, sede Puerto Montt (Abril 2002).

b) A partir de fouling extraído en los centros de cultivo de salmones:

El *fouling* se obtuvo al momento de recolectar la mortalidad de peces, en redes de balsas-jaulas y redes loberas. Las muestras fueron debidamente rotuladas y mantenidas, hasta luego ser remitidas al laboratorio.

Las muestras proceden de 5 centros de cultivo de salmónidos ubicados en distintas zonas de la décima región (Tabla 1). A los centros se les asignó la siguiente rotulación:

Tabla 1: Rotulación de los centros de cultivo muestreados

Centro de Cultivo	Origen
Centro de Cultivo 1	Chiloé central
Centro de Cultivo 2	Chiloé central
Centro de Cultivo 3	Palena
Centro de Cultivo 4	Palena
Centro de Cultivo 5	Palena

c) Redes:

Se tomaron las muestras en un taller de redes, colectándose antes de lavar y después de lavar. Se extrajo un trozo (20 cm²) del fondo y otro del costado de la red, colectándose en bolsas estériles debidamente rotuladas. Las muestras fueron remitidas al laboratorio.

d) Residuos líquidos:

Los residuos líquidos fueron colectados en diferentes puntos de dos talleres de redes, manteniéndose en bolsas estériles debidamente rotuladas para su análisis.

2.2.2 Procesamiento de las muestras.

Fouling:

Se clasificaron los organismos que componen el *fouling* según la familia a la cual pertenecen y según la especie cuando fue posible. Una vez clasificados se procedió a realizar los análisis de laboratorio respectivos.

Redes:

Se cortaron varios trozos de la muestra de red y se sumergieron en un matraz graduado con 200 ml de agua peptonada y se dejó en reposo por 10 minutos. Se tomó una alícuota de suspensión de red en agua peptonada para su procesamiento.

2.3 Análisis de laboratorio

Las enfermedades consideradas fueron: Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), Síndrome Rickettsial Salmonídeo (SRS).

Los métodos utilizados fueron para el virus de la necrosis pancreática infecciosa el cultivo en líneas celulares CHSE-214 y RT-PCR-ELISA para IPNV, para la enfermedad bacteriana del riñón y el Síndrome Rickettsial Salmonídeo se utilizó enzimoimmunoanálisis, (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFAT).

Para otras enfermedades bacterianas se utilizaron cultivos convencionales para bacterias patógenas marinas como agar soya tripticasa con sal (TSA/sal), agar tiosulfato citrato sales biliares (TCBS) y Agar sangre.

El detalle de los protocolos de análisis se entregan en el Anexo 1.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación de riesgos de transmisión de enfermedades.

A continuación se describen los principales patógenos que potencialmente se pueden transmitir durante el lavado de redes, los pasos operacionales que se llevan a cabo en el proceso y los insumos empleados.

3.1.1 Caracterización de los principales patógenos que afectan a la salmonicultura en Chile.

En el ámbito de la salud de peces, se considera que los agentes patógenos que causan una mayor impacto en la salud son *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis* y el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa.

a) *Renibacterium salmoninarum*, BKD:

En salmónidos produce la “Enfermedad Bacteriana del Riñón”. Es una bacteria tipo diplobacilo gram positivo, pequeña (0,3-1,5µm x 0,1-1,0µm), inmóvil, no esporulado, patógeno intracelular. Se transmite horizontalmente a través del agua dulce y de mar, como también por la ingesta de vísceras de peces contaminados. Se ha demostrado que *R. salmoninarum* puede sobrevivir 12 días en agua de mar, y 21 días en fecas y sedimento, y se estima que tiene mayor afinidad con la materia orgánica. No se conoce la participación de vectores en su transmisión.

b) *Piscirickettsia salmonis*, SRS:

En todas las especies de salmónidos cultivadas en Chile, produce el Síndrome Rickettsial Salmonídeo (SRS). Esta enfermedad se puede transmitir horizontalmente.

P. salmonis es una bacteria gram negativa, inmóvil, no encapsulada, pleomórfica, habitualmente cocoide, patógeno intracelular obligado y de un tamaño variable 0,5-1,5µm. Se multiplica por división binaria. Ha sido aislada tanto en salmónidos, como también en algunos moluscos, crustáceos y artrópodos, los cuales podrían participar como vectores o reservorios del microorganismo. Esta afirmación se sustenta en que en el ambiente terrestre las rickettsias requieren un vector artrópodo para transmitirse, por lo que se estima que muchos crustáceos parásitos pueden servir como vectores. Su multiplicación disminuye marcadamente bajo los 10 °C y sobre los 21 °C. Un rol importante de los vectores en la transmisión de las enfermedades, es la prevención de la desecación, por ello, estos no serían vitales en su ciclo de transmisión dentro del mar.

Se ha demostrado que *P. salmonis* sobrevive hasta 14 días en el mar, lo que permite su transmisión sin el requerimiento de un vector.

También se ha demostrado transmisión horizontal en agua dulce, a pesar de que *in vitro* existiría una baja viabilidad de *P. salmonis* en agua dulce. Experimentalmente, se ha observado que el agente es eliminado mediante las heces, orina y bilis, que podrían constituir las posibles vías de infección.

c) Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, IPN:

Es un virus perteneciente a la familia Birnavirus. Afecta a los salmónidos en agua dulce y mar causando la enfermedad llamada “Necrosis Pancreática Infecciosa”, caracterizada por ser altamente contagiosa. Los birnavirus son los microorganismos patógenos más ubicuos en las especies acuáticas. Han sido detectados en alrededor de 80 especies de organismos acuáticos. Si bien estos virus aislados pertenece a la misma familia del IPNV, la mayoría de las especies eran organismos aparentemente sanos.

Está demostrado que el virus IPN, es excretado vía heces por moluscos bivalvos contaminados, lo mismo sucede en el caso de aves predatoras de peces.

El IPNV es muy estable y resistente a las condiciones ambientales. Puede sobrevivir 230 días en agua dulce, 210 días en el barro, 4 semanas en ambiente seco y 4 semanas en el mar. Se ha determinado que la sobrevivencia del virus en un silo a 4 °C, por sobre 12 meses y a 20 °C por 71 días, es resistente a bajos pH (3,8). Altas temperaturas inactivan el virus: 1 hora a 60 °C, o 3 horas a 45 °C.

3.1.2 Descripción de los procesos operacionales

Los procesos que se describen a continuación corresponden a los procedimientos utilizados en general por los talleres de lavado de redes, no obstante, existen empresas que presentan algunas variaciones, dependiendo básicamente de la infraestructura y tecnología.

La figura 1 muestra en general el flujo tipo que presenta un proceso completo de lavado e impregnación de redes.

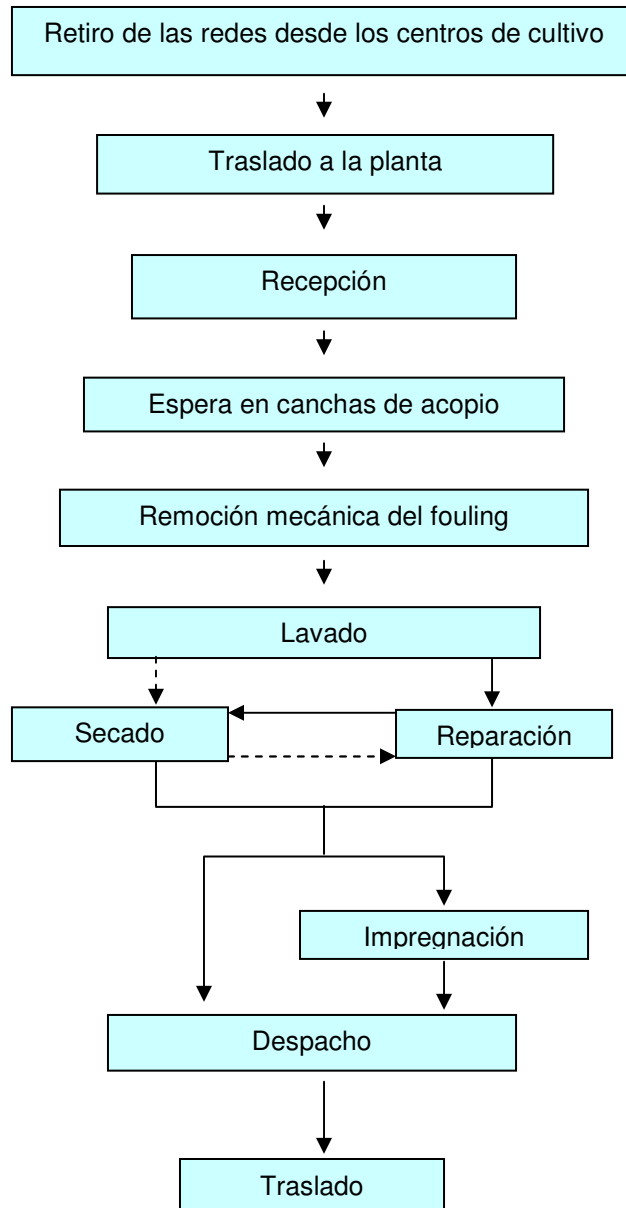


Fig. 1: Flujo de un proceso de lavado e impregnación de redes

a) Lavado de redes:

- Recepción de redes

Las redes son retiradas de los centros de cultivos por medio de embarcaciones, para posteriormente ser trasladadas en camiones hasta el taller. Las redes son recepcionadas, estiradas, identificadas y ordenadas. No se reciben antecedentes respecto del estado sanitario del centro del cual provienen. El tiempo que transcurre entre la extracción hasta su recepción en los talleres varía de acuerdo a la distancia de los centros de cultivo y los requerimientos de la empresa.

- Aclarado

Extracción de impurezas existentes en la red. Consiste en una primer etapa en seco durante la cual se eliminan los residuos sólidos de las redes. Durante esta etapa las redes se encuentran en la cancha de acopio, se espera la descomposición del *fouling* para proceder a la extracción en forma mecánica y las redes se dejan en el patio para su posterior lavado. Las redes permanecen en el patio de espera, donde se consigue el grado de descomposición que permita disminuir en gran porcentaje la cantidad de *fouling* adherido a la red.

- Ciclo de lavado

Las redes se lavan con agua, obtenida generalmente de pozo o agua potable. La duración de este proceso varía de acuerdo al sistema empleado, ya sea lavado en tambor rotatorio, hidrolavadora, motobomba, etc. En general, el proceso de lavado demora aproximadamente entre 1 a 6 horas.

Muy ocasionalmente y según requerimientos de los clientes, se realizan lavados desinfectantes con algún producto, proporcionado por el mismo cliente.

b) Secado de redes:

Las redes lavadas son dispuestas en un recinto abierto, ordenadas y llevadas al secador. Dependiendo de la tecnología empleada por las empresas, el secado de las redes puede ser al aire libre, en galpones o mediante secadores a gas o petróleo. El secado tiene una duración que varía de acuerdo al sistema empleado, desde 30 minutos hasta 1 día. La temperatura no excede los 55 °C, dado que a mayor temperatura se daña la red. Una vez seca la red, se ordena y lleva a bodega.

c) Reparación de las redes:

La red es ingresada a un galpón donde es revisada para ver posibles daños. Si está muy dañada, ésta debiera darse de baja, de lo contrario, se repara, tardando este proceso entre 10 horas a 2 días.

Una vez finalizada la reparación, se realiza un control de calidad del trabajo realizado. En algunas ocasiones las redes son almacenadas durante un tiempo variable, mientras esperan para su impregnación. Según los requerimientos de la empresa, algunas redes son despachadas sin impregnar.

d) Impregnación de la red:

Se prepara el recipiente, o pozo según el taller, con la pintura a empelar en el proceso. La red generalmente es enrollada, para ser introducida en la pintura de impregnación. Esto puede variar de acuerdo a la infraestructura con que cuenta cada taller. La impregnación se realiza con pintura *antifouling* y tiene una duración de 1 a 7 horas. Posteriormente tiene una etapa de estilado, que varía desde 4 a 24 horas. Una vez estilada la red, ésta se envuelve húmeda en plástico y se empaqueta. Terminado este proceso, la red queda en bodega a la espera de su despacho al centro de cultivo de origen. El embalaje se realiza de forma manual y tiene una duración de 5 a 45 minutos aproximadamente.

e) Despacho:

Las redes son despachadas del taller vía terrestre a los centros de cultivo de origen. El camión no se desinfecta ni se lava, la mayoría de las veces los camiones que ingresan redes sucias son los mismos usados en el despacho de las redes lavadas.

En el proceso de lavado e impregnación de redes se identifican y definen los Puntos Críticos de Control. Para ello se establecen las etapas, los riesgos y las medidas preventivas (Anexo 2).

3.1.3 Identificación de los insumos

Fouling : Se define como una mezcla de animales y vegetales componentes naturales del medio acuático, que colonizan una matriz formando una comunidad incrustante o *fouling*. El *fouling* además de poseer un efecto mecánico sobre el medio, impidiendo el flujo libre de la corriente a través de la red y deteriora la calidad de ésta, además, podría poseer un efecto sanitario importante al ser vector y reservorio de agentes patógenos.

Se ha demostrado la presencia de *P. salmonis* en especies de peces nativos como merluza, cabrilla y jurel. También se ha demostrado la presencia de patógenos en otras especies marinas como choritos, picorocos, copépodos y poliquetos, todos componentes habituales del *fouling*. Otro antecedente importante es el aislamiento de algunas especies birnavirus en ejemplares de moluscos y crustáceos.

ANEXOS

Anexo 1:

Protocolos de análisis utilizados para la detección de patógenos Detección de *Piscirickettsia salmonis* y *Renibacterium salmoninarum* a través de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFAT).

Fundamento

Esta técnica utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con los antígenos del patógeno en cuestión. La presencia de los complejos antígeno-anticuerpo se detecta con un anti-IgG conjugado a FITC observando en un microscopio de fluorescencia. Las bacterias se observan de coloración verde.

Procesamiento

La muestra de *fouling* (choritos, picorocos, tunicados, etc) se secciona y exponen los tejidos internos.

En forma aséptica se extrae una porción de tejido por medio de un algodón, abarcando la mayor cantidad de tejido posible.

Con el algodón que contiene la muestra de tejido se hace un frotis sobre un portaobjeto, el cual esta debidamente rotulado e identificado.

Se fija el frotis con acetona por 10 minutos. Se lava con PBS y seca a T° ambiente.

Se Coloca 100µl de reactivo oligoclonal diluido 1:100 y se incuba a T° ambiente por 30 minutos en cámara oscura y humedad.

Se lava 3 veces con PBS por 5 minutos.

Se Coloca 100µl de conjugado FITC diluido 1:100 y se incuba a T° ambiente por 30 minutos en cámara oscura y humedad.

Se lava 3 veces con PBS por 5 minutos.

Secar y agregar fluido de montaje. Cubrir con cubreobjetos y con inmersión, al microscopio de fluorescencia

Expresión de resultados

Microorganismos presentes	Positivo
1-15 microorganismos x campo	1+
16-25 microorganismos x campo	2+
26-49 microorganismos x campo	3+
> 50 microorganismos x campo	4+

Detección de *Piscirickettsia salmonis* y *Renibacterium salmoninarum* a través del Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

Fundamento

Es una técnica inmunoenzimática para la detección del patógeno en cuestión. La presencia de los complejos antígeno-anticuerpo se detecta con un anti-IgG conjugado a peroxidasa visualizándose una reacción positiva por la aparición de color producto de la degradación por la peroxidasa de los sustratos suministrados.

Procedimientos

La muestra de *fouling* (choritos, picorocos, tunicados, etc) se secciona y se exponen los tejidos internos.

Se toma un trozo de tejido y se coloca en una bolsa estéril, previamente rotulada e identificada. Se macera la muestra de tejido, 1 gramo aprox., en buffer de extracción a razón de 1:2

Se transfiere una alícuota de la muestra obtenida en la etapa anterior a un tubo Eppendorf y se centrifuga a 2.000 rpm por 2 minutos a T° ambiente.

A partir del sobrenadante obtenido en la etapa 2, se toma 100µl en duplicado y se agrega a los pocillos correspondientes en la placa.

Se sella la placa para evitar evaporación de los reactivos y se incuba a 37°C por 60 minutos.

Se elimina el contenido de los pocillos y se lava la placa con solución de lavado usando aprox. 350 µl por pocillo. Se repite 4 veces.

Después del último lavado se invierte la placa sobre una toalla de papel absorbente y se golpea suavemente, para remover solución de lavado remanente, evitando que la placa se seque.

Se agrega a cada pocillo la solución de anticuerpos específicos. Se sella la placa e incuba a 37°C por 30 minutos. Se lava la placa como ya se describió anteriormente.

Para revelar la placa, se agrega a cada pocillo 50µl de sustrato A y luego 50 µl de sustrato B.

Se incuba la placa en oscuridad absoluta, a T° ambiente por 30 minutos.

Se agrega 100 µl de H₂SO₄ 3N cada pocillo, para detener la reacción. Se lee la placa a 450 nm.

Interpretación de los resultados

Una muestra negativa o positiva esta determinada a partir del promedio de lectura de absorbancia de los controles negativos mas una constante (CUT OFF) una muestra positiva registra una lectura de absorbancia mayor que el CUT OFF y una muestra negativa registra una lectura de absorbancia menor que el CUT OFF

Detección del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa a través del método Transcriptasa reversa-Reacción en cadena de la polimerasa-ensayo inmunoenzimático. (RT-PCR-ELISA)

Fundamento

RT-PCR-ELISA es un ensayo para la detección del virus IPN. Este ensayo que se basa en la amplificación del genoma viral por RT-PCR y la posterior detección del producto de amplificación mediante un ELISA de captura.

En una primera etapa se sintetiza el cDNA correspondiente al RNA genómico viral, luego el cDNA se amplifica mediante PCR y el producto amplificado se denatura para ser capturado en la placa de ELISA mediante hibridización específica con un oligonucleótido complementario que ha sido previamente inmovilizado en la placa. Finalmente el producto amplificado se detecta mediante un ensayo de ELISA.

Procedimiento

Preparación de la muestra.

La muestra *de fouling* (choritos, picorocos, tunicados, etc.) se secciona y se exponen los tejidos internos

Se confeccionan pools con los respectivos tejidos, cada pool contiene como máximo 5 individuos de la misma especie

Los tejidos son puestos en bolsas estériles previamente rotuladas

Se agrega a la bolsa 500 µL de solución de homogenizado, se sella la bolsa y se macera.

Se transfiere 100 µL de macerado a un microtubo estéril

Se agrega 30 µL de mezcla entre solución de extracción de RNA y solución de coprecipitación de RNA. Se incuba a 55 °C por 1 Hora. Se centrifuga a 15.000g por 10 min

Se transfiere 100 µL del sobrenadante a un tubo, donde se le agregan 10µL de solución de precipitación de RNA, se incuba por 60 min. en hielo

Se centrifuga a 15.000g y se lava el pellet con 200 µL de etanol frío al 70%

Centrifugar a 15.000g por 10min

Se elimina el sobrenadante y se vuelve a repetir el lavado con etanol.

Centrifugar a 15.000g por 10min, eliminar el sobrenadante del etanol y dejar evaporar durante 5-10 min

Resuspender el pellets con 25 µL de agua estéril

Esto constituye la muestra de RNA

RT-PCR

Se preparan microtubos para cada muestra incluyendo los controles positivo y negativo
Se Agrega el partidor de RT-PCR.
Se Agrega la muestra de RNA
Incubar a 95 °C por 5min
Transferir a baño con hielo por 5min
Centrifugar por 10 seg a 10.000g
Se agrega amortiguador de síntesis de RT-PCR y Enzimas de RT-PCR

ELISA

Se activa la placa con la sonda de captura
Se procede a la denaturación de la muestra a 100 °C por 5min
Transferir a hielo por 5min
Agregar la muestra sobre una solución de hibridación, previamente puesta en el pocillo de

ELISA

Incubar a 50 °C por 40min
Lavar con solución de lavado 3 veces 5min cada vez
Agregar anticuerpo conjugado e incubar a 37 °C por 15min
Agregar 100 µl de una mezcla de sustrato A y B
Incubar a temperatura ambiente en oscuridad total por 15min

Interpretación de los resultados

Una muestra negativa o positiva esta determinada a partir del promedio de lectura de absorbancia de los controles negativos mas una constante (CUT OFF) una muestra positiva registra una lectura de absorbancia mayor que el CUT OFF y una muestra negativa registra una lectura de absorbancia menor que el CUT OFF

Detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa por medio de la técnica de cultivo en línea celular CHSE-214.

Fundamento

Los virus necesitan células vivas para su multiplicación, ya que no posee la maquinaria enzimática para su replicación. La infección de células susceptibles termina produciendo la lisis celular manifestándose como efecto Citopático (CPE)

Existen variadas líneas celulares para la detección de patógenos virales en salmónidos. La línea celular CHSE-214 (Embryo chinook salmon) es la línea celular de elección para el diagnóstico de IPNV por su susceptibilidad al virus.

Procedimiento

La muestra de *fouling* (choritos, picorocos, tunicados, etc.) se secciona y se exponen los tejidos internos.

De cada ejemplar se toman en forma aséptica trozos de tejidos (1gr) y se confeccionan pooles (cada pool esta compuesto como máximo de 5 ejemplares pertenecientes a la misma especie).

Las muestras de tejidos se maceran hasta la obtención de una masa homogénea.

Seguidamente se diluyen proporcionalmente con solución salina balanceada y se centrifugan. Se toma una alícuota desde el sobrenadante obtenido y se mezcla con solución antibiótica – antimicótica, incubando posteriormente la mezcla 2 a 4 horas a 16 °C o 8 a 72 a 4 °C, antes de proceder a la inoculación en líneas celulares.

Se preparan microplacas de 96 pocillos con una monocapa de la línea celular

Se toma una alícuota de 50 μ l desde el tubo de centrifuga de 1,5 ml que contiene la muestra (mezcla antibiótica + sobrenadante de un homogeneizado) y se inocula 1 pocillo de la microplaca (con células y sin medio). La operación se realiza por duplicado.

Se reservan 2 pocillos por microplaca para control negativo (-) y dos pocillos para control positivo (+). Estos últimos serán inoculados con un una suspensión en MEM-0 (Medio Esencial Mínimo sin Suero Bovino Fetal) de virus IPNV titulado

Se tapa la microplaca y dejar 1 hora a temperatura ambiente

Se procede llenar con 100 μ l de medio de cultivo correspondiente) cada uno de los pocillos inoculados anteriormente los cuales se sellan.

Revisar diariamente bajo microscopio invertido para determinar si se ha producido efecto citopático (ECP), es decir la aparición de aglomeraciones celulares y lisis incipiente que se van haciendo más evidentes conforme transcurren los días. El efecto puede comenzar lentamente (4º al 6º día) o rápidamente (2º al 3er día). La presencia o ausencia de ECP determina el procedimiento a seguir:

- Si a los 7 días de incubación no se observa, se procede a transferir el sobrenadante de los pocillos inoculados de las microplacas originales hacia otras microplacas con monocapa celular confluyente. Este procedimiento se denomina repique, la inoculación y el repique constituyen los pasajes
- Si al cabo de los 21 días de incubación no se observa ECP, la muestra se considera negativa a la presencia de IPNV
- Si se observa efecto citopático, transferir inmediatamente los sobrenadantes con efecto citopático hacia una nueva microplaca. Se Incuba la nueva microplaca a la temperatura requerida en estufa de incubación.
- Si se repitiera el efecto de lisis celular observado en la microplaca original se confirma el ECP. Si el efecto no se repite en la nueva microplaca, se considera efecto citotóxico producido por la presencia de enzimas líticas en los restos de tejidos presentes en la muestra. Estas enzimas no afectan las células de la nueva microplaca debido al efecto de dilución.

Anexo 2: Identificación de los Puntos Críticos de Control

Punto Critico de Control	Riesgo	Medida preventiva
Lavado con agua	Contaminación microbiológica cruzada entre redes de diferentes orígenes y calidades Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Implementar Sistema all in - all out, que incorporen limpieza y desinfección de área de trabajo. Posiblemente desinfectar redes posterior a esta etapa (por evaluar)
Impregnación de la red	Solución y tiempo de impregnado no sea suficiente por lo que existe riesgo de contaminación cruzada por red mal procesada. Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos	Chequeo de solución impregnante (cantidad) y tiempo de exposición.
Despacho de la red	Contaminación microbiológica entre redes embaladas listas a despachar y redes o superficies sucias de camiones o embarcaciones que trasladaron materiales contaminados (redes, mortalidad, otros): Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Sistema de limpieza y desinfección de camiones y embarcaciones previo a ser cargados con redes limpias / impregnadas.

MANEJO DE RIESGO

1. Metodología

1.1 Impacto del proceso en la sobrevivencia de los patógenos

Con el fin de recopilar evidencia en relación a la probabilidad a sobrevivir de patógenos a los procedimientos operacionales utilizados en la industria de lavado e impregnación de redes, se llevó a cabo un ensayo para evaluar la viabilidad de los patógenos al proceso de impregnación. En esta etapa, los análisis fueron realizados tomando como modelo el virus de la necrosis pancreática infecciosa, por ser este un virus altamente estable y resistente a variaciones ambientales.

1.1.1 Elaboración de procedimientos de mitigación de la diseminación

Con el fin de evaluar el impacto de los protocolos y procedimientos de mitigación de riesgos sobre la habilidad de los patógenos a sobrevivir en las redes se desarrollaron los siguientes puntos:

- Determinar los mejores procedimientos prácticos a ser aplicados en la industria.
- Identificar y evaluar el espectro de desinfectantes que se encuentran disponibles en el mercado, incluyendo sus consideraciones ambientales.
- Incorporar procedimientos de manejo para la industria.

1.2 Sobrevivencia de patógenos a la acción de *antifouling*

1.2.1 Ensayos de sobrevivencia de IPNV a la acción de pinturas *antifouling*.

La incrustación de vectores y algas a las redes, ocasiona un problema mecánico al no permitir el paso libre de la corriente de agua hacia los peces.

El considerable aumento de la salmonicultura nacional ha requerido de redes que persistan por más tiempo en el medio acuático sin sufrir incrustaciones, disminuyendo el recambio de redes, con el consiguiente estrés de los peces y por ende el aumento de la mortalidad. Para evitar la incrustación se han desarrollado una serie de pinturas que por su acción biocida impiden el asentamiento de organismos componentes del *fouling*.

Las pinturas *antifouling* están fabricadas principalmente en base a dos solventes: orgánico y acuoso, el primero de los cuales ocupa gran porcentaje en la participación del mercado. El principal compuesto activo de las pinturas

antifouling usado en nuestro país es el óxido cuproso, precisamente es el que posee las características biocidas que impide el incrustamiento en las redes, a través de su lenta liberación al medio.

Se ha estudiado el rol de las pinturas *antifouling* como biocidas de los vectores y algas componentes habituales del medio marino, pero no existen antecedentes del rol que este pudiera desempeñar como agente bactericida y viricida en el control de enfermedades.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa es altamente resistente a las condiciones ambientales extremas, resistiendo sin problemas largos períodos de tiempo sin un huésped, altas temperaturas, bajo pH, por ende se convierte en una excelente herramienta a la hora de evaluar la acción viricida de las pinturas *antifouling*.

Procedimiento.

Se pintaron placas petri de tamaño estándar con pintura *antifouling* en base a solvente orgánico y en base acuosa. La pintura se deja secar en promedio 8 horas. Una vez secas las superficies de las placas se agregan 10 ml de una suspensión que contiene una alta concentración de IPNV, a la vez se prepararon diluciones en base 10. (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5).

Se realizan 6 ensayos, cada uno con distintos tiempos de contacto entre la pintura y la suspensión viral.

Ensayo Nº 1.

El tiempo de exposición de la suspensión viral con la pintura es de dos horas, posteriormente se retira 200 μ L de suspensión y se inocula 50 μ L (4 réplicas) en microplacas de cultivo celular (línea CHSE-214).

Las botellas de cultivo celular siguen el procedimiento normal descrito en el Anexo 1, y la confirmación del efecto citopático se realiza a través de la técnica de *dot-blot* descrita en el mismo anexo. El experimento se resume en la tabla 1 y 2.

Tabla 1: Ensayo con Pintura en base solvente Orgánico

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
2 horas	Inóculo directo	1
2 horas	-1	1
2 horas	-2	1
2 horas	-3	1
2 horas	-4	1
2 horas	-5	1

Tabla 2: Ensayo con Pintura en base solvente Acuoso

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
2 horas	Inóculo directo	1
2 horas	-1	1
2 horas	-2	1
2 horas	-3	1
2 horas	-4	1
2 horas	-5	1

Ensayo Nº 2

El tiempo de exposición de la suspensión viral con la pintura es de 12 horas, posteriormente se retira 200 µL de suspensión y se inoculara 50 µL (4 réplicas) en microplaca de cultivo celular (línea CHSE-214).

Las botellas de cultivo celular siguen el procedimiento normal descrito en el Anexo 4, y la confirmación del efecto citopático se realiza a través de la técnica de *dot-blot* descrita en el mismo anexo 1.

El experimento se resume en la tabla 3 y 4.

Tabla 3: Ensayo con Pintura en base solvente Orgánico

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
12 horas	Inóculo directo	1
12 horas	-1	1
12 horas	-2	1
12 horas	-3	1
12 horas	-4	1
12 horas	-5	1

Tabla 4: Ensayo con Pintura en base solvente Acuoso

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
12 horas	Inóculo directo	1
12 horas	-1	1
12 horas	-2	1
12 horas	-3	1
12 horas	-4	1
12 horas	-5	1

Ensayo N° 3.

El tiempo de exposición de la suspensión viral con la pintura es de 36 horas, posteriormente se retira 200 µL de suspensión y se inoculara 50 µL (4 réplicas) en microplaca de cultivo celular (línea CHSE-214).

Las botellas de cultivo celular siguen el procedimiento normal descrito en el Anexo 1, y la confirmación del efecto citopático se realiza a través de la técnica de *dot-blot* descrita en el mismo anexo.

El experimento se resume en la tabla 5 y 6.

Tabla 5: Ensayo con Pintura en base solvente Orgánico

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
36 horas	Inoculo directo	1
36 horas	-1	1
36 horas	-2	1
36 horas	-3	1
36 horas	-4	1
36 horas	-5	1

Tabla 6: Ensayo con Pintura en base solvente Acuoso

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
36 horas	Inoculo directo	1
36 horas	-1	1
36 horas	-2	1
36 horas	-3	1
36 horas	-4	1
36 horas	-5	1

Ensayo N° 4

El tiempo de exposición de la suspensión viral con la pintura es de 84 horas, posteriormente se retira 200 µL de suspensión y se inoculara 50 µL (4 réplicas) en microplaca de cultivo celular (línea CHSE-214).

Las botellas de cultivo celular siguen el procedimiento normal descrito en el Anexo 1, y la confirmación del efecto citopático se realiza a través de la técnica de *dot-blot* descrita en el mismo anexo.

El experimento se resume en la tabla 7 y 8.

Tabla 7: Ensayo con Pintura en base solvente Orgánico

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
84 horas	Inoculo directo	1
84 horas	-1	1
84 horas	-2	1
84 horas	-3	1
84 horas	-4	1
84 horas	-5	1

Tabla 8: Ensayo con Pintura en base solvente Acuoso

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
84 horas	Inoculo directo	1
84 horas	-1	1
84 horas	-2	1
84 horas	-3	1
84 horas	-4	1
84 horas	-5	1

Ensayo N° 5

El tiempo de exposición de la suspensión viral con la pintura es de 156 horas, posteriormente se retira 200 µL de suspensión y se inocula 50 µL (4 réplicas) en microplaca de cultivo celular (línea CHSE-214).

Las botellas de cultivo celular siguen el procedimiento normal descrito en el Anexo 1, y la confirmación del efecto citopático se realiza a través de la técnica de *dot-blot* descrita en el mismo anexo.

El experimento se resume en la tabla 9 y 10.

Tabla 9: Ensayo con Pintura en base solvente Orgánico

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
156 horas	Inoculo directo	1
156 horas	-1	1
156 horas	-2	1
156 horas	-3	1
156 horas	-4	1
156 horas	-5	1

Tabla 10: Ensayo con Pintura en base solvente Acuoso

Tiempo de exposición	Dilución de la suspensión viral en base 10	Número de placas
156 horas	Inoculo directo	1
156 horas	-1	1
156 horas	-2	1
156 horas	-3	1
156 horas	-4	1
156 horas	-5	1

1.2.2 Ensayos de sobrevivencia de IPNV a la acción de desinfectantes

El concepto de desinfectante se refiere a un agente químico que actúa sobre microorganismos, matándolos y/o inactivándolos. Existen ciertas características que debe poseer un buen desinfectante como ser soluble en agua, tóxicos para los organismos a temperatura ambiente, ser estable, no reaccionar con la materia orgánica ni inactivarse en presencia de ella, escasa o nula toxicidad para personas o animales, rápida acción, capacidad residual, amplio espectro etc.

Existe una variada gama de desinfectantes en el mercado, con diferencias en el compuesto activo, la dosificación el espectro de acción, el precio, etc.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa es altamente resistente a las condiciones ambientales extremas, resistiendo sin problemas largos períodos de tiempo sin un huésped, altas temperaturas, bajo pH, por ende se convierte en una excelente herramienta a la hora de evaluar la acción viricida de un desinfectante.

Se evaluó la formulación recomendada por el fabricante en productos desinfectantes comerciales, indicados en tabla 11.

Tabla 11: Productos comerciales

Producto	Dilución	Tiempo de exposición.
Glutaraldehído	6,5 %	20 min.
Monopersulfato de potasio	1:300	20 min.
Peróximonosulfato de potasio	1:100	20 min.
Yodóforo	1:300	20 min.

Se prepararon 5 botellas de cultivo celular con superficie de 25 cm², con una monocapa de la línea celular CHSE-214, estas fueron inoculadas con una suspensión de alta concentración de IPNV y se incubó a 15 °C por 48 horas.

Se prepararon los desinfectantes a utilizar según recomendaciones del fabricante, y se agregó un desinfectante, por cada botella de cultivo. Se dejó actuar cada producto por 20 minutos.

Luego de ser expuestas a los desinfectantes las células infectadas con IPNV, se procedió a retirar el desinfectante de las botellas de cultivo, y se realizó cuatro lavados con PBS con el fin de remover completamente el desinfectante de las células.

Se removió mecánicamente de las botellas de cultivo las células y se resuspendieron en mezcla de Buffer fosfato salino más antibiótico.

Trascurrido el tiempo de incubación con la mezcla antibiótica las muestras se inoculan en microplacas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos circulares cubiertos de una monocapa celular confluyente (células CHSE-214), después de la inoculación, las microplacas se incuban en estufa refrigerada a 16 °C por 72 ± 6 hrs. Luego de la incubación, las células se fijan y sus membranas celulares se permeabiliza mediante la adición de metanol frío.

Finalmente, se realiza la técnica de inmunofluorescencia indirecta para IPN, sobre las células contenidas en los cubreobjetos circulares, se agrega una alícuota de un anticuerpo específico contra IPNV, se incuba a 22 °C por 30 min, se lava tres veces con solución de lavado y se agrega una alícuota de un anticuerpo conjugado a FITC, se incuba a 22 °C por 30 min, se lava tres veces con solución de lavado, y se procede a retirar de la microplaca el cubreobjeto circular para ser montado en un portaobjeto, se cubre con solución de montaje y se observa al microscopio de fluorescencia.

1.2.3 Ensayos de sobrevivencia de IPNV a la acción del óxido cuproso

El óxido cuproso es el compuesto activo de pinturas *antifouling*, por su acción biocida impide el incrustamiento de algas y/o vectores a las redes. Las pinturas *antifouling* mediante un proceso de disolución en agua o lixiviación entregan lentamente el óxido cuproso al medio.

El óxido cuproso es ampliamente usado en la elaboración de pinturas *antifouling*, y son reconocidas sus cualidades como antiincrustante, Sin embargo no se ha registrado la posible acción viricida o bactericida en el control de enfermedades de importancia sanitaria.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa es altamente resistente a las condiciones ambientales extremas, resistiendo sin problemas largos períodos de tiempo sin un huésped, altas temperaturas, bajo pH, por ende se convierte en una excelente herramienta a la hora de evaluar la acción viricida de un desinfectante.

Se preparó una botella de cultivo celular con superficie de 25 cm², con una monocapa de la línea celular CHSE-214, esta fue inoculada con una suspensión de alta concentración de IPNV y se incubó a 15 °C por 48 horas.

Se preparó el óxido cuproso según la concentración formuladas por el fabricante (18%), se agregó a la botella de cultivo celular y se dejó actuar por 20 min, se realizaron cuatro lavados con PBS con el fin de remover completamente el óxido cuproso de las células.

Se removió mecánicamente de las botellas de cultivo las células y se resuspendieron en mezcla de Buffer fosfato salino más antibiótico.

Trascurrido el tiempo de incubación con la mezcla antibiótica las muestras se inoculan en microplacas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos circulares cubiertos de una monocapa celular confluyente (células CHSE-214), después de la inoculación, las microplacas se incuban en estufa refrigerada a 16 °C por 72 ± 6 hrs. Luego de la incubación, las células se fijan y sus membranas celulares se permeabiliza mediante la adición de metanol frío.

Finalmente, se realiza la técnica de inmunofluorescencia indirecta para IPNV, sobre las células contenidas en los cubreobjetos circulares, se agrega una alícuota de un anticuerpo específico contra IPNV, se incuba a 22 °C por 30 min, se lava tres veces con solución de lavado y se agrega una alícuota de un anticuerpo conjugado a FITC, se incuba a 22 °C por 30 min, se lava tres veces con solución de lavado, y se procede a retirar de la microplaca el cubreobjeto circular para ser montado en un portaobjeto, se cubre con solución de montaje y se observa al microscopio de fluorescencia.

2. RESULTADOS

2.1 Evaluación de los riesgos:

Se realizaron visitas médico veterinarias con el objetivo de evaluar sanitariamente los talleres de redes, y se realizaron layout (Anexo 1) de las empresas visitadas, con el fin de establecer el flujo de los procesos. De estas visitas se pudo concluir que existen deficiencias en los procesos higiénicos dentro de las empresas, existiendo cruzamiento de líneas que podrían ser fuentes de contaminación cruzada entre redes. No existe una delimitación física de las áreas de proceso.

Los riesgos se evalúan de acuerdo a su probabilidad de ocurrencia, Incidencia y significancia (Anexo 2):

- **Probabilidad de ocurrencia:** Es la frecuencia posible de presentación de un riesgo identificado.
- **Incidencia:** corresponde a la posibilidad que, ocurrido un riesgo, se obtenga un producto final contaminado.
- **Significancia:** corresponde a la obtención de un producto contaminado que se convertiría en un foco infeccioso, por la ocurrencia de un riesgo determinado.

2.1.1 Detección de patógenos en *Fouling*

En la tabla 1 se presenta el detalle de las muestras analizadas.

Tabla1: Desglose de muestras de fouling analizadas

Identificación del Fouling	Numero de muestras
<i>Mytilus chilensis</i> (choritos)	166
<i>Halicarcinus planatus</i> (cangrejo)	3
Tunicados (piure y otros)	9
Poliquetos	3
Equinodermos	2
<i>Aulacomya ater</i> (cholgás)	5
<i>Megabalanus psittacus</i> (Picorocos)	3
<i>Crepídula sp.</i>	3
Total	194

a) *Piscirickettsia salmonis*, SRS

En la Tabla 2 y Fig. 1 se presentan las muestras de *fouling* con presencia de *P. salmonis*

Tabla 2: Detección de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de fouling

Especie de fouling	Nº de muestras	Positivos a SRS	%
<i>Mytilus chilensis</i>	165	8	5
<i>Halicarcinus planatus</i> (cangrejos)	3	2	67
Tunicados	9	5	56
Poliquetos	3	2	67
Equinodermos	2	0	0
<i>Aulacomya ater</i> (cholgás)	5	0	0
<i>Megabalanus psittacus</i> (picorocos)	3	2	67
<i>Crepídula sp.</i>	3	2	67
Total	193	21	

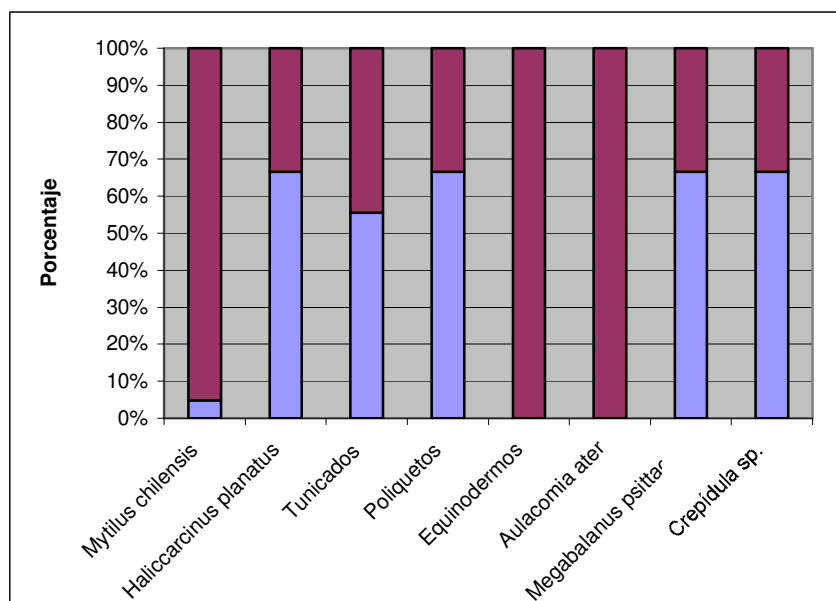


Fig. 1: Porcentaje de detección de *P. salmonis* según especie

Cabe señalar que de las 194 muestras analizadas, sólo el 11% (21) de ellas presentaron presencia del patógeno *P. salmonis*.

Por su parte, en la tabla 3 y Fig. 2 se presenta el detalle de las muestras positivas a *P. salmonis*, por centro de origen.

*Tabla 3: Detección de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de fouling, según origen de la muestra.*

Origen	Nº de muestras	Positivos a SRS
Centro 1	30	11
Centro 2	3	3
Centro 3	60	0
Centro 4	35	2
Centro 5	60	0
Taller A	5	5

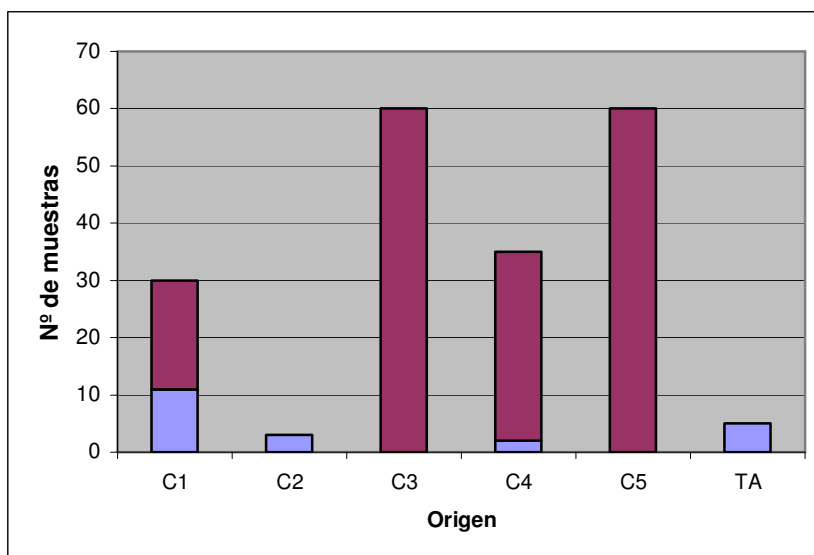


Fig. 2: Detección de *P. salmonis* según centro de origen

b) *Renibacterium salmoninarum*, BKD

Tabla 4: Detección de *Renibacterium salmoninarum* en muestras de fouling

Especie de fouling	Nº de muestras	Positivos a BKD
<i>Mytilus chilensis</i>	166	1
<i>Halicarcinus planatus</i> (cangrejos)	3	0
Tunicados	9	0
Poliquetos	3	0
Equinodermos	2	0
<i>Aulacomya ater</i> (cholgas)	5	0
<i>Megabalanus psittacus</i> (picorocos)	3	0
<i>Crepídula sp.</i>	3	0
Total	194	1

En este caso, se encontró una sola muestra positiva a *R. salmoninarum*, correspondiendo a una muestra de chorito (Fig. 3). Asimismo, en la tabla 5 se presenta el detalle de las muestras realizadas por origen y presencia de patógeno.

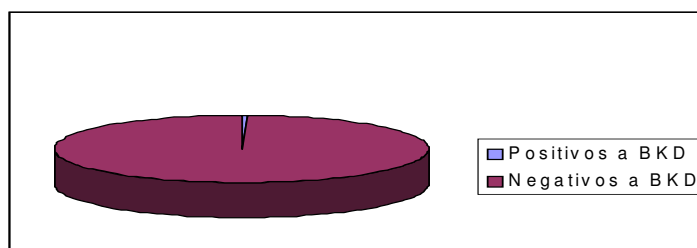


Fig. 3: Porcentaje de *R. salmoninarum* detectado en fouling

Tabla 5: Detección de *Renibacterium salmoninarum* en fouling, según origen de la muestra.

Origen	Nº de muestras	Positivos a BKD
Centro 1	30	0
Centro 2	3	0
Centro 3	60	0
Centro 4	35	2
Centro 5	60	0
Taller A	5	1
Total	193	1

c) Necrosis Pancreática Infecciosa, IPNV

La determinación de positividad al virus de la necrosis pancreática infecciosa, ya sea a través del Cultivo en líneas celulares o a través de RT-PCR ELISA, se realiza a través de pooles. Estos pooles están confeccionados por máximo 5 individuos de la misma especie o familia (Tabla 6).

Tabla 6: Detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa en muestras de fouling

Técnica empleada	Nº de Pooles	Positivos a IPNV
RT-PCR	41	0
Cultivo celular	40	1

En la tabla 7 y Fig. 4 se presenta el número de muestras de *fouling* positivas a IPNV. En este sentido, se detectó sólo una muestra, en este caso de Chorito, con presencia del patógeno.

Tabla 7: Detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa en muestras de fouling por especies mediante cultivo celular.

Especie de fouling	Nº de Pooles	Positivos a IPNV
<i>Mytilus chilensis</i>	33	1
<i>Haliccarcinus planatus</i> (cangrejos)	1	0
Tunicados	3	0
Poliquetos	0	0
Equinodermos	0	0
<i>Aulacomya ater</i> (cholgás)	1	0
<i>Megabalanus psittacus</i> (picorocos)	1	0
Crepídula sp.	1	0
Total	40	1

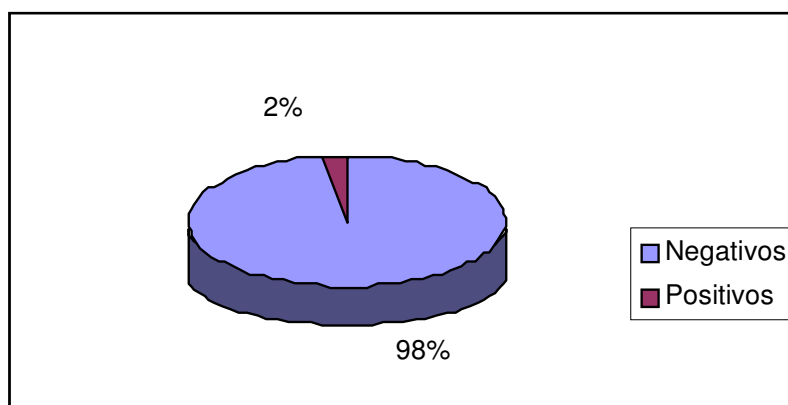


Fig. 4: Porcentaje de IPNV detectado en fouling

En la tabla 8 se presentan las estaciones de muestreo que presentaron patógenos. En ella se aprecia que en sólo una estación, localizada en Centro de cultivo 3, se detectó presencia de del virus.

Tabla 8: Detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa en muestras de fouling, según origen de la muestra.

Origen	Nº de Pooles	Positivos a IPNV
Centro 1	7	0
Centro 2	1	0
Centro 3	12	1
Centro 4	7	0
Centro 5	12	0
Taller A	1	0
Total	194	1

En general, se puede señalar que los resultados correspondientes al análisis del total del *fouling* indican que un porcentaje no despreciable de las muestras, fueron positivas a *P. salmonis*, agente causal del Síndrome Rickettsial Salmonídeo. La mayor frecuencia se encontró en especies del género *Mytilus* (choritos), y en menor porcentaje en *Haliccarcinus* (cangrejos), Tunicados, Poliquetos, *Megalobalanus* (Picorocos) y *Crepídula*. No se detectó la presencia de *P. salmonis* en especies del género *Aulacomya* (cholgas) y Equinodermos.

Con respecto al origen, la mayor frecuencia corresponde al Centro 1. Este centro se sitúa en la zona de Chiloé central y registra periódicamente eventos de SRS. De los Centros 2, 3, 4 y 5 y el Taller A no se tienen mayores

antecedentes respecto a la situación de SRS. Sin embargo, en todas las muestras de *fouling* recolectada a partir del Taller A se detectó la presencia de *P. salmonis*.

De las muestras analizadas para la detección de *R. salmoninarum*, agente causal de la Enfermedad Bacteriana del Riñón BKD, sólo se registró la presencia de la bacteria en una muestra procedente de *Mytilus chilensis* (choritos), esta muestra fue recolectada en el Taller A. Las demás muestras resultaron negativas.

El análisis de las muestras para la detección del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa IPNV arrojó un pool positivo al cultivo celular, proveniente de *Mytilus chilensis* (choritos) procedente del Centro 3, con antecedentes de registrar eventos de IPNV. Todas las demás muestras resultaron negativas.

2.1.2 Detección de patógenos en Redes

Todas las muestras de redes analizadas resultaron negativas a la presencia de *P. salmonis*, *R. salmoninarum*, y al virus de la Necrosis pancreática infecciosa (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados análisis redes

Patógeno	Nº de Muestras	Muestras Positivas
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	4	0
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	4	0
Virus de la necrosis pancreática infecciosa.	4	0
Otros agentes bacterianos	4	0

2.1.3 Detección de patógenos en Residuos líquidos

El análisis de los líquidos procedentes de efluentes de lavado y percolados de *fouling* de talleres de lavado de redes no arroja muestras positivas a *R. salmoninarum* y al virus de la necrosis pancreática infecciosa. Sin embargo se detecta en un tercio de éstas (33%) la presencia *P. Salmonis*, agente causal del Síndrome rickettsial salmonídeo (Tabla 10 y Fig. 5).

Tabla 10: Resultados análisis residuos líquidos

Patógeno	Nº de Muestras	Muestras Positivas
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	9	3
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	9	0
Virus de la necrosis pancreática infecciosa.	9	0

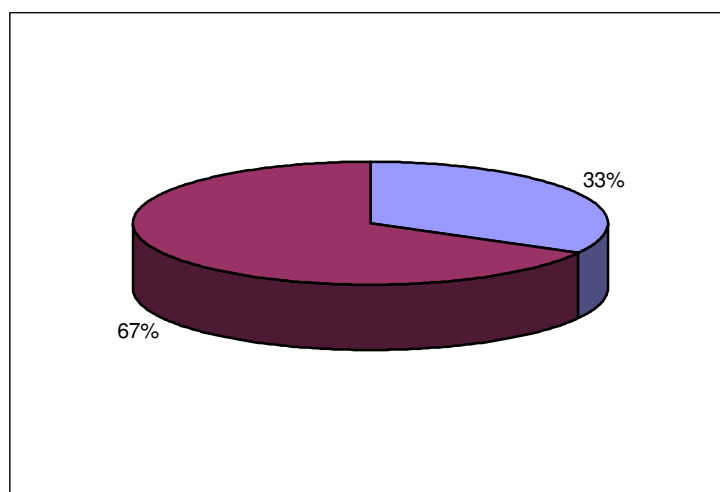


Fig. 5: Presencia de P. salmonis en residuos líquidos

2.2 Sobrevivencia de patógenos a la acción del Antifouling

2.2.1 Ensayos de sobrevivencia de IPNV a la acción de pinturas antifouling

A continuación, se presentan los resultados de los ensayos sobre la sobrevivencia de patógenos a la acción de pinturas Antifouling y de acuerdo a la dilución del inóculo (Tabla 11).

Tabla 11: Ensayos de sobrevivencia de patógenos a la acción de pinturas Antifouling, según dilución inóculo

Inoculo directo

Ensayo	Tiempo (hr)	Pintura acuosa	Pintura orgánica	Confirmación
1	2	(+)	(+)	dot blot (+)
2	12	(-)	(+)	dot blot (+)
3	36	(-)	(+)	dot blot (+)
4	84	(-)	(+)	dot blot (+)
5	156	(+)	(-)	dot blot (-)

Dilución 10⁻¹

Ensayo	Tiempo (hr)	Pintura acuosa	Pintura orgánica	Confirmación
1	2	(-)	(+)	dot blot (+)
2	12	(-)	(+)	dot blot (+)
3	36	(-)	(+)	dot blot (+)
4	84	(-)	(+)	dot blot (+)
5	156	(-)	(-)	dot blot (-)

Dilución 10⁻²

Ensayo	Tiempo (hr)	Pintura acuosa	Pintura orgánica	Confirmación
1	2	(-)	(+)	dot blot (+)
2	12	(-)	(+)	dot blot (+)
3	36	(-)	(+)	dot blot (+)
4	84	(-)	(-)	dot blot (-)
5	156	(-)	(-)	dot blot (-)

Dilución 10⁻³

Ensayo	Tiempo (hr)	Pintura acuosa	Pintura orgánica	Confirmación
1	2	(-)	(+)	dot blot (+)
2	12	(-)	(+)	dot blot (+)
3	36	(-)	(+)	dot blot (+)
4	84	(-)	(-)	dot blot (-)
5	156	(-)	(-)	dot blot (-)

Dilución 10⁻⁴

Ensayo	Tiempo (hr)	Pintura acuosa	Pintura orgánica	Confirmación
1	2	(-)	(+)	dot blot (+)
2	12	(-)	(+)	dot blot (+)
3	36	(-)	(-)	dot blot (-)
4	84	(-)	(-)	dot blot (-)
5	156	(-)	(-)	dot blot (-)

Dilución 10⁻⁵

Ensayo	Tiempo (hr)	Pintura acuosa	Pintura orgánica	Confirmación
1	2	(-)	(+)	dot blot (+)
2	12	(-)	(+)	dot blot (+)
3	36	(-)	(+)	dot blot (+)
4	84	(-)	(-)	dot blot (-)
5	156	(-)	(-)	dot blot (-)

2.2.2 Ensayos de sobrevivencia de IPNV a la acción de desinfectantes

A continuación, se presentan los resultados de los ensayos sobre la sobrevivencia de patógenos a la acción de desinfectantes (Tabla 12).

Tabla 12: Ensayos de sobrevivencia de patógenos a la acción de desinfectantes

Desinfectante	Concentración	Resultado	Confirmación
Glutaraldehído	6.50%	positivo	CC-IFAT (+)
Monopersulfato de potasio	1:300	positivo	CC-IFAT (+)
Peróximonosulfato de potasio	1:100	negativo	CC-IFAT (-)
Yodóforo	1:300	positivo	CC-IFAT (+)

Nota: los resultados positivos se refieren a la manifestación del IPNV sobre las células CHSE-214 utilizadas en el análisis cultivo celular - Ifat

2.2.3 Ensayos de sobrevivencia de IPNV a la acción del óxido cuproso

El resultado del ensayo con óxido cuproso se resume en la Tabla 13.

Tabla 13: Ensayos de sobrevivencia de patógenos a la acción del óxido cuproso

Compuesto	Concentración	Reacción	Confirmación.
Oxido cuproso	18%	negativo	CC-IFAT (-)

3. CONCLUSIONES (Abril 2002)

A partir de los resultados del presente estudio se puede establecer que el *fouling* proveniente de redes de centros de cultivo de salmónidos y de los talleres de lavado, reparación e impregnación de redes es portador de agentes patógenos.

Renibacterium salmoninarum BKD, *Piscirickettsia salmonis* SRS y el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa IPNV fueron detectados en muestras de *fouling*.

En las redes analizadas no se detectó la presencia de agentes patógenos.

En los líquidos provenientes del *fouling* y del proceso de lavado de las redes se detectó la presencia de *P. salmonis*, no así la presencia del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa y de *R. salmoninarum*.

El *fouling* y los efluentes relacionados con los procesos productivos en los talleres de lavado de redes, pueden constituir un factor importante en la transmisión de agentes patógenos.

Mediante el análisis de riesgo se pudo establecer que es posible que exista contaminación cruzada entre redes limpias y redes sucias, lo cual es relevante si se considera que esta industria puede ser una fuente diseminadora de patógenos de distintos orígenes.

Los puntos Críticos de Control (PCC) identificados es la etapa de lavado (en seco y con agua) y las etapas de impregnación y despacho final.

Un elemento importante para aminorar el riesgo de contaminación entre redes es la aplicación de un manual de buenas prácticas sanitario, que evite la contaminación cruzada y constituye un prerrequisito en la implementación de los Puntos Críticos de Control. Entre los puntos a considerar en este manual se incluyen, estructura y *layout*, procedimientos de limpieza y sanitización, uso de detergentes y desinfectantes, procedimientos para disposición de desechos, monitoreo y verificación de los procedimientos de saneamiento.

Se puede concluir en base al ensayo realizado *in vitro*, que el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), es susceptible a la pintura *antifouling* en base a solvente orgánico como solvente acuoso.

Las pinturas *antifouling* tanto en solvente orgánico, como solvente acuoso, difieren en el tiempo de inactivación del virus.

La pintura en base a solvente orgánico a altas cargas virales inactiva el virus con un tiempo de exposición mayor a los de 3 días, y a cargas virales bajas inactiva el virus con un tiempo de exposición de 12 a 36 horas.

La pintura en base solvente acuoso elimina el virus a partir de las 2 horas, sin importar la carga viral aplicada.

A partir de los resultados de los ensayos realizados con las pinturas *antifouling*, en los procesos de impregnación serían eficientes en la inactivación de patógenos de importancia sanitaria.

De acuerdo a los resultados obtenidos el desinfectante a base de Peroximonosulfato de potasio aparece como el más efectivo para eliminar el IPNV bajo las condiciones del ensayo.

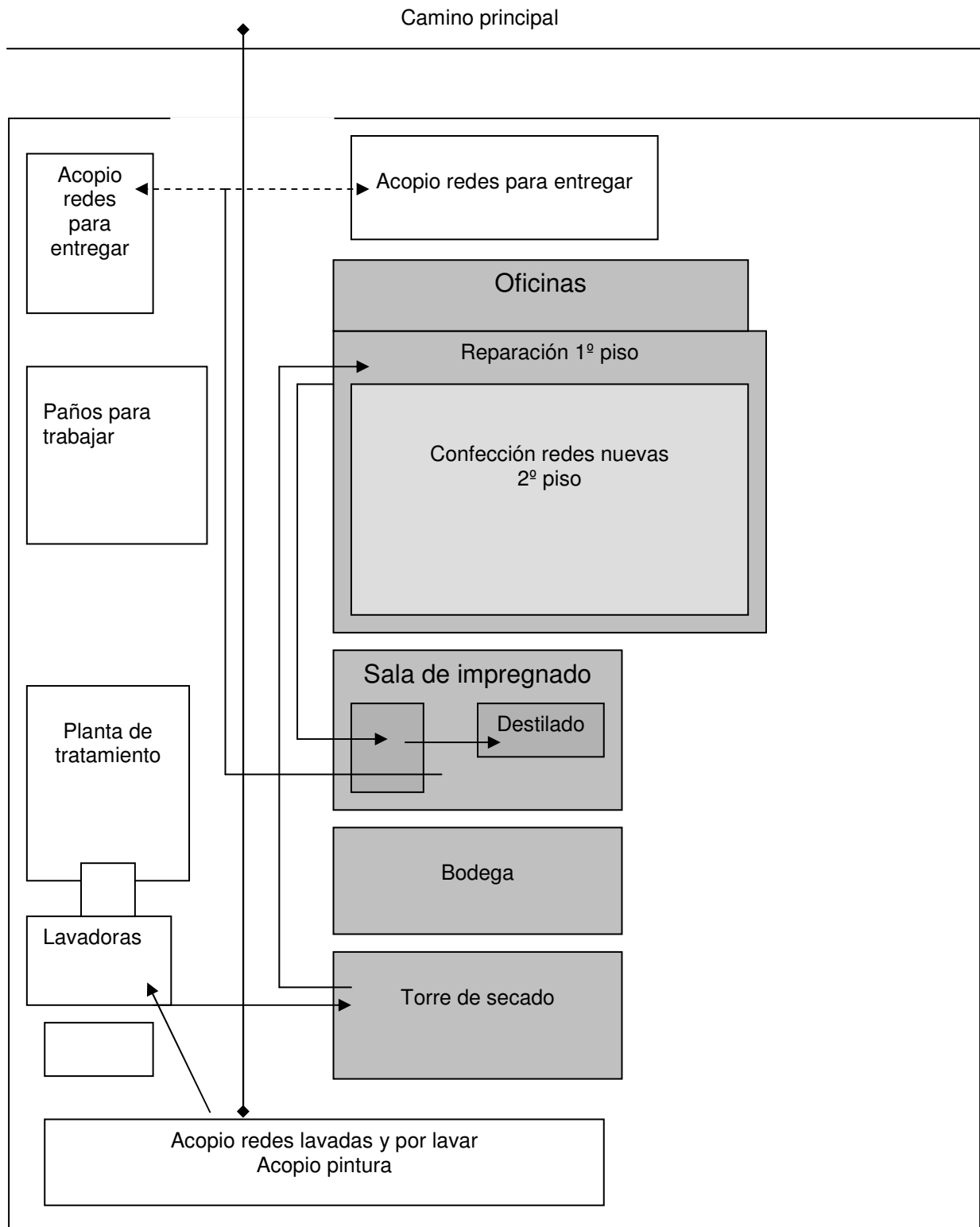
Los desinfectantes a base de Glutaraldehído, Monopersulfato de potasio y Yodóforo, fueron inefectivos para inactivar el IPNV, bajo las condiciones del ensayo. Con estos resultados se podría recomendar el tipo de desinfectante a utilizar en los talleres de lavado de redes.

El óxido cuproso, componente activo en la elaboración de pinturas *antifouling*, fue efectivo para inactivar el IPNV, en las concentraciones formuladas por el fabricante en la elaboración de las pinturas *antifouling*

ANEXOS

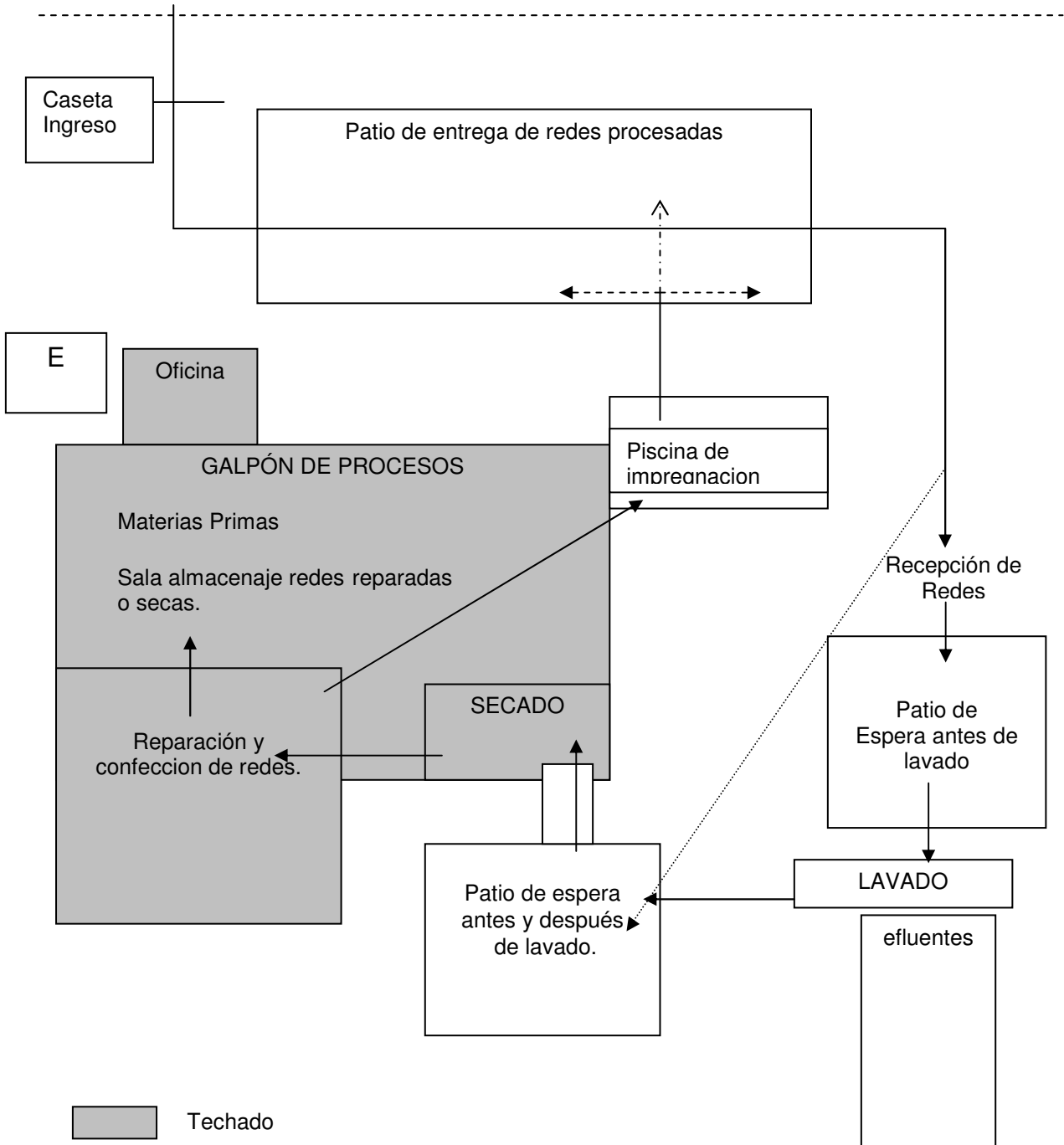
Anexo 1: Layout de talleres de lavado de redes

Empresa A

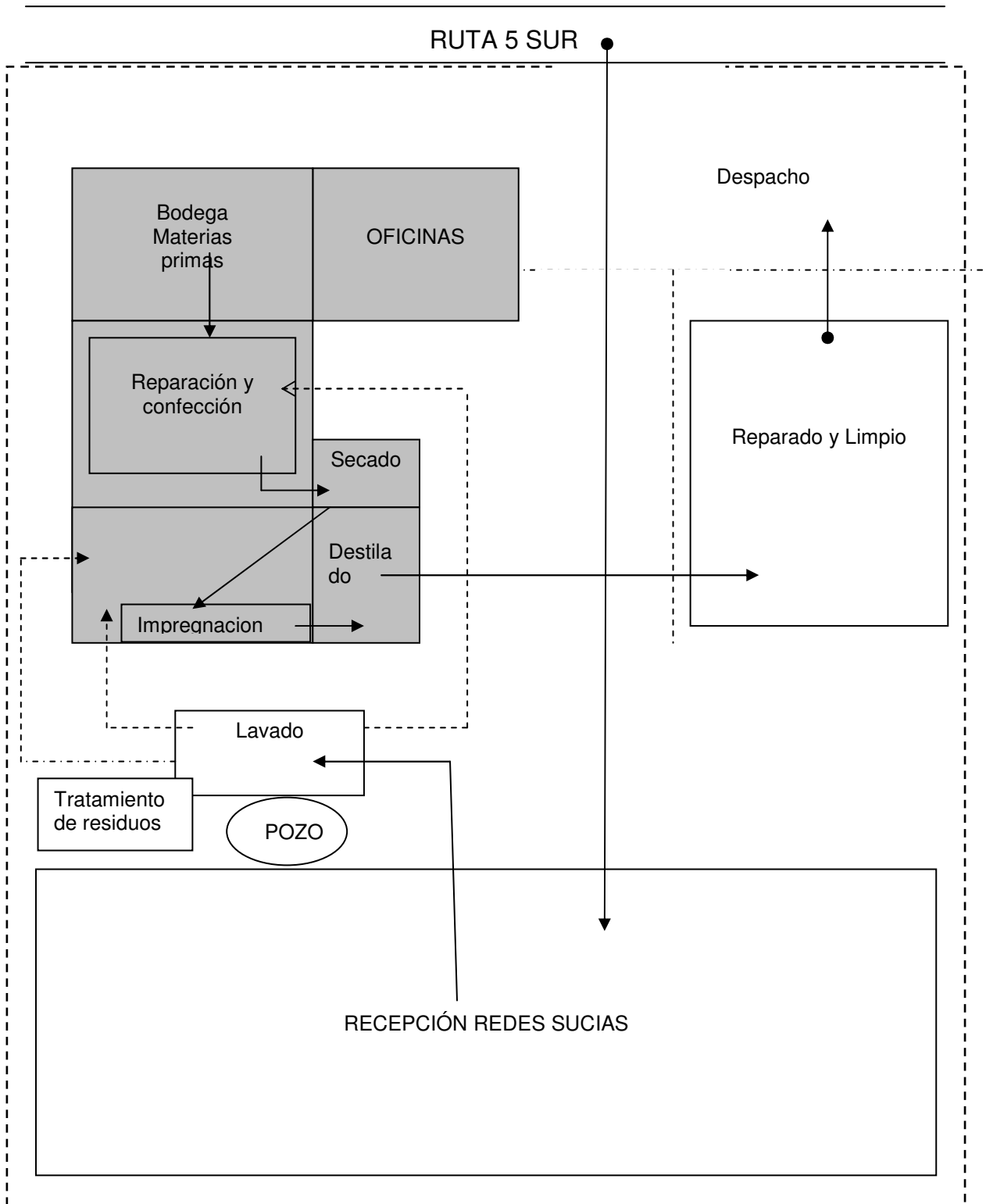


Empresa B

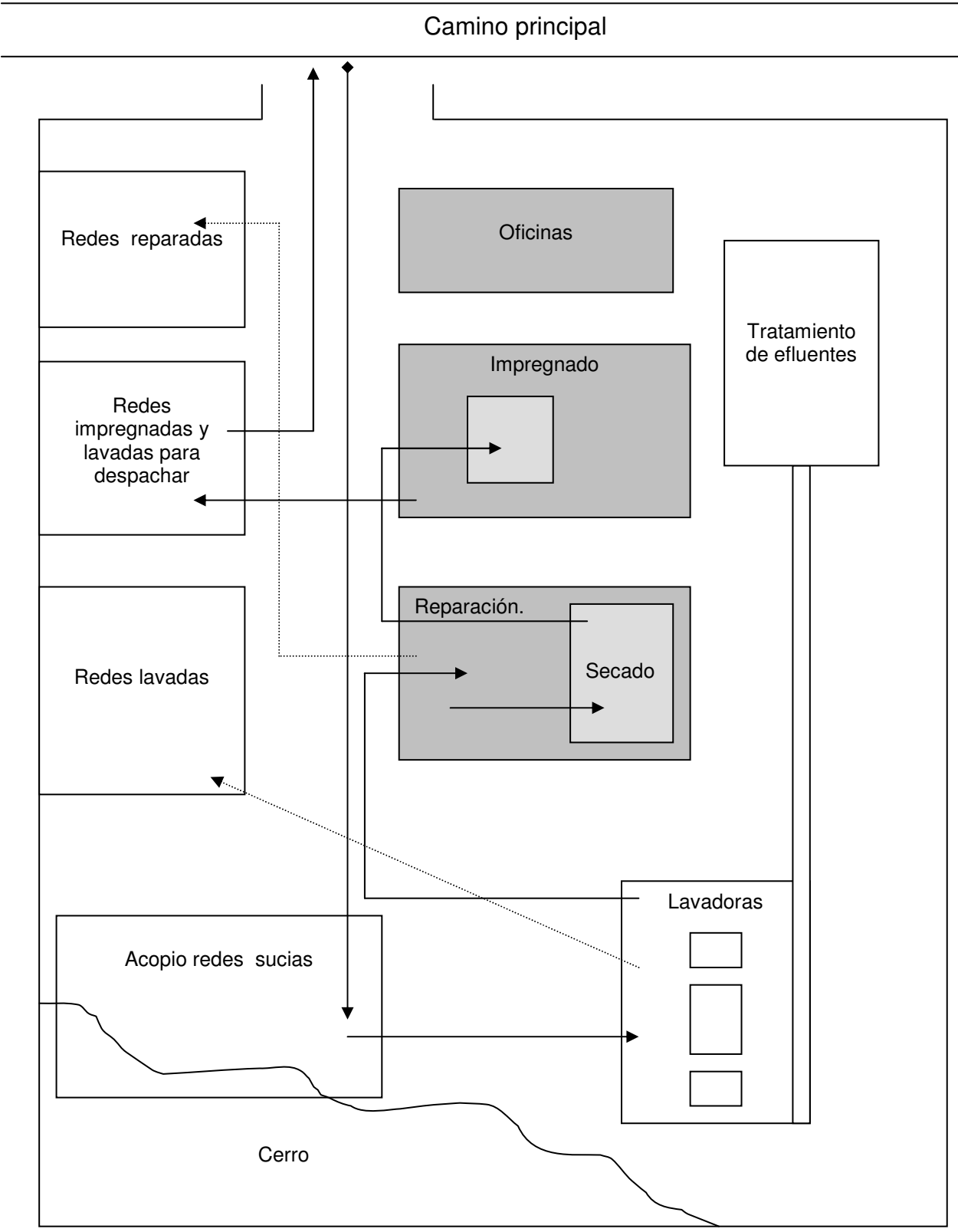
Camino Lateral



Empresa C



Empresa D



Anexo 2: Identificación de los Riesgos

Paso Operacional	Insumos	Riesgos (descripción)	Área de riesgo
Extracción de redes	<ul style="list-style-type: none"> Embarcación Redes de distinta procedencia, contaminadas con residuos sólidos, líquidos y seres vivos como crustáceos y moluscos. 	Contaminación microbiológica cruzada entre redes y contaminación por vectores: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos, vectores como moluscos y crustáceos SRS en residuos líquidos y vectores como choritos, picorocos, copépodos de vida libre y poliquetos. BKD en agua.	Salud en peces
Transporte de redes	<ul style="list-style-type: none"> Camión Barco / Barcaza Redes de distinta procedencia, contaminadas con residuos sólidos, líquidos y seres vivos como crustáceos y moluscos. 	Contaminación microbiológica cruzada entre redes y contaminación por vectores: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos, vectores como moluscos y crustáceos SRS en residuos líquidos y vectores como choritos, picorocos, copépodos de vida libre y poliquetos. BKD en agua.	Salud en peces
Recepción de redes	<ul style="list-style-type: none"> Redes de distinta procedencia, contaminadas con residuos sólidos, líquidos y seres vivos como crustáceos y moluscos. 	Contaminación microbiológica cruzada entre redes y contaminación por vectores: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos, vectores como moluscos y crustáceos; SRS en residuos líquidos y vectores como choritos, picorocos, copépodos de vida libre y poliquetos; BKD en residuos líquidos.	Salud en peces
Lavado con agua	<ul style="list-style-type: none"> Agua Redes 	Contaminación microbiológica cruzada entre redes limpias y sucias: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Salud en peces
Secado de redes	<ul style="list-style-type: none"> Redes Aire caliente 	Contaminación microbiológica cruzada entre redes lavadas y redes sucias: Virus IPNV en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Salud en peces
Reparación y Control de Calidad Almacenaje	<ul style="list-style-type: none"> Redes 	Contaminación microbiológica cruzada entre redes lavadas y redes sucias:	Salud en peces
Impregnación y Secado de impregnación	<ul style="list-style-type: none"> Antifouling, Pintura base solvente Redes 	Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Salud en peces
Embalaje individual	<ul style="list-style-type: none"> Polietileno Redes 	Contaminación microbiológica cruzada entre redes lavadas y redes sucias: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Salud en peces
Despacho de redes	<ul style="list-style-type: none"> Camión. Barcos / Barcazas Redes 	Contaminación cruzada entre redes limpias a ser despachadas y redes y / o superficies sucias de camiones y embarcaciones.	Salud en peces

Anexo 3: Evaluación de los Riesgos

Paso Operacional	Riesgos (descripción)	Probabilidad de ocurrencia	Incidencia	Significancia
Extracción de redes	Contaminación microbiológica cruzada entre redes y contaminación por vectores: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos, vectores como moluscos y crustáceos SRS en residuos líquidos y vectores como cabrilla, jurel, choritos, picorocos, copépodos de vida libre y poliquetos. BKD en agua.	Alta	Siempre	No
Transporte de redes	Contaminación microbiológica cruzada entre redes y contaminación por vectores: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos, vectores como moluscos y crustáceos SRS en residuos líquidos y vectores como cabrilla, jurel, choritos, picorocos, copépodos de vida libre y poliquetos. BKD en agua.	Alta	Siempre	No
Recepción de redes	Contaminación microbiológica cruzada entre redes y contaminación por vectores: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos, vectores como moluscos y crustáceos; SRS en residuos líquidos y vectores como cabrilla, jurel, choritos, picorocos, copépodos de vida libre y poliquetos; BKD en residuos líquidos.	Alta	Siempre	No
Lavado con agua	Contaminación microbiológica cruzada entre redes: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Alta	A veces	Si
Secado de redes	Contaminación microbiológica cruzada entre redes lavadas y redes sucias: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Baja	A veces	No
Reparación y Control de Calidad Almacenaje	Contaminación microbiológica cruzada entre redes lavadas y redes sucias:	Baja	A veces	No
Impregnación y Secado de impregnación	Solución y tiempo de impregnado no sea suficiente por lo que existe riesgo de contaminación cruzada por red mal procesada ingresada previamente. Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Alta	A veces	Si
Embalaje individual	Contaminación microbiológica cruzada entre redes lavadas y redes sucias: Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Baja	A veces	No
Despacho de redes	Contaminación microbiológica entre redes embaladas listas a despachar y redes o superficies sucias de camiones o embarcaciones que trasladaron materiales contaminados (redes, mortalidad, otros): Virus IPN en residuos sólidos y líquidos; SRS y BKD en residuos líquidos.	Alta	A veces	Si

COMUNICACIÓN DE RIESGO

Esta actividad se llevó en el mes de agosto de 2002 mediante una reunión ampliada de difusión, oportunidad en que se señalaron los avances del proyecto y se entregaron los resultados de la etapa y las actividades involucradas.

Registro de esta reunión se entrega en el Acta que a continuación se detalla:

ACTA REUNION TECNICA Nº 2

Proyecto FDI-Corfo "Tratamiento y Manejo de Residuos en Talleres de Lavado de Redes: Una Estrategia Competitiva y Sustentable para la Salmonicultura Chilena"

El día jueves 22 de agosto de 2002, entre las 10:20 y 12:35 hrs. se llevó a cabo en las oficinas de Nisa Redes, km 5 a Pargua, en Puerto Montt, la segunda reunión técnica de avance, que agrupó a los empresarios de Atared A.G. Asociados al proyecto, a profesionales de la Unidad de Desarrollo Tecnológico UDT de la Universidad de Concepción y profesionales del Area de Acuicultura de Fundación Chile. El objetivo de esta reunión fue presentar y analizar los avances y resultados finales logrados en las etapas 1 y 2 del proyecto, y planificar las actividades futuras.

A dicha reunión asistieron 23 personas, entre profesionales y técnicos relacionados con el tema del lavado de redes, pinturas *antifouling* y los organismos ejecutores del proyecto. En hoja adjunta se entrega el detalle de las personas participantes.

En primer lugar, el director del proyecto agradeció la asistencia de los participantes y le entregó a cada uno de ellos una copia del boletín informativo nº 2 y copia del resumen ejecutivo del segundo y tercer informe de avance parcial entregado a Corfo, en el marco del plan de actividades comprometido.

Enseguida se expusieron las actividades realizadas a la fecha y que fueron básicamente los ensayos en laboratorio para diferentes tratamientos de Riles, optimización de los tratamientos, selección de la mejor alternativa de tratamiento, ingeniería conceptual de las modificaciones a las plantas de tratamiento existentes en los talleres de lavado y el tema de la Diseminación de enfermedades en los talleres de lavado de redes.

La exposición sobre el tema **“Ensayos de laboratorio, optimización y selección”** estuvo a cargo de Paola Taboada, profesional de la UDT, quien entregó una detallada relación de los diferentes ensayos realizados en el laboratorio, con las diferentes muestras de riles y lodos de los talleres; las optimizaciones realizadas al mejor tratamiento, la selección de alternativa de tratamiento y el diseño básico de la ingeniería del sistema propuesto.

En general, se señaló como conclusiones que es totalmente factible realizar el tratamiento de los residuos de los talleres de lavado de redes mediante una primera etapa de separación de los lodos por sedimentación, luego una etapa de tratamiento de los lodos por medio de la acidificación de la solución, después un tratamiento de precipitación del cobre soluble en la solución ácida y finalmente, el tratamiento primario del material orgánico que se genere al final del tratamiento.

Se señaló también que con la metodología aplicada en el laboratorio es posible reducir la generación de residuos peligrosos en un 90%; con lo cual se reducen también en un 90% los costos de disposición.

Se indicó que realizado un análisis costo–oportunidad de las opciones de tratamiento, se piensa que la instalación de una sola planta de tratamiento es más conveniente que la instalación de 10 plantas (una en cada taller de redes), ya que las ventajas que tiene la primera opción están asociada a costos de transporte, costos operacionales y costos de inversión.

La alternativa seleccionada contempla la instalación de un sedimentador en terreno, para determinar las características del líquido clarificado obtenido al tratar los efluentes antes que sean sometidos a un tratamiento químico. Estas actividades están asociadas a la etapa 3 del proyecto.

La inquietud de algunos asistentes se relacionó con la complejidad y costos de realizar los tratamientos para poder cumplir con la normativa, señalándose que sería preferible eliminar una menor cantidad de residuos peligrosos con una mayor concentración de cobre, y enviarlos a vertedero. Sin embargo, se señala que este tipo de residuo se clasifica como peligroso, lo cual hace muy costoso su transporte y debe ser trasladado en contenedores especiales y finalmente dispuestos en vertederos de seguridad.

La mesa señala que es imprescindible implementar lo antes posible la planta demostrativa para tener una real visión de los tratamientos propuestos y sus resultados.

Se consulta también sobre el costo de una planta de tratamiento para cada taller de redes, a lo cual se responde que en comparación con una planta común para 10 talleres, el costo es del orden de magnitud de 2 a 3 veces menor.

Respecto a la exposición “**Análisis de riesgo de la diseminación de enfermedades a través de los talleres de lavado de redes**” realizada por Alejandro Rojas, de Fundación Chile, se entregaron en detalle los principales resultados obtenidos de los distintos ensayos realizados.

Se pudo establecer que el *fouling* proveniente de redes de centros de cultivo de salmónidos y de los talleres de lavado, reparación e impregnación de redes es

portador de agentes patógenos. El 11% de las muestras tenía SRS, el 0,5% BKD y el 2,5% IPN.

Por ser el IPN el patógeno más resistente, se realizaron ensayos con distintas diluciones.

Una situación importante de considerar es la posible existencia de contaminación cruzada entre redes limpias y redes sucias. Lo cual es relevante si se considera que esta industria puede ser una fuente diseminadora de patógenos de distintos orígenes, señalándose que los puntos críticos de control son la etapa de lavado, impregnación y despacho final.

Un aspecto importante de considerar es el control sobre los camiones y otros medios de transporte, ya que se piensa son vectores de diseminación de enfermedades.

Las pinturas *antifouling* tanto en solvente orgánico, como solvente acuoso, difieren en el tiempo de inactivación del virus. La pintura en base a solvente orgánico a altas cargas virales inactiva el virus con un tiempo de exposición mayor a los de 3 días, y a cargas virales bajas inactiva el virus con un tiempo de exposición de 12 a 36 horas. Esto permite concluir que el proceso de lavado e impregnación de redes puede cortar o inhibir a los patógenos de importancia sanitaria.

De acuerdo a los resultados obtenidos el desinfectante a base de Peroximonosulfato de potasio y el óxido cuproso aparecen como los más efectivos para eliminar el IPNV bajo las condiciones del ensayo.

Luis Andrade plantea la inquietud de los Asociados de Atared A.G., quienes en su mayoría ha emprendido medidas e inversiones para realizar sus tratamientos y señala que ahora Marine Harvest (Asociado del proyecto FDI) licitó el lavado de sus redes con un taller no asociado. El director del proyecto responde señalando que existe un contrato de confidencialidad entre los asociados y ejecutores del proyecto, y de no cumplirse es penado por la ley.

Asimismo, Martin Hevia señala a la audiencia que la dirección del proyecto está disponible para responder cualquier consulta de los asociados, así como también, concurrir a reuniones extraordinarias si es necesario. La idea es estar bien informados y solucionar y responder todas las dudas posibles, para el éxito del proyecto.

Finalmente se plantearon las tareas de trabajo futuro a seguir por los profesionales del proyecto, las cuales contemplan las etapas 3 y 4 del estudio.

- La etapa 3 contempla, en general, implementar a la brevedad la planta demostrativa para el tratamiento de residuos, de acuerdo al principio propuesto, y que opere bajo condiciones reales en tres talleres de lavado de redes. A través de los ensayos de operación de esta planta demostrativa,

deberán confirmarse los resultados y condiciones de las experiencias realizadas en laboratorio.

- La etapa 4 contempla implementar un manual de procedimientos sanitario-ambiental, que incluya la normativa nacional vigente.
- Continuar trabajando en el análisis de las pinturas, según una metodología de común acuerdo.
- Próxima reunión se estima para fines de año; con posible invitación de autoridades y prensa.

Lista Asistentes a Segunda Reunión Técnica de Avance Proyecto FDI Taller de Redes

N	NOMBRE	EMPRESA	TELEFONO	E-MAIL
1	Orlando Domke	DomkeNet	65-233310	domkenet@surnet.cl
2	Alejandro Rojas	Fundación Chile	65-255588	arojas@fundacionchile.org
3	Carlos Estrada	Fundación Chile	240 0375	cestrada@fundacionchile.cl
4	Martin Hevia	Fundación Chile	240 0473	mhevia@fundacionchile.cl
5	Claudio Silva	Kaweshkar	65-271319	kaweshkar@telsur.cl
6	Ania Dellacasa	Marine Harvest Chile	65-269100	ania.dellacasa@nutreco.com
7	Segundo Igor	Marine Harvest Chile	65-269000	segundo.igor@nutreco.com
8	Francisco Oteiza	Master Nets	Master Nets	masternets@telsur.cl
9	Luis Andrade	Nisa Redes S.A.	65-431710	l.andrade@nisanet.cl
10	Pedro Vacarezza	Pinturas Ceresita	383 2200	pvacarez@ceresita.cl
11	Ricardo Auba	Pinturas Ceresita	65-272560	-
12	Omar Laferte	Pinturas Hempel		hempelpmontt@easyatnet.cl
13	Germán Carmona	Redes E.B.H.	65-255965	redesebh@telsur.cl
14	Cristián Contardo	Redes y Nets	65-276872	ccontardo@telsur.cl
15	Jorge Rojas	Redes y Nets	65-276872	redesynets@telsur.cl
16	Francisco Sabugo	Redmar Ltda.		redmar@surnet.cl
17	Teresa Barceló	Salmored Ltda..	65-250111	-
18	Marco Morales	Serv.Inst. Australes Ltda.	65-431132	-
19	Juan C. Maldonado	SimarNet	65-266265	jmsimarnet@telsur.cl
20	Gonzalo Cea	SimarNet	65-266265	erko@telsur.cl
21	Alex Berg	UDT- U.Concepción	41-747431	aberg@udt.cl
22	Paola Taboada	UDT- U.Concepción	41-747430	ptaboada@udec.cl
23	Oscar Vera	Redes JVO	65-680158	-

SEGUNDA CAMPAÑA MUESTREO (MAYO 2003) PARA LA DETECCIÓN DE PATOGENOS DE IMPORTANCIA SANITARIA, PROCEDENTES DE TALLERES DE REDES EN LA X REGION.

1. OBJETIVO

Detectar e identificar, en una segunda campaña de muestreo, patógenos de peces de importancia sanitaria en la industria salmonera nacional, a partir muestras de *fouling*, riles, redes pre y post lavado, procedentes de talleres de redes en la x región, que proceden de talleres de reparación e impregnación de estas, por medio de técnicas diagnosticas convencionales.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MUESTREO

Durante el mes de Mayo de 2003 se realizaron dos muestreos a las distintas empresas de lavado, impregnación y reparación de redes. La tabla 1 resume las empresas, contacto, tipo y cantidad de muestras analizadas.

Tabla 1: Empresas muestreadas, contactos, tipo y cantidad de muestras obtenidas.

Empresa	Contacto	Fono	Muestras	Cantidad
Redes Nets	Jorge Rojas	276872	Riles1	3
			Riles2	3
			Red 1	3
			Red 2	3
			<i>Fouling</i>	3
Nisa	Luis Andrade	317125	Riles1	3
			Riles2	3
			Red 1	3
			Red 2	3
			<i>Fouling</i>	3
Redes E.B.H	Elba Briceño	255365	Riles1	3
			Riles2	3
			Red 1	3
			Red 2	3
			<i>Fouling</i>	3
Simar	Gonzalo Cea	278030	Riles1	3
			Riles2	3
			Red 1	3
			Red 2	3
			<i>Fouling</i>	3

2.2 MUESTRAS

Durante los muestreos se tomaron distintos tipos de muestras las cuales se clasificaron según la siguiente definición.

- **Fouling:** Es la materia orgánica tanto animal o vegetal que se encuentra adherida a la red. La identificación del *fouling* muestreado fue *Mytilus sp.*
- **Redes:** Es la red ya recepcionada antes de procesar o procesada por los talleres de redes. Se pueden distinguir redes antes de lavar y después de lavar.
- **Residuos líquidos:** Es el producto de los procesos de limpieza, o lavado de las redes. Se pueden distinguir efluentes del proceso de lavado, percolados de las mallas con *fouling*, percolado de camión (residuo de las redes en tarima del camión) y barros provenientes del proceso de las redes.

Las muestras tomadas fueron clasificadas de acuerdo a las siguientes categorías.

2.2.1 Fouling.

2.2.2 Redes.

- Redes 1: redes sucias
- Redes 2: redes limpias

2.2.3 Residuos líquidos.

- Riles 1 Residuo industrial crudo (salida directa de lavado de redes).
- Riles 2 Percolado de camión (residuo de las redes en tarima del camión).

La tabla 2 resume los tipos de muestras y número de cada una de estas analizadas.

Tabla 2: Tipos de muestras y total de cada una para su análisis.

Tipo de muestra	Numero de muestras
<i>Fouling (Mytilus spp)</i>	12
Redes 1 (sucias)	12
Redes 2 (limpias)	12
Riles 1 (post lavado)	12
Riles 2 (percolado de camión)	12
Total	60

2.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

2.3.1 *Fouling*

El *fouling* se obtuvo a partir de redes en espera a ser lavadas. (redes sucias). Las muestras de *fouling* fueron colectadas asépticamente de diferentes zonas de las redes. Una vez extraídas fueron puestas en bolsas plásticas estériles debidamente rotuladas. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de Ictiopatología de Aquagestion - Fundación Chile, Sede Puerto Montt.

2.3.3 Redes

Las muestras fueron tomadas directamente de los talleres de redes, colectándose redes antes de lavar (sucias) y redes después de lavar (limpias). Para la extracción se cortó una pieza (20 cm²) del fondo de esta, para luego ser puestas en bolsas estériles debidamente rotuladas. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de Ictiopatología de Aquagestion - Fundación Chile, Sede Puerto Montt.

2.3.4 Residuos líquidos

Los residuos líquidos fueron colectados directamente de los talleres de redes, disponiéndose en botellas estériles debidamente rotuladas. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de Ictiopatología de Aquagestion - Fundación Chile, Sede Puerto Montt.

Todas las muestras proceden de 4 talleres de redes ubicados en las cercanías de la décima región.

3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.1 *Fouling*

El *fouling* recepcionado en el laboratorio se procede a clasificar según especie y en el caso de no ser clasificado se agrupa según la familia.

Una vez clasificado se procede de distintas formas, según la técnica a utilizar.

- Cultivo en línea celular CHSE-214 (C.C) para detección del agente patógeno viral, causante de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), Virus de la necrosis pancreática viral (IPNV).
- Test de la Inmunofluorescencia indirecta (IFAT) para la detección de los agentes bacterianos, causantes de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) *Renibacterium salmoninarum* y del agente causal del Síndrome Rickettsial salmónido (SRS) *Piscirickettsia salmonis*.

3.2 Redes

Las redes recepcionadas en el laboratorio se procesan de la siguiente manera:

Se cortan varios trozos de red de diferentes secciones y se colocan en un matraz graduado que contiene 200 ml de agua peptonada. El matraz se homogeniza y se deja en reposo por 10 minutos. Se toma una alícuota de 1,5 ml de suspensión de red en agua peptonada y se coloca en un tubo eppendorf.

Las técnicas a utilizar son:

- Cultivo en línea celular CHSE-214 (C.C) para detección del agente patógeno viral, causante de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), Virus de la necrosis pancreática viral (IPNV).
- Test de la Inmunofluorescencia indirecta (IFAT) para la detección de los agentes bacterianos, causantes de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) *Renibacterium salmoninarum* y del agente causal del Síndrome Rickettsial salmonidio (SRS) *Piscirickettsia salmonis*.

3.3 Residuos líquidos

De los residuos líquidos se toma directamente una alícuota (1,5 ml) y se coloca en un tubo eppendorff para ser analizados.

Las técnicas a utilizar son:

- Cultivo en línea celular CHSE-214 (C.C) para detección del agente patógeno viral, causante de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), Virus de la necrosis pancreática viral (IPNV).
- Test de la Inmunofluorescencia indirecta (IFAT) para la detección de los agentes bacterianos, causantes de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) *Renibacterium salmoninarum* y del agente causal del Síndrome Rickettsial salmonidio (SRS) *Piscirickettsia salmonis*.

4. DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS DIAGNOSTICAS UTILIZADAS PARA DETECTAR PATÓGENOS EN LAS MUESTRAS A ANALIZAR.

4.1 Detección de *Piscirickettsia salmonis* a través de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFAT).

Esta técnica utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales que son específicos para *Piscirickettsia salmonis*. Estos anticuerpos reaccionan con antígenos específicos de *P. salmonis* que se encuentre en alguna preparación de tejido. La presencia de los complejos antígeno-anticuerpo se detecta con un anti - IgG de ratón conjugado a FITC observando en un microscopio de fluorescencia. Las bacterias se observan como formas cocoides de una intensa coloración verde.

Tabla 3: Interpretación de resultados de informe (IFAT SRS) de acuerdo a número de organismos Rickettsiales por campo.

Negativo o bajo los niveles de detección	N
1-10 Organismos Rickettsiales en 50 campos	1+
11-25 Organismos Rickettsiales en 50 campos	2+
26-50 Organismos Rickettsiales en 50 campos	3+
> 50 Organismos Rickettsiales en 50 campos	4+

4.2 Detección de *Renibacterium salmoninarum* a través de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Técnica inmunológica basada en la detección de antígenos de *Renibacterium salmoninarum* por medio de anticuerpos específicos. La detección se realiza ya sea directa (primer anticuerpo conjugado a fluoresceína) o indirectamente (segundo anticuerpo conjugado a fluoresceína, conocido como IFAT) en frotis de tejido, previamente fijados en acetona. Los complejos antígeno-anticuerpo se observan bajo microscopio de fluorescencia, visualizándose microorganismos bacilares verde intenso de fácil observación.

Tabla 4: Interpretación de resultados de informe (IFAT BKD), de acuerdo a número de diplobacilos por campo.

Negativo o bajo los niveles de detección	N
1-10 Diplobacilos en 50 campos	1+
11-25 Diplobacilos en 50 campos	2+
26-50 Diplobacilos en 50 campos	3+
> 50 Diplobacilos en 50 campos	4+

4.3 Detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) por medio de la técnica de cultivo celular en línea CHSE-214.

Los virus necesitan células vivas para su multiplicación, la infección de células susceptible por un virus en muchos casos culmina en la multiplicación de la descendencia, además de alteraciones en la síntesis macromoleculucular de la célula, manifestado generalmente como efecto Citopático (CPE) y que culmina con cambios bioquímicos, muchas veces finalizado en muerte celular, contracción, lisis, acumulación de células en grupos y formación de sincitios.

Existen variadas líneas celulares para la detección de patógenos virales en salmónidos, cada línea posee una característica particular. La línea CHSE-214 (Embryo chinook salmón) es la línea celular de elección para el diagnóstico de IPNV por su sensibilidad y respuesta frente al virus.

La tabla 5 resume los patógenos analizados, técnicas diagnósticas empleadas y número total de análisis realizados.

Tabla 5: Patógenos, técnica diagnostica y número de exámenes según cada una de estas.

PATÓGENOS	TÉCNICA DIAGNÓISTICA	NUMERO TOTAL DE EXÁMENES
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Inmunofluorescencia Indirecta para SRS	60
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Inmunofluorescencia Indirecta para BKD	60
<i>Necrosis pancreática infecciosa (IPNV)</i>	Cultivo celular en línea CHSE-214	60
Totales		180

5. RESULTADOS

5.1 Detección de agentes patógenos a partir del *fouling*

5.1.1 Síndrome rickettsial salmonídeo (*P. salmonis*).

La tabla 6 resume los resultados de Inmunofluorescencia para SRS realizados a las muestras de *fouling*.

Tabla 6: Número de muestras de *fouling*, sometidas a examen IFAT SRS y su resultado.

NUMERO DE MUESTRAS	POSITIVOS A IFAT (SRS)
12	0/12

Los resultados correspondientes al análisis del total del *fouling* indican que no se detectó la presencia de *P.salmonis*. en las muestras analizadas de *Mytilus spp.*

5.1.2 Enfermedad bacteriana del riñón (*R. salmoninarum*).

La tabla 7 resume los resultados de Inmunofluorescencia para BKD realizados a partir de muestras de *fouling*.

Tabla 7: Número de muestras de *fouling*, sometidas a examen IFAT BKD y su resultado.

NUMERO DE MUESTRAS	POSITIVOS A IFAT (BKD)
12	0/12

Los resultados correspondientes al análisis del total del *fouling* indican que no se detectó la presencia de *R. salmoninarum*. en las muestras analizadas de *Mytilus sp.*

5.1.3 Virus de la Necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

La determinación de positividad al virus de la necrosis pancreática infecciosa, ya sea a través del Cultivo en líneas celulares se realiza a través de pooles, estos pooles están confeccionados por máximo 5 individuos de la misma especie o familia.

La tabla 8 resume los resultados obtenidos partir de muestras de *fouling* utilizando la técnica de Cultivo Celular.

Tabla 8: Numero de muestras de *fouling*, sometidas a Cultivo en líneas celulares y su resultado.

TÉCNICA	NUMERO DE POOLES	POSITIVOS A C.C (IPNV)
<i>Cultivo celular</i>	12	0/12

Los resultados correspondientes a los análisis de cultivo celular indican que no se detectó la presencia del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en las muestras de *fouling*.

5.2 REDES

Las redes fueron clasificadas en Redes 1 correspondientes a las Limpias y Redes 2 correspondientes a las Sucias.

5.2.1 Síndrome rickettsial salmonídeo (*P. salmonis*).

La tabla 9 resume los resultados obtenidos a partir de Redes limpias y sucias, utilizando la técnica de Inmunofluorescencia para SRS.

Tabla 9: Número de muestras de Redes 1 y 2, sometidas a examen IFAT SRS y su resultado.

TIPO Y NUMERO DE MUESTRAS	POSITIVAS A IFAT (SRS)
<i>Redes 1 (12)</i>	0/12
<i>Redes 2 (12)</i>	0/12

Los resultados correspondientes al análisis del total de redes, indican que no se detectó la presencia de *P. salmonis* en las muestras analizadas de redes 1 y 2.

5.2.2 Enfermedad bacteriana del riñón (*R. salmoninarum*).

La tabla 10 resume los resultados obtenidos a partir de Redes limpias y sucias, utilizando la técnica diagnóstica de Inmunofluorescencia para BKD.

Tabla 10: Numero de muestras de Redes 1 y 2, sometidas a examen IFAT BKD y su resultado.

TIPO Y NUMERO DE MUESTRAS	POSITIVAS A IFAT (BKD)
<i>Redes 1 (12)</i>	0/12
<i>Redes 2 (12)</i>	0/12

Los resultados correspondientes al análisis del total de redes, indican que no se detectó la presencia de *R. salmoninarum* en las muestras analizadas de redes 1 y 2.

5.2.3 Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

La tabla 11 resume los resultados obtenidos a partir del análisis de Redes limpias y sucias, utilizando la técnica de diagnóstico de Cultivo celular (CHSE-214).

Tabla 11: Numero de muestras de Redes 1 y 2, sometidas cultivo celular (CHSE-214) y su resultado.

TIPO Y NUMERO DE MUESTRAS	POSITIVAS A C.C (IPNV)
<i>Redes 1 (12)</i>	0/12
<i>Redes 2 (12)</i>	0/12

Los resultados correspondientes al análisis del total de redes, indican que no se detectó la presencia del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en las muestras analizadas de redes 1 y 2.

5.3 Residuos líquidos (Riles 1 y 2)

Los Riles fueron clasificados en Residuos Industriales Crudo (Riles 1) y Percolado de Camión (Riles 2).

5.3.1 Síndrome rickettsial salmonídeo (*P.salmonis*).

La tabla 12 resume los resultados obtenidos a partir de muestras de Riles 1 y 2 utilizando la técnica de Inmunofluorescencia para SRS:

Tabla 12: Numero de muestras de Riles 1 y 2, sometidas a examen IFAT SRS y su resultado.

TIPO Y NUMERO DE MUESTRAS	POSITIVAS A IFAT (SRS)
<i>Riles 1 (12)</i>	3/12
<i>Riles 2 (12)</i>	0/12

A partir de los análisis realizados, se detectó la presencia de *P.salmonis* en tres muestras de 12 analizadas, procedentes de efluentes de lavado (Riles1) y no se detectó la presencia de *P.salmonis* en percolados de camiones de transporte de redes (Riles 2).

5.3.2 Enfermedad bacteriana del riñón (*R. salmoninarum*).

La tabla 13 resume los resultados obtenidos a partir de muestras de Riles 1 y Riles 2, utilizando la técnica de Inmunofluorescencia para BKD.

Tabla 13: Número de muestras de Riles 1 y 2, sometidas a examen IFAT BKD y su resultado.

NUMERO DE MUESTRAS	POSITIVAS A IFAT (BKD)
<i>Riles 1 (12)</i>	0/12
<i>Riles 2 (12)</i>	0/12

A partir de los análisis de los líquidos procedentes de efluentes de lavado (Riles1) y percolados de camiones (Riles2), de talleres de redes no se detectaron muestras positivas a *R. salmoninarum*.

5.3.3 Virus de la necrosis Pancreática infecciosa (IPN).

La tabla 14 resume los resultados obtenidos a partir de muestras de Riles 1 y Riles 2 utilizando la técnica de Cultivo Celular (CHSE-214).

Tabla 14: Numero de muestras de Riles sometidas a Cultivo en líneas celulares y su resultado.

NÚMERO DE MUESTRAS	POSITIVAS A C.C (IPNV)
<i>Rile 1 (12)</i>	0/12
<i>Riles 2 (12)</i>	0/12

A partir de los análisis de los líquidos procedentes de efluentes de lavado (Riles 1) y percolados de camiones (Riles 2), de talleres de redes no se detectaron muestras positivas al Virus de La Necrosis Pancreática Infecciosa.

6. CONCLUSIONES (MAYO 2003)

- A partir de los resultados del presente estudio se puede establecer que *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis* y el *Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa* no fueron detectados en las muestras de *fouling* analizadas.
- A partir de los resultados del presente estudio se puede establecer que *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis* y el *Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa* no fueron detectados en las muestras de redes analizadas.
- En los líquidos provenientes del proceso de lavado (Residuo Industrial Crudo, salida directa de lavado de redes) se detectó la presencia de *P. salmonis*, no así la presencia del *Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa* y de *Renibacterium salmoninarum*.
- A partir de los resultados se puede inferir que es probable la detección de patógenos en muestras de *fouling*, redes y riles provenientes de Talleres de Lavado e Impregnado de Redes.
- La no detección de otros patógenos *R.salmoninarum* y *Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa* en muestras de *fouling* y redes y *R. salmoninarum* y *Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa* en riles, provenientes de Talleres de Lavado e Impregnado de Redes puede relacionarse a diferentes factores:

- El primero de los factores a considerar son las técnicas diagnósticas y su interacción con las muestras. Actualmente es posible afirmar que las técnicas diagnósticas empleadas se encuentran estandarizadas para la detección de patógenos a partir de muestras de tejidos y fluidos. Se desconoce, por lo tanto, las interferencias que puede producirse desde el punto de vista bioquímico entre los diferentes reactivos de las técnicas diagnósticas y los componentes químicos de muestras de riles, *fouling*, o redes y su impacto en la sensibilidad y especificidad de la técnica empleada.
 - El otro de los factores a considerar es la significancia estadística de los muestreos, lo cual es más relevante cuando se trata de Riles. En este estudio el número de muestras se encontraba determinado por los recursos, más que por una consideración estadística.
 - Por último la estacionalidad y procedencia de las redes es un factor de importancia en la detección de enfermedades en *fouling*, redes y por ende riles. Se conoce que la presentación de enfermedades esta determinado estacionalmente (otoño, primavera) y por ende la carga de patógenos en el ambiente.
- Finalmente es destacable la realización de este estudio complementario para los Talleres de Lavado de Redes y para la Industria de Salmónidos en general, ya que constituye uno de los primeros esfuerzos en poder determinar el rol en la diseminación de enfermedades que puedes tener estas empresas.

ANEXOS

Resultados Análisis Laboratorio