



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

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y ASOCIACIÓN DE  
*Piscirickettsia salmonis* EN HECES, HÍGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA  
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN CONDICIONES DE CULTIVO  
EN MAR**

**Patricio Peirano Hinojosa**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: DRA. MARIANA ACUÑA RETAMAR

SANTIAGO, CHILE  
2015



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

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y ASOCIACIÓN DE  
*Piscirickettsia salmonis* EN HECES, HÍGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA  
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN CONDICIONES DE CULTIVO  
EN MAR**

**Patricio Peirano Hinojosa**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

Nota Final .....

Dra. Mariana Acuña .....  
Dr. Julio Larenas .....  
Dr. Patricio Retamal .....

SANTIAGO, CHILE

2015

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

Resumen .....	IV
Abstract .....	V
Introducción.....	1
Revisión bibliográfica.....	2
Hipótesis .....	7
Objetivo general .....	7
Objetivos específicos .....	7
Materiales y métodos .....	8
1) Marco geográfico de trabajo: .....	8
2) Obtención de peces objetivo .....	8
3) Obtención de las muestras .....	8
4) Procesamiento de las muestras .....	11
a.- aislamiento de material genético. ....	11
b.- generalidades de la técnica pcra .....	11
c.- electroforesis.....	12
Resultados .....	14
1) Toma de muestras: .....	14
2) Extracción de adn: .....	14
3) PCR Anidado: .....	15
4) Análisis estadístico: .....	18
Discusión .....	19
Conclusiones .....	24
Bibliografía .....	25
Anexos.....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1: Materiales utilizados en cada etapa del procesamiento de las muestras. extracción de adn, reacción en cadena de la polimerasa anidada. ....	13
Tabla Nro. 2: Intensidad de lesiones externas en peces orillados extraídos en el centro ubicado en la xi región. ....	15
Tabla Nro. 3: Resultados de presencia/ausencia de p. salmonis en muestras de heces, hígado y riñón de los 24 peces muestreados. ....	17

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1: materiales de toma de muestras, lugar de trabajo y necropsia .....	10
Figura Nro. 2: electroforesis en gel tbe de agarosa al 2% de muestras de heces, riñón e hígado de 4 peces .....	16
Figura Nro. 3: electroforesis en gel tbe de agarosa al 2% de muestras de heces .....	18

## RESUMEN

La piscirickettsiosis es una enfermedad causada por un agente bacteriano denominado *Piscirickettsia salmonis* que afecta a los salmónidos cultivados en el sur de Chile principalmente en etapas de cultivo en el mar, cuyo diagnóstico se basa comúnmente en el análisis de laboratorio de muestras de riñón, hígado y cerebro según programas de vigilancia de la autoridad sanitaria acuícola de Chile. La presente memoria de título tuvo por objetivo determinar, mediante un índice de concordancia (Kappa), la asociación estadística entre la presencia de *P. salmonis* en muestras de heces y la presencia del agente en muestras de riñón e hígado provenientes de 24 truchas arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) adultas con signología clínica de la enfermedad y que se encuentran mantenidas en condiciones de cultivo en el mar, utilizando una técnica molecular para la detección de la bacteria en cada una de las muestras. Se determinó la presencia de *P. salmonis* en un 70,8%, 83,3% y 75% de las muestras de heces, riñón e hígado respectivamente, y el índice kappa calculado para evaluar la asociación entre la presencia de la bacteria en heces y riñón fue negativo indicando nula concordancia mientras que el valor de kappa para la asociación entre la presencia del agente en heces e hígado fue de 0,276, indicando una débil concordancia. Este estudio es el primero en detectar *P. salmonis* en muestras de heces de truchas arcoíris mantenidas en condiciones naturales de cultivo en mar pero se requieren mayores estudios para poder determinar la viabilidad de la bacteria en el contenido fecal y así establecer su mecanismo de diseminación.

## ABSTRACT

The piscirickettsiosis is a disease caused by a bacterial agent called *Piscirickettsia salmonis* and it affects salmonids hatched in the south of Chile, principally at sea hatchery stages, whose diagnosis is commonly based in the laboratory analysis of kidney, liver and brain samples according to monitoring programs of the aquaculture sanitary authority. The objective of the present memory was to determine, through a concordance coefficient (Kappa), the statistical association between the *P. salmonis* presence in faeces samples and its presence in kidney and liver samples from 24 adult rainbow trouts (*Onchorynchus mykiss*) with clinical signology maintained in sea hatchery conditions, using a molecular technique for the detection of the bacterium in each sample. The presence of *P. salmonis* was determined in 70,8%, 83% and 75% of the faeces, kidney and liver samples respectively and the kappa coefficient calculated for evaluate the association between the presence of the bacterial agent in faeces and kidney was negative indicating a null concordance while the kappa value for the association between the presence of the bacterium in faeces and liver was 0,267 indicating a weak concordance. This study is the first one detecting *P. salmonis* in faeces samples from rainbow trout maintained in natural hatchery condition but its required more studies to determine the viability of the bacterium in the fecal content and then set the dissemination mechanism.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el óptimo desarrollo de la salmonicultura nacional se ha visto afectado por infecciones masivas de microorganismos capaces de generar altas mortalidades. En la actualidad, la piscirickettsiosis es la patología más prevalente que afecta a diversas especies de salmónidos cultivados en el sur de Chile. Esta enfermedad, comúnmente conocida como septicemia rickettsial salmonídea (SRS), es producida por un agente bacteriano intracelular facultativo altamente contagioso denominado *Piscirickettsia salmonis*, el cual genera grandes pérdidas económicas asociadas a elevada mortalidad y uso excesivo de vacunas y antimicrobianos para su prevención y control.

En los últimos años, la industria del salmón en Chile ha adoptado diversas medidas de bioseguridad las cuales han reducido la probabilidad de transferir el patógeno entre los centros de cultivo ubicados en mar. Sin embargo, la piscirickettsiosis continúa siendo la enfermedad preponderante en nuestro país y, a pesar de que fue diagnosticada a fines de los años 80, es poco lo que se conoce en cuanto a su ciclo de vida, patogenia y virulencia.

Algunos aspectos importantes de conocer de la patogenia de la piscirickettsiosis y que podrían ser el punto base para la búsqueda de nuevas medidas de control de esta enfermedad, son las vías de transmisión de *P. salmonis*. Actualmente existe escasa información disponible que sugiere la existencia de transmisión, tanto vertical como horizontal, en condiciones experimentales en agua dulce y se ha establecido empíricamente que la transmisión horizontal de esta bacteria ocurre a través de las heces en condiciones de cultivo en mar.

En base a lo anterior, el presente proyecto de memoria de título buscará determinar la presencia de *P. salmonis* en heces de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la asociación de ésta con la presencia de la bacteria en órganos como riñón e hígado, los cuales normalmente son utilizados como muestras para el diagnóstico de la enfermedad.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La bacteria *P. salmonis* es considerada actualmente como el patógeno más prevalente de peces salmónidos en Chile y es el agente causal de la enfermedad denominada piscirickettsiosis o septicemia rickettsial salmonídea (SRS), enfermedad que ha estado causando grandes pérdidas económicas para la industria del salmón en la última década (Rees *et al.*, 2014; Rozas y Enríquez, 2014), como lo fue en el año 2012, donde la piscirickettsiosis generó pérdidas de US\$ 450.643.229 por conceptos de mortalidad, tratamientos antimicrobianos y vacunas (Camussetti, 2014).

El agente afecta diversas especies de salmónidos cultivados principalmente en el sur de Chile, como lo son el salmón coho (*O. kisutch*), salmón chinook (*O. tshawytscha*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanic *et al.*, 1991; Bravo, 1994).

La piscirickettsiosis es una patología que se presenta principalmente en mar y estuario, observándose mayor incidencia de la enfermedad desde enero a mayo donde las temperaturas del agua oscilan entre 12°C y 14°C (Rees *et al.*, 2014; Larenas *et al.*, 1997). El agente etiológico de esta enfermedad tiene una replicación óptima *in vitro* a 14°C y retardada a temperaturas extremas de 8°C y 18°C (Larenas *et al.*, 1997). Se describe que centros de salmón coho infectados con *P. salmonis* reportan mortalidades mensuales entre 1 y 20%, y sobre el 40% durante estas epizootias, las cuales coinciden con las 6 a 12 semanas post introducción de los *smolt* al mar (Cvitanich *et al.*, 1991; Fryer y Lannan, 1996; Larenas *et al.*, 1997).

Debido al gran impacto que tiene la piscirickettsiosis para la industria, el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) estableció en el año 2013 el Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de la Piscirickettsiosis (PSEVC-P), el cual entrega las bases para clasificar los centros de cultivo en centros de vigilancia, centros de alerta o centros de alta diseminación de acuerdo al número de jaulas con un porcentaje de mortalidad semanal asociado a la enfermedad sobre 0,35% y al número de tratamientos antimicrobianos utilizados en un periodo de tiempo determinado, así como también establece las metodologías diagnósticas de monitoreo de la piscirickettsiosis y dirige las acciones a realizar para mitigar el impacto de esta enfermedad (Sernapesca, 2013).

La bacteria, del género *Piscirickettsia*, perteneciente a la familia *Piscirickettsiaceae* (Fryer y Hedrick, 2003), es descrita como gramnegativa, cocoide, aeróbica e inmóvil, con un diámetro que varía entre 0,2 y 1,5 µm, capaz de replicar en vacuolas citoplasmáticas de las células hospederas y posee una doble membrana: una interna citoplasmática y otra externa ondulada (Fryer *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1992; Rojas *et al.*, 2008). Además, desde el punto de vista del cultivo *in vitro* posee características de una bacteria intracelular facultativa (Vera *et al.*, 2012).

La enfermedad cursa con signos bien descritos en la literatura, sin embargo la mayoría no son específicos para la piscirickettsiosis (Fryer y Lannan, 1996). Los peces infectados por lo general cursan con letargia, anorexia, oscurecimiento de la piel, alteración del nado y con frecuencia se encuentran en la superficie del agua. La primera evidencia de la enfermedad es la aparición de lesiones externas en piel tipo petequias y equimosis, comúnmente ubicadas en la base de las aletas, además de pequeñas máculas blancas que pueden progresar a úlceras hemorrágicas de hasta 2 cm de diámetro. Junto a estas lesiones, la presencia de branquias pálidas es otro signo consistente con la enfermedad (Fryer *et al.*, 1992; Cvitanich *et al.*, 1991; Fryer y Hedrick, 2003). A pesar de la descripción de estas lesiones externas, ocasionalmente se encuentran peces muertos por piscirickettsiosis sin signos externos evidentes (Toranzo *et al.*, 2005; Fryer y Hedrick, 2003; Almendras y Fuentealba, 1997). En cuanto a las lesiones internas, las más consistentes con la enfermedad son la hepato, reno y esplenomegalia, siendo característica de esta enfermedad la presencia de nódulos subcapsulares cremoso amarillentos en hígado, en cerca del 20% de los casos (Cvitanich *et al.*, 1991). Además, se describe la presencia de ascitis, palidez generalizada, hemorragias petequiales y equimóticas en intestinos, ciegos pilóricos y vejiga natatoria (Almendras y Fuentealba, 1997; Larenas *et al.*, 1995; Cvitanich *et al.*, 1991; Fryer y Lannan, 1996) además de la presencia de un líquido mucoso amarillento a nivel intestinal (Larenas *et al.*, 1997).

Según el PSEVC-P, las técnicas utilizadas actualmente en Chile para la confirmación diagnóstica de la piscirickettsiosis son la Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT) y la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), y las muestras a utilizar según este programa y la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) (OIE, 2006) para el diagnóstico de la

enfermedad son las de hígado, riñón y cerebro. La técnica de PCR anidada desarrollada por Mauel y colaboradores (1996), y que fue adoptada por la OIE para el diagnóstico de la piscirickettsiosis, utiliza partidores diseñados para detectar 5 cepas de *P. salmonis* existentes y ha demostrado ser una técnica rápida, sensitiva y específica, la cual determina como positivo muestras de ADN amplificado de 467 pares de bases (pb). Actualmente esta técnica es parte de los programas de control y prevención de la enfermedad y ha sido de gran ayuda a la hora de tratar de definir la distribución geográfica de *P. salmonis*, sus reservorios, hospederos naturales así como también su modelo de transmisión.

Todavía existen muchos aspectos relevantes sobre el ciclo de vida, virulencia y patogénesis de *P. salmonis* que son pobremente comprendidos, los cuales deben ser investigados antes de poder diseñar adecuadamente procedimientos profilácticos. El desarrollo de estrategias efectivas de control para esta enfermedad se limitan al poco conocimiento que se tiene de la biología, crecimiento intracelular, virulencia y transmisión del patógeno (Rozas y Enríquez, 2014).

En cuanto a la transmisión de *P. salmonis*, aún existen ciertas conjeturas de cómo se propaga esta bacteria bajo condiciones naturales (Rozas y Enríquez, 2014). Lo que respecta al ingreso de la bacteria a los peces, Smith y colaboradores (1999) indican que *P. salmonis*, en condiciones experimentales en agua dulce, es capaz de penetrar branquias y piel intacta de truchas, y que la vía oral es poco relevante en la transmisión. Sin embargo, otros autores sostienen que la vía oral es relevante como ruta de ingreso de esta bacteria, dado que existen brotes naturales de piscirickettsiosis pocas semanas luego del ingreso de los *smolt* al mar, donde éstos, como mecanismo osmoregulatorio, absorben grandes cantidades de agua, la cual podría estar potencialmente infestada con *P. salmonis* (Almendras y Fuentealba, 1997).

En cuanto a la transmisión vertical, en 1994 se reportó un caso en salmónes coho donde se identificó a *P. salmonis* en cerca del 100% de alevines provenientes de reproductores positivos a esta bacteria. Desde entonces algunas empresas realizan *screening* de reproductores para evitar la transmisión congénita de la piscirickettsiosis (Almendras y Fuentealba, 1997). En estudios posteriores, Larenas y colaboradores (2005) determinaron la presencia de *P. salmonis* en la progenie de reproductores inoculados con la bacteria,

corroborando la existencia de transmisión vertical. Sin embargo, este estudio indica que la progenie infectada con la bacteria no presentaría signología asociada a la enfermedad.

La transmisión horizontal directa ha sido demostrada experimentalmente tanto en agua de mar como en agua dulce, y en ausencia de vectores (Cvitanich *et al.*, 1991; Almendras y Fuentealba, 1997). Además, se demostró que mientras mayor es la densidad de cultivo, existe mayor probabilidad de contagio (Larenas *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha establecido que la transmisión horizontal es más relevante en el mar dada la mayor supervivencia que tiene *P. salmonis* en esas condiciones. Al respecto, Lannan y Fryer (1994) determinaron que el periodo de supervivencia en mar es mayor a medida que baja la temperatura dado que, en condiciones experimentales, *P. salmonis* sobrevivió 21 días a 10°C, 14 días a 15°C y 7 días a 20°C en agua de mar y se inactivó rápidamente en condiciones de agua dulce. A pesar de la existencia de este tipo de estudios, el modo por el cual los peces infectados con la bacteria eliminan ésta al medio marino aún se desconoce.

El hallazgo de lesiones histopatológicas y la presencia de *P. salmonis* en intestino conducen a la hipótesis de que la bacteria es liberada a través de las heces. Al respecto, Cvitanich y colaboradores (1991), reportaron la existencia de una abundante cantidad de bacterias en las células hepáticas y del intestino de salmón coho, sugiriendo que la bacteria podría estar siendo eliminada a través de las heces y sobrevivir por largo tiempo para infectar otros peces en el medio marino.

Larenas y colaboradores (1997) también sugieren este modo de transmisión dado que, en un estudio donde inocularon la bacteria a truchas arcoíris, encontraron abundante fluido cremoso amarillento a nivel intestinal en el cual se demostró, por medio de IFAT, que contenía gran cantidad de microorganismos, sin especificar si se detectó *P. salmonis* en sí. Ese mismo año, en un estudio realizado por Salinas (1998) se demostró, también a través de IFAT, la presencia de *P. salmonis* en heces, orina y bilis de truchas arco iris mantenidas en agua dulce y experimentalmente infectadas, tanto en peces aparentemente sanos como en moribundos. Esta eliminación fue mayor en peces con signología clínica asociada a la enfermedad y un mayor porcentaje de peces clínicamente sanos fue positivo en la medida que avanzaban los días post-inoculación.

Años más tarde se determinó, mediante IFAT, la presencia de la bacteria en heces de alevines de salmón coho provenientes de reproductores positivos a *P. salmonis* (Larenas *et al.*, 2005). En este último trabajo no hubo una adecuada correlación entre la presencia del agente en riñón y heces, dado que no todos los individuos que tenían la bacteria en riñón eran positivos a la bacteria en heces y viceversa. Con esta información se podría extrapolar que, a pesar de que una muestra de riñón (o hígado y cerebro) que se utiliza para el diagnóstico temprano de la enfermedad sea negativa, *P. salmonis* podría estar presente en otro sistema del organismo y diseminándose a través de las heces sin que se esté llevando a cabo una pronta detección y un tratamiento rápido y oportuno.

Dada la existencia de información que sugiere una transmisión horizontal de esta bacteria a través del contenido fecal y en condiciones experimentales en agua dulce, el presente proyecto de memoria de título buscó determinar, por medio de la técnica de PCR anidada, la presencia de *P. salmonis* en heces y estableció la existencia de una asociación estadística entre la presencia de la bacteria en hígado y riñón, con su presencia en el contenido fecal de truchas arcoíris cultivadas en centros de engorda ubicados en la región de Los Lagos y de Aysen del General Carlos Ibáñez del Campo, los cuales al momento del muestreo estaban catalogados como centros en alerta de acuerdo al PSEVC-P de SERNAPESCA

## **HIPÓTESIS**

Existe asociación entre la presencia de *P. salmonis* en heces, hígado y riñón de truchas arcoíris afectadas por la enfermedad de manera natural.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia y asociación de *P. salmonis* en heces, hígado y riñón de trucha arcoíris (*O. mykiss*) en centros de cultivo en mar asociado a brotes de piscirickettsiosis

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar mediante PCR la presencia de *P. salmonis* en muestras hígado y riñón de peces afectados por la enfermedad
2. Detectar mediante PCR la presencia de *P. salmonis* en heces de peces con signos clínicos de piscirickettsiosis
3. Establecer si existe una asociación entre la presencia de *P. salmonis* en hígado, riñón y heces.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1) Marco geográfico de trabajo:

Las muestras provinieron de 2 empresas distintas y fueron tomadas en un centro de cultivo de trucha arcoíris de cada una de éstas. Los centros se encuentran ubicados, uno en la región De los Lagos (X) y otro en la región de Aysen del General Carlos Ibáñez del Campo (XI). Una vez obtenidas las muestras, éstas fueron transportadas y mantenidas en refrigeración hasta el momento de la extracción de ADN, proceso que se llevó a cabo en Santiago, en el Laboratorio Nacional de Referencia Para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas de la FAVET de la Universidad de Chile.

### 2) Obtención de peces objetivo:

En el centro de la X región se obtuvieron peces provenientes de la mortalidad diaria del centro de cultivo. El criterio de elección para estos peces fue la presencia de lesiones externas sugerentes de piscirickettsiosis las cuales han sido descritas con anterioridad. Los tubos crioviales en los que se conservaron las muestras de este centro fueron marcados con la sigla “S1”, sumado al número ordinal del pez y la sigla del sustrato muestreado (Heces = Hc, Hígado = H, Riñón = R).

Del centro ubicado en la XI región se extrajeron, desde distintas balsas-jaula, 37 peces orillados con evidentes lesiones externas papulares y ulcerativas, los cuales fueron retirados con quechas y se eutanasiaron con una sobredosis de benzocaína (Bz-20®. Benzocaína 20% - Veterquímica). La solución de inmersión para la eutanasia fue de 100 ml de Bz-20® en 100 litros de agua de mar, según lo establecido por la American Veterinary Medical Association en su reporte del año 2013 (Leary *et al.*, 2013). Los tubos crioviales en los que se mantuvieron las muestras de este centro fueron marcados con la sigla “S2”, sumado también al número ordinal del pez y la sigla del sustrato muestreado de cada uno.

### 3) Obtención de las muestras:

Se trabajó en un mesón para necropsias dispuesto en cada centro. Se dispuso de 4 contenedores con cloro al 3% para desinfección continua de tijeras mayo, pinza diente de ratón y mango de bisturí, uno con instrumental exclusivo para acceder a cavidad peritoneal del pez, otro para la toma de muestra de heces, otro para la de riñón y otro para la de hígado, enumerados con las siglas N, HC, R y H respectivamente. Los materiales

utilizados, el mesón de trabajo del muestreo y la disposición de cada pez en el mesón para la necropsia pueden verse en el Figura Nro. 1.

La primera muestra a tomar en cada pez fue la de heces, realizando una evacuación manual del contenido fecal del pez previa a la realización de la necropsia en sí. Una vez exteriorizada una pequeña cantidad de heces, ésta fue tomada con una pinza del contenedor “HC” y guardada en un tubo criovial de 2 ml que contenía 1,5 ml de etanol al 70%. Posteriormente se llevó a cabo la necropsia con el bisturí del contenedor “N”, realizando un corte longitudinal en la línea ventral de cada pez, desde el punto medio entre las aletas pectorales hasta unos 2 cm laterales al orificio anal. Manteniendo el pez de cúbito dorsal se removió la vejiga natatoria y se dejó a la vista el riñón posterior. Se hizo cambio de guantes y de instrumental, y con un bisturí del contenedor “R” se realizó la incisión de una pequeña porción de riñón posterior, para luego tomar el trozo con una pinza y guardarlo en un tubo criovial también con etanol al 70%. Se realizó cambio de guantes e instrumental nuevamente para tomar la muestra de hígado, utilizando la tijera mayo del contenedor “H” y extrayendo un pequeño trozo del borde ventral del hígado, el cual, con ayuda de la pinza del mismo contenedor, es guardado también en un tubo criovial con etanol 70%.

Se realizó una limpieza y desinfección continua de materiales, quitando residuos de tejidos en las tijeras y bisturí para luego dejarlos en los contenedores con cloro al 3%. Las hojas de bisturí se fueron cambiando entre cada pez y se disminuyó al máximo la manipulación del resto de órganos comprendidos en la cavidad peritoneal así como de las muestras, con el fin de evitar una posible contaminación cruzada de éstas. En cuanto a los controles negativos se utilizó riñón de bovino en el centro de la X región y hamburguesa de pollo cruda en el centro de la XI región como sustratos negativos a *P. salmonis*. Se tomaron 3 muestras de controles negativos, una al inicio del muestreo, otra a la mitad del muestreo, y otra al final en ambos centros de cultivo. Siguiendo el protocolo para cada pez muestreado, se dejó un control negativo sobre el mesón de necropsias y se tomó un pequeño trozo de éste para guardarlo en un tubo criovial también con etanol 70%.

**A. Materiales utilizados para el muestreo de órganos y heces.** Cada tubo criovial contenía 1,5 ml de etanol al 70%. Después del muestreo de cada pez se limpió el mesón y se desinfectó con cloro 3%. Cada control negativo del muestreo se dispuso sobre una bolsa en el mesón al igual que el resto de los peces muestreados.

<b>A. Materiales para el muestreo</b>	
	4 Mangos bisturí n°3
	Caja hojas de bisturí n°10
	4 Pinzas de disección
	1 Caja de guantes desechables
	75 tubos crioviales de 2 ml con etanol 70%
	Bolsas de basura 90x120
	4 Recipientes con cloro al 3%
	Atomizador con cloro al 3%
	Hamburguesa y riñón de bovino (controles negativos de muestreo)
	Trozos de paño para limpieza de instrumental

**B. Mesón de trabajo del muestreo.** Se utilizan 4 set de instrumental, uno para la necropsia y los otros 3 para la toma de muestras. Cada “set”, una vez utilizado, fue limpiado y mantenido en contenedores individualizados con cloro al 3%. Se realizó cambio de guantes entre cada muestra extraída.



**C. Posicionamiento de un pez en el mesón de necropsia.** Se aprecian lesiones papulares y ulcerativas en región abdominal. Cada pez fue colocado sobre una bolsa de basura diferente a fin de evitar contaminación cruzada. Se anotaron las lesiones externas de cada pez caracterizándolas en presencia e intensidad.



**Figura Nro. 1:** Materiales de toma de muestras, lugar de trabajo y necropsia.

Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta llegar al laboratorio y una vez arribados los tubos, las muestras de tejido, heces y controles fueron mantenidas en congelación hasta su procesamiento.

#### **4) Procesamiento de las muestras**

Las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción de ADN con un “kit” comercial, y se realizó la lectura del ADN de alguna de ellas mediante espectrofotometría. Posteriormente se llevó a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCRa) descrita por Mauel y colaboradores (1996) para el diagnóstico de laboratorio de la piscirickettsiosis con modificaciones menores. Finalmente los productos de cada amplificación fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa.

##### **a.- Aislamiento de material genético.**

Para aislar el ADN genómico de cada una de las muestras de heces, hígado, riñón y controles negativos se utilizó el “kit” de extracción Wizard® (Promega). Los materiales utilizados en el proceso de extracción de ADN genómico se encuentran enumerados en la Tabla Nro. 1. Se realizó este procedimiento siguiendo las indicaciones del fabricante para la extracción de ADN desde tejido animal.

##### **b.- Generalidades de la técnica PCRa**

Todo procesamiento de muestras, previo al uso del termociclador, fue llevado a cabo al interior de una campana de bioseguridad (BIOBASE, modelo 11231 BBC 86). Los materiales utilizados en el PCRa se encuentran en la Tabla Nro. 1. Para la preparación de la mezcla de PCRa (MP), en un tubo Eppendorf de 2 ml, y por cada muestra a procesar (ADN extraído y controles positivos y negativos de la técnica), se colocaron 6,5 µl de agua libre de nucleasas, 12,5 µl de enzima (GoTaq Colorless Mastermix) y 2,5 µl de cada uno de los partidores (Eub-A y Eub-B en la primera amplificación; PS2S y PS2AS en la segunda amplificación). Como control negativo de la técnica se utilizó agua libre de nucleasas y como control positivo un extracto de ADN de *P. salmonis* (cepa LF-89) proveniente de cultivo celular (línea CHSE-214, embrión de salmon chinook).

Los partidores Eub-B y Eub-A, cuyas secuencias son 5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3' y 5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAN-CCR-CA-3' respectivamente, corresponden

a partidores universales de ADNr 16S bacteriano, mientras que los partidores PS2S y PS2AS, cuyas secuencias son 5'-CTA-GGA-GAT-GAG-CCC-GCGTTG-3' y 5'-GCT-ACACCT-GAA-ATT-CCA-CTT-3' respectivamente, son partidores diseñados a partir de la secuencia del ADNr 16S de 5 cepas de *P. salmonis* (LF-89, EM-90, ATL-4-91, NOR-92, SGLO-94).

Los constituyentes de la MP fueron retirados de congelación y llevados a la campana de bioseguridad. Una vez constituida la mezcla de PCRa, éstos fueron devueltos a congelación. Se utilizaron microtubos de 0,2 ml marcados con las siglas correspondientes a las muestras de ADN y controles del PCRa. A cada uno se le colocaron 24 µl de la MP más 1 µl de cada muestra, ya sea control de la técnica (positivo y negativo), muestra de ADN extraído (en el caso de la primera amplificación), o muestra de ADN amplificado (en el caso de la segunda amplificación). Cada solución compuesta por la mezcla de PCRa y ADN fue centrifugada durante 20 segundos a 30 rpm en una microcentrífuga *Capp Rondo CR68X*, previo al inicio de los ciclos en cada una de las amplificaciones.

En cuanto a la primera amplificación, ésta se llevó a cabo en un termociclador *PCR Touch 960* (Fermelo) y correspondió a una desnaturalización a 94°C durante 2 minutos previo al inicio de 35 ciclos de PCR, estando cada ciclo constituido por 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 2 minutos de hibridación a 60°C y 3 minutos de extensión a 72°C. La segunda amplificación se llevó a cabo con el mismo número de ciclos y en las mismas condiciones, con la excepción de que la temperatura de hibridación fue de 65°C en cada uno de los ciclos. Una vez logrados los productos del PCRa, éstos fueron mantenidos en refrigeración hasta el momento de la electroforesis sin pasar de 24 horas.

### **c.- Electroforesis**

Para las muestras de ADN amplificado se realizaron electroforesis en gel TBE (Tris, Borato y EDTA) de agarosa al 2%. Se midieron 100 ml de solución buffer TBE 1X (Fermelo) y se mezclaron con 2 gr de *Agar 1,5 Lafken* (Fermelo). Se llevó la mezcla a un microondas y se colocó a alta temperatura hasta ver que la solución comenzara a burbujear. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y cuando la solución de agarosa bajó la temperatura a 65°C se agregaron 10 µl de la tinción GelRed (Biotium) la cual es una tinción fluorescente de geles que reemplaza al bromuro de etidio. Se dejó enfriar la solución de agarosa un poco más

para luego moldear el gel. Para la visualización de los productos del PCRa, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Maestrogen). Se utilizaron 2 µl del marcador más 2 µl de Orange/Blue (Promega), el cual es un colorante de carga para depositar el marcador de peso molecular en uno de los bolsillos del gel. El resto de los bolsillos fue llenado con 2 µl de Blue/Orange y 5 µl de ADN amplificado diluido 1:5 en buffer TBE 1X.

**Tabla Nro. 1:** Materiales utilizados en cada etapa del procesamiento de las muestras. Extracción de ADN, Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada.

Extracción de ADN	Reacción en Cadena de la Polimerasa
“Kit” de extracción Wizard (Promega)	Termociclador PCR Touch 960 de Fermo
2 micropipetas de 2 a 20 µl y de 20 a 1000µl	Campana de bioseguridad
Puntas de micropipeta (200 µl) y (1000 µl)	Microcentrífuga (Capp Rondo – CR68X)
Centrífuga “Centrifuge 5403” (Eppendorf)	Enzima Taq Polimerasa (Promega GoTaq Colorless Mastermix)
Gradillas	Partidores Eub-B y Eub-A (primera amplificación)
Contenedor de hielo	Partidores PS2S y PS2AS (segunda amplificación)
Papel absorbente	2 micropipetas de 1 a 20 µl y de 20 a 1000 µl
Tubos Eppendorf de 1,5 ml	Agua libre de nucleasas
Tijeras y pinzas	Microtubos de 0,2 ml
Cloro 3%	Puntas de micropipeta (200 µl) y (1000 µl)
Pistilos para homogenización	Tubos Eppendorf de 2 ml

Se corrieron las electroforesis durante 90 minutos a una potencia de 70 volts utilizando una fuente de poder *Voltronic* (Nyxtechnik). Para la visualización de las bandas de ADN se utilizó un transiluminador *UV WiseUV* (WUV-L10 – Wisd) y se obtuvieron fotografías de los geles.

A las muestras de heces y tejido que fueron negativas a *P. salmonis* se les cuantificó el ADN extraído mediante espectrofotometría con un espectrofotómetro Epoch (Biotek).

## RESULTADOS

### 1) Toma de muestras:

Se lograron obtener 24 peces entre los dos centros donde se realizaron los muestreos. El número total fue de 78 muestras, las cuales comprenden 24 de heces, 24 de riñón y 24 de hígado además de 6 controles negativos (hamburguesa y riñón de bovino). Específicamente se obtuvieron 15 muestras correspondientes a hígado, riñón y heces de 4 peces y 3 controles negativos (de riñón de vacuno) desde el centro de la X región, y 63 muestras del centro de la XI región, las cuales correspondieron a 60 de hígado, riñón y heces de 20 peces, además de 3 controles negativos (hamburguesa de pollo cruda).

Previo al retiro de peces orillados desde las balsas-jaula, se pudo apreciar gran cantidad de peces con lesiones descritas para la piscirickettsiosis, tanto en peces moribundos nadando, así como también en peces extraídos como mortalidad diaria (ver Anexo 1). Durante la necropsia de los peces se pudo ver lesiones externas asociadas a la enfermedad las cuales se encuentran descritas en presencia e intensidad en la Tabla Nro. 2.

De los 37 peces orillados extraídos en el centro de la XI región, 17 presentaban diversos grados de ascitis a la necropsia por lo que fueron descartados para la toma de muestras. En cuanto a las muestras de heces, en 4 ocasiones no se logró la evacuación manual del contenido fecal por lo que posterior al muestreo del riñón e hígado, se ingresó al lumen intestinal con el bisturí del contenedor “HC” para tomar la muestra de heces directamente. De los 20 peces muestreados en este centro, sólo se pudo obtener muestras de heces con cierto grado de contextura sólida en 7 peces, el resto de las muestras de heces de los 13 peces restantes correspondieron al líquido intestinal de aspecto mucoso amarillento que se describe en la literatura para cuadros de piscirickettsiosis (Larenas *et al.*, 1997). En cuanto al centro de la X región, los 4 peces muestreados presentaban heces de contextura líquida viscosa.

### 2) Extracción de ADN:

Mediante el uso de un “kit” comercial de extracción de ADN (Wizard ®, Promega) se extrajo el ADN de las 72 muestras de los peces y de los 6 controles negativos.

### 3) PCR anidado:

Ambas amplificaciones de la técnica, una primera con partidores generales para eubacterias y una segunda con partidores específicos para cepas de *P. salmonis*, permitieron determinar la presencia de la bacteria en diversas muestras tanto de heces como de riñón e hígado. Los controles negativos del muestreo no evidenciaron presencia de *P. salmonis* con el PCRa.

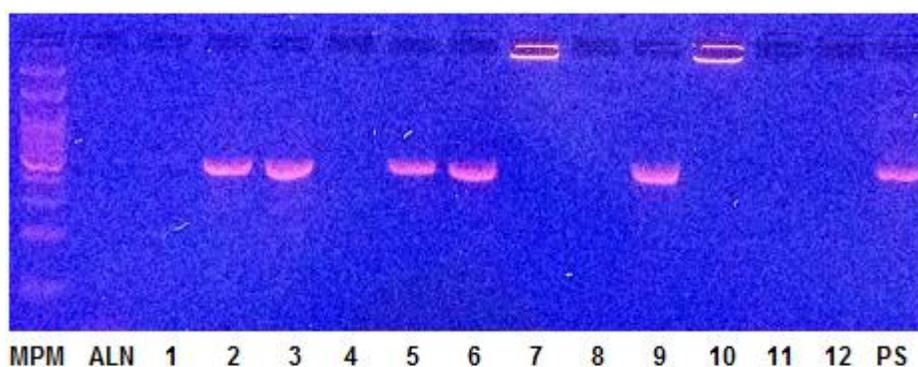
**Tabla Nro. 2:** Intensidad de lesiones externas en peces orillados extraídos en el centro ubicado en la XI región.

Hallazgo de lesiones externas						
Nº Pez	Úlc	Páp	EU	EB	CM	HP
S2-1	++					++
S2-2	+++		+			
S2-3	++					
S2-4		++				++
S2-5	+	++		+		
S2-6		+++	+			
S2-7	+++	++		+		++
S2-8	++					+++
S2-9	++	++				
S2-10	+	+++	+			
S2-11	++			+		
S2-12	+++					++
S2-13	+	++				
S2-14	++					+
S2-15	+++					
S2-16	++					+++
S2-17		+++	+		+	
S2-18	+	++				++
S2-19	++					
S2-20	++		+			+++

Las lesiones fueron anotadas una vez colocados los peces en el mesón de necropsias. (+): Al menos una lesión o foco. (++): Entre 2 y 5 lesiones o focos. (+++): Más de 5 lesiones o focos. (ULC): Úlcera. (PAP): Pápula. (EU): Exoftalmia unilateral. (EB): Exoftalmia bilateral. (CM): Caverna muscular. (HP): Hemorragia petequiral en base de aletas.

La mayoría de las muestras de riñón e hígado presentaron una banda en gel de agarosa cercana a los 467 pb indicando, según Mauel y colaboradores (1996), positividad a la

bacteria (83,3% y 75% respectivamente) mientras que las muestras de heces, en una primera instancia, presentaron positividad en un 29,2%. Sin embargo, las muestras de ADN amplificado provenientes de 11 muestras de heces no presentaron un avance en los geles de agarosa quedándose en los bolsillos de éstos, como se aprecia en la Figura Nro. 2, donde dos muestras de heces aparecen negativas y otras dos muestras no avanzaron por el gel. Se volvió a extraer ADN de las 11 muestras de heces realizando centrifugaciones a 14.000 g de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se obtuvo una positividad a *P. salmonis* en el 70,8% de las muestras (Figura Nro. 3). Los resultados finales de presencia o ausencia del agente en las muestras de heces, riñón e hígado de cada pez se muestran en la Tabla Nro. 3. Aquellas muestras negativas mostraron cantidades ADN (ng/μl) suficiente para el desarrollo de la técnica de PCR con un grado de pureza, de acuerdo a la relación de absorbancia 260/280, entre 1,8 y 2.



**Figura Nro. 2:** Electroforesis en gel TBE de agarosa al 2% de muestras de heces, riñón e hígado de 4 peces. (MPM) = Marcador de peso molecular de 100 pb. (ALN) = Control negativo: agua libre de ARNasa. (1, 4, 7 y 10) = Muestras de heces. (2, 5, 8, 11) = Muestras de riñón. (3, 6, 9 y 12) = Muestras de hígado. (PS) = Control positivo: ADN de *P. salmonis* de cultivo celular. La banda más brillante del marcador indica 500 pb.

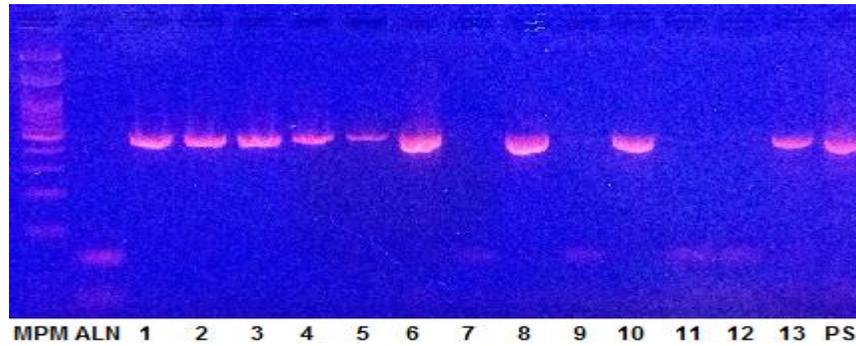
De los 24 peces muestreados, 10 fueron positivos a la bacteria en heces, hígado y riñón a la vez. En tanto 4 peces muestran ausencia de *P. salmonis* en heces y presencia de ésta en riñón e hígado mientras que sólo 1 pez es positivo a la bacteria en el contenido fecal y negativo en ambos órganos. En cuanto a la relación heces-riñón, 12 peces fueron positivos a *P. salmonis* en ambas muestras mientras que sólo en uno la bacteria estuvo ausente en ambos sustratos. En 8 peces se detectó ADN de la bacteria sólo en riñón y 3 peces

mostraron *P. salmonis* sólo en el contenido fecal. Lo que respecta a la relación heces-hígado, también 12 peces presentaron la bacteria tanto en heces como en hígado, mientras que en 4 peces el agente no se pudo detectar en las dos muestras. En tanto, 5 peces mostraron positividad a *P. salmonis* sin observarse presencia en heces pero si en hígado mientras que en 3 peces sólo se observó la bacteria en el contenido fecal de éstos, estando ausente en tejido hepático. Además, en lo que respecta a la relación riñón-hígado, se puede apreciar que en 14 peces se pudo detectar la bacteria en ambos y sólo uno fue negativo en riñón e hígado. 6 peces presentaron la bacteria sólo en el riñón y 3 sólo en hígado.

**Tabla Nro. 3:** Resultados de presencia/ausencia de *P. salmonis* en muestras de heces, hígado y riñón de los 24 peces muestreados.

N° Pez	HECES	RIÑÓN	HÍGADO
S1-1	1	0	1
S1-2	0	1	0
S1-3	1	1	0
S1-4	1	1	1
S2-1	0	1	1
S2-2	1	1	1
S2-3	1	1	1
S2-4	1	1	1
S2-5	1	1	1
S2-6	1	1	0
S2-7	1	1	1
S2-8	0	1	1
S2-9	0	1	1
S2-10	1	1	1
S2-11	1	1	1
S2-12	0	1	0
S2-13	0	1	0
S2-14	1	1	1
S2-15	0	1	0
S2-16	1	0	1
S2-17	1	1	1
S2-18	0	1	1
S2-19	0	0	1
S2-20	1	0	0

*S1: centro de la X región, S2: centro de la XI región. 1 indica presencia y 0 indica ausencia. No se incluyen los controles negativos del muestreo.*



**Figura Nro. 3:** Electroforesis en gel TBE de agarosa al 2% de muestras de heces. (MPM) = Marcador de peso molecular de 100 pb. (ALN) = Control negativo: agua libre de ARNasa. (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13) = Muestras de heces. (PS) = Control positivo: ADN de *P. salmonis* de cultivo celular. La banda más brillante del marcador indica 500 pb.

#### 4) Análisis estadístico:

La asociación estadística de la presencia de *P. salmonis* en muestras de heces con la presencia de la bacteria en muestras de riñón e hígado, por separado, así como también la asociación entre la presencia de la bacteria tanto en riñón como en hígado, se analizaron, con los resultados mostrados anteriormente, mediante el índice kappa (K), siendo éste un índice de concordancia de variables categóricas, en este caso presencia (1) o ausencia (0).

El valor de kappa calculado, de acuerdo a las indicaciones de Landis y Koch (1997), para la evaluación de concordancia entre la presencia de *P. salmonis* en heces con la presencia de la bacteria en riñón fue  $K = -0,429$  indicando una nula asociación, mientras que el valor de kappa para la concordancia entre la presencia de *P. salmonis* en heces con la presencia de la misma en hígado fue  $K = 0,276$  indicando una débil concordancia de acuerdo a la tabla de Landis y Koch (1997) para los valores calculados de kappa. En cuanto a la relación riñón-hígado, el valor de kappa calculado fue de  $K = -0,0384$  indicando también que no existe ninguna concordancia de la presencia de *P. salmonis* en ambas muestras. Los valores negativos de K que se obtuvieron al evaluar la concordancia de la presencia de la bacteria en heces-riñón e riñón-hígado, indican que la concordancia observada es menor a la concordancia esperada por el azar, lo que significa que la presencia de la bacteria en los sustratos en cuestión se debe al azar, sin existir ningún tipo de asociación entre ambas (Landis y Koch, 1997).

## DISCUSIÓN

La piscirickettsiosis es una enfermedad bacteriana que ha sido capaz de generar altas tasas de mortalidad en centros de cultivo de salmónidos, así como también excesivas pérdidas económicas para la industria del salmón en Chile (Rozas y Enríquez, 2014; Camussetti, 2014). A pesar de lo anterior, esta enfermedad continúa siendo difícil de controlar y se requiere mayor investigación del ciclo de vida del agente etiológico.

La fuente y reservorios de *P. salmonis* en el ambiente natural, así como el modo de transmisión exacto de la bacteria aún se desconocen (Rozas y Enríquez, 2014). Si bien se ha determinado que no existe necesidad de vectores para la transmisión en mar de la bacteria no se ha podido definir con exactitud la existencia de éstos o de reservorios para *P. salmonis*, ni tampoco la fuente de infección en el mar una vez ingresados los peces a éste (Olivares y Marshall, 2010).

Los peces infectados con la bacteria cursan con signología clínica bien descrita en la literatura y que puede ser muy sugerente de la enfermedad. En el presente estudio se logró detectar la presencia de la bacteria en muestras de heces, hígado y riñón de peces seleccionados por presentar signología externa descrita para la enfermedad. Durante el muestreo de las truchas se pudo apreciar, en un gran porcentaje de los peces de las balsas-jaula, una o varias de las lesiones externas descritas por diversos autores. Las lesiones internas descritas por Cvitanich y colaboradores (1991), Fryer y Hedrick (2003), Almendras y Fuentealba (1997), Larenas y colaboradores (1995) y Fryer y Lannan (1996) se condicen con los hallazgos anatómo-patológicos encontrados durante la necropsia de los peces de este trabajo (datos no recopilados).

Actualmente existen métodos diagnósticos presuntivos de la presencia de *P. salmonis* en un centro de cultivo como lo son los cortes histológicos o improntas de tejido (Fryer *et al.*, 1990, Larenas *et al.*, 1995), las técnicas inmunológicas como el IFAT (Lannan *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1996) o técnicas moleculares como el PCR convencional, PCR anidado (Mauel *et al.*, 1996) o PCR tiempo real (Karatat *et al.*, 2008). La técnica de PCR anidado utilizada en esta investigación permitió probar la existencia de *P. salmonis* en el contenido fecal del 70,8% de truchas afectadas por la enfermedad de manera natural en condiciones de cultivo en mar. Dado que esta investigación ha sido la primera en la que se ha detectado

la presencia de *P. salmonis* en el contenido fecal de truchas provenientes de centros de cultivo en mar, los cuales presentaban un estado avanzado de enfermedad (ambos centros clasificados como centros en alerta de acuerdo al PSEVC-P de SERNAPESCA), la técnica de PCRa no ha sido utilizada para detección de la bacteria en heces de truchas provenientes de centros de engorda en estados iniciales de un brote. Mauel y colaboradores (1996) indican que la técnica de PCRa incrementa la sensibilidad del PCR convencional desde 60 DICT<sub>50</sub> (Dosis infectiva media en cultivo de tejido) a 1 DICT<sub>50</sub>, lo que permitiría detectar la bacteria en los inicios de un brote de piscirickettsiosis, donde la cantidad de *P. salmonis* en el contenido fecal de peces en etapas tempranas de infección podría suponerse que es baja.

Al respecto, durante el muestreo de heces del total de las truchas del centro de la XI región, se pudo apreciar que el aspecto y consistencia de la mayoría de las muestras de heces eran de un líquido mucoso amarillento, tal como describe Larenas y colaboradores (1997) en truchas de 30 g inoculadas con la bacteria y mantenidas en condiciones experimentales de agua dulce. La detección de este líquido mucoso se pudo apreciar, en aquel estudio, a los 35 días post inoculación. Esta consistencia mucosa de las heces se presenta en un muy bajo porcentaje de peces provenientes de un centro en mar con principios de brote de piscirickettsiosis (apreciación personal), donde las heces mantienen el aspecto típico cilíndrico de color café-mostaza de consistencia más sólida. A pesar de que la técnica de PCRa de Mauel y colaboradores (1996) resultó ser útil para detectar material genético de la bacteria en las heces de las truchas muestreadas, no se ha realizado el estudio con heces de aspecto normal de truchas en estados iniciales de brotes de la enfermedad.

Los resultados de esta investigación respaldarían los hallazgos encontrados en un par de estudios realizados en condiciones experimentales en agua dulce, donde se ha podido detectar *P. salmonis* en muestras de heces provenientes de alevines de trucha arcoíris (Salinas, 1998; Larenas *et al.*, 2005). Durante su investigación, Salinas (1998) inoculó intraperitonealmente la bacteria a 50 alevines de trucha arcoíris, y al día 13 post inoculación, se determinó, a través de IFAT, la positividad a *P. salmonis* en el 32% de las muestras de heces obtenidas de los peces y en un 20% de las muestras de bilis y orina de los mismos peces. Sin embargo, los resultados no indicarían si los peces positivos a *P. salmonis* en heces eran también positivos a la bacteria en bilis u orina. En tanto, Larenas y

colaboradores (2005) buscaron detectar la bacteria en heces de 100 alevines de 5 g provenientes de la cruce de reproductores los cuales presentaban una prevalencia mediante frotis renal para IFAT del 21,5%. Se tomaron frotis de riñón y heces para IFAT, siendo positivas en un 12% y 11% respectivamente, habiendo sólo un pez positivo en ambas muestras, lo que denota la casi nula correlación de la presencia de la bacteria en heces con su presencia en el riñón. Los resultados obtenidos por Larenas y colaboradores (2005) se respaldan con los obtenidos en este estudio al determinarse, mediante PCRa, que no existe ningún grado de asociación entre la presencia de *P. salmonis* en heces y la presencia de la bacteria en riñón (índice Kappa negativo). Por otro lado se pudo establecer que existe asociación estadística, aunque débil, entre la presencia de la bacteria en heces con la presencia de la misma en hígado (Kappa = 0,26), lo que podría indicar que peces positivos a *P. salmonis* en muestras de hígado podrían estar eliminando la bacteria vía contenido fecal infectando otros peces, a diferencia de lo que ocurre con la relación heces-riñón donde la asociación se debe únicamente al azar, sin poder afirmar que peces positivos a la bacteria en riñón estén infestando el medio marino vía excreción fecal de *P. salmonis*.

El hecho de que se pudo determinar que en 3 peces se detectó la bacteria en heces y no en riñón, y en otros 3 en heces y no en hígado, además de 1 pez donde sólo se presentó en heces y no en los órganos, hace pensar que la bacteria podría tener predilección por otro sistema u órgano que no necesariamente son los tejidos que se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad los cuales son, de acuerdo al PSEVC-P, hígado, riñón y cerebro. Al respecto, Solis y colaboradores (2002) compararon la presencia de *P. salmonis*, por medio de IFAT, en frotis de riñón y fluido seminal o celómico de reproductores, machos y hembras, de 3 especies de salmónidos (salmón coho, trucha arcoíris y salmón del Atlántico). Los hallazgos encontrados para trucha arcoíris revelaron que no se detectó la bacteria en muestras de frotis renal pero sí en muestras de fluido seminal y celómico, sin existir diferencias entre ambos sexos, lo que se contrasta con los resultados obtenidos en este estudio donde, mediante la técnica de PCRa, las muestras de riñón fueron las que tuvieron mayor prevalencia de *P. salmonis* (83,3%). En contraste, en aquel estudio, el salmón del Atlántico presentó positividad a *P. salmonis* sólo en muestras de frotis renal y no en fluido seminal ni celómico, indicando diferencias por especie (salmón coho presentó positividad en ambos, pero mayormente en frotis renal). El presente trabajo no contemplo

toma de muestras desde reproductores sino de truchas inmaduras en crecimiento cercanas a los 2,5 kg, lo que podría sugerir que la predilección de la bacteria por los tejidos variaría entre etapas del ciclo de vida de las truchas.

Si bien se determinó la presencia de *P. salmonis* en heces de trucha arcoíris, el modo por el cual la bacteria contaminaría el material fecal en el tracto gastrointestinal de los peces infectados es incierto. La presencia de la bacteria en el intestino podría deberse al ingreso de ésta vía oral o por ingreso al tracto digestivo durante la infección sistémica. Existen algunas bacterias que afectan a salmónidos y no salmónidos que son capaces de sobrevivir las condiciones adversas del estómago, y una vez que pasan al intestino crecen con facilidad en éste (Shannon *et al.*, 1996), como lo es el caso de *Vibrio anguillarum*, el agente causal de la vibriosis clásica en salmónidos alrededor del mundo, el cual es capaz de sobrevivir por horas el ambiente ácido del estómago, proliferar en intestino y salir intacto al medio a través de las heces (Olsson *et al.*, 1998). Sin embargo no se conoce como *P. salmonis* podría interactuar con el bajo pH y las enzimas digestivas a nivel estomacal de los salmónidos. Al respecto, Smith y colaboradores (1999) lograron reproducir la enfermedad en un grupo de truchas arcoíris de 12 g vía intubación gástrica logrando una mortalidad del 2% pero sin lograr detectar la bacteria en el epitelio estomacal en cortes seriados para frotis, lo que haría pensar que *P. salmonis* es incapaz de ingresar al intestino utilizando la ruta oral. Sin embargo estos resultados no son concluyentes, y se podría pensar que la bacteria sólo logra llegar a intestino vía infección sistémica en estados avanzados de enfermedad donde produciría el líquido de aspecto mucoso en intestino, recalándose la relevancia de detectar *P. salmonis* en heces de aspecto normal de truchas provenientes de centros en estados iniciales de brote.

Shannon y colaboradores (1996) lograron establecer que el mecanismo de propagación de *Renibacterium salmoninarum*, agente causal de la enfermedad bacteriana del riñón en los salmónidos de cultivo, es la ruta oro-fecal. En el estudio lograron detectar la bacteria en el contenido fecal de truchas arcoíris mantenidas en balsas-jaula en el mar, naturalmente infectadas, así como también fueron capaces de determinar la presencia de *R. salmoninarum* en muestras de agua proveniente de la superficie del mar comprendida dentro de una balsa-jaula que contenía salmónes chinook con la enfermedad. La detección

de la bacteria, tanto en heces como en la superficie del agua, se llevó a cabo a través de cultivo celular con IFAT, determinándose así que la bacteria es capaz de propagarse por medio de las heces y estar íntegra y viable para infectar otros peces susceptibles.

La técnica de PCRa ha mostrado ser rápida y de alta sensibilidad y especificidad para detectar *P. salmonis* en las muestras de contenido fecal, sin embargo, ésta no nos permite asegurar a ciencia cierta que la bacteria podría excretarse vía heces e infectar otros peces. Esto dado a que la técnica en sí detecta material genético de la bacteria, sin permitirnos confirmar que se encuentra viva e íntegra para sobrevivir en el medio marino y continuar su ciclo de vida en otros salmónidos susceptibles.

Hoy en día es posible determinar la presencia de *P. salmonis* en muestras de tejido por medio de cultivo celular en agar sangre enriquecido con cisteína (Mikalsen *et al.*, 2008; Mauel *et al.*, 2008) o en sales de hierro (Vera *et al.*, 2012). Sin embargo, la detección de *P. salmonis* utilizando el cultivo celular como método diagnóstico no se ha realizado, hasta el día de hoy, en muestras de heces provenientes de salmónidos cultivados en condiciones naturales en el mar.

## CONCLUSIONES

*P. salmonis* puede ser detectada, mediante PCRa, en heces de truchas arcoíris cultivadas en mar y se requieren mayores estudios para establecer la viabilidad de la bacteria en el contenido fecal. Existe un bajo grado de asociación entre la presencia de la bacteria en hígado y su presencia en heces, y no existe ninguna correlación de la presencia de *P. salmonis* en riñón y el contenido fecal de truchas arcoíris.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALMENDRAS, F.; FUENTEALBA, C.** 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. *Dis Aquat Org.* 29: 137-144.

**BRAVO, S.** 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14:137-138

**CAMUSSETTI, M.** 2014. Piscirickettsiosis: Análisis de la investigación, reglamentación, quimioterápicos y vacunas utilizadas en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 41 p

**CVITANICH, J.; GARATE, O.; SMITH, C. E.** 1991. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish. Dis.* 14:121-145

**FRYER, J.; LANNAN, C.; GARCÉS, L.; LARENAS, J.; SMITH, P.** 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol.* 25: 107-114.

**FRYER, J.; LANNAN, C.; GIOVANNONI, S; WOOD, N.** 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov.; sp. nov. the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:120-126.

**FRYER, J.; LANNAN, C.** 1996. Rickettsial infections of fish. *Annual Review of Fish Diseases.* 6: 3-13.

**FRYER, J.; HEDRICK, R.** 2003. *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases.* 26: 251–262

**KARATAS, S.; MIKALSEN, J.; STEINUM, T.; TAKSDAL, T.; BORDEVIK, M.; COLQUHOUN, D.** 2008. Real time PCR detection of *Piscirickettsia salmonis* from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Fish Dis* 31. 747-753

**LANDIS, J.; KOCH, G.** 1997. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33: 159-174

**LANNAN, C.; EWING S.; FRYER J.** 1991. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in chilean salmonids. *J Aquat Anim Health*. 3: 229-234

**LANNAN, C.; FRYER, J.** 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of Fish Diseases*. 17: 545-548.

**LARENAS, J.; HIDALGO, L.; GARCÉS, H.; FRYER, J.; SMITH, P.** 1995. Piscirickettsiosis: Lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Av. Cienc. Vet.* 10: 53-58

**LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J.; GARCÉS, H.; FRYER, J.; SMITH, P.** 1996. Rapid Detection of *Piscirickettsia salmonis* Using Microwave Irradiation. *Fish Pathology*. 31: 231 - 232

**LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.** 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. *Arch Med Vet.* 29: 113-119.

**LARENAS, J.; ZAMORANO, E.; SMITH, P.** 2005. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. *Mon. Electr. Patol. Vet.* 2 (1): 59-67

**LEARY, S.; UNDERWOOD, W.; ANTHONY, R.; CARTNER, S.; COREY, D.; GRANDIN, T.; GREENACRE, C.; GWALTNEY-BRAN, S.; MCCRACKIN, A.; MEYER, R.; MILLER, D.; SHEARER, J.; YANONG, R.** 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. Edition 2013.

**MAUEL, M.; GIOVANNONI, S.; FRYER, J.** 1996. Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Dis Aquat Org.* 26: 189-195.

**MAUEL, M.; WARE, C.; SMITH, P.** 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 20. 213-214.

- MIKALSEN, J.; SKJAERVIK, O.; WIİK-NIELSEN, J.; WASMUTH, M.; COLQUHOUN, D.** 2008. Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiology Letters*. 278: 43-47
- OIE, WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH.** 2006. Piscirickettsiosis. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. 5: 250-256
- OLIVARES, J.; MARSHALL, S.** 2010. Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. *J. Fish Dis.* 33: 261-266
- OLSSON, J.; JÖBORN, A.; WESTERDAHL, A.; BLOMBERG, L.; KJELLEBERG, S.; CONWAY, P.** 1998. Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. *J. Fish. Dis.* 21: 1-10
- REES, E.; IBARRA, R.; MEDINA, M.; SANCHEZ, J.; JAKOB, E.** 2014. Transmission of *Piscirickettsia salmonis* among salt water salmonid farms in Chile. *Aquaculture*. 429: 189-194
- ROJAS, V.; OLIVARES, J.; DEL RÍO, R.; MARSHALL, S.** 2008. Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*. *Microbial Pathogenesis*. 44: 370-378.
- ROZAS, M.; ENRÍQUEZ, R.** 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of Fish Diseases*. 37: 163-188.
- SALINAS, G.** 1998. Efecto de la densidad poblacional sobre la presentación y transmisión horizontal de piscirickettsiosis en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas experimentalmente. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 65 p
- SERNAPESCA.** 2013. Sernapesca presentó nuevo programa sanitario de vigilancia y control en la salmonicultura. [en línea]. <[http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1573:sernap](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=1573:sernap)

[esca-presento-nuevo-programa-sanitario-de-vigilancia-y-control-en-la-salmonicultura&catid=1:ultimas&Itemid=69](#)> [consulta: 28-07-2014]

**SHANNON, B.; LAWRENCE, I.; TREVOR, V.** 1996. Horizontal transfer of *Renibacterium salmoninarum* among farmed salmonids via the fecal-oral route. *Dis Aquat Org.* 25: 63-69.

**SMITH, P.; PIZARRO, P.; OJEDA, P.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; LARENAS, J.** 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in Rainbow trout *Onchorynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 37:165-172.

**SOLIS, A.; LARENAS, J.; SMITH, P.; MORALES, M.** 2002. Comparación del nivel de presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de frotis renal, fluído celómico y seminal de reproductores de salmónidos de la Décima Región de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 62 p.

**TORANZO, A.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J.** 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture.* 246: 37-61

**VERA, T.; ISLA, A.; CUEVA, A.; FIGUEROA, J.** 2012. A new liquid medium for the pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Arch Med Vet.* 44: 273-277.

## ANEXOS

### Anexo 1.



Imagen 1. Peces extraídos como mortalidad diaria del centro de la XI región. Se aprecian lesiones ulcerativas y papulares distribuidas en gran parte del cuerpo.



Imagen 2. Pez moribundo nadando en superficie y con evidentes lesiones papulares distribuidas en la región ventral así como hemorragias petequiales en base de aletas pélvicas.