

Nota Técnica N°5

07 de Junio 2023



Somos Experiencia, Compromiso & Innovación

IPN en Chile: *nuevas variantes, nuevos desafíos*



Elaborado por:
Área Asistencia Técnica & Area I+D+i

El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), enfermedad controlada en la salmonicultura nacional, sigue dando a ratos algunos dolores de cabeza, incluso en Noruega y Escocia. IPNV está presente en Chile desde hace casi cuatro décadas, las evidencias han mostrado que el virus procedía desde Norteamérica, presumiblemente siendo introducida a través de las ovas; si bien la transmisión vertical está científicamente demostrada sólo en truchas, las múltiples evidencias permiten dar por hecho que esto mismo ocurre en salmón del Atlántico y salmón coho.

A través de los años, se han implementado en el país una serie de estrategias que han permitido controlar efectivamente la enfermedad, entre las que destacan el uso de vacunas, mejores prácticas de cultivo y de bioseguridad y, en especial, para el caso de salmón del Atlántico, la selección de peces genéticamente resistentes al virus (QTL y ahora agregando más marcadores genéticos). Como muchas veces sucede, este virus es más “inteligente” de lo que pensamos, reportándose algunos brotes asociados a mortalidades por IPN desde el 2021 a la fecha, incluso en peces QTL, lo que se ha asociado a la aparición de nuevas variantes genéticas (mutaciones) del virus. Estas mortalidades han sido muy variables en porcentaje, sin embargo, en algunos casos de mortalidades bajas, se han generado pérdidas más elevadas de lo pensado, específicamente atribuidas a peces con menor rendimiento productivo, que se van quedando rezagados; algo característico de la versión crónica de IPN que era común de observar en brotes con mortalidades de importancia.

Cepas y clasificación

En cuanto a la clasificación de las cepas del virus IPN, existen dos enfoques: uno basado en las características serológicas y otro en la variabilidad genotípica. A nivel serológico, se describen los serogrupos A y B, dentro del primero (serogrupo A) existen nueve serotipos, mientras que en el serogrupo B solo hay un serotipo. Por su parte, el enfoque genotípico clasifica las distintas cepas en siete genotipos (G1 a G7). Por cierto, existe una relación entre los distintos serotipos, genotipos y cepas.




En Chile, se ha reportado casi de manera exclusiva la cepa americana West Buxton (WB, genotipo 1, serotipo A1) en trucha arco iris y salmón coho, mientras que la cepa danesa Spjarup (Sp, genotipo 5, serotipo A2) se ha reportado casi exclusivamente en salmón del Atlántico, lo que sugiere una relación específica con el hospedero.

CEPA	West Buxton, WB (G1 - SA1)	Spjarup, Sp (G5 - SA2)
ESPECIE SUSCEPTIBLE	Salmón coho, Trucha arco iris	Salmón del Atlántico

En ADL, además de disponer de la técnica de RT-qPCR para la identificación de IPNV mediante el uso de marcadores moleculares específicos, también se cuenta con RT-qPCR específicos para los serotipos West Buxton (WB) y Spajarup (Sp), que son aquellos más frecuentes en Chile, sumándose además los marcadores de virulencia para el serotipo Sp, que nos permite discriminar en función de esa variable.

Dado que una fracción importante de los peces en la industria recibe la vacuna IPNV de Pharmaq, que utiliza una variante noruega de Sp que no está presente en Chile, es que ADL hace más de 8 años desarrolló una técnica específica a la que hemos denominado RT-qPCR no interferencia Pharmaq (NPHQ) y RT-qPCR vacuna Pharmaq (VacPh), que permiten discriminar si la positividad a IPNV en peces inmunizados se asocia a marcadores específicos de la vacuna o bien corresponde efectivamente a una infección natural. Estos, han sido utilizados en muchos casos por varios años, pues aportan valiosa información para interpretar situaciones en las cuales existe incertidumbre y se requiere certeza para generar las intervenciones o medidas que corresponden. Esto se ha hecho más necesario toda vez que estas vacunas han dado reacción cruzada a IPNV incluso en peces recién transferidos al mar. Ciertamente, esta discriminación no se puede llevar a cabo con vacunas que usan virus de IPNV presentes en Chile.

Discriminación de IPNV mediante qPCR específicos, según propósito (Disponibles como Servicios Diagnósticos en ADL)

NPHQ 	Sp/WB 	VacPh 
<p>PCR no interferencia a vacuna <i>Pharmaq</i></p>	<p>PCR de asociación a genomas de serotipos IPNV Sp y WB</p>	<p>PCR Vacuna <i>Pharmaq</i></p>
<p>Objetivo: Discriminar si un resultado PCR positivo a IPNV se debe a la presencia de la vacuna o la presencia de infección natural.</p>	<p>Objetivo: Determinar si el genoma de IPNV de la muestra positiva corresponde a la referencia seroneutralizada Sp o West Buxton(WB).</p>	<p>Objetivo: Determinar la presencia o ausencia de la vacuna <i>Pharmaq</i></p>
<p>Interpretación: Si este PCR presenta amplificación (Ct), significa que existe la infección natural.</p>	<p>Interpretación: Significa que el serotipo presente es Sp o WB y esto permite definir pasos a seguir.</p>	<p>Interpretación: Si este PCR presenta amplificación (Ct) significa que existe la presencia de la vacuna <i>Pharmaq</i> en la muestra</p>

Características del virus

IPNV es un virus icosaédrico sin envoltura, con un tamaño promedio de 65 nm. Una de las principales características del agente es la gran resistencia a condiciones físico-químicas, se mantiene estable a valores de pH cercanos a 3, soporta un amplio rango de salinidades (0 a 40 ppt) y temperaturas (resiste hasta 60°C durante 30 minutos, siendo capaz de replicarse en temperaturas que van desde los 4° a 27,5 °C). Por otro lado, se reconoce que los peces sobrevivientes a la infección se convierten en portadores asintomáticos de por vida, diseminando el virus a través de sus heces y/o gametos. Estos factores determinan en gran parte el endemismo del virus y su difícil control.

Otra característica del IPNV es su variada virulencia, reportándose diferencias incluso en cepas de un mismo tipo. Un componente viral ampliamente estudiado en este ámbito es la proteína VP2, proteína estructural de la cápside viral que contiene los principales sitios antigénicos, la especificidad celular de unión a células del hospedero y algunos determinantes de virulencia. Diversos estudios han identificado que diferencias en las secuencias aminoacídicas de VP2 actúan como determinantes de virulencia, destacando particularmente los cambios en las posiciones 217, 221 y 247. La identificación de mutaciones en VP2, ha sido de gran relevancia ya que podrían explicar la reciente adaptación del virus en salmones genéticamente resistentes. Los análisis de virulencia, basados en este criterio científico, forman parte de la batería de análisis realizados en ADL hace más de una década y nos ha permitido incluso realizar estudios en casos clínicos diversos y en vacunas.

Una innovación tecnológica relevante en la industria mundial y que fue responsable de controlar efectivamente IPN en salmón del Atlántico, superando con creces la contribución de la vacuna, fue la generación de poblaciones genéticamente resistentes al virus (QTL); específicamente hacia el serotipo Sp. Después de muchos años de funcionar perfectamente, de pronto el virus muta y se presentan algunos brotes en Noruega y Escocia, como también en Chile.

Investigaciones realizadas por ADL, en conjunto con el Norwegian Veterinary Institute (NVI), utilizando poblaciones de salmón del Atlántico genéticamente resistentes, pero afectados por brotes de IPN desde fines 2021 y durante el año 2022 en Chile, permitieron determinar que existen mutaciones espontáneas que afectan algunos residuos aminoacídicos de VP2 de aislados recientes. A lo anterior, se suma una investigación realizada de manera independiente por ADL en una serie de casos de la misma temporada, en los cuales se recuperó e identificó aislados del genogrupo I (WB). La secuenciación del genoma de dichos aislados confirmó mutaciones en el segmento B, la mayoría de ellas sobre el gen que codifica para la proteína VP2, los que vendrían siendo los primeros casos documentados de salares genéticamente resistentes afectados por este tipo de cepa.

Si bien, no es posible establecer con certeza que los cambios detectados a nivel de secuencia sean responsables de la capacidad de estos nuevos aislados de infectar peces genéticamente resistentes, este hecho pone en evidencia la gran capacidad de adaptación del virus y la posibilidad de generar variantes

genéticas con nuevas características, las que podrían ser más virulentas, afectar un rango más amplio de hospederos y presentar mayor resistencia a condiciones ambientales, entre otros. Estas mutaciones fueron comparativamente más amplias, y por lo mismo más complejas, en Noruega y Escocia respecto de Chile.

Para mantener protegida a la industria de esta importante enfermedad, se hace necesaria una vigilancia epidemiológica molecular rigurosa y continua sobre los diferentes genotipos del virus IPN, de manera de estudiar si potenciales mutaciones podrían ser responsables de quiebres en la resistencia genética al virus, las cuales necesariamente deben ser comprobadas en peces, en ensayos de desafío en ambiente controlado. Esta vigilancia debe ser acompañada de inmunización activa (vacunas) y de medidas de control y prevención oportunas y adecuadas.

Bibliografía

Dopazo, C. (2020). The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its Virulence Determinants: What is Known and What Should be Known. *Pathogens* 9 (2):94.

Hillestad, B., Johannessen, S., Melingen, G. O., & Moghadam, H. K. (2021). Identification of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant in Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*) that can Cause High Mortality Even in Genetically Resistant Fish. *Front Genet*, 12, 635185. doi:10.3389/fgene.2021.635185

Kuznar, J. Virus IPN: La importancia de la caracterización molecular y el contexto epidemiológico de aislados chilenos. *Salmonexpert*, 24.02.2018

Tapia, D., Barria, A., Kuznar, J., & Yanez, J. M. (2020). Comparison of mortality and viral load in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) genogroups 1 and 5. *J Fish Dis*, 43(1), 139-146.

Wong-Benito, V., Barraza, F., Trujillo-Imarai, A., Ruiz-Higgs, D., Montero, R., Sandino, A. M., . . . Imarai, M. (2022). Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) recombinant viral protein 1 (VP1) and VP2-Flagellin fusion protein elicit distinct expression profiles of cytokines involved in type 1, type 2, and regulatory T cell response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*, 131, 785-795.