



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

PROSPECCIÓN PRELIMINAR DE PISCINE REOVIRUS EN *GENYPTERUS CHILENSIS* Y BÚSQUEDA DE LESIONES CARDÍACAS ASOCIADAS CON “INFLAMACIÓN DE MÚSCULO CARDÍACO Y ESQUELÉTICO (HSMI)”

LARA VALDERRAMA PÉREZ

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

PROFESOR GUÍA: DR. PEDRO SMITH SCHUSTER

SANTIAGO, CHILE

2015



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

PROSPECCIÓN PRELIMINAR DE PISCINE REOVIRUS EN *GENYPTERUS CHILENSIS* Y BÚSQUEDA DE LESIONES CARDÍACAS ASOCIADAS CON “INFLAMACIÓN DE MÚSCULO CARDÍACO Y ESQUELÉTICO (HSMI)”

LARA VALDERRAMA PÉREZ

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

PROFESOR GUÍA: DR. PEDRO SMITH SCHUSTER

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: PEDRO SMITH
PROFESOR CORRECTOR: GUSTAVO FARÍAS
PROFESOR CORRECTOR: VALERIA ROJAS

SANTIAGO, CHILE

2015

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta memoria de título a mis padres, a mi familia, a mis amigos y a Pablo por su incondicional apoyo durante toda mi formación, tanto profesional como personal. Os estoy muy agradecida ya que cada uno de ustedes ha aportado su granito de arena en todo este proceso.

Y especialmente, quiero dedicar esta memoria a mis abuelos con cuyo apoyo siempre conté.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pedro Smith por darme la oportunidad de realizar esta memoria de título y por su guía y enseñanza durante todo este proceso.

A Pablo Fueyo por la ayuda y el esfuerzo brindados tanto durante la toma de muestras como durante el todo el desarrollo de la memoria de título.

Al Sr. Pablo Véliz por su colaboración y experiencia durante la captura de los peces.

Al Sr. Miguel Sepúlveda por su ayuda y enseñanza durante la preparación de las muestras para histología.

Al Dr. Federico Cifuentes por entregarnos su opinión en numerosas oportunidades y por cedernos su cámara fotográfica.

A la Dra. Estela Roja por su paciencia y meticulosidad para corregir el escrito de la memoria de título.

A mis correctores, la Dra. Valeria Rojas y el Dr. Gustavo Farías, por su colaboración durante todo este proceso.

A mi madre, Rosa María Pérez, por la ayuda y paciencia brindadas durante la corrección del escrito de la memoria de título y los ensayos de la presentación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Peces	10
Examen macroscópico post-mortem.....	10
Histopatología.....	11
Muestreo:.....	11
Examen histopatológico:.....	11
Detección viral.....	11
Muestreo:.....	11
RT-qPCR:.....	12
RESULTADOS	14
Examen macroscópico post-mortem.....	14
Examen histopatológico de tejido cardíaco	14
Hallazgos microscópicos sin significancia patológica.....	15
RT-qPCR	15

DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS	35
Tabla N° 1: Alteraciones macroscópicas observadas en congrios colorados (<i>Genypterus chilensis</i>)	35
Figura N° 1: Fotografías de las principales lesiones macroscópicas observadas en congrios colorados (<i>Genypterus chilensis</i>).....	37
Tabla N° 2: Alteraciones cardíacas microscópicas observadas en congrios colorados (<i>Genypterus chilensis</i>)	38
Figura N° 2: Fotografías de las principales alteraciones cardíacas microscópicas observadas en congrios colorados (<i>Genypterus chilensis</i>)	43
Figura N° 3: Fotografías de los principales hallazgos cardíacos sin significancia patológica observados al microscopio óptico en congrios colorados (<i>Genypterus chilensis</i>).....	47
Tabla N° 3: Concentración de ARN y valor medio de Ct para el gen <i>housekeeping</i> 18s ribosomal en muestras de riñón anterior de congrios colorados (<i>Genypterus chilensis</i>).....	48
Tabla N° 4: Talla aproximada de congrios colorados (<i>Genypterus chilensis</i>).....	49

RESUMEN

Piscine reovirus (PRV) es considerado el agente causal de la enfermedad denominada “inflamación del músculo cardíaco y esquelético” (HSMI), una de las afecciones más comunes en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) criados en jaulas marinas en Noruega. En Chile, recientemente también se ha detectado PRV en salmones del Atlántico cultivados en el mar, especie que no es nativa de nuestro país, aunque sin lesiones compatibles con HSMI. A fin de buscar la presencia de PRV en poblaciones de peces nativos marinos silvestres y asociarla con HSMI, se analizaron quince congrios colorados (*Genypterus chilensis*) que fueron capturados en la Península de Punta Lengua de Vaca de la Región de Coquimbo de Chile. Cada pez fue sometido a una necropsia para registrar sus lesiones macroscópicas generales, examinar su corazón histopatológicamente y detectar PRV desde muestras de riñón anterior mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real. Se encontraron varias lesiones como ascitis, hidropericardio, epicarditis y, especialmente, infiltración de células mononucleares en tejido cardíaco, las cuales son compatibles con HSMI. Sin embargo, se descartó la presencia de HSMI debido a que todos los peces resultaron negativos a PRV. Como hallazgos no patológicos, se encontró folículos tiroideos localizados de modo adyacente al atrio en uno de los congrios y ausencia del estrato compacto del ventrículo en la mayoría de los peces examinados. Los resultados sugieren que PRV no está presente en congrios colorados de la zona geográfica muestreada. Sería útil extender estos estudios para establecer si este virus realmente aún no se encuentra en poblaciones de peces silvestres nativas de nuestro país.

Palabras claves: PRV, HSMI, peces silvestres, congrios colorados, *Genypterus chilensis*, Chile

ABSTRACT

Piscine reovirus (PRV) is described to be the causative agent of “Heart and Skeletal Muscle Inflammation” (HSMI), a highly prevalent disease of sea-cages reared Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. Rather recently, this virus has also been detected in Atlantic salmon cultured in Chilean sea-water, aquatic habitat in which they are not a native species, but these fish did not show lesions consistent with HSMI. In order to search for PRV presence and its association with HSMI in wild marine fish, fifteen red cusk-eels (*Genypterus chilensis*), captured in the near shore of the Península de Punta Lengua de Vaca in the Coquimbo Region of Chile, were studied. Necropsy, heart histopathology and PRV testing from head kidney samples using real-time reverse transcription polymerase chain reaction were carried out in each fish. Although several lesions associated to HSMI, such as ascitis, liver paleness, hydropericardium, epicarditis and, particularly, mononuclear cell infiltration in heart, were found, all fish resulted negative to PRV and therefore the presence of HSMI, as described so far, was also discarded. Thyroid follicles close to the atrium in one fish and lack of the ventricle compact stratum in most of them were interesting non-pathological findings. Results suggest that PRV would not be present in red cusk-eels of the sampled area. It would be useful to expand this research to establish if Chilean native wild fish are really PRV free.

Keywords: PRV, HSMI, wild marine fish, red cusk-eels, *Genypterus chilensis*, Chile

INTRODUCCIÓN

Actualmente, tanto la pesca como la acuicultura contribuyen al bienestar y a la prosperidad de un gran número de países. El pescado constituye una fuente esencial de nutrientes y de proteína de origen animal a nivel mundial. Por otro lado, la acuicultura presenta una serie de ventajas por lo cual se ha constituido en uno de los sistemas de producción de alimentos de origen animal de mayor desarrollo en las últimas décadas (FAO, 2012).

Actualmente, diversas epidemias de enfermedades infecciosas se han asociado al cultivo del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) no sólo afectando la producción de esta especie, sino que también pudiendo infectar a los peces silvestres que cohabitan en las mismas zonas amagadas (Palacios *et al.*, 2010). Es el caso de la enfermedad denominada “inflamación del músculo cardíaco y esquelético” (HSMI, sigla proveniente del inglés *Heart and Skeletal Muscle Inflammation*) la que fue descrita por primera vez en 1999 en Noruega. Recientemente, se ha demostrado que el agente etiológico de esta patología es el virus piscine reovirus (PRV) (Kongtorp *et al.*, 2004; Palacios *et al.*, 2010). Esta enfermedad emergente ha causado grandes pérdidas económicas en el cultivo del salmón del Atlántico en el hemisferio Norte, ya que posee una morbilidad cercana al 100% y una mortalidad que puede alcanzar hasta el 20% de la población afectada (Kongtorp *et al.*, 2004).

Respecto de la situación en Chile, entre los años 2011 y 2012, estudios encabezados por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) confirmaron la presencia de PRV en centros de cultivos de salmónidos en la zona Sur; sin embargo, no se encontraron lesiones concordantes con HSMI en los peces muestreados (SERNAPESCA, 2011; Balboa, 2012).

En esta memoria de título se postula que es posible que este virus se encuentre en poblaciones de peces nativos de Chile que no han compartido el hábitat con salmónidos infectados. En particular, el objetivo de este estudio es detectar la presencia de PRV en congrios colorados (*Genypterus chilensis*) silvestres capturados en la Región de Coquimbo y encontrar posibles lesiones cardíacas macroscópicas e histopatológicas concordantes con HSMI.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En 1999 distintos brotes de una nueva patología afectaron a salmones del Atlántico cultivados en la costa Oeste de Noruega, presentando signos clínicos iniciales inespecíficos tales como disminución del apetito y conducta de nado anormal, seguido de la presencia de peces moribundos y aumento de la mortalidad en una o varias de las jaulas afectadas (Kongtorp *et al.*, 2004; Løvoll *et al.*, 2012). Rápidamente, esta enfermedad emergente se distribuyó por las costas noruegas constituyendo, actualmente, una de las afecciones más comunes del cultivo de salmón del Atlántico de dicho país (Finstad *et al.*, 2012). Esta patología, denominada HSMI, posee un gran impacto económico en Noruega, ya que el número de brotes en centros de cultivo de salmones del Atlántico ha aumentado a más del doble entre el 2003 y el 2010, lo que ha traído como consecuencia un aumento de la mortalidad, disminución del crecimiento de los peces e incremento de los costos asociados al manejo de esta patología. Es por esta razón que HSMI está incluida en la lista de enfermedades de notificación obligatoria de Noruega desde el año 2008 (Kristoffersen *et al.*, 2012; Garseth *et al.*, 2013a).

Esta enfermedad se denominó HSMI por las lesiones macroscópicas e histológicas que produce. A nivel macroscópico, se puede observar un corazón pálido, hemorragia pericárdica, ascitis, hígado pálido o icterico y presencia de petequias en la grasa perivisceral. A nivel histológico, se observa necrosis de los cardiomiocitos con una infiltración de células inflamatorias mononucleares tanto del tejido compacto como del esponjoso del ventrículo, epicarditis asociada a miocarditis, necrosis focal del hígado, edema y congestión en distintos órganos, producto de una falla circulatoria. Con respecto al músculo esquelético, éste puede presentar patrones de inflamación similares a los observados en el músculo cardíaco, aunque no están siempre presentes (Mikalsen *et al.*, 2012; Yousaf *et al.*, 2012).

Kongtorp *et al.* (2004) demostraron que esta patología posee una naturaleza infecciosa, ya que lograron reproducir la enfermedad en salmones del Atlántico vía inoculación intraperitoneal de homogeneizados de tejido cardíaco provenientes de peces con lesiones de HSMI y por cohabitación con individuos enfermos. En ambos casos se desarrollaron

lesiones compatibles con la enfermedad. No se observaron lesiones en el músculo esquelético durante las doce semanas que duró el estudio, por lo que se postuló que éstas se desarrollarían en una etapa más tardía de la enfermedad y/o que se necesitaría una mayor carga del supuesto agente infeccioso para su desarrollo. Paralelamente, los cultivos bacteriológicos de la sangre extraída de los peces muestreados mostraron resultados negativos, descartando una posible etiología bacteriana. Finalmente, los autores concluyeron que HSMI era causado por un agente infeccioso, probablemente un virus, y que éste se podía transmitir a través del agua (Kongtorp *et al.*, 2004).

Posteriormente, se logró identificar al agente, PRV, mediante pirosecuenciación de alto rendimiento a partir de muestras de suero y de tejido cardíaco de peces con HSMI experimentalmente infectados (Palacios *et al.*, 2010). Este agente pertenece a la familia *Reoviridae*, subfamilia *Spinareoviridae*, género *Orthoreovirus* y es un virus icosaédrico, sin envoltura y que posee una doble hebra de ARN con 10 segmentos (Carstens y Ball, 2009; Garseth *et al.*, 2013b; Markussen *et al.*, 2013). El segmento S1 es bicistrónico y codifica las proteínas p13 y $\sigma 3$. La proteína p13 es capaz de inducir citotoxicidad y la proteína $\sigma 3$ está asociada a la proteína *outer-clamp* de otros *Orthoreovirus* que interactúa con la proteína de cápside externa formando un complejo estable. El conocimiento de la codificación de ambas proteínas es importante ya que éstas pueden ser posibles blancos para el desarrollo de vacunas o inhibidores moleculares, permitiendo el desarrollo de una estrategia efectiva contra la infección por PRV en peces (Key *et al.*, 2013; Markussen *et al.*, 2013).

HSMI afecta principalmente a salmones del Atlántico cultivados de 1 kg de peso, después de 5 a 9 meses de haber sido transferidos a aguas marinas (Kongtorp *et al.*, 2004; Wiik-Nielsen *et al.*, 2012a). No obstante, se ha detectado el agente viral desde pre-smolts hasta peces adultos previo a la cosecha. Tanto la prevalencia como la carga viral aumentan posterior a la transferencia a aguas marinas, pero decaen previo al sacrificio, lo que indica el desarrollo de una posible respuesta inmune por parte de los peces infectados (Løvoll *et al.*, 2012). La infección de los pre-smolts se puede deber a una transmisión vertical a través de las ovas de reproductores positivos y/u horizontal a través del agua o por una inadecuada desinfección del instrumental utilizado. Sin embargo, la transmisión vertical es poco

probable puesto que ovas fertilizadas provenientes de reproductores obtenidos de jaulas con brotes de HSMI fueron negativas a PRV (Løvoll *et al.*, 2012; Wiik-Nielsen *et al.*, 2012b).

Por otro lado, peces con mayor tiempo de vida en aguas marinas parecen tener mayores probabilidades de infectarse por PRV. Debido a que el tamaño de cada pez se relaciona colinealmente con el tiempo de vida en aguas marinas, se concluye que peces de mayor tamaño tienen mayor riesgo de estar infectados por PRV (Garseth *et al.*, 2013a). No obstante, Kristoffersen *et al.* (2012) demostraron que peces con un peso inferior a 0,5 kg son más susceptibles a infectarse por PRV y a desarrollar HSMI. Esto puede deberse a que si se transfieren peces de menor tamaño a aguas marinas, tanto el estrés como el tiempo de permanencia en la etapa marina son mayores, incrementándose el riesgo de contraer PRV y de desarrollar la enfermedad (Kristoffersen *et al.*, 2012).

En cuanto a la carga viral y el desarrollo de la patología, se ha observado que existiría una relación directamente proporcional entre ambas, puesto que se ha detectado bajas cargas virales en salmones sanos, tanto silvestres como cultivados (Mikalsen *et al.*, 2012). Sin embargo, de acuerdo al estudio realizado por Marty *et al.* (2014), la asociación entre el número de peces muestreados que presentaron lesiones compatibles con HSMI y los valores de ciclo umbral (Ct, sigla proveniente del inglés *Cycle threshold*) obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR) no fue estadísticamente significativa.

A pesar de que la enfermedad se presenta durante todo el año, se ha observado una mayor incidencia durante la primavera y principios del verano. La morbilidad es alta ya que la mayoría de los peces de una jaula infectada presentan lesiones concordantes con HSMI. No obstante, la mortalidad varía desde valores insignificantes hasta el 20% de la población afectada. Generalmente, las mortalidades más altas se asocian a manejos estresantes de los peces (Kongtorp *et al.*, 2004).

En cuanto a la transmisión de este virus, se ha descrito que la mayoría de los centros de cultivo que han sufrido algún brote de HSMI ya había sido afectado por esta patología durante el año anterior o se encontraba en un radio de 50 km o menos de distancia de otro centro de cultivo que había desarrollado la enfermedad (Aldrin *et al.*, 2010). Debido a este

hecho, se puede suponer que el virus es capaz de mantenerse en el ambiente e infectar a los nuevos smolts introducidos. Es por esta razón que el uso de adecuados sistemas de descanso y desinfección posteriores a la cosecha de los centros de cultivos son de suma importancia para el control de esta patología (Kristoffersen *et al.*, 2012).

Cabe señalar que los casos clínicos de HSMI se han reportado sólo en salmones del Atlántico en cautiverio y, especialmente, durante la etapa marina de su ciclo productivo. Esta situación puede deberse a que los centros de cultivo proporcionan un ambiente favorable para la transmisión de patógenos debido a las condiciones a las que son sometidos los peces, tales como altas densidades, empleo de jaulas abiertas durante la fase marina y uso de instrumental y personal común para un gran número de individuos (Garseth *et al.*, 2013a). Sin embargo, en Noruega se ha detectado PRV en salmónidos silvestres -salmón del Atlántico y trucha café (*Salmo trutta*) en su variedad anádroma- y en peces silvestres marinos no salmónidos, tales como jurel (*Trachurus trachurus*), arenque (*Clupea harengus*) y capelán (*Mallotus mallotus*), todos ellos sin lesiones coincidentes con la enfermedad (Wiik-Nielsen *et al.*, 2012a; Garseth *et al.*, 2013b). Por ende, es probable que factores no relacionados con el virus, tales como manejos estresantes y enfermedades concomitantes, contribuyan al desarrollo de esta patología (Finstad *et al.*, 2012).

Los peces silvestres no salmónidos muestreados durante el estudio de Wiik-Nielsen *et al.* (2012a) fueron capturados en zonas alejadas de centros de cultivo que sufrieron brotes de HSMI, por lo tanto existe la posibilidad de que estas especies silvestres cumplan un rol de vector. La transmisión del virus desde peces cultivados a silvestres, y viceversa, parece ocurrir durante la migración marina de estos últimos. El hecho de que se haya detectado la misma cepa de PRV en aguas distantes, permite suponer que el agente viral puede ser transportado por corrientes marinas, fómites y/o peces migratorios por largas distancias (Kristoffersen *et al.*, 2012).

La presencia de PRV no sólo se ha descrito en Noruega, sino que también en Escocia, Chile y Canadá (Kibenge *et al.*, 2013). Respecto a este último país, Marty *et al.* (2014) demostraron que dicho virus ya estaba presente en la costa Oeste de Canadá desde al menos 1977, ya que detectaron el agente en una muestra en bloque de parafina correspondiente al hígado de una trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) recolectada en dicho año. Este

resultado se contrapondría a la teoría de que PRV fue introducido a la costa canadiense a través de la importación de salmones del Atlántico con fines productivos en el año 1985, pese a que, filogenéticamente, la cepa canadiense no tiene diferencias significativas con la secuencia genética de la cepa noruega (Marty *et al.*, 2014). No obstante, estos resultados se oponen a las conclusiones derivadas de la investigación de Kibenge *et al.* (2013) que sugieren que las cepas de PRV, tanto de Chile como de Canadá, son de origen noruego.

El diagnóstico de HSMI se basa fundamentalmente en la detección de signos clínicos, de alteraciones patológicas macroscópicas y de lesiones histopatológicas en corazón y músculo esquelético. Es necesario diferenciar esta enfermedad del síndrome cardiomiopático (CMS) y de la enfermedad del páncreas debido a la similitud de las lesiones que estas entidades patológicas desarrollan en el salmón del Atlántico (Finstad *et al.*, 2012). La detección de PRV se realiza mediante RT-qPCR desde muestras, generalmente, provenientes de riñón anterior (Finstad *et al.*, 2012; Garseth *et al.*, 2013c). Habitualmente, el segmento genómico objetivo de amplificación corresponde al L1 (Løvoll *et al.*, 2012; Wiik-Nielsen *et al.*, 2012b; Garseth *et al.*, 2013b). No obstante, esta detección no es una herramienta de diagnóstico concluyente de la presencia de la enfermedad, puesto que se ha logrado identificar el agente con esta técnica en salmones sanos, ya sean cultivados como silvestres (Finstad *et al.*, 2012; Garseth *et al.*, 2013c). Otra herramienta suplementaria de diagnóstico consiste en la inmunohistoquímica con el fin de detectar antígenos de PRV en leucocitos y/o cardiomiocitos (Finstad *et al.*, 2012). Los antígenos virales son detectables en el citoplasma de leucocitos y cardiomiocitos previo al desarrollo de daño celular. Esta ubicación en el citoplasma coincide con el lugar de replicación viral realizada por los reovirus en sus células blanco. Por ende, la inmunohistoquímica sería una herramienta útil para la detección temprana de infección por PRV previo al desarrollo de las lesiones (Finstad *et al.*, 2012). No obstante, un estudio recientemente publicado (Finstad *et al.*, 2014) indica que los eritrocitos corresponderían a las primeras células blanco en ser infectadas por PRV. Puede que la amplia distribución de PRV en salmones cultivados y silvestres aparentemente sanos se deba a una infección de los eritrocitos, sin llegar a afectar la musculatura cardíaca ni esquelética. Adicionalmente, es posible que la mantención del

agente en peces supervivientes a brotes de HSMI se deba a la infección de estas células (Finstad *et al.*, 2014).

En Chile, en enero del 2011, SERNAPESCA encargó un estudio con el fin de detectar la eventual presencia de los agentes etiológicos de HSMI y de CMS en salmones del Atlántico en centros de cultivos marinos. De los doce centros de la Región de Los Lagos que fueron muestreados, diez dieron resultados positivos a la presencia de PRV mediante la técnica de PCR; no obstante, ninguno de los peces infectados presentó signos de la enfermedad. En cuanto al agente de CMS, ninguno de los centros muestreados resultó positivo a su presencia ni presentó peces con lesiones compatibles con la patología (SERNAPESCA, 2011). Posteriormente, en el 2012, en una investigación conjunta de SERNAPESCA y de la Universidad Austral de Chile se obtuvo positividad a PRV no sólo en centros de cultivo marinos de salmónidos de la Región de los Lagos, sino también en las regiones de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo y Magallanes y de la Antártica chilena (Balboa, 2012).

La literatura disponible indica que en Chile este agente sólo se ha buscado en cultivos de salmónidos y, específicamente, en la zona Sur de nuestro país. Como se menciona en la revisión bibliográfica, PRV es, aparentemente, un virus ubicuo, ya que se ha detectado no sólo en el salmón del Atlántico sino también en otras especies silvestres no salmónidas del hemisferio Norte en zonas distantes de centros de cultivo de salmones. En este contexto, en la presente memoria de título se postula que PRV podría encontrarse muy diseminado en poblaciones de peces silvestres nativas, en las cuales la enfermedad podría eventualmente manifestarse y no, necesariamente, provenir de centros de cultivo de especies salmónidas. Dado lo anterior, en este estudio se obtuvieron muestras de congrios colorados de vida libre en una zona muy alejada de los centros de cultivo de salmónidos. Esta especie de congrios se encuentra naturalmente distribuida en el Pacífico Sureste desde Perú al extremo sur de Chile y es una de las especies extraídas por la pesca artesanal de nuestro país (Chirichigno, 1974; Avilés, 1979, citados por Chong y González, 2009; SERNAPESCA, 2006). Además, posee la ventaja de que es una especie de fácil captura por su relativamente alta biomasa, no tiene restricciones de vedas y no está protegida. Debido a sus hábitos sedentarios (Mann, 1954), sus migraciones son cortas, lo que impediría que congrios alejados de las zonas de

cultivos marinos de salmónidos estuviesen en contacto con poblaciones de salmones infectados por PRV.

En esta memoria de título se investigó la presencia de PRV, mediante RT-qPCR, en congrios colorados silvestres de la Región de Coquimbo obtenidos mediante pesca artesanal. Paralelamente, se realizó análisis macroscópico e histológico de los peces muestreados en búsqueda de lesiones cardíacas concordantes con HSMI para establecer la relación entre la presencia del virus y la enfermedad.

La localización de este agente en especies silvestres de distintas regiones geográficas de nuestro país contribuye al conocimiento de la epidemiología de PRV y, por lo tanto, facilita el establecimiento de medidas apropiadas para la prevención y el control de eventuales futuros brotes de esta enfermedad tanto en especies cultivadas como silvestres.

HIPÓTESIS

Congrios colorados de la Región de Coquimbo son portadores de PRV, agente causal de HSMI, y presentan lesiones cardíacas asociadas a esta enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Obtener información sobre la epidemiología de PRV y sobre su patología cardíaca asociada en congrios colorados silvestres de la Región de Coquimbo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de PRV en una muestra de congrios colorados silvestres de la Región de Coquimbo.
2. Describir lesiones macro y microscópicas de tejido cardíaco de los congrios colorados muestreados.
3. Asociar las lesiones descritas en el objetivo específico anterior con las descritas para HSMI y con la presencia de PRV en los peces estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Peces

Se utilizaron quince congrios colorados de un rango de talla desde 40,3 cm hasta 70 cm capturados en aguas costeras de la Región de Coquimbo. Estos peces fueron obtenidos mediante la técnica de caza submarina con arpón en las cercanías de la Península Punta Lengua de Vaca (latitud -30,2439 y longitud -71,6303), a una profundidad máxima de 30 m. El tamaño de muestra seleccionado fue de quince individuos y éste se obtuvo a través de la aplicación de la fórmula de Cannon y Roe (1982), asumiendo una prevalencia de un 20%, de acuerdo al estudio realizado por Palacios *et al.* (2010), y un 95% de nivel estadístico de confianza. En cuanto fueron retirados del agua, los peces fueron insensibilizados por aturdimiento por percusión en la cabeza seguido de descabello para sacrificio respetando las normas de bioética correspondientes (AVMA, 2013), previamente aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Examen macroscópico post-mortem

Después de su sacrificio, cada pez fue rotulado y fotografiado para asegurar su identificación. Se realizó una necropsia de cada espécimen con el fin de buscar en ellos lesiones pericárdicas y cardíacas macroscópicas asociables a HSMI (hemorragia pericárdica y/o tejido cardíaco pálido) (Mikalsen *et al.*, 2012; Yousaf *et al.*, 2012). Adicionalmente, se registraron alteraciones de los órganos pertenecientes a la cavidad abdominal que también se asocian a la enfermedad en estudio, tales como lesiones de tipo hemorrágicas, ictéricas y/o ascitis de acuerdo a lo descrito por Mikalsen *et al.* (2012) y Yousaf *et al.* (2012). Los hallazgos no relacionados directamente con HSMI también fueron registrados.

Se tomaron fotografías de los órganos de las cavidades pericárdicas y abdominales de los peces con el objetivo de respaldar las observaciones hechas durante las necropsias. Las lesiones fueron calificadas de acuerdo a su intensidad mediante un sistema de apreciación cualitativa por cruces según el consenso de tres observadores independientes (+: leve, ++: moderada, +++: severa).

Histopatología

Muestreo:

En el momento de realizar la necropsia, se extrajo el corazón de cada pez y se preservó en una solución de formalina neutra tamponada al 10% en una relación de 20 volúmenes respecto del tamaño del órgano (Kongtorp *et al.*, 2004).

Examen histopatológico:

Se analizó el tejido cardíaco de todos los peces considerando tres cortes para-sagitales (de 5 µm de grosor de sección con 15 µm de separación entre cada corte) de cada corazón completo. Para la preparación de las muestras fijadas, se aplicó la técnica estándar de cera de parafina. Posteriormente, los cortes respectivos se tiñeron con hematoxilina y eosina (Kongtorp *et al.*, 2004). Todas las preparaciones se examinaron completas al microscopio óptico en una magnificación de 100x, 200x, 400x y 1.000x. Los hallazgos no asociados a HSMI, tanto patológicos como no, también se registraron para un mejor provecho del estudio. La intensidad de las alteraciones detectadas fueron calificadas mediante un sistema de apreciación cualitativa por cruces según las observaciones de dos examinadores diferentes (+: leve, ++: moderada y +++: severa).

Detección viral

Muestreo:

Para este fin, se siguió la metodología descrita por Løvoll *et al.* (2010) y Palacios *et al.* (2010). Se tomaron muestras de riñón anterior (aproximadamente 0,125 g por pez) y se preservaron en RNAlater (Qiagen, Hialden, Alemania) en un volumen de 1,25 mL en congruencia con las recomendaciones del instructivo del fabricante (Qiagen, 2012). Las muestras se refrigeraron durante las primeras 24 h para luego congelarlas a -20° C hasta su uso.

RT-qPCR:

Estas pruebas se llevaron a cabo en el Western Fisheries Research Center perteneciente al United States Geological Survey (U.S.G.S.), ubicado en la ciudad de Seattle en el Estado de Washington de Estados Unidos (EE.UU.). Una vez recibidas en el laboratorio mencionado, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis. La extracción del ARN desde los tejidos se realizó empleando el *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen, Hialden, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN fue cuantificado mediante espectrofotometría (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Las hebras de ADN complementario (ADNc) fueron sintetizadas utilizando el *High Capacity cDNA Synthesis Kit* (Life Technologies, California, EE.UU.). La síntesis de ADNc se inició utilizando $1,5\ \mu\text{g}$ de ARN diluido en $20\ \mu\text{L}$ de volumen de reactivo. Esta mezcla, a su vez, se diluyó en una proporción de 1:5 v/v con agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Los ensayos de RT-qPCR fueron realizados utilizando el *Viiia 7 Real-Time PCR System* de Applied Biosystems (Life Technologies, California, EE.UU.). Los partidores utilizados se obtuvieron de *Integrated DNA Technology* (California, EE.UU.) y la sonda se obtuvo de Applied Biosystems (Life Technologies, California, EE.UU.). Cada tubo para PCR contuvo $12\ \mu\text{L}$ de *Universal PCR Master Mix* de Applied Biosystems (Life Technologies, California, EE.UU.) sin diluir al cual se le adicionó los partidores directo e inverso ($900\ \text{nM}$), la sonda ($200\ \text{nM}$) y $5\ \mu\text{L}$ de ADNc diluido según se describió anteriormente.

Los partidores y la sonda utilizados para la amplificación del segmento L1 coincidieron con los usados por Løvoll *et al.* (2012), Wiik-Nielsen *et al.* (2012b) y Garseth *et al.* (2013b) y corresponden a los descritos a continuación:

- Partidor directo: F 5'-TGCTAACACTCCAGGAGTCATTG-3'
- Partidor inverso: R 5'-TGAATCCGCTGCAGATGAGTA-3'
- Sonda: 5'-CGCCGGTAGCTCT-3' – MGB/NFQ

En cuanto a la metodología, se siguieron las siguientes etapas durante los ciclos de RT-qPCR: mantención a 50°C durante 2 min, mantención a 95°C durante 10 min y realización

de 40 ciclos de qPCR en los que se mantuvo una temperatura de 95° C durante 15 seg (desnaturalización) y posteriormente, una temperatura de 60° C durante 1 min (alineamiento). La prueba fue repetida dos veces por muestra.

Para la lectura, se consideraron positivas a aquellas muestras con un valor medio de Ct menor a 37, en las que se amplificó L1 en todas las repeticiones de la técnica y en las que se obtuvo una curva sigmoïdal de amplificación en todas las repeticiones de la misma. Se caracterizaron como sospechosas de ser positivas a aquellas muestras que obtuvieron un valor medio de Ct entre 37 y 40, en las que se amplificó L1 en al menos una de las repeticiones de la técnica y en las que se obtuvo una curva sigmoïdal de amplificación en la(s) repetición(es) en la(s) que se amplificó L1. Aquellas muestras con resultados que no cumplieron con los requisitos mencionados fueron categorizadas como negativas a la presencia de PRV.

Finalmente, en cuanto a la determinación del grado de preservación del ARN de las muestras, éste se evaluó mediante la amplificación del gen *housekeeping* 18s ribosomal.

RESULTADOS

Para facilitar la lectura, en esta sección se presentan los principales resultados; en tanto que sus detalles y documentación fotográfica respectiva se muestran en las Tablas N° 1 a 3 y en las Figuras N° 1 a 3 que se encuentran en el anexo ubicado después de la bibliografía.

Examen macroscópico post-mortem

Las lesiones u otros hallazgos observados durante la necropsia se agruparon en dos categorías principales según el (los) órgano(s) afectado(s). Éstas correspondieron, por una parte, a corazón, incluyendo pericardio, y, por otra, a los órganos intraabdominales que se observaron afectados durante el examen. En ambos casos, también se describió si hubo alteraciones en las cavidades que contienen dichos órganos. Las lesiones macroscópicas observadas en cada individuo y su intensidad se resumen en la Tabla N° 1. Además, en la Figura N° 1, se presentan las fotografías representativas de las principales lesiones macroscópicas observadas durante las necropsias. Se observó dos tipos de lesiones cardíacas: pigmentación oscura de la superficie del ventrículo o del atrio (Fig. 1a) e hidropericardio (Fig. 1b). En cuanto a las alteraciones de los órganos intraabdominales, se observó ascitis (Fig. 1c), presencia de nemátodos adheridos a la túnica serosa del hígado o del estómago (Fig. 1d) e hígado pálido (Fig. 1e) o con una zona congestiva.

Examen histopatológico de tejido cardíaco

Todas las observaciones se muestran en la Tabla N° 2 en la que, además, se detalla la localización de las lesiones (según tejido y pez implicado) y su intensidad correspondiente. Asimismo, las principales lesiones están representadas por las fotografías de la Figura N° 2. La lesión de mayor significancia por su frecuencia, implicancia patológica y que, además, coincide con la principal alteración asociada a HSMI correspondió a infiltración de células mononucleares tanto en el atrio como en el ventrículo (Fig. 2a, i, n). Otras lesiones detectadas fueron presencia de trombos (Fig. 2b, c), vacuolizaciones intracitoplasmáticas (Fig. 2d, e), infiltración de melanomacrófagos (Fig. 2f), de células eosinofílicas granulares (Fig. 2i, m) y/o de fibroblastos (Fig. 2j, l), fibras musculares en degradación, elongadas

(Fig. 2g) y/o rotas, fibrosis (Fig. 2h, i, j), endocarditis, epicarditis (Fig. 2k, l, m, n), hemorragia miocárdica (Fig. 2o) y, posiblemente, un xenoma (Fig. 2p), un granuloma (Fig. 2q), un quiste parasitario (Fig. 2r) y un parásito protozoario (Fig. 2s). Adicionalmente, se evidenció la presencia de zonas con engrosamientos subendocárdicos con núcleos prominentes de las células del endocardio asociado (Fig. 2t, u). Esta última característica tisular estuvo presente en todos los peces, tanto en el atrio como en el ventrículo, lo cual sugiere que no tiene significancia patológica y, más bien, forma parte de la histología normal de esta especie.

Hallazgos microscópicos sin significancia patológica

Estos hallazgos están ilustrados en la Figura N° 3. Éstos correspondieron a una ova adyacente al tejido cardíaco (Fig. 3a), folículos tiroideos contiguos al atrio (Fig. 3b) y la observación de la total ausencia del estrato compacto del ventrículo (Fig. 3c), con excepción de sólo dos (congrios II y XIV) de los quince peces examinados. En el espécimen II, esta capa estaba presente con un grosor variable y sin una separación nítida entre ésta y el estrato esponjoso (Fig. 3d) y, en el congrio XIV, el estrato compacto se apreció como una estructura muy delgada. Adicionalmente, cabe agregar que los vasos coronarios sólo fueron detectados en el epicardio del atrio y del ventrículo, a excepción del congrio III en el que se distinguió una arteriola en el estrato esponjoso del ventrículo.

RT-qPCR

Ninguna de las muestras analizadas mostró niveles detectables de ARN de PRV en las dos repeticiones de la técnica. Por lo tanto, se concluyó que ninguno de los peces muestreados estaba infectado por el virus.

Por otro lado, todas las muestras analizadas presentaron valores medios de Ct para la amplificación del gen *housekeeping* 18s ribosomal bajos (rango desde 14,3 hasta 16,5). La cantidad de ARN y el valor medio de Ct para este gen obtenidos de cada muestra se presentan en la Tabla N° 3

DISCUSIÓN

Pese a que la lesión de mayor significancia en los individuos analizados correspondió a la infiltración de células mononucleares, manifestación característica de HSMI, ésta no se asoció a la infección por PRV ya que ninguno de los peces arrojó resultado positivo a la presencia de este virus en la RT-qPCR. Cabe mencionar que dicha lesión, aunque se asocia a HSMI, es inespecífica y sólo es indicativa de una respuesta inflamatoria. Por ende, y en cierto modo paradójicamente a los objetivos de esta memoria, cualquier otro agente distinto de PRV, de los múltiples que podrían inducir este tipo de reacción, puede ser el causante de esta infiltración en los peces muestreados.

En cuanto a la confiabilidad del método de diagnóstico viral, es de importancia considerar que los valores Ct obtenidos para la amplificación del gen *housekeeping* 18s ribosomal fueron bastante bajos. El Ct corresponde al número de ciclo en el cual la intensidad de la señal fluorescente emitida al hibridar la sonda con la secuencia de interés comienza a aumentar de forma exponencial y a partir de éste se registran los datos. Este número de ciclo se denomina Ct y su valor es inversamente proporcional al número de copias del ADNc blanco, es decir, a mayor concentración de ADNc blanco, menor es el valor de Ct obtenido (Fonseca *et al.*, 2010). Como se obtuvo valores de Ct bajos, este resultado indica que el ARN de las muestras se preservó adecuadamente hasta su procesamiento. Por lo tanto, los resultados de los análisis son válidos desde esta perspectiva. Cabe indicar que el uso de estos genes *housekeeping* es comúnmente utilizado para la normalización de las pruebas de PCR en tiempo real (Bas *et al.*, 2004).

Debido a que existe mayor certeza de que las lesiones calificadas como moderadas y/o severas, tanto macroscópicas como histológicas, tienen significancia patológica y no así las leves, sólo las primeras se analizan en esta discusión. No obstante, en este acápite también se incluyen cinco lesiones categorizadas como leves y que corresponden a presencia de nemátodos y posibles xenoma, granuloma, quiste parasitario y protozoo intracelular, ya que tienen, claramente, un potencial efecto patológico.

Al respecto, llama la atención que tres individuos (congríos III, V y VI) concentraron un mayor número de lesiones que el resto. Es importante hacer notar que la interpretación de

las causas y consecuencias fisiopatológicas de las lesiones en los peces tiene limitaciones importantes puesto que la información es incompleta ya que, además de los datos macroscópicos recolectados durante las necropsias, sólo se dispone de exámenes histológicos de corazón.

El individuo III presentó hígado pálido lo que se puede deber, entre otras causas, a una anemia o a una esteatosis (Kumar, 2013a; Kumar 2013b). Es posible que la captura con arpón contribuyera a generar una anemia por hemorragia, no sólo en este pez, sino que en todos los individuos muestreados, aun cuando no en todos se evidenció palidez hepática. Además, en este individuo, se observó presencia de trombos en venas del sistema coronario lo que se puede deber a un daño endotelial producido por algún virus o por una reacción inflamatoria de otro origen. Asimismo, se detectó infiltración de células mononucleares y de melanomacrófagos en el miocardio del atrio lo que indicó el desarrollo de un proceso inflamatorio (Trigo, 1998a; Trigo, 1998b; MacLachlan y Dubovi, 2011; Kumar, 2013a). Por lo tanto, se concluye que dicho congrio habría estado cursando un cuadro patológico importante, de causa desconocida, con probable compromiso de la función cardíaca.

A su vez, el congrio colorado V también presentó hígado pálido, probablemente debido a una anemia hemorrágica puesto que este pez sufrió una mayor ruptura de vísceras que los demás producto del arpón utilizado para su captura. A nivel histológico, además de la presencia focal de trombos venosos en el epicardio tanto del atrio como del ventrículo, se evidenció dos lesiones cardíacas adicionales de gran extensión. Una de ellas correspondió a una fibrosis en el miocardio del ventrículo que, probablemente, se encontraba en etapa de remodelación con algunos focos inflamatorios y proliferativos remanentes. La otra lesión consistió en una epicarditis en el ventrículo compuesta por engrosamiento severo del epicardio, infiltración moderada de fibroblastos, de células eosinofílicas granulares y de células mononucleares y presencia de fibras de colágeno. Se postula que esta otra lesión, pese a ser crónica, estaba cursando aún una respuesta inflamatoria activa debido a la intensidad de las infiltraciones celulares. Se estima, entonces, que pese a que este pez poseía lesiones crónicas, probablemente la etiología de éstas aún seguía actuando al momento del muestreo. Adicionalmente, la presencia de trombos podría haber contribuido a la formación de estas lesiones debido a las alteraciones generadas por el taponamiento de

los vasos coronarios, sobre todo en el ventrículo (Kumar *et al.*, 2013a; Kumar *et al.*, 2013c; Kumar *et al.*, 2013d).

Por su parte, el pez VI presentó un hidropericardio severo, lo que al menos en mamíferos podría ser causado por una falla circulatoria congestiva importante, una hipoproteinemias o una infección septicémica (Trigo, 1998a). Microscópicamente, este congrio colorado sólo presentó infiltración de células mononucleares en epicardio y miocardio del ventrículo. Llama la atención que, pese a que este pez presentó hidropericardio severo, no se observaron otros signos concordantes con una posible falla circulatoria congestiva ni otras lesiones microscópicas a nivel de tejido cardíaco. Al respecto, en teleósteos, se describe que el pericardio visceral es muy poco flexible y la dilatación del atrio tiene una importante dependencia del efecto *vis-a-fronte* generado por la contracción ventricular en esta cavidad pericárdica rígida (Ferguson, 2006). Por estas razones, se esperaría que un hidropericardio generara una disminución significativa en la eficiencia del débito cardíaco en los peces afectados. En este caso, no se puede señalar con precisión la causa del hidropericardio; no obstante los hallazgos sugieren una etiología extracardíaca, probablemente asentada en una disfunción hepática y/o renal (Trigo, 1998a; Kumar *et al.*, 2013c). Además, este pez presentó dos hallazgos patológicos leves; la presencia de un granuloma con un espacio en su centro en el miocardio ventricular y de anisákidos adheridos a la túnica serosa del estómago. Dichos hallazgos, que se discuten posteriormente, no parecen explicar el desarrollo de las lesiones moderadas y severas del congrio VI, ya comentadas anteriormente.

Cabe destacar que el pez V, siendo el que concentró más lesiones moderadas a severas, es el de mayor talla, tal y como se indica en la Tabla N° 4. Se puede hipotetizar que dicho congrio es el más viejo de la muestra y que, por lo tanto, ha tenido más tiempo para desarrollar lesiones durante su vida. Sin embargo, también se tendría que tomar en cuenta otros factores para analizar el efecto de la talla de los individuos muestreados como el género, el peso y el estado de salud. Por otro lado, el congrio colorado III también concentró varias lesiones moderadas a severas; no obstante no correspondió a uno de los individuos de mayor talla dentro de la muestra. Asimismo, el pez VI presentó varias lesiones de intensidad moderada a severa, pero su talla fue una de las más bajas dentro de la

muestra. Por ende, aunque no se puede aseverar con seguridad por el bajo número de peces analizados, probablemente no existe una relación entre la talla del individuo y el desarrollo de las lesiones de mayor intensidad.

Por otra parte, los especímenes VI y VIII presentaron nemátodos adheridos a la túnica serosa del estómago y del hígado (Tabla N° 1), respectivamente. De acuerdo a su apariencia, luego de haber sido observados a la lupa, estos parásitos parecen pertenecer a la familia *Anisakidae* en estado larvario L3 y probablemente corresponden a la especie *Anisakis simplex*. Las larvas L3 de *A. simplex* se encuentran, generalmente, encapsuladas de modo enrollado adheridas a las serosas de los órganos viscerales de los peces hospederos (Levsen y Berland, 2012). Esta disposición corresponde a la que se observó en los nemátodos detectados en estos congrios y, además, sus características morfológicas de tamaño, color y disposición anatómica del aparato digestivo son coincidentes con *A. simplex* de acuerdo a lo que describe Lorenzo (2000). En un estudio realizado por Torres *et al.* (2000), cuyo objetivo fue el registro de nemátodos anisákidos en peces comercializados para su consumo en la ciudad de Valdivia, se encontró larvas de *Pseudoterranova decipiens* en la musculatura de nueve de los dieciocho congrios colorados examinados. Cabe destacar que estas dos especies son de importancia en salud pública debido a su capacidad zoonótica (Nagasawa, 2005). Por lo tanto, aunque en la literatura revisada no se encontró reportes de *A. simplex* en congrios colorados, sí se ha descrito presencia de otros anisákidos en esta especie de peces. En cualquier caso, se requiere una confirmación taxonómica para asegurar la identificación de la especie de anisákidos encontrada, idealmente con técnicas moleculares de acuerdo a las metodologías de uso actual (Umehara *et al.*, 2006).

A su vez, en el congrio colorado IV se detectó un posible xenoma adosado a la pared de una arteriola del epicardio del ventrículo (Fig. 2p). Los xenomas son característicos de la infección por parásitos microsporidios de los géneros *Glugea* y *Spraguea*, ambos de importancia en los peces de cultivo. Estos agentes inducen una hipertrofia masiva del citoplasma de la célula infectada que, a su vez, aloja en su interior esporas del parásito (Roberts, 2012). Adicionalmente, en este pez también se detectó un trombo antiguo endotelializado en una arteriola del epicardio del bulbo arterioso (Fig. 2c). Cabe destacar

que este trombo fue el único que se detectó en una arteria, todos los demás se ubicaron en venas, como generalmente ocurre en este tipo de alteraciones en mamíferos (Trigo, 1998a).

Asimismo, en el miocardio ventricular del individuo VI, se observó un granuloma con un espacio en su centro (Fig. 2q). Este tipo de granuloma, en salmones del Atlántico, se asocia a una reacción inflamatoria granulomatosa por efecto secundario de la administración de vacunas con adyuvantes oleosos (Koppang *et al.*, 2005). Debido a que los congrios examinados eran silvestres y, por ende, nunca fueron vacunados, se descarta que ésta sea la causa de esta lesión. Por su parte, en mamíferos, se describe el lipogranuloma hepático formado por agregados de macrófagos y linfocitos y material lipídico en su centro en forma de vacuola los que pueden tener origen metabólico, farmacológico e/o infeccioso (Villar *et al.*, 1996; Anandakumar y Vanitha, 2014). No obstante, no se ha descrito el desarrollo de éstos en el tejido cardíaco por lo que parece difícil que alguna de las causas recién mencionadas sea la responsable del desarrollo de dicha lesión en el congrio examinado.

Por su parte, en el congrio colorado X, se observó un posible quiste parasitario en el ventrículo (Fig. 2r). Al respecto, se ha descrito el desarrollo de quistes en musculatura cardíaca en peces marinos por la infección de microsporidios, específicamente *G. takedai* (Dyková, 2006). Sin embargo dichos parásitos se presentan normalmente en aguas de baja temperatura (Dyková, 2006), lo cual no coincide con el hábitat acuático de los congrios estudiados.

Finalmente, en el individuo XV, se observó una estructura semejante a una de las etapas de desarrollo de las coccidias: el merozoito (Fig. 2s). Las coccidias que afectan a los peces marinos se dividen en dos grandes grupos: las coccidias propiamente tales y las coccidias *sensu lato*. La mayoría de las coccidias propiamente tales se desarrollan en intestino. Sin embargo, algunas de ellas se reproducen en otros órganos, pero no en corazón. Por otro lado, las coccidias *sensu lato* se desarrollan en células sanguíneas tales como linfocitos, neutrófilos, monocitos y eritrocitos, las que se pueden encontrar en cualquier órgano, y, además, necesitan dos hospederos para su desarrollo: peces y sanguijuelas (Mólnar, 2005). Debido a la localización de este posible merozoito en el tejido cardíaco es bastante difícil que se trate de una infección por una coccidia propiamente tal. En cambio, sí podría corresponder a una infección por alguna coccidia *sensu lato*, puesto que el parásito, en este

caso, sí se podría localizar en el tejido cardíaco y que, además, se han descrito distintas especies de sanguijuelas en la costa chilena (Muñoz y Olmos, 2007) las que podrían actuar como hospederas intermediarias. Inclusive, George-Nascimento y Huet (1984) describieron a una de ellas afectando a un congrio negro (*G. maculatus*).

Respecto a los engrosamientos subendocárdicos, su presencia llama la atención ya que, en teoría, dificultarían la difusión de la sangre desde las cavidades atrial y ventricular al tejido miocárdico esponjoso. Cabe mencionar que, en peces, como se detalla más adelante en esta discusión, la irrigación del estrato esponjoso depende de la sangre proveniente de las cavidades y no de la circulación coronaria (Farrel, 2011). Al respecto, Amin y Poppe en 1989, describieron una lesión similar en salmones del Atlántico la cual la caracterizaron como una fibroelastosis subendocárdica. En ese reporte se presentaron distintas hipótesis sobre la etiología y patogénesis de esta enfermedad tales como hipoxia, exposición del endocardio a un flujo sanguíneo de alta presión, efectos metabólicos en el miocardio, enfermedad autoinmune del tejido conectivo, desorden congénito, obstrucción linfática e infección viral. La segunda posibilidad es la que mejor coincide con la alteración observada en las muestras de esta memoria de título puesto que, en los congrios examinados, los engrosamientos subendocárdicos fueron observados en zonas cercanas a las válvulas atrio-ventricular y ventrículo-bulbar, donde se esperaría que el flujo sanguíneo tuviese una alta presión y turbulencia. Debido a que todos los peces presentaron estos engrosamientos subendocárdicos es que se concluye que, posiblemente, se trate de una adaptación fisiológica más que de una manifestación patológica. Asimismo, respecto al aspecto prominente de los núcleos de las células endocárdicas que revestían estos engrosamientos, es importante recordar que el endocardio de los peces posee capacidad fagocítica (Genten *et al.*, 2009a). Por otro lado, se ha descrito que existe una fuerte correlación entre el tamaño nuclear y los niveles de transcripción de ARN (Sato *et al.*, 1994; Schmidt y Schibler, 1995). Por lo tanto, una posible explicación de estos núcleos sobresalientes es que las células del endocardio se encontraban con un mayor nivel de transcripción de ARN derivado de una actividad fagocítica importante.

Adicionalmente a las lesiones ya comentadas, se encontraron tres hallazgos microscópicos, que aunque sin significancia patológica, son de interesante discusión. El primero de ellos

fue la detección de una ova en la periferia del tejido cardíaco del pez VI (Fig. 3a). Ésta se debe haber adherido al corazón durante la preservación de las muestras en formalina tamponada. Este artefacto, seguramente, se produjo porque en la toma de muestras se extrajeron distintos órganos por pez y se introdujeron en el mismo tubo. La ova fotografiada se encuentra en la fase vitelogénica ya que posee un núcleo central, un citoplasma pálido, gránulos de vitelo y vacuolas lipídicas. Esta etapa es la segunda de tres etapas marcadas del desarrollo de la ova y es la que antecede a la fase madura (Genten *et al.*, 2009b).

El segundo de estos hallazgos tuvo lugar en el pez XIII en el que se detectó folículos tiroideos adyacentes al atrio (Fig. 3b). Se describe que los peces óseos adultos presentan la glándula tiroidea en forma de folículos difusos dispersos, generalmente, alrededor de la aorta ventral y de los vasos branquiales aferentes. No obstante, éstos pueden distribuirse fuera de la región faríngea ya que la glándula tiroidea no está encapsulada ni rodeada por tejido conectivo. Estos folículos se denominan folículos tiroideos heterotópicos (Genten *et al.*, 2009c). Este hallazgo corresponde, a nuestro entender, a la primera descripción de folículos tiroideos en esta especie.

Finalmente, la tercera observación correspondió a que la mayoría de los corazones de los congrios examinados no presentaron estrato compacto ventricular. Respecto a este tema, es importante mencionar que en los peces se describen dos tipos de organización del miocardio. En el primero de ellos, el miocardio está compuesto por dos estratos: uno compacto ubicado en la periferia del miocardio, de grosor variable y con irrigación coronaria, y otro denominado esponjoso que está en contacto con el endocardio. El segundo tipo consiste en un miocardio compuesto sólo por estrato esponjoso (Santer *et al.*, 1983). Asimismo, los peces que no presentan estrato compacto ventricular, deben la mayoría del suministro de oxígeno y nutrientes del miocardio a la sangre contenida en la cavidad ventricular que fluye hacia las lagunas del estrato esponjoso. En cambio, los peces con mayor actividad física, como los salmones y los atunes, sí necesitan un estrato compacto con su propia circulación coronaria para satisfacer los requerimientos energéticos del miocardio (Farrel, 2011). De acuerdo a nuestros resultados, en la mayoría de los peces no se detectó estrato compacto ventricular y solamente se distinguió circulación coronaria en

la zona epicárdica ya fuere de atrio y/o de ventrículo. Por ende, el segundo tipo de organización del miocardio descrito corresponde a la arquitectura del miocardio observado en los congrios colorados muestreados y es concordante a lo comunicado por Sánchez-Quintana *et al.* (1995) para otros teleósteos con hábitos sedentarios. Esto, además, coincidiría con la actividad descrita para esta especie que, en general, incluye movimientos pesados y lentos en sus desplazamientos mediante natación y/o deslizamiento por el substrato de fondos rocosos (Mann, 1954). Esta información, hasta donde se sabe, correspondería a la primera descripción de la estructura del ventrículo en los congrios colorados.

Aunque todos los peces hayan resultado negativos a la presencia de PRV, se aporta información valiosa sobre la epidemiología de este virus y de su enfermedad asociada en Chile. Pese a que el tamaño de muestra no es suficiente para poder concluir que el agente en estudio no está infectando a los peces nativos de la Región de Coquimbo, sí se puede inferir que éste no se encontraría o tendría una muy baja prevalencia en los congrios que habitan la Península de Punta Lengua de Vaca. Por ende, probablemente, PRV no sea un agente infeccioso nativo de esa zona ni de la especie de peces estudiada.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este virus sí se ha detectado en un alto porcentaje de los centros de cultivo de salmón del Atlántico estudiados de la zona Sur de Chile. Por lo tanto, sería interesante estudiar el estado de los peces silvestres que habitan en las cercanías de estos centros y así, detectar si éstos se encuentran también infectados y si presentan lesiones asociables a HSMI. En caso de positividad, existirían dos posibles orígenes de la infección. En primer lugar, podría ser que este agente sea nativo de la zona Sur de la costa chilena y que no haya alcanzado la zona Norte del país. En segundo término, existe la posibilidad de que este virus haya ingresado al mar chileno debido a la introducción del salmón del Atlántico a Chile con fines productivos. De ser la segunda posibilidad el verdadero origen de la infección, ésta representaría un descubrimiento de importancia ecológica, puesto que se estaría exponiendo a la población de peces nativos de nuestro país a un agente exótico, pudiendo producir daños irreparables. Por lo tanto, se tendrían que buscar medidas apropiadas con el fin de erradicar o al menos controlar la

infección por este agente y así disminuir su impacto tanto en los peces silvestres como en los cultivados.

CONCLUSIONES

- Los congrios muestreados no estaban infectados por PRV.
- Los resultados sugieren que PRV estaría ausente en congrios colorados de la zona geográfica muestreada y que estas poblaciones de peces estarían libres de HSMI.
- Algunos peces presentaron lesiones cardíacas compatibles con HSMI, pero se descarta que hayan estado cursando dicha enfermedad debido a la ausencia de su agente causal (PRV).
- La mayoría de los peces estudiados presentaron alteraciones a nivel de tejido cardíaco, y en algunos casos de carácter bastante severo, por lo cual sería interesante realizar estudios adicionales para discernir las causas de estas anomalías.
- Se evidenció la presencia de folículos tiroideos contiguos al atrio, lo que correspondería a la primera descripción de estas estructuras anatómicas y su localización en congrios colorados.
- Se detectó la ausencia de estrato compacto del ventrículo en la mayoría de los congrios colorados estudiados, lo que sería coincidente con su estilo de vida relativamente sedentario.
- Sería útil extender estos estudios para establecer si este virus realmente aún no se encuentra en poblaciones de peces silvestres nativas de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

- **ALDRIN, M.; STORVIK, B.; FRIGESSI, A.; VILJUGREN, H.; JANSEN, P. A.** 2010. A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anaemia in marine fish farms in Norway. *Prev. Vet. Med.* 93(1):51-61.
- **AMIN, A. B.; POPPE, T. T.** 1989. Subendocardial fibroelastosis in Atlantic salmon: a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 9(4):86-87.
- **ANANDAKUMAR, P.; VANITHA, M. K.** 2014. Drug induced hepatotoxicity – A review. *Adv. J. Pharm. Life Sc. Res.* 2(4):39-45.
- **AVILÉS, S.** 1979. Peces. Congrio colorado, *Genypterus chilensis* (Guichenot) Teleostomi, Perciformes, Ophidiidae. **In:** IFOP. Estado actual de las principales pesquerías nacionales. Bases para un desarrollo pesquero. Santiago, Chile. CORFO. v.1. pp. 1-13 (citado por Chong, J.; González, P. 2009. Ciclo reproductivo y talla media de madurez del congrio colorado, *Genypterus chilensis* (Guichenot, 1881) en el litoral de Talcahuano, Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44(1):257-262).
- **AVMA. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION.** 2013. Part III – Methods of euthanasia by species and environment. S6.2.6 Finfish in particular environments. **In:** AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, Illinois, EE.UU. p. 72.
- **BALBOA, C. A.** 2012. Pesquisa de lesiones compatibles con la “Inflamación del músculo esquelético y cardíaco (HSMI)” en base a histología y RT-PCR en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) en cuatro centros de cultivo del Sur de Chile. Memoria de Título para optar al Título de Médico Veterinario. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile, Fac. Cs. Veterinarias, Inst. Patología Animal. 32 pp.

- **BAS, A.; FORSBERG, G.; HAMMARSTRÖM, S.; HAMMARSTRÖM, M.-L.**
2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 59:566-573.

- **CANNON, R. M.; ROE, R. T.**1982. *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians.* Australian Government Publishing Service. Canberra, Australia. 35 pp.

- **CARSTENS, E. B.; BALL, L. A.** 2009. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2008). *Arch. Virol.* 154(7):1181-1188.

- **CHIRICHIGNO, N.** 1974. Clave para identificar los peces marinos del Perú. Informe. Callao, Perú. IMARPE. 46: 1-109 (citado por Chong, J.; González, P. 2009. Ciclo reproductivo y talla media de madurez del congrio colorado, *Genypterus chilensis* (Guichenot, 1881) en el litoral de Talcahuano, Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44(1):257-262).

- **DYKOVÁ, I.** 2006. Phylum Microspora. **In:** Woo, P.T.K. *Fish diseases and disorders.* 2ª ed. CABI. King's Lynn, Reino Unido. v.1. pp. 205-229.

- **FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** 2012. Parte 1: Examen mundial de la pesca y la acuicultura. **In:** El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Dpto. de Pesca y Acuicultura de la FAO. ONU para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. pp. 3-114.

- **FARREL, A. P.** 2011. The coronary circulation. **In:** Farrel, A. P.; Stevens, E. D.; Cech, J. J. Jr.; Richards, J. G. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment.* Elsevier. Oxford, Reino Unido. v.1. pp. 1077-1084.

- **FERGUSON, H.** 2006. Cardiovascular system. **In:** Systemic Pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleosts and their response in disease. 2da ed. Scotian Press. Londres, Reino Unido. pp. 140-167.

- **FINSTAD, Ø. W.; FALK, K.; LØVOLL, M.; EVENSEN, Ø.; RIMSTAD, E.** 2012. Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). [en línea]. Vet. Res.43:27.
<<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1297-9716-43-27.pdf>>. [consulta: 09-07-2015].

- **FINSTAD, Ø. W.; DAHLE, M. K.; LINDHOLM, T. H.; NYMAN, I. B.; LØVOLL, M.; WALLACE, C.; OLSEN, C. M.; STORSET, A. K.; RIMSTAD, E.** 2014. Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. [en línea]. Vet. Res.45:35.
<<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1297-9716-45-35.pdf>>. [consulta: 09-07-2015].

- **FONSECA, D.; MATEUS, H.; CONTRERAS, N.** 2010. Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica. U. del Rosario. Bogotá, Colombia. 69 pp.

- **GARSETH, A. H.; BIERING, E.; AUNSMO, A.** 2013a. Associations between piscine reovirus infection and life history traits in wild-caught Atlantic salmon *Salmo salar* L. in Norway. Prev. Vet. Med. 112(1-2):138-146.

- **GARSETH, A. H.; FRITSVOLD, C.; OPHEIM, M.; SKJERVE, E.; BIERING, E.** 2013b. Piscine reovirus (PRV) in wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and sea-trout, *Salmo trutta* L., in Norway. J. Fish Dis. 36(5):483-493.

- **GARSETH, A.H.; EKREM, T.; BIERING, E.** 2013c. Phylogenetic evidence of long distance dispersal and transmission of piscine reovirus (PRV) between farmed and wild Atlantic salmon. [en línea]. PLOS ONE 8(12):e82202.
<<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0082202&representation=PDF>> [consulta: 04-08-2015].
- **GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A.** 2009a. Cardiovascular system and blood. **In:** Atlas of fish histology. Science Publishers. New Hampshire, EE.UU. pp. 47-56.
- **GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A.** 2009b. Reproductive system. **In:** Atlas of fish histology. Science Publishers. New Hampshire, EE.UU. pp. 159-175.
- **GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A.** 2009c. Endocrine glands. **In:** Atlas of fish histology. Science Publishers. New Hampshire, EE.UU. pp. 141-158.
- **GEORGE-NASCIMENTO, M.; HUET, B.** 1984. Una aproximación ecológica al estudio del parasitismo en el “congrío negro” *Genypterus maculatus* (Tschudi) (Pisces: Ophidiidae). Biol. Pesq.13:23-30.
- **KEY, T.; READ, J.; NIBERT, M. L.; DUNCAN, R.** 2013. Piscine reovirus encodes a cytotoxic, non-fusogenic, integral membrane protein and previously unrecognized virion outer-capsid proteins. J. Gen. Virol. 94(5):1039-1050.
- **KIBENGE, M. J. T.; IWAMOTO, T.; WANG, Y.; MORTON, A.; GODOY, M. G.; KIBENGE, F. S. B.** 2013. Whole-genome analysis of picine reovirus (PRV) shows PRV represents a new genus in family *Reoviridae* and its genome segment S1 sequences group it into two separate sub-genotypes. [en línea]. Virol. J. 10:230.
<<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1743-422X-10-230.pdf>>. [consulta: 09-07-2015].
- **KONGTORP, R. T.; KJERSTAD, A.; TAKSDAL, T.; GUTTVIK, A.; FALK, K.** 2004. Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a new infectious disease. J. Fish Dis. 27(6):351-358.

- **KOPPANG, E. O.; HAUGARVOLL, E.; HORDVIK, I.; AUNE, L.; POPPE, T. T.** 2005. Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., white muscle. *J. Fish Dis.* 28(1):13-22.

- **KRISTOFFERSEN, A. B.; JENSEN, B. B.; JANSEN, P. A.** 2013. Risk mapping of heart and skeletal muscle inflammation in salmon farming. *Prev. Vet. Med.* 109(1-2):136-143.

- **KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C.** 2013a. Cell injury, cell death, and adaptations. In: Robbins basic pathology. 9^a ed. Elsevier. Philadelphia, EE.UU. pp. 1-28.

- **KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C.** 2013b. Liver, gallbladder, and biliary tract. In: Robbins basic pathology. 9^a ed. Elsevier. Philadelphia, EE.UU. p. 603-644.

- **KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C.** 2013c. Inflammation and repair. In: Robbins basic pathology. 9^a ed. Elsevier. Philadelphia, EE.UU. pp. 29-73.

- **KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C.** 2013d. Hemodynamic disorders, thromboembolism, and shock. In: Robbins basic pathology. 9^a ed. Elsevier. Philadelphia, EE.UU. pp. 75-98.

- **LEVSEN, A.; BERLAND, B.** 2012. *Anisakis* species. In: Woo, P.T.K; Buchmann, K. Fish parasites. Pathobiology and protection. CABI. Londres, Reino Unido. pp. 298-309.

- **LORENZO, S.** 2000. Introducción. *Anisakis simplex*: taxonomía, ciclo biológico y morfología. In: *Anisakis* y alergia. U. de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España. pp. 5-15.

- **LØVOLL, M.; WIİK-NIELSEN, J.; GROVE, S.; WIİK-NIELSEN, C. R.; KRISTOFFERSEN, A. B.; FALLER, R.; POPPE, T.; JUNG, J.; PEDAMALLU, C. S.; NEDERBRAGT, A. J.; MEYERSON, M.; RIMSTAD, E.; TENGS, T.** 2010. A novel totivirus and piscine reovirus (PRV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with cardiomyopathy syndrome (CMS). [en línea]. Virol. J. 7:309.
<<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1743-422X-7-309.pdf>>. [consulta: 09-07-2015].

- **LØVOLL, M.; ALARCÓN, M.; JENSEN, B. B.; TAKSDAL, T.; KRISTOFFERSEN, A. B.; TENGS, T.** 2012. Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production. Dis. Aquat. Organ. 99(1):7-12.

- **MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J.** 2011. Pathogenesis of viral infections and diseases. **In:** Fenner's veterinary virology. 4ª ed. Elsevier. Oxford, Reino Unido. pp. 43-74.

- **MANN, G.** 1954. Segunda parte. Orden *Perciformes*. Familia *Ophidiidae*. **In:** Vida de los peces en aguas chilenas. 2da ed. Instituto de Investigaciones Veterinarias, Ministerio de Agricultura. U. Chile, Fac. de Filosofía y Educación. Santiago, Chile. pp. 284-286.

- **MARKUSSEN, T.; DAHLE, M. K.; TENGS, T.; LØVOLL, M.; FINSTAD, Ø. W.; WIİK-NIELSEN, C. R.; GROVE, S.; LAUKSUND, S.; ROBERTSEN, B.; RIMSTAD, E.** 2013. Sequence analysis of the genome of piscine orthoreovirus (PRV) associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in Atlantic salmo (*Salmo salar*). [en línea] PLOS ONE 8(7):e70075.
<[http://www.researchgate.net/profile/Maria_Dahle/publication/255695795_Sequence_Analysis_of_the_Genome_of_Piscine_Orthoreovirus_\(PRV\)_Associated_with_Heart_and_Skeletal_Muscle_Inflammation_\(HSMI\)_in_Atlantic_Salmon_\(Salmo_salar\)/links/00b7d51fd278c76890000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Maria_Dahle/publication/255695795_Sequence_Analysis_of_the_Genome_of_Piscine_Orthoreovirus_(PRV)_Associated_with_Heart_and_Skeletal_Muscle_Inflammation_(HSMI)_in_Atlantic_Salmon_(Salmo_salar)/links/00b7d51fd278c76890000000.pdf)>. [consulta: 04-08-2015].

- **MARTY, G. D.; MORRISON, D. B.; BIDULKA, J.; JOSEPH, T.; SIAH, A.**
2014. Piscine reovirus in wild and farmed salmonids in British Columbia, Canada: 1974-2013. *J. Fish Dis.* 38(8):713-728.

- **MIKALSEN, A. B.; HAUGLAND, O.; RODE, M.; SOLBAKK, I. T.; EVENSEN, O.** 2012. Atlantic salmon reovirus infection causes a CD8 T cell myocarditis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). [en línea]. *PLOS ONE* 7(6):e37269.
<<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0037269&representation=PDF>>. [consulta: 04-08-2015].

- **MÓLNAR, K.** 2005. Apicomplexa (sporozoans). **In:** Rhode, K. *Marine parasitology*. CSIRO. Collingwood, Australia. pp. 26-29.

- **MUÑOZ, G.; OLMOS, V.** 2007. Revisión bibliográfica de especies ectoparásitas y hospedadoras de sistemas acuáticos de Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 42(2):89-148.

- **NAGASAWA, K.** 2005. Anisakiasis. **In:** Rohde, K. *Marine parasitology*. CSIRO. Collingwood, Australia. pp. 430-434.

- **PALACIOS, G.; LOVOLL, M.; TENGS, T.; HORNING, M.; HUTCHISON, S.; HUI, J.; KOGTORP, R.-T.; SAVJI, N.; BUSSETTI, A. V.; SOLOVYOV, A.; KRISTOFFERSEN, A. B.; CELONE, C.; STREET, C.; TRIFONOV, V.; HIRSCHBERG, D. L.; RABADAN, R.; EGHOLM, M.; RIMSTAD, E.; LIPKIN, W. I.** 2010. Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. [en línea]. *PLOS ONE* 5(7):e11487.
<<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0011487&representation=PDF>>. [consulta: 04-08-2015].

- **QIAGEN.** 2012. Quick-Start Protocol. Hialden, Alemania.

- **ROBERTS, R. J.** 2012. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts.
In: Fish pathology. 4^a ed. Wiley-Blackwell. Chinchester, Reino Unido. pp. 62-143.
- **SANCHEZ-QUINTANA, D.; GARCIA-MARTINEZ, V.; CLIMENT, V.;**
HURLE, J. M. 1995. Morphological analysis of the fish heart ventricle: myocardial and connective tissue architecture in teleost species. *Ann. Anat.* 177(3):267-274.
- **SANTER, R. M.; GREER WALKER, M.; EMERSON, L.; WITTHAMES, P. R.**
1983. On the morphology of the heart ventricle in marine teleost fish (*Teleostei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 76A(3):453-457.
- **SATO, S.; BURGESS, S. B.; MCLLWAIN, D. L.** 1994. Transcription and motoneuron size. *J. Neurochem.* 63(5):1609-1615.
- **SCHMIDT, E. E.; SCHIBLER, U.** 1995. Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP. *J. Cell Biol.* 128(4):467-483.
- **SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA.** 2006.
Anuario estadístico de pesca 2005. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Gobierno de Chile. Valparaíso, Chile. 210 pp.
- **SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA.**
2011. Informe técnico. Avance de estudio sobre detección de piscine reovirus y totivirus asociados a patologías cardíacas en la salmicultura. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Gobierno de Chile. Valparaíso, Chile. 2 pp.
- **TORRES, P.; MOYA, R.; LAMILLA, J.** 2000. Nematodos anisákidos de interés en salud pública en peces comercializados en Valdivia, Chile. *Arch. Med. Vet.* 32(1):107-113.
- **TRIGO, F. J.** 1998a. Aparato cardiovascular. In: Patología sistémica veterinaria. 3^a ed. McGraw-Hill Interamericana. D.F., México. pp. 1-32.

- **TRIGO, F. J.** 1998b. Aparato digestivo. **In:** Patología sistémica veterinaria. 3^a ed. McGraw-Hill Interamericana. D.F., México. pp. 85-122.
- **UMEHARA, A.; KAWAKAMI, Y.; MATSUI, T.; ARAKI, J.; UCHIDA, A.** 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. Parasitol. Int. 55(4):267-271.
- **VILLAR, J.; DÍAZ, S.; GARCÍA, J. M.** 1996. Granulomatosis hepática. **In:** Herrería, J. M.; Díaz, A.; Jiménez, M. Tratado de hepatología. U. de Sevilla. Sevilla, España. v.2. pp. 685-692.
- **WIIK-NIELSEN, C. R.; LØVOLL, M.; SANDLUND, N.; FALLER, R.; WIIK-NIELSEN, J.; JENSEN, B. B.** 2012a. First detection of piscine reovirus (PRV) in marine fish species. Dis. Aquat. Org. 97(3):255-258.
- **WIIK-NIELSEN, C. R.; SKI, P.-M. R.; AUNSMO, A.; LØVOLL, M.** 2012b. Prevalence of viral RNA from piscine reovirus and piscine myocarditis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish and progeny. J. Fish Dis. 35(2):169-171.
- **YOUSAF, M. N.; KOPPANG, E. O.; SKJØDT, K.; KÖLLNER, B.; HORDVIK, I.; ZOU, J.; SECOMBES, C.; POWELL, M. D.** 2012. Cardiac pathological changes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). Fish Shellfish Immunol. 33(2):305-315.

ANEXOS

Tabla N° 1: Alteraciones macroscópicas observadas en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)

		Congrio colorado n°														
Alteraciones macroscópicas	Zona	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
	Corazón															
Pigmentación oscura en superficie del corazón	Atrio					+										
	Ventrículo			+						++						
Hidropericardio							+++					+	++	+		
	Otros órganos															
Ascitis													++	+		
Presencia de nemátodos en túnica serosa	Estómago						+									
	Hígado								+							
Hígado pálido				++	++	++										
Hígado con una zona congestiva														++		

- Pigmentación oscura en corazón: leve (+), moderada (++) y severa (+++) de acuerdo a la extensión de la lesión según el consenso de tres observadores diferentes
- Hidropericardio: leve (+), moderado (++) y severo (+++) de acuerdo al consenso de tres observadores diferentes
- Ascitis: leve (+), moderada (++) y severa (+++) de acuerdo al consenso de tres observadores diferentes
- Nemátodos: parásitos se sitúan en la túnica serosa de 1 órgano (+), parásitos se sitúan en la túnica serosa de 2-3 órganos (++) , parásitos se sitúan en la túnica serosa de más de 3 órganos (+++)
- Hígado pálido: leve (+), moderado (++) y severo (+++) de acuerdo al consenso de tres observadores diferentes
- Hígado con una zona congestiva: zona congestiva abarca una pequeña porción de la superficie del hígado (+), zona congestiva abarca hasta la mitad de la superficie del hígado (++) , zona congestiva abarca más de la mitad de la superficie del hígado (+++)
- Espacio en blanco: no se detectó lesión en el individuo muestreado

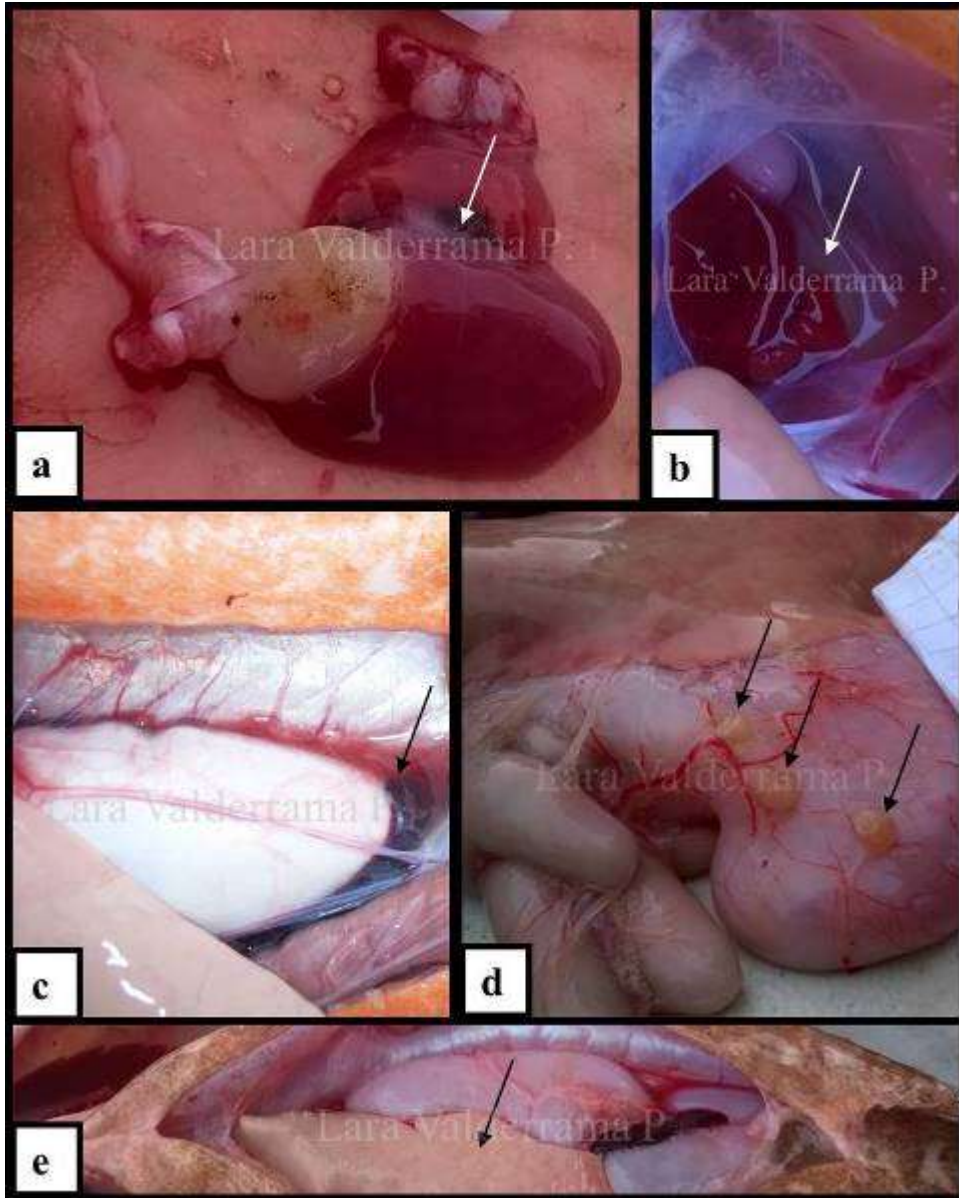


Figura N° 1: Fotografías de las principales lesiones macroscópicas observadas en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)

- a:** Congrio colorado V. Pigmentación oscura leve (flecha blanca) en atrio
- b:** Congrio colorado VI. Hidropericardio severo (flecha blanca)
- c:** Congrio colorado XII. Ascitis moderada (flecha negra)
- d:** Congrio colorado VI. Nemátodos adheridos a la túnica serosa del estómago (flechas negras)
- e:** Congrio colorado III. Hígado pálido moderado (flecha negra)

Tabla N° 2: Alteraciones cardíacas microscópicas observadas en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)

Lesiones microscópicas	Zona	Congrio colorado n°														
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Infiltración de células mononucleares en atrio	Miocardio			++			+		+							
Infiltración de células mononucleares en ventrículo	Epicardio		++			++	++	+								
	Miocardio					+	++	++	+	+	++	+	+	++	+	
Presencia de trombos en epicardio	Atrio			+++		++										
	Ventrículo			+		++										
	Bulbo arterioso				+											
Vacuolización en ventrículo	Endocardio		+			+	+							+	+	+
	Miocardio			+			+				+			+	++	
	Macrófagos							+								
Infiltración de melanomacrófagos en miocardio	Atrio			++					+		+					
	Ventrículo						+	+								

Continuación Tabla N° 2: Alteraciones cardíacas microscópicas observadas en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)

Lesiones microscópicas	Zona	Congrio colorado n°														
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Infiltración de células eosinofílicas granulares en atrio	Miocardio			+				+								
Infiltración de células eosinofílicas granulares en ventrículo	Epicardio					++										
	Miocardio					++		+								
Infiltración de fibroblastos en ventrículo	Epicardio					++										
	Miocardio					++										
Fibras musculares en degradación	Atrio										+					
	Ventrículo						+		+				+			
Fibras musculares elongadas	Ventrículo						+									
Ruptura de fibras musculares	Ventrículo						+		+				+	+	+	
Fibrosis	Miocardio ventrículo					++										
Endocarditis	Atrio			+												

Continuación Tabla N° 2: Alteraciones cardíacas microscópicas observadas en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)

Lesiones microscópicas	Zona	Congrio colorado n°														
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Epicarditis	Ventrículo					++										
Hemorragia	Miocardio ventrículo													+		
Posible xenoma adherido a pared de arteriola	Epicardio ventrículo				+											
Granuloma con espacio central	Miocardio ventrículo						+									
Posible quiste parasitario	Miocardio ventrículo										+					
Posible protozoo intracelular	Miocardio ventrículo															+
Engrosamientos subendocárdicos y núcleos prominentes del endocardio	Atrio	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Ventrículo	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

- Infiltración de células mononucleares: 1-5 focos de 5-50 células (+), 6 o más focos de 5-50 células o 1-5 focos de 51-100 células (++), 6 o más focos de 51-100 células o 1 o más focos de más de 100 células (+++)
- Presencia de trombos: 1-2 trombos (+), 3-7 trombos (++), más de 7 trombos (+++)
- Zonas con vacuolización: 1-5 zonas (+), 6-10 zonas (++), más de 10 zonas (+++)
- Infiltración de melanomacrófagos: 1-3 focos de 1-9 células (+), 4 o más focos de 1-9 células o 1-3 focos de 10-50 células (++), 4 o más focos de 10-50 células o 1 o más focos de más de 50 células (+++)
- Infiltración de células eosinofílicas granulares: 1-2 focos de 1-5 células (+), 3 o más focos de 1-5 células o 1-2 focos de 6-20 células (++), 3 o más focos de 6-20 células o 1 o más focos de más de 20 células (+++)
- Infiltración de fibroblastos: 1-2 focos de 1-10 células (+), 3 o más focos de 1-10 células o 1-2 focos de 11-50 células (++), 3 o más focos de 11-50 células o 1 o más focos de más de 50 células (+++)
- Zonas con fibras musculares en degradación: 1-3 zonas (+), 4-10 zonas (++), más de 10 zonas (+++)
- Zonas con fibras musculares elongadas: 1-3 zonas (+), 4-10 zonas (++), más de 10 zonas (+++)
- Zonas con ruptura de fibras musculares: 1-3 zonas (+), 4-10 zonas (++), más de 10 zonas (+++)
- Fibrosis: de acuerdo a la intensidad de la infiltración de células en la lesión, presencia de fibrina y extensión de la lesión según el consenso de dos observadores diferentes
- Endocarditis: de acuerdo a la intensidad de la infiltración de células en la lesión, presencia de fibrina y extensión de la lesión según la observación de dos observadores diferentes
- Epicarditis: de acuerdo a la intensidad de la infiltración de células en la lesión, angiogénesis, engrosamiento epicárdico y presencia de fibrina de acuerdo al consenso de dos observadores diferentes

- Hemorragia: de acuerdo a la extensión de la lesión de un foco único según el consenso de dos observadores diferentes
- Posible xenoma (px): 1 px (+), 2-5 pxs (++), más de 5 pxs (+++)
- Granuloma con espacio central: 1 granuloma (+), 2-5 granulomas (++), más de 5 granulomas (+++)
- Posible quiste parasitario: 1 quiste (+), 2-5 quistes (++), más de 5 quistes (+++)
- Posible protozoo intracelular (pi): 1 pi (+), 2-5 pis (++), más de 5 pis (+++)
- Engrosamientos subendocárdicos y núcleos prominentes: poco frecuente y abarca una pequeña proporción del endocardio (+), frecuente y abarca una proporción importante del endocardio (++), muy frecuente y abarca la totalidad del endocardio (+++). Estos criterios corresponden al consenso de las conclusiones de dos observadores independientes.
- Espacio en blanco: no se detectó lesión en el individuo muestreado

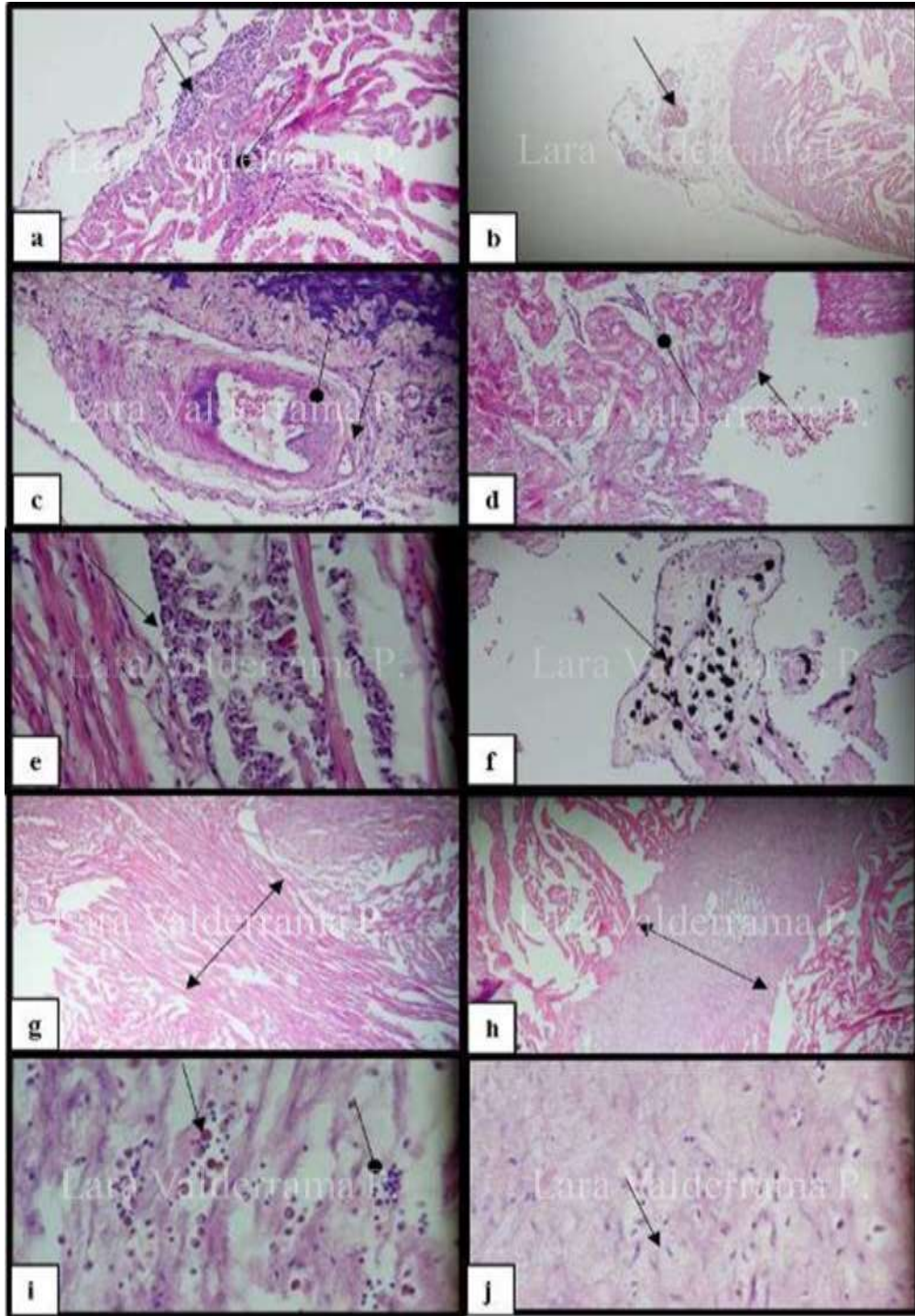
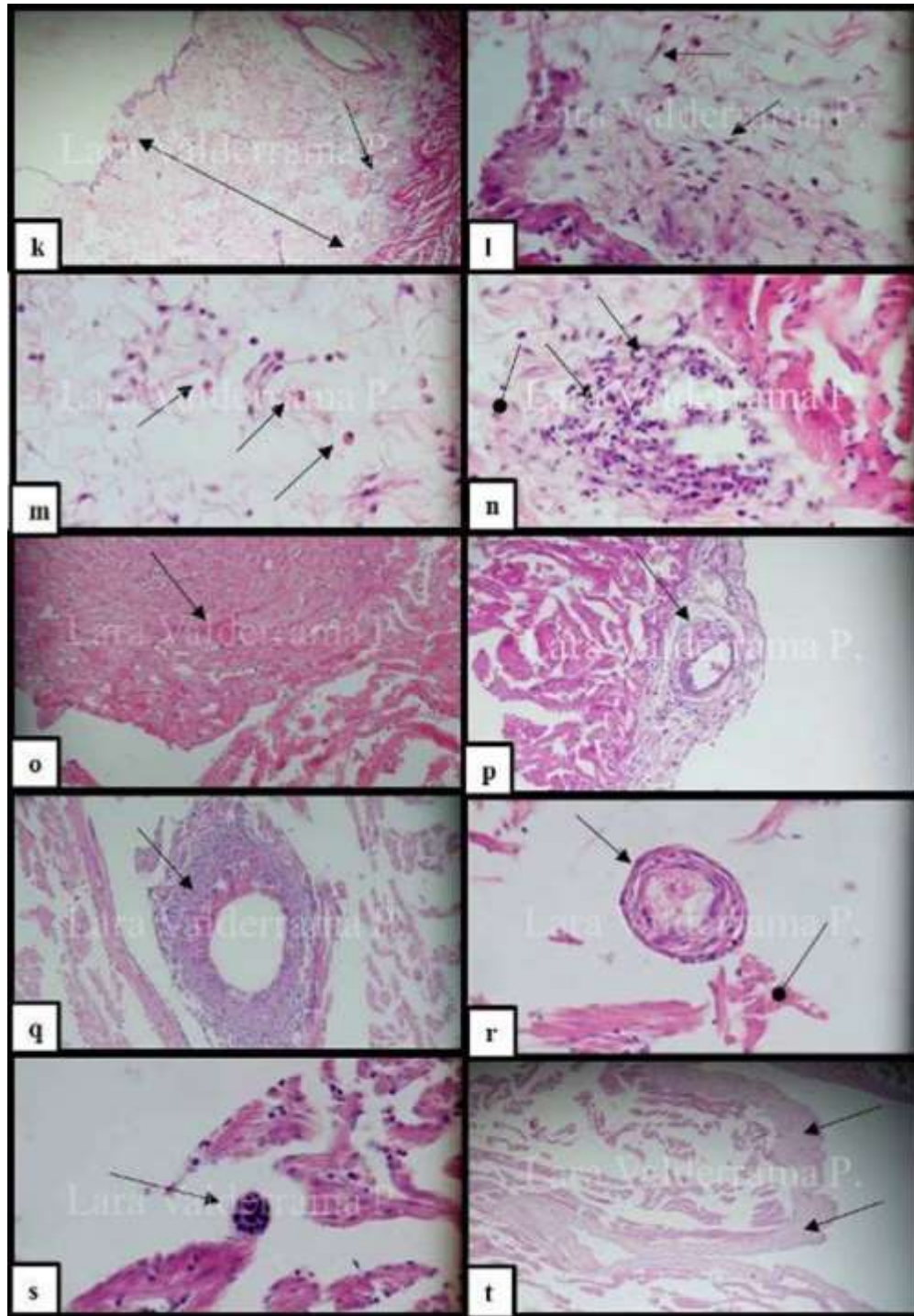
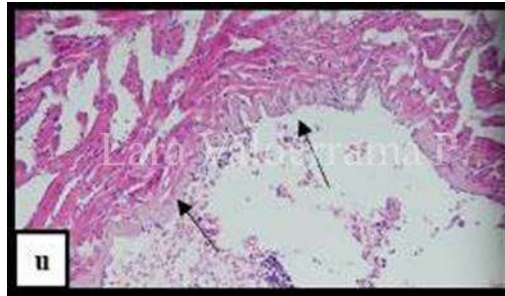


Figura N° 2: Fotografías de las principales alteraciones cardíacas microscópicas observadas en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)



Continuación Figura N° 2: Fotografías de las principales alteraciones cardíacas microscópicas observadas en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)



Continuación Figura N° 2: Fotografías de las principales alteraciones cardíacas microscópicas observadas en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)

a: Congrio colorado VI, 400x. Focos moderados de células mononucleares en el epicardio (flecha negra) y en el miocardio (flecha con punta circular) del ventrículo

b: Congrio colorado III, 100x. Trombo de macrófagos con hemosiderina (flecha negra) en vena del epicardio del ventrículo

c: Congrio colorado IV, 400x. Trombo antiguo endotelializado (flecha con punta circular) en arteriola del epicardio del bulbo arterioso, esta arteriola posee un *vaso vasorum* (flecha negra)

d: Congrio colorado VI, 400x. Endocardio (flecha negra) y miocardio (flecha con punta circular) del ventrículo vacuolizados

e: Congrio colorado VII, 1.000x. Macrófagos vacuolizados (flecha negra) entre fibras musculares del ventrículo

f: Congrio colorado III, 400x. Infiltración moderada de melanomacrófagos (flecha negra) en miocardio del atrio

g: Congrio colorado VI, 100x. Fibras musculares elongadas (flecha con dos puntas) en miocardio del ventrículo

h: Congrio colorado V, 100x. Fibrosis (flecha con dos puntas) en miocardio del ventrículo

i: Congrio colorado V, 1.000x. Infiltración moderada de células eosinofílicas granulares (flecha negra) e infiltración leve de células mononucleares (flecha con punta circular) en fibrosis del miocardio del ventrículo

- j:** Congrio colorado V, 1.000x. Infiltración moderada de fibroblastos (flecha negra) en fibrosis del miocardio del ventrículo
- k:** Congrio colorado V, 100x. Epicardio del ventrículo engrosado (flecha con dos puntas) y angiogénesis (flecha negra)
- l:** Congrio colorado V, 1.000x. Infiltración moderada de fibroblastos (flechas negras) en epicardio del ventrículo
- m:** Congrio colorado V, 1.000x. Infiltración moderada de células eosinofílicas granulares (flechas negras) en el epicardio del ventrículo
- n:** Congrio colorado V, 1.000x. Infiltración moderada de células mononucleares (flechas negras) y presencia de fibras de colágeno (flecha con punta circular) en el epicardio del ventrículo
- o:** Congrio colorado XIII, 400x. Hemorragia leve (flecha negra) en el miocardio del ventrículo
- p:** Congrio colorado IV, 400x. Posible xenoma (flecha negra) adosado en la pared de una arteriola en el epicardio del ventrículo
- q:** Congrio colorado VI, 400x. Posible granuloma con un espacio en su centro (flecha negra) localizado en el miocardio ventricular
- r:** Congrio colorado X, 1.000x. Posible quiste parasitario (flecha negra) rodeado por miofibrillas rotas del ventrículo (flecha con punta circular)
- s:** Congrio colorado XV, 1.000x. Posible protozoo intracelular (flecha negra) en ventrículo
- t:** Congrio colorado VIII, 100x. Engrosamiento subendocárdico y núcleos prominentes (flechas negras) del endocardio asociado en atrio
- u:** Congrio colorado VII, 400x. Engrosamiento subendocárdico y núcleos prominentes (flechas negras) del endocardio asociado en ventrículo

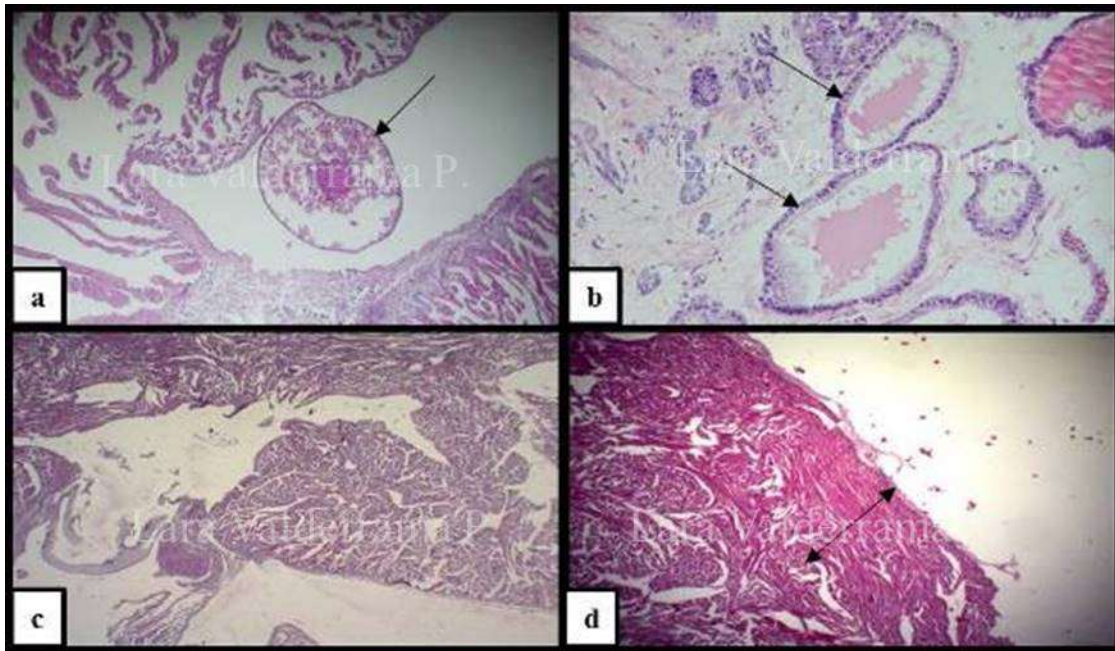


Figura N° 3: Fotografías de los principales hallazgos cardíacos sin significancia patológica observados al microscopio óptico en congrios colorados (*Genypterus chilensis*)

a: Congrio colorado VI, 100x. Ova (flecha negra) adyacente al corazón

b: Congrio colorado XIII, 400x. Folículos tiroideos con material coloidal en su centro (flechas negras) contiguos al atrio

c: Congrio colorado I, 200x. Ventrículo sin estrato compacto

d: Congrio colorado II, 200x. Ventrículo con estrato compacto delgado (flecha con dos puntas)

Tabla N° 3: Concentración de ARN y valor medio de Ct para el gen *housekeeping 18s* ribosomal en muestras de riñón anterior de congrios colorados (*Genypterus chilensis*)

N° identificador de cada pez	Cantidad de ARN (ng/μL)	Valor medio Ct para gen <i>housekeeping 18s</i> ribosomal
I	177,6	15,3
II	227,5	15,3
III	277	14,6
IV	181,3	14,4
V	244,1	15,2
VI	137,4	15,1
VII	143,9	15,1
VIII	84,8	14,7
IX	158,5	15,2
X	142	14,3
XI	120,8	15,3
XII	202,3	15,0
XIII	117,9	15,1
XIV	S.D. ¹	S.D. ¹
XV	193,5	14,6

¹ Sin dato: el informe enviado por la U.S.G.S. no incluyó los valores para el congrio colorado XIV

Tabla N° 4: Talla aproximada de congrios colorados (*Genypterus chilensis*)¹

Congrio colorado n°	Talla aproximada en cm
I	40,8
II	S.R. ²
III	56
IV	49
V	70
VI	40,3
VII	58
VIII	39,7
IX	56
X	43,7
XI	51,3
XII	53,7
XIII	58,8
XIV	58,3
XV	53,7
Promedio (desviación estándar)	53 (8,7)

¹Medida desde la punta de la boca hasta la bifurcación de la cola.

² S.R.: Sin registro confiable.