



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

Revisión bibliográfica sobre *Piscirickettsia salmonis* y propuesta de un modelo experimental para evaluar la unión del patógeno a plásticos de uso común en la salmonicultura en condiciones de campo.

DIEGO ESTEBAN MATURANA GUTIÉRREZ

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

PROFESOR GUÍA: Dr. Julio Larenas Herrera

Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de enfermedades de especies
hidrobiológicas.

SANTIAGO, CHILE

2023.



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

Revisión bibliográfica sobre *Piscirickettsia salmonis* y propuesta de un modelo experimental para evaluar la unión del patógeno a plásticos de uso común en la salmonicultura en condiciones de campo.

DIEGO ESTEBAN MATURANA GUTIÉRREZ

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

Nota Final

Prof. Guía: Julio Larenas Herrera	Firma
Profesor Corrector: Eduardo Kessi Campos	Firma
Profesor Corrector: Andrónico Neira Carrillo	Firma.....

SANTIAGO, CHILE

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi mismo, por no rendirme y seguir adelante en los momentos de dudas e inseguridad. También a mi familia y pareja que estuvieron conmigo a lo largo de toda la carrera apoyándome como los pilares fundamentales de mi vida y desarrollo profesional.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. Contexto nacional	8
2.2. Generalidades de <i>P. salmonis</i>	8
2.2.1. Agente etiológico	8
2.2.2. Distribución geográfica	9
2.2.3. Sintomatología	9
2.2.4. Tratamientos	10
2.2.5. Métodos de detección de <i>P. salmonis</i>	11
2.2.6. Patogenia de la piscirickettsiosis	11
2.2.7. Transmisión	12
2.3. Adhesión de bacterias patógenas marinas	13
2.3.1. Adhesión de <i>P. salmonis</i>	15
2.4. Generalidades de los polímeros artificiales	16
2.4.1. Principales polímeros artificiales utilizados en centros de cultivo de salmones en Chile	17
2.5. Modelos experimentales de adhesión con <i>Piscirickettsia salmonis</i>	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Materiales	21
4.1.1. Recopilación de información	21
4.1.2. Motores de búsqueda	21

4.1.3. Palabras Clave	21
4.1.4. Operadores de búsqueda	21
4.2. Métodos	22
4.2.1. Recopilación de antecedentes contextuales	22
4.2.2. Organización de antecedentes y redacción	23
4.2.3. Fuentes de publicaciones consultadas	23
4.2.4. Criterios de exclusión de información	23
4.2.5. Base de la propuesta experimental	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Análisis de los antecedentes bibliográficos relacionados con los diferentes métodos de estudio de adhesión en superficies abióticas y bióticas de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	25
5.1.1. Método PRISMA	27
5.2. Principales plásticos y sus características físico- químicas utilizados en la salmonicultura en Chile en condiciones de crianza en jaula en mar y estuario	29
5.3. Propuesta de un modelo experimental de campo para estudiar la adhesión de la bacteria a algunos materiales plásticos utilizados en la salmonicultura	30
5.3.1. Sustratos de adhesión	31
5.3.2. Condiciones del modelo	32
5.3.3. Retiro de las muestras y análisis	33
6. DISCUSIÓN	37
7. CONCLUSIONES	41
8. BIBLIOGRAFÍA	42
9. ANEXOS.....	48

RESUMEN

La piscirickettsiosis es la enfermedad que provoca mayor mortalidad y pérdidas económicas en la industria de la salmonicultura de Chile. Dicha enfermedad es provocada por la bacteria gramnegativa *Piscirickettsia salmonis* la cual, al infectar a los peces puede causar cuadros hemorrágicos, anemia severa y necrosis de diversos órganos y tejidos. Actualmente, la vacunación como medida de prevención no ha demostrado una eficacia de protección, por lo cual los tratamientos con antimicrobianos como florfenicol y oxitetraciclina se han constituido en un modo de controlar y evitar la diseminación de un brote, lo que conlleva a un problema de certificación de la calidad en el producto de exportación.

Si bien se conocen algunos aspectos de la patogenia de piscirickettsiosis en los peces, son escasos los estudios de supervivencia del agente etiológico en condiciones ambientales fuera de un hospedador. Al respecto, en base a algunos experimentos realizados en condiciones *in vitro*, así como de campo, se han establecido algunos sustratos, tanto bióticos (branquias, ovas, piel de trucha arcoíris y conchas de *Mytilus chilensis*) como abióticos (vidrio y polímeros artificiales) a los que *P. salmonis* demuestra adhesión, lo cual ha sido detectado mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (MEB) y PCR anidado.

Debido a la capacidad de la bacteria de adherir a polímeros y que estos se encuentran presentes en los materiales de centros de cultivo de salmones los que se encuentran en constante contacto con microorganismos marinos, se realizó una revisión bibliográfica sobre los polímeros utilizados en salmonicultura y los métodos de estudio y adhesión de *P. salmonis*. Producto de lo anterior, en la presente memoria se propone un modelo experimental utilizando cuatro polímeros artificiales (HDPE, PA, PVC y PTFE) y conchas de *M. chilensis*. Estos materiales serán mantenidos en el mar en un centro de cultivo, durante 7, 60 y 90 días post un brote de piscirickettsiosis. El método de detección de la adhesión será mediante la técnica de PCR anidado.

El presente trabajo puede ser utilizado como base para otros modelos de adhesión ya sea en aguas estuarinas o mar, con diversos polímeros de sustrato o interviniendo las propiedades fisicoquímicas de estos y observar como se manifiesta en la adhesión de *P. salmonis*.

ABSTRACT

Piscirickettsiosis is the disease that causes the highest mortality and economic losses in the Chilean salmon farming industry. This disease is caused by the gram-negative bacterium *Piscirickettsia salmonis* which, when infecting fish, can cause hemorrhagic symptoms, severe anemia and necrosis of various organs and tissues. Currently, vaccination as a preventive measure has not shown protective efficacy, for which reason antimicrobial treatments such as florfenicol and oxytetracycline have become a way to control and prevent the spread of an outbreak, which leads to a problem of quality certification in the export product.

Although some aspects of the pathogenesis of piscirickettsiosis in fish are known, studies on the survival of the etiological agent under environmental conditions outside of a host are scarce. In this regard, based on some experiments carried out under in vitro conditions, as well as in the field, some substrates have been established, both biotic (gills, eggs, rainbow trout skin and *Mytilus chilensis* shells) and abiotic (glass and artificial polymers). to which *P. salmonis* demonstrates adhesion, which has been detected using scanning electron microscopy (SEM) and nested PCR.

Due to the ability of the bacteria to adhere to polymers and that these are present in the materials of salmon farms, which are in constant contact with marine microorganisms, a bibliographic review was carried out on the polymers used in salmon farming and the study methods and adherence of *P. salmonis*. As a result of the above, in this report an experimental model is proposed using four artificial polymers (HDPE, PA, PVC and PTFE) and *M. chilensis* shells. These materials will be kept in the sea in a culture center, for 7, 60 and 90 days after a piscirickettsiosis outbreak. The adhesion detection method will be through the nested PCR technique.

This work can be used as a basis for other adhesion models, either in estuarine or sea waters, with various substrate polymers or by intervening in their physicochemical properties and observing how it manifests in the adhesion of *P. salmonis*.

1. INTRODUCCIÓN

Piscirickettsia salmonis es una bacteria patógena responsable de provocar la piscirickettsiosis o septicemia rickettsial del salmón (SRS), siendo ésta la enfermedad de mayor mortalidad en salmones de cultivo lo que produce las mayores pérdidas económicas anuales de la industria pesquera del país (700 millones de dólares aproximadamente). Los principales costos económicos se deben, por una parte, a la ineficacia de los tratamientos, a la muerte de salmones y a la pérdida de la calidad del producto final. Sumado a lo anterior, cabe señalar que las vacunaciones han sido poco efectivas al utilizar antimicrobianos como tratamiento (SERNAPESCA, 2018).

Los estudios realizados sobre la sobrevivencia y transmisión de *P. salmonis* fuera de su hospedero solo han sido realizados en condiciones *in vitro*, revelando que la bacteria es capaz de adherirse a diversos sustratos como conchas de choritos, ovas de salmón, vidrio y algunos plásticos. Además, se ha demostrado que en algunos casos la bacteria se puede liberar desde el material donde se adhirió. Ello ha sugerido, a partir de la extrapolación de dichos estudios que, en condiciones de campo, las conchas de choritos y ciertos polímeros sintéticos de uso común en centros de cultivo de salmones como los utilizados en infraestructura, balsas y materiales de trabajo, también pueden ser reservorios de la bacteria.

Muchas bacterias ambientales y patógenas, por ejemplo, la *Pseudomonas aeruginosa*, produce *biofilms* como una estrategia de supervivencia. Al respecto, existen estudios que demostraron la producción de *biofilms* por *P. salmonis*, dando lugar a la hipótesis de que podría prolongar la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente. Sin embargo, la evidencia sobre el ciclo de vida de *P. salmonis* tanto en condiciones de campo como *in vitro* son escasas y no han podido esclarecer en su totalidad las estrategias de supervivencia y diseminación de la bacteria fuera de un hospedero.

La presente memoria tuvo por objetivo, en primer lugar, realizar una revisión de antecedentes bibliográficos sobre la adherencia de *P. salmonis* en superficies bióticas y abióticas y proponer un modelo de investigación de campo utilizando polímeros sintéticos en centros de engorda de salmones.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contexto nacional

En la industria salmonícola nacional, la enfermedad que causa mayor impacto económico y mortalidad en salmones, es la piscirickettsiosis o también denominada septicemia rickettsial salmonídea (SRS), la cual fue descrita por primera vez el año 1989 durante un brote en los centros de cultivo de salmones en el canal de Huito, Región de Los Lagos en Chile. Durante el brote de 1989 fue afectado principalmente el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), pudiendo aislarse el agente etiológico, *Piscirickettsia salmonis*, que había provocado una mortalidad entre el 30% y 90% de esta especie. Hoy en día, se ha descrito la infección en todos los salmones cultivados en Chile como: chinook (*O. tshawytscha*), coho, del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*O. mykiss*). También existe evidencia que esta bacteria infecta a peces no salmónidos como el róbalo (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Atractoscion nobilis*), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) y tilapia de mentón negro (*Sarotherodon melanotheron*); así como en especies chilenas nativas tales como el róbalo patagónico (*Eleginops maclovinus*), pejerrey (*Odontesthes regia*), falso jacobever (*Sebastes capensis*) y el bacalao criollo (*Salilota australis*) (Bravo y Campos, 1989; Fryer *et al.*, 1990; Mauel *et al.*, 2003; Athanapoulou *et al.*, 2004; Arkush *et al.*, 2005; Contreras-Lynch *et al.*, 2015).

2.2. Generalidades sobre *P. salmonis*

2.2.1. Agente etiológico

Piscirickettsia salmonis es una bacteria gramnegativa, patógena, no encapsulada, de un tamaño entre 0,5 a 1,5 μm , pleomórfica, pero predominantemente cocoide e intracelular facultativa. Fue clasificada inicialmente en la clase de las Proteobacteria- α , familia de *Rickettsiaceae*, referida como “rickettsia-like” por su similitud morfológica con otros miembros de esa familia. Posteriormente, mediante el uso de métodos basados en la secuencia de RNA ribosomal 16S, clasificaron a la bacteria en la clase Proteobacteria- γ ,

orden *Thiotrichales* y se le asignó un nuevo género *Piscirickettsia* y especie *salmonis* (Fryer *et al.*, 1990; Mauel *et al.*, 1996; Fryer y Hedrick, 2003).

Inicialmente se pensaba que la bacteria era intracelular obligada debido a que sólo era posible de cultivar en condiciones *in vitro*, principalmente en líneas celulares derivadas de peces, tales como: CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo Cells), SHK-1 (Salmon Head Kidney), EPC (*Epithelioma papulosum Cyprini*), BB (Brown Bullhead Catfish), RTS-11 (Rainbow Trout Spleen). Sin embargo, actualmente existen registros sobre cultivos celulares de *P. salmonis* libres de células que utilizan sangre de oveja o salmones, suero fetal bovino, glucosa y altos niveles de L-cisteína (Mauel *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2012).

2.2.2. Distribución geográfica y presentación

Desde su primera descripción en el brote de Huito, en el año 1989; a partir del año 1992, *P. salmonis* ha sido descrita en Irlanda, Noruega, Escocia, las costas Pacíficas y Atlánticas de Canadá y recientemente en Turquía y Estados Unidos. Cabe señalar, sin embargo, que la piscirickettsiosis no ha tenido el mismo impacto económico ni la misma mortalidad en estos países del hemisferio norte (SERNAPESCA, 2012).

En general la enfermedad se presenta en agua salada o estuarina principalmente en otoño y comienzos de invierno, con temperaturas acuáticas entre 12 y 16 °C. También se puede presentar un segundo aumento de contagios a comienzos de la primavera, según ha podido constatar el Servicio Nacional de Pesca (2012).

2.2.3. Sintomatología

Las infecciones naturales y experimentales de peces son a menudo asintomáticas y tienen una alta tasa de mortalidad. Los síntomas (inespecíficos) y mortalidad comienzan a aparecer de 6 a 12 semanas después de que los *smolts* son trasladados a los sistemas de engorda en agua salada o estuarina. Se ha observado en los peces síntomas de letargia, anorexia, oscurecimiento de la piel, dificultad respiratoria y comportamiento errático y nado superficial (Branson y Nieto, 1991; Almendras y Fuentealba, 1997; Lannan *et al.*, 1999; Cabello y Godfrey, 2019).

2.2.4. Tratamientos y manejos

Actualmente, los tratamientos contra la piscirickettsiosis consisten en altas dosis de antimicrobianos, principalmente florfenicol y oxitetraciclina ya que son liposolubles y presentan un alto volumen de distribución. La cantidad de principio activo utilizado anualmente ha ido decreciendo, sin embargo, los resultados están lejos de ser efectivos (Tabla 1). Las vacunas contra *P. salmonis*, no han logrado prevenir la infección ni disminuir la cantidad de muertes de los salmones (Jakob *et al.*, 2014; SERNAPESCA, 2021).

Tabla 1. Cantidad de antimicrobianos (principio activo), biomasa cosechada de salmónidos e índice de consumo de antimicrobiano anual (ICA) 2007- 2022 en Chile

Año	Consumo antimicrobianos (t)	Biomasa cosechada (t)	ICA (%)
2007	385,6	600.862	0,064
2008	325,6	630.647	0,052
2009	184,5	474.174	0,039
2010	143,2	466.857	0,031
2011	206,8	649.492	0,032
2012	337,9	826.949	0,041
2013	450,7	786.091	0,057
2014	563,2	955.179	0,059
2015	557,2	883.102	0,063
2016	382,5	727.812	0,053
2017	393,9	855.326	0,046
2018	322,7	923.900	0,035
2019	334,1	989.546	0,034
2020	379,6	1.075.895	0,035
2021	463,4	985.958	0,047

Fuente: Sernapesca, 2021.

El uso indiscriminado de antimicrobianos en sistemas de cultivo de peces ha provocado que emerjan cepas resistentes. Los antimicrobianos residuales en los organismos de engorda constituyen un potencial riesgo para la salud ante el consumo humano (Chen *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015).

Entre las medidas de manejo sanitario implementadas en sistemas de engorda de salmones se recomienda mantener densidades de cultivo apropiadas por jaula o área geográfica,

minimizar el estrés de los salmones por sobre manejo, retirar constantemente los especímenes muertos y moribundos, evitar la contaminación acuática con sangre durante las operaciones de cosecha, promover periodos de descanso entre ingreso de nuevo lote de salmones (*all in all out*), eliminar ovas de reproductores positivos a piscirickettsiosis, el uso de sustancias estimulantes y protectores hepáticos (Cristi, 2003).

2.2.5. Métodos de detección de *P. salmonis*

El diagnóstico de *P. salmonis* en laboratorio se realiza principalmente a través de reacción de la cadena de polimerasa (PCR), siendo este el método diagnóstico de confirmación. También se puede realizar la tinción de frotis sanguíneo con Giemsa y Gram, aislamiento del patógeno en medios de cultivo con o sin células y a través de inmunohistoquímica (Fryer *et al.* 1990; Lannan *et. al.*, 1991; Alday- Sanz *et al.* 1994; Mauel, *et al.*, 1996).

2.2.6. Patogenia de la piscirickettsiosis

Los factores desencadenantes de la piscirickettsiosis aún no están bien establecidos, los primeros brotes se relacionaron con estrés por aumento en las fluctuaciones de temperatura en el agua, tormentas severas y floración de algas no tóxicas (Olsen *et al.*, 1997).

La bacteria es capaz de penetrar la piel intacta y las branquias de los salmones, desde donde se traslada al torrente sanguíneo penetrando en el citoplasma de monocitos y macrófagos, lo que le permite evadir el sistema inmune. Posteriormente, afecta el tejido hematopoyético y endotelio vascular donde se replica por fisión binaria lo que produce anemia, focos necróticos y alteración de la coagulación (Almendras y Fuentealba, 1997, Smith *et al.*, 1999, Mauel y Miller 2002).

Histopatológicamente las lesiones microscópicas más prominentes se encuentran en el hígado, páncreas, riñón e intestinos, pero también se pueden observar cambios patológicos en el corazón, músculo esquelético, meninges, ovarios y branquias. Durante la fase más aguda de la enfermedad es común encontrar necrosis multifocal de hepatocitos, necrosis vascular, perivascular y coagulación intravascular en el hígado; en el parénquima renal y pancreático se puede observar una infiltración de células hematopoyéticas y necrosis que

posteriormente pasa a inflamación granulomatosa. La lámina propia de los intestinos es otro sitio común donde se puede encontrar necrosis, hemorragia e inflamación crónica (Larenas *et al.*, 1995; Fryer y Hedrick, 2003).

2.2.7. Transmisión

La transmisión horizontal es el principal medio de infección, esta puede ocurrir con o sin contacto directo, diseminando la bacteria en el agua por la orina, bilis y heces de los peces. La probabilidad de contagio aumenta en relación directa con la densidad poblacional en que se encuentren los salmones producto de su crecimiento durante el cultivo y también con el aumento de lesiones en la piel por contacto físico entre ellos e infecciones concomitantes con piojos de mar (Salinas *et al.*, 1997; Almendras *et al.*, 2003; Cabello y Godfrey, 2019).

Se ha estudiado la posibilidad de participación de hospederos intermediarios o vectores que contribuyan a diseminar la infección, aquí encontramos a los piojos de mar (*Caligus spp.*), isópodos y/o moluscos que se mueven a través de las jaulas donde se producen los brotes de *P. salmonis*. Sin embargo, no se ha demostrado que estos posibles vectores sean necesarios para la diseminación de la bacteria. (Lannan y Fryer, 1994).

Con respecto a la transmisión vertical, ésta sólo se ha podido demostrar *in vitro* en un experimento realizado por Larenas *et al.* (2003), en el cual se inoculó *P. salmonis* vía intraperitoneal a machos y hembras de truchas arcoíris (*O. mykiss*), para comprobar si la bacteria era capaz de proliferar en tejidos y órganos reproductores y transmitirse a su progenie. La bacteria fue detectada con inmunofluorescencia indirecta en fluido seminal y celómico de machos y hembras respectivamente. En base a los resultados obtenidos se realizó un segundo experimento para observar si el patógeno era capaz de ingresar a las ovas de salmón, el cual consistió en incubarlas durante el proceso de fertilización en un medio que contenía el agente, posteriormente fueron estudiadas a través de MEB. Los resultados demostraron que la bacteria se adhería a la superficie de las ovas e ingresaba en su interior; además, se comprobó que las progenies originadas de esta inoculación fueron positivas y asintomáticas.

2.3. Adhesión de bacterias patógenas marinas

Existen antecedentes de que bacterias patógenas marinas como *Pseudomonas*, *Shewanella* y el género *Vibrio* se adhieren a través de la formación de *biofilms* a polímeros artificiales en centros de cultivo de peces. Se han realizado estudios de formación de *biofilms* de *Vibrio* en materiales plásticos comunes de forma similar al presente proyecto, por medio de sumergir los materiales en agua de mar en condiciones de campo para observar la adhesión a estos sustratos (Li *et al.*, 2014; Fernández, 2015).

El proceso de formación de *biofilms* (Figura 1) involucra la interacción con el sustrato, en el cual intervienen factores físicos como: rugosidad del sustrato, temperatura, topografía y carga superficial; factores químicos como: composición del sustrato, composición del medio en que se desarrolle el *biofilm*, pH y oxígeno disuelto. También se adiciona al *biofilm* material orgánico presente en el mar conocido como película condicionante (*conditioning film*) que altera las propiedades fisicoquímicas de la interfase fluido-sustrato favoreciendo las condiciones para el desarrollo bacteriano (Pacheco, 2017).

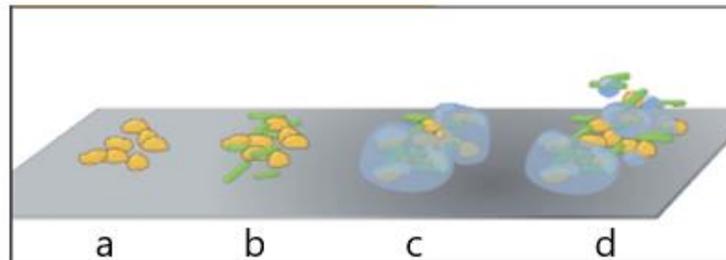


Figura 1. Proceso de formación de biofilm bacteriano (Carton *et al.*, 2011). a) residuos orgánicos en sustrato, b) colonización bacteriana, c) formación de matriz extracelular y d) maduración y expansión del *biofilm*.

La adhesión bacteriana a un sustrato es un proceso en el cual intervienen diversos factores ya sean de la bacteria, del ambiente en el que se desarrolla la adhesión o del sustrato.

- Entre los factores bacterianos la presencia de estructuras morfológicas que permiten el movimiento celular como flagelos, fimbrias o pilis, una vez en contacto con el sustrato, la bacteria se adhiere por medio de EPS (sustancias poliméricas extracelulares) o macromoléculas de alto peso molecular, en la pared celular externa

las que facilitan una firme adhesión a la superficie del sustrato. Las bacterias que no producen EPS son menos adherentes y menos patógenas (Pacheco, 2017).

- Los factores ambientales, que participan principalmente en una dinámica marina son los movimientos que facilitan la diseminación bacteriana como la gravedad, difusión, dinámica de fluidos y precipitación de partículas (Pacheco, 2017).
- En cuanto a los factores del sustrato, son relevantes sus características físico químicas, las que influyen en el grado y extensión de la adhesión (compuestos hidrófobos, hidrófilos, cationes, aniones, etc.). Se ha demostrado que la adhesión de diversos cationes como calcio, sodio y hierro afectan la adhesión de *Pseudomonas* en vidrio. La maduración del *biofilm* está dada por factores que mantienen la estabilidad del complejo, como su densidad y complejidad que aumentan a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los EPS interactúan con moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente. El potencial de crecimiento del *biofilm* está limitado por la disponibilidad y la capacidad de penetración de nutrientes al interior del *biofilm* junto con la eliminación de residuos (Pacheco, 2017).

El desprendimiento de bacterias del *biofilm* responde principalmente a la necesidad de nutrientes o a la presencia de sustancias agresivas que lleven a la liberación de bacterias en busca de ambientes nutritivamente más ricos o menos nocivos en donde desarrollarse. Se conocen tres formas de desprendimiento, principalmente por erosión, en la cual se remueven pequeñas cantidades de células constantemente, por separación, donde la remoción es rápida y masiva; y la menos frecuente, por colisión, donde partículas impulsadas por corrientes de flujo chocan y remueven células del *biofilm* (Pacheco, 2017).

2.3.1. Adhesión de *Piscirickettsia salmonis*

Durante el experimento de Larenas *et al.* (2003), se observó a través de MEB la unión de *P. salmonis* a ovas de trucha arcoíris, formando conglomerados bacterianos adheridos mediante extensiones a la superficie de las ovas, lo que fue denominado Complejo de Adhesión

Piscirickettsial (CAP). Esto constituye la primera evidencia sobre la adhesión de *P. salmonis* como método de sobrevivencia extracelular.

Con el fin de esclarecer si la formación de CAP corresponde a un factor de virulencia de la bacteria, Quinteros (2005) realizó un experimento en el cual comparó la cinética de formación de CAP entre las cepas LF-89 y SLGO-95, siendo ésta última más virulenta. A través de MEB se observó que la cepa SLGO-95 formó un complejo de adhesión más extenso, lo que se atribuyó a un factor de virulencia de la cepa.

La formación del CAP también puede variar según el sustrato al cual se adhiere. Al respecto, Levipan *et al.* (2020) detectaron que algunas formaciones de CAP fueron sensibles al mucus de la piel del salmón del Atlántico. Esto se atribuyó a que el mucus de la piel de los peces posee una gran variedad de moléculas de inmunidad innata, la cual funciona como primera línea de defensa contra patógenos marinos. Sin embargo, no existen estudios que demuestren los efectos específicos del mucus de la piel en el comportamiento de formación de CAP por *P. salmonis*. De todas formas, se postula que la capacidad de *P. salmonis* para formar un complejo de adhesión viable y resistente constituye el principal riesgo ambiental para la resistencia y diseminación de la bacteria.

Recientemente, se ha demostrado que *P. salmonis* puede adherirse a superficies de origen biótico como conchas de choritos (*M. chilensis*) y ovas de salmón; así como sustratos abióticos tales como vidrio, poliestireno y teflón en experimentos *in vitro* (Pérez, 2017; Steven *et al.*, 2018; Larenas *et al.*, 2019).

Dada la contaminación humana de diversos ecosistemas es común encontrar dentro de los sustratos abióticos bacterianos los plásticos o polímeros artificiales, la interacción que han desarrollado algunos microorganismos para formar *biofilms* en estos sustratos se ha denominado plastísfera. Existe como antecedentes que *P. salmonis* produce extensos agregados bacterianos en estructuras de *biofilm* en condiciones de estrés (Zettler *et al.*, 2013).

Los reservorios bacterianos en instalaciones de salmicultura favorecen la persistencia y diseminación de variedades virulentas de *P. salmonis* capaces de mantener la viabilidad celular y que son tolerantes al mucus de la piel de los salmones bajo condiciones severas de escasez de nutrientes en el mar (Marshall *et al.*, 2012; Zettler *et al.*, 2013 y Levipan *et al.*, 2020).

2.4. Generalidades de los polímeros artificiales

Los polímeros artificiales, comúnmente conocidos como plásticos corresponden a un tipo particular de macromolécula la cual se caracteriza por ser una estructura conformada por unidades repetidas, denominadas monómeros. Estos monómeros se unen a través de la polimerización, la cual es una reacción química que puede clasificarse en (López, 2015):

- Polimerización por etapas o condensación: La polimerización transcurre entre grupos funcionales de distinta naturaleza, tales como hidroxilo (-OH), cloruros de acilo (-COCl), carboxilo (-COOH), amina (-NH₂) con eliminación de una molécula pequeña. Algunos ejemplos de polímeros comunes que se obtienen por condensación son las poliamidas, poliésteres, policarbonatos y poliuretanos, entre otros.
- Polimerización en cadena o adición: Esta se lleva a cabo a través de la adición continua de monómeros a la cadena de crecimiento con un extremo activado, transcurre sin pérdida de materia o moléculas, por lo que cada unidad de monómero posee una estequiometría idéntica a la unidad constitucional repetitiva del polímero. Este tipo de polimerización puede subdividirse a su vez en:
 - Polimerización radical: Algunos monómeros vinílicos al ser compuestos que poseen doble enlace pueden polimerizar en presencia de peróxidos en condiciones que estos generen radicales libres. Algunos de los ejemplos más comunes son el poli cloruro de vinilo (PVC), poliestireno (PS), polietileno (PE) y polimetilmetacrilato (PMMA).
 - Polimerización iónica: La cual se clasifica en aniónica o catiónica si las especies propagantes son aniones o cationes respectivamente. Un ejemplo de

polimerización aniónica es la obtención de poliestireno iniciada por aniones radicales aromáticos formados por sodio metálico y naftaleno.

Los polímeros artificiales pueden clasificarse según la disposición de las cadenas que conformen el polímero en (Figura 2.):

- Termoplásticos: Son aquellos que no pierden su forma ante la acción del calor y la presión. A nivel molecular, los monómeros se encuentran unidos por fuerzas intermoleculares o fuerzas de Van der Waals que forman uniones lineales o ramificadas (Estacio *et al.*, 2019).
- Termoestables: Son aquellos que pierden su forma ante la acción del calor y la presión. Los monómeros se encuentran unidos por enlaces químicos adquiriendo una forma reticulada (Estacio *et al.*, 2019).

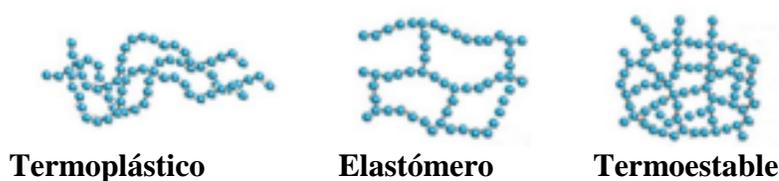


Figura 2. Distribución de los monómeros en los plásticos termoplásticos y termoestables. Tomado de Lide (2004).

2.4.1. Principales polímeros artificiales utilizados en centros de cultivo de salmones en Chile

Los centros de cultivo o engorda de salmones se encuentran principalmente inmersos en el mar o estuario, utilizan un sistema de balsas-jaula cuyo diseño está conformado en general por una estructura semirrígida superficial con boyas y estabilidad propia que pueden ser cuadradas o circulares ancladas al suelo marino. Acoplado a esta estructura se encuentra un sistema de redes, que se dividen en redes peceras, redes loberas contra depredadores acuáticos y redes pajareras contra depredadores aéreos (Olivares, 2009).

Los polímeros sintéticos son utilizados en su mayoría para la confección de jaulas, balsas/ flotadores, redes en piscicultura, materiales de trabajo como cubetas, bandejas, contenedores, etc. Los polímeros más usados en salmonicultura son (Steven *et al.*, 2018):

- **HDPE:** Utilizado para tuberías, jaulas y objetos flotantes; está conformado por monómeros de etileno polimerizados a través de catalizadores y a baja presión se obtiene PE de mayor densidad (Cardona *et al.*, 2010).
- **PVC:** Comúnmente se encuentra en tuberías, mangueras, válvulas y estructuras de jaulas; se obtiene por medio de polimerización vía radicales libres de mono cloruro de vinilo (Mohapatra *et al.*, 2011).
- **PA:** Más conocido como nylon, se utiliza para la elaboración de redes, mallas y fibras en general; se obtiene por procesos de policondensación de diaminas o ω - aminoácidos (Ramírez, 2019).
- **PTFE:** Utilizado generalmente como cobertura de objetos expuestos al medio como Larenas *et al.* (2003) el cual revela la formación del CAP y, a partir de esto, Quinteros (2005) postula que el CAP corresponde a un factor asociado a la virulencia y por lo tanto puede variar dependiendo de la cepa bacteriana. Posteriormente, Pérez (2017), Steven *et al.* (2018) y Larenas *et al.* (2019) establecen diversos sustratos tanto bióticos como abióticos de *P. salmonis* en los que se evidencia la formación del CAP.

Teniendo en cuenta lo expuesto sobre la capacidad de adhesión de *P. salmonis* a plásticos *in vitro*, existe el antecedente de que otras bacterias patógenas marinas del género *Vibrio*, *Pseudomona* y *Shewanella* se adhieren a materiales plásticos en centros de cultivo de peces como estrategia de supervivencia y podrían servir de modelos de la propuesta (Li *et al.*, 2014).

En la presente memoria se establece un protocolo de modelo experimental de campo para detectar la adhesión de *P. salmonis* sobre polímeros artificiales en centros de cultivo afectados por la piscirickettsiosis. El modelo contempla la literatura descrita con relación a los estudios realizados en la bacteria y, además, en los principales productos plásticos usados

en la salmonicultura y que tienen un potencial de mantener como reservorio al agente. Igualmente, el trabajo se enfoca en establecer las condiciones de cultivo en mar o estuario y posterior a la manifestación de un brote de piscirickettsiosis, ello para poner en evidencia la posibilidad de encontrar esta bacteria adherida a diversas superficies.

Por lo anterior, la finalidad de esta memoria de título es generar un protocolo de modelo experimental para conocer los aspectos de supervivencia y transmisión de *P. salmonis* en el medio ambiente y así aportar datos epidemiológicos para el control y manejo de la piscirickettsiosis, contribuyendo de este modo a reducir el impacto de esta enfermedad en la industria nacional.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Proponer un modelo experimental que permita estudiar en condiciones de campo la adhesión de *Piscirickettsia salmonis* en los principales materiales plásticos utilizados en la salmonicultura en Chile.

3.2. Objetivos específicos

- Analizar los antecedentes bibliográficos relacionados con los diferentes métodos de estudio de adhesión en superficies abióticas y bióticas de la *Piscirickettsia salmonis*.
- Establecer cuáles son los principales plásticos utilizados en la salmonicultura en Chile en condiciones de crianza en jaula en mar y estuario, determinando las características físico químicas de estos polímeros.
- Proponer un modelo experimental de campo que permita estudiar la adhesión de la bacteria a algunos materiales plásticos utilizados en la salmonicultura.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1 Recopilación de información

Se realizó una revisión bibliográfica que comprendió principalmente los estudios realizados desde el año 1989 a la fecha, considerando que el brote bacteriano se describió por primera vez en Chile a partir de dicho año. La investigación comprendió antecedentes sobre la adhesión de *P. salmonis* a sustratos, tanto bióticos como abióticos, en condiciones *in vitro* o de campo.

4.1.2. Motores de búsqueda

Con respecto a la búsqueda de información aparecida en artículos académicos, se utilizaron las bases de datos de Google, Google Scholar, Catálogo Bello, Science direct, PubMed y las que contienen datos de origen nacional provenientes del Servicio Nacional de Pesca.

4.1.3. Palabras clave

La búsqueda fue enfocada en base a las siguientes palabras clave: enfermedades en salmones, *Piscirickettsia salmonis*, Epidemiología SRS, adhesión bacteriana, *biofilms*, plásticos en salmonicultura, polímeros, entre otras.

4.1.4. Operadores de búsqueda

Para realizar algunas búsquedas especializadas en la base de datos, se utilizaron algunos “operadores de búsqueda” tales como (Ponce *et al.*, 2014):

Operador *doble comilla* “ ”

Se emplea cuando se desea buscar una palabra o frase exacta. Reduce la cantidad de resultados y nos devuelve solamente aquellos que se ajustan a la búsqueda concreta que deseamos realizar. No siempre es conveniente utilizarlo, ya que en algunos casos el buscador puede no devolvernos ningún resultado.

Operador *OR*

Busca una o más palabras clave a la vez

Operador *AND*

Busca todas las palabras clave a la vez

Operador + (*incluser*)

Permite incluir una o más palabras clave que por alguna razón no son consideradas por el buscador como parte de sus resultados, como ocurre por ej., en el caso de las “StopWord” (palabras de significado vacío que no son registradas por las arañas de los buscadores a la hora de hacer una búsqueda. Están compuestas por artículos, pronombres y preposiciones).

Operador - (*excluser*)

Permite excluir una o más palabras clave de los resultados de una búsqueda.

Operador *filetype*

Busca archivos con un formato determinado: pdf, ppt, doc, etc.

Operador *allintext*

Busca páginas que contengan la palabra clave en su contenido.

Operador ()

Permite combinar operadores.

4.2. Métodos

4.2.1. Recopilación de antecedentes contextuales

La organización de esta revisión comprendió una estructura deductiva, la cual hace un desglose desde la información más general hasta las más particular. Se realizó una revisión bibliográfica sistematizada proveniente de diversas bases de datos sobre *P. salmonis* y sus mecanismos de adhesión *in vitro*. Se ordenó, se sistematizó y se priorizó la información según

su relevancia, como es el caso de la Revista Web of Science (ISI o Scielo) hasta artículos evaluados por pares en revistas indexadas con comité editor.

4.2.2. Organización de antecedentes y redacción

Posterior a la recopilación y revisión de información, esta se organizó en una base de datos según los distintos temas de la monografía relacionados con aquellos que abordó la memoria de título. De esta manera, estos se clasificaron como se indica:

- Adhesión de bacterias marinas
- Adhesión de *P. salmonis*
- Polímeros artificiales de uso común en salmonicultura
- Propuesta de modelo experimental

4.2.3. Fuentes de publicaciones consultadas

Se consultaron publicaciones procedentes de: Journal Of Fish Diseases, Diseases Of Aquatic Organisms, Journal of Applied Ichthyology, Acta Ortopédica Mexicana, Chile pesquero, Marine Pollution Bulletin, Aquaculture, Fish Pathology, Frontiers in Microbiology, Fish Diseases and Disorders, Journal of Aquatic Animal Health, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, Scientist Reports, FAO, Research in Microbiology, Veterinary Microbiology, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Diseases of Fish and Shellfish, Archivos de Medicina Veterinaria, SERNAPESCA, e-polymers y Environmental Science & Technology.

4.2.4. Criterios de exclusión de la información

- No se consideraron aquellas publicaciones que incluyen “*Rickettsia like*” no asociadas a *Piscirickettsia salmonis*.
- Las publicaciones que tenían por contenido índices económicos o cifras de importación/exportación que fueron excluidas del análisis por tener más de once años de antigüedad (2012-2023).

- Sólo se consideraron artículos en idioma inglés o español. Excepcionalmente se tomaron en cuenta artículos que contenían un resumen en esos idiomas cuando la publicación estaba escrita en uno distinto.

4.2.5. Base de la propuesta experimental

De acuerdo con la revisión, análisis y discusión de la información obtenida se realizó una propuesta de modelo de estudio sobre la adhesión de *P. salmonis* en condiciones de campo. Dicho trabajo incluyó *a priori* la participación de elementos abióticos (plásticos) y algún método de control experimental de acuerdo con la información de la literatura ya analizada. Además, se consideró un periodo de tiempo, las condiciones de cultivo en mar o estuarina, el sistema de adhesión (experimental) en balsas jaulas, un brote de piscirickettsiosis y un sistema de detección (diagnóstico) de la bacteria, entre otros elementos.

5. RESULTADOS

5.1. Analizar los antecedentes bibliográficos relacionados con los diferentes métodos de estudio de la adhesión de la *Piscirickettsia salmonis* en superficies abióticas y bióticas.

El primer antecedente que se documenta sobre la adhesión de la *Piscirickettsia salmonis* en superficies fue expuesto por Larenas *et al.* (2003) durante un experimento cuyo objetivo fue establecer la capacidad de la bacteria para colonizar ovas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y transmitirla vía vertical a alevines. Al observar las ovas a través del microscopio electrónico de barrido (MEB) se observaron diversos conglomerados bacterianos adheridos a la superficie de las ovas, lo cual se denominó complejo de adhesión piscirickettsial o CAP.

Quinteros (2005) propone que la formación de CAP está relacionada con factores de virulencia de la cepa, por lo que realiza una comparación de la cinética de crecimiento de CAP entre la cepa SLGO- 95 y la cepa LF- 89 de *P. salmonis*. Se utilizaron 24 ovas seleccionadas de trucha arcoíris, sin alteraciones macroscópicas y testeadas libres de *P. salmonis*. Luego se expusieron dos grupos a *P. salmonis* 1) 8 ovas + cepa LF-89, 2) 8 ovas + cepa SLGO-95 y un control negativo 3) 8 ovas + medio esencial mínimo (MEM), durante 1, 5, 15 y 60 minutos. Se observó a través de MEB la formación de un complejo de adhesión más extenso por parte de la cepa SLGO- 95, la cual es más virulenta.

Posteriormente, Pérez (2017) realizó una evaluación *in vitro* sobre la adhesión de la *Piscirickettsia salmonis* en conchas de choritos (*M. chilensis*) y su capacidad de infectar un cultivo celular una vez formado el complejo de adhesión. Para esto, utilizó trozos de estas conchas previamente desinfectadas y esterilizadas; las que fueron expuestas a *P. salmonis* en tiempos de 1, 24 y 48 horas. Posteriormente fueron observadas por medio de MEB para evaluar la adhesión bacteriana. Para evaluar la capacidad de liberación del CAP de *P. salmonis*, simultáneamente al experimento sobre adhesión, se utilizaron pedazos de concha de choritos *M. chilensis* expuestos durante 48 horas a la bacteria, se colocaron en un cultivo celular de línea CHSE-214 y fueron observadas cada 24 horas con microscopio

invertido con luz polarizada para establecer si se producía efecto citopático. Al cabo de tres días post infección, se pudo observar efecto citopático y para el décimo había un 80% de las células infectadas.

Por otra parte, Steven *et al.* (2018) realizaron un reporte sobre los vectores y reservorios de *P. salmonis* a través de un experimento en condiciones de campo. Sobre esta materia, se estudió la adhesión de la bacteria a conchas de choritos (*M. chilensis*) y polímeros sintéticos de uso común en salmonicultura. Esto se llevó a cabo mediante un modelo de campo que consistió en sumergir a cinco metros de profundidad láminas de HDPE, PVC, PA, PTFE y las conchas atadas a unas cuelgas, en un centro de cultivo de salmones (Región de Los Lagos) en aguas de estuario durante un brote de piscirickettsiosis. Posterior a 7 días las muestras fueron retiradas para ser procesadas en laboratorio y como resultado se observó la formación de adhesión sobre PTFE a través de PCR anidado.

Un año más tarde, Larenas *et al.* (2019) reportaron un estudio de adhesión e infectividad de *P. salmonis* en conchas de choritos, para lo que se dispuso de 12 pedazos de conchas de *M. chilensis* expuestas a *P. salmonis* durante una, 24 y 48 horas. Tras la posterior observación a través de MEB la bacteria fue observada en la superficie de la concha una hora post desafío y a las 48 horas se observaron agrupaciones de bacterias de 0.5 a 1.5 μ de diámetro adheridas a la superficie de la concha.

En 2020 Levipan *et al.* investigaron sobre sustratos en los que *P. salmonis* puede adherirse por medio del CAP y detectaron que algunas formaciones de *biofilms* fueron sensibles al mucus de la piel del salmón del Atlántico (*S. salar*). Sin embargo, no existe evidencia sobre los efectos específicos del mucus de la piel de salmón en el comportamiento de formación de CAP. Esto se realizó usando las cepas Psal-103 (tipo LF-89) y Psal-104 (tipo EM-90) las cuales fueron expuestas al mucus de *S. salar*. Como resultado, a través de inmunofluorescencia se comparó el número de bacterias vivas y la relación de bacterias vivas con las muertas en *biofilms* midiendo el radio de fluorescencia de cada cepa y se determinó que las bacterias expuestas al mucus de salmón tendieron a tener un radio de luminiscencia significativamente más bajo que el grupo libre de mucus.

En la tabla 2, se resumen algunas condiciones en las que se han desarrollado estudios de adhesión de *P. salmonis*, algunos de los cuales se utilizaron como base de la propuesta experimental.

Tabla 2. Análisis comparativo entre estudios publicados sobre la adhesión de *P. salmonis* a distintos tipos de sustratos.

Autores/ año	Propuesta	Condición experimento	Cepa de desafío	Medio de cultivo	Adhesión a sustrato	Método diagnóstico	Resultados
Larenas <i>et al.</i> 2003.	Transmisión vertical de <i>P. salmonis</i> en cultivo con ovas de salmón.	<i>In vitro</i>	LF-89	CHSE-214 sin AB ⁵	Ovas <i>O. mykiss</i>	MEB ¹	Adhesión y formación de CAP ² en ovas salmón.
Quinteros 2005.	Formación de CAP depende de factores de virulencia	<i>In vitro</i>	LF-89 Y SLGO-95	CHSE-214 sin AB	Ovas <i>O. mykiss</i>	MEB	Cepa SLGO- 95 presenta CAP más extenso
Pérez 2017 y Larenas <i>et al.</i> 2019.	<i>P. salmonis</i> puede adherirse a conchas de <i>M. chilensis</i>	<i>In vitro</i>	LF-89	CHSE-214 sin AB	Conchas <i>M. chilensis</i>	MEB	Formación de CAP en conchas de choritos
Steven <i>et al.</i> 2018.	<i>P. salmonis</i> es capaz de adherirse a polímeros artificiales.	De campo	Silvestre	<i>P. salmonis</i> en agua de mar	Polímeros artificiales + Conchas <i>M. chilensis</i>	MEB + PCR	Adhesión a NY ⁴ y conchas de choritos
Levipan <i>et al.</i> 2020.	Influencia de mucus de salmón en formación de CAP	<i>In vitro</i>	Psal-103 y Psal- 104	Caldo AUSTRAL-SRS	Placa <i>Petri</i> + Mucus salmón	IFD ⁵	Formación CAP en placa <i>Petri</i> + sensibilidad a mucus salmón

¹MEB: Microscopía electrónica de barrido, ²CAP: Complejo de adhesión piscirickettsial, ³NY: Nylon, ⁴IFD: Inmunofluorescencia directa, ⁵AB: Antibiótico.

5.1.1 Método PRISMA

Para facilitar el análisis de las publicaciones consultadas según el criterio indicado se ha resumido en la tabla 3 el número de publicaciones clasificadas según la bibliografía de la presente memoria, el origen de la publicación, idioma, fecha, base de datos, condición del experimento y contenido del avance.

Tabla 3. Método PRISMA. Clasificación de las publicaciones consultadas en la revisión bibliográfica.

Criterio de clasificación	Publicaciones	Criterio de clasificación	Publicaciones
Bibliografía		Idioma	
Publicación científica	57	Inglés	33
Presentación	27	Español	24
Origen publicación		Selección en avance	
Nacionales	16	Incluidos en avance	25
Extranjeras	41	Excluidos en avance	2
Condiciones experimento		Base de datos	
Adhesión <i>in vitro</i>	5	Revista ISI	33
Adhesión en campo	1	Revista Scielo	3
		Informes institucionales	9
		Memoria de tesis	6
		Otros	6
Fecha de publicación		Contenido	
1989	1	Adhesión de BPM	5
1990 - 1999	12	Adhesión de <i>P. salmonis</i>	1
2000 - 2009	14	Adhesión a conchas de choritos	8
2010 - 2019	27	Adhesión a ovas	3
2020 – 2022	3	Polímeros artificiales	5
		Adhesión a polímeros	5
		Propuesta Modelo experimental	1

También se ha clasificado en la tabla 4 el contenido del avance según los autores que han publicado sobre adhesión de bacterias patógenas marinas (BPM), adhesión de *P. salmonis*, adhesión a conchas de choritos *M. chilensis*, ovas de salmón, polímeros sintéticos y finalmente los modelos de adhesión en los que se fundamenta el seleccionado para esta memoria de título.

Tabla 4. Antecedentes bibliográficos relacionados con la adhesión bacteriana y de *P. salmonis* a diversos sustratos.

Contenido	Autores
Adhesión de B.P.M*	Li <i>et al.</i> , 2014; Fernández, 2015; Pacheco, 2017.
Adhesión de <i>P. salmonis</i>	Larenas <i>et al.</i> 2003; Quinteros 2005; Pérez 2017; Steven <i>et al.</i> , 2018; Larenas <i>et al.</i> , 2019; Levipan <i>et al.</i> , 2020.
Adhesión a conchas de choritos**	Pérez 2017; Steven <i>et al.</i> , 2018; Larenas <i>et al.</i> , 2019.
Adhesión a ovas de salmón	Larenas <i>et al.</i> , 2003; Quinteros, 2005.
Polímeros sintéticos	Olivares, 2009; Cardona <i>et al.</i> , 2010; Mohapatra <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2017; Steven <i>et al.</i> , 2018; Ramírez, 2019.
Adhesión a polímeros sintéticos	Steven <i>et al.</i> , 2018; Levipan <i>et al.</i> , 2020.
Propuesta de modelo experimental	Steven <i>et al.</i> , 2018.

*B.P.M = Bacterias Patógenas Marinas, ***Mytilus chilensis*

- **5.2. Establecer cuáles son los principales plásticos utilizados en la salmonicultura en Chile en condiciones de crianza en jaula en mar y estuario, determinando las características físico químicas de estos polímeros.**

Los plásticos comúnmente utilizados para balsas, jaulas y redes que están en contacto con el mar son: Polietileno de alta densidad (HDPE), poli cloruro de vinilo (PVC), poliamida o nylon (PA) y poli tetrafluoretileno o teflón (PTFE) como material antiadherente (Steven *et al.*, 2018).

- Polietileno de alta densidad (HDPE): Se utiliza principalmente en tuberías, jaulas y objetos flotantes; el polietileno (PE) pertenece al grupo de los materiales termoplásticos, estos se pueden dividir en cuatro subgrupos de materiales industriales de mayor uso: Polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP) y poli cloruro

de vinilo (PVC). El PE se obtiene a través de la polimerización de monómeros de etileno, se caracteriza por su alta resistencia al impacto y abrasión, por ser químicamente inerte y tener bajo coeficiente de roce (Cardona *et al.*, 2010; Steven *et al.*, 2018).

- Poli cloruro de vinilo (PVC): es el principal componente de tuberías, mangueras, válvulas, estructura de jaulas, etc. Este material se obtiene a través de la polimerización vía radicales libres del mono cloruro de vinilo. Como propiedades destacan su alta resistencia química, flexibilidad, bajo costo de producción y su característica de barrera (Mohapatra *et al.*, 2011).
- Poliamida (PA) o nylon: se utiliza para la fabricación de sedales, fibras, cuerdas y redes de pesca, se obtiene a través de policondensación de diaminas o auto policondensación de ω -aminoácidos; existen muchos tipos de PA que difieren en la cantidad de grupos metilo según posea la molécula. Los más importantes a nivel industrial son la PA 6, PA 66 y PA 11. Tiene gran resistencia mecánica, mayor elasticidad que fibras naturales, resistencia a la intemperie y temperaturas de ebullición (Ramírez, 2019).
- Poli tetrafluoretileno o teflón (PTFE): se utiliza en la fabricación de cubiertas para materiales que estén expuestos al medio ambiente. Debido a su gran resistencia mecánica, coeficiente de roce casi nulo, ser químicamente inerte, dieléctrico y su baja conductividad térmica se utiliza como superficie antiadherente. El proceso para formar el PTFE involucra la polimerización de radicales de tetra fluoroetileno (TFE) (Wang *et al.*, 2017; Steven *et al.*, 2018).

5.3. Propuesta de un modelo experimental de campo para estudiar la adhesión de la bacteria a algunos materiales plásticos utilizados en la salmonicultura.

5.3.1. Sustratos de adhesión

En base a los modelos de adhesión utilizados en experimentos *in vitro* por Pérez (2017) y Larenas *et al.* (2019) sumado al proyecto en condiciones naturales de Steven *et al.* (2018), se

estableció un modelo de adhesión experimental de campo *P. salmonis* con los polímeros artificiales de mayor uso en salmonicultura.

Se utilizarán cuatro tipos de polímeros artificiales: polietileno de alta densidad (HDPE), polícloruro de vinilo (PVC), poliamida o nylon (PA) y poli tetrafluoretileno o teflón (PTFE). Además, serán expuestas conchas de *M. chilensis* las cuales serán utilizadas para el grupo de control positivo.

Los plásticos se obtendrán de una empresa comercial; el formato del producto son láminas de espesor máximo de 4 mm. Las conchas de *M. chilensis* serán conseguidas en el comercio oficial, considerando como criterio de selección: tamaño uniforme y superficie homogénea. Se utilizará el protocolo estandarizado de limpieza descrito por Larenas *et al.* (2019): en primera instancia las conchas y los plásticos serán lavados con abundante agua tibia destilada, luego serán secados y cortados en piezas de 10 x 10 cm aproximadamente. Después serán cepillados con un cepillo dental tipo suave uno a uno con agua destilada y secados sobre papel absorbente. Se desinfectarán sumergidos durante 24 horas en una solución de amonio cuaternario al 8,5%, dentro de vasos precipitados, rotulados y cubiertos con Parafilm®. Transcurrido el tiempo, con la ayuda de una pinza y un cepillo estéril, se cepillarán nuevamente todos los trozos con la misma solución desinfectante; se realizarán 10 lavados con agua destilada estéril, y se dejarán sumergidos en esta misma por 24 horas. Finalmente se secarán dentro de la campana de flujo laminar sobre papel absorbente, sometidos a radiación UV por 20 min. por lado y almacenados en tubos estériles rotulados a -20 °C hasta su uso. Se realizará un control de limpieza de todos los materiales, en duplicado, los que serán fijados en glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio (0,2 M), para luego ser procesados y observados mediante MEB.

5.3.2. Condiciones del modelo

El modelo a postular podrá utilizarse para comparar la adhesión de *P. salmonis* tanto en aguas de estuario como en aguas de mar.

Se proponen tres grupos (tres modelos), cada modelo agrupará cuatro láminas de 10 x 10 cm de los polímeros mencionados además de tres conchas de *M. chilensis* (Tabla 5).

Una vez seleccionado el centro de engorda de salmones se sumergirán en las piscinas los tres modelos a una profundidad de 5 metros como lo realizado por Steven *et al.* (2018), y a una distancia no excesiva unos de otros. Los tiempos de exposición de cada grupo se basan en que el primer grupo será retirado el día 7 post desafío para así comparar con la extracción realizada por Steven *et al.* (2018), en el mismo periodo. El segundo grupo se retirará en el día 60 ya que se ha postulado en publicaciones respecto de la sobrevivencia extracelular de *P. salmonis*, la cual superaría los 40 días en el medio ambiente marino. Finalmente, al día 90 se retirará el último grupo ya que en los centros de engorda de salmones utilizan estrategias sanitarias estipuladas por SERNAPESCA como el *all in all out* el cual tiene una duración aproximada de 90 días (SERNAPESCA, 2008; Olivares y Marshall, 2010).

Tabla 5. Grupos experimentales según días de desafío.

Grupos	Día 7		Día 60		Día 90	
	A	B	A	B	A	B
Cara superficial*						
PVC + <i>P. s</i> en agua de mar						
PTFE + <i>P. s</i> en agua de mar						
HDPE + <i>P. s</i> en agua de mar						
PA + <i>P. s</i> en agua de mar						
Concha 1 + <i>P. s</i> en agua de mar						
Concha 2 + <i>P. s</i> en agua de mar						
Concha 3 + <i>P. s</i> en agua de mar						

*Se designará las letras A y B a cada cara superficial de cada uno de los materiales como duplicado de muestra.

Para cada grupo experimental se definirá un control negativo, se desafiarán las láminas de cada polímero artificial más las conchas de choritos que serán sumergidas en agua de mar esterilizada extraída de los centros de engorda de salmones por 7, 60 y 90 días, tal como se indica en la tabla 6.

Tabla 6. Grupos controles negativos según días de desafío.

Grupos (-)	Día 7		Día 60		Día 90	
	A	B	A	B	A	B
	Cara superficial					
PVC + agua de mar esterilizada						
PTFE + agua de mar esterilizada						
HDPE + agua de mar esterilizada						
PA + agua de mar esterilizada						
C1 + agua de mar esterilizada						
C2 + agua de mar esterilizada						
C3 + agua de mar esterilizada						

*Se designará las letras A y B a cada cara superficial de cada uno de los materiales como duplicado de muestra.

5.3.3. Retiro de las muestras y análisis

Durante cada periodo de muestreo, los prototipos serán empacados individualmente en bolsas plásticas, se fijarán en solución de metanol y serán trasladados bajo cadena de frío al laboratorio donde se raspará la superficie de cada material y se depositará en tubos Eppendorf para ser sometidas a PCR anidado y posterior electroforesis (Anexo 3). También se extraerán muestras de agua de mar superficial (5 metros) del centro de cultivo para utilizar como medio de cultivo para los controles negativos.

Una vez en el laboratorio se asignará la nomenclatura para diferenciar los tubos, se abreviará cada material como PVC, PTFE, HDPE, PA, C1, C2, C3 y también se agregará las letras A y B para establecer duplicados según la cara superficial de la muestra.

Además de los controles negativos de las muestras, se establecerán controles (positivos y negativos) para asegurar que el proceso esté libre de contaminación externa y los resultados arrojen falsos positivos durante la toma de muestra, la extracción del DNA y finalmente para la PCR y electroforesis.

- Control negativo de contaminación de toma de muestra: hígado de pollo.
- Control negativo de contaminación durante la extracción de DNA: hígado de pollo.
- Controles de PCR anidado: agua libre de DNAsas (Promega ®) como control de reactivos y una muestra de tejido con *P. salmonis* como control positivo.

Cada muestra será sometida a cuatro etapas: primero se aislará el DNA mediante el “*kit*” de extracción Wizard® (Promega), para comprobar que el DNA se encuentra en buenas condiciones se someterá a espectrofotometría según describe el “Programa de control de calidad de ácidos nucleicos (2020). Luego se cuantificará el DNA extraído utilizando el “*kit*” QuantiFluor® (Promega), en tercer término, se realizarán las amplificaciones correspondientes a la técnica de reacción en cadena de polimerasa anidada (PCR anidado) descrita por Mauel *et al.* (1996) con las modificaciones hechas por Peirano (2015) y finalmente se evidenciarán los resultados del PCR anidado en electroforesis en gel TBE de agarosa al 2%.

Aislamiento de material genético.

Para lograr aislar el DNA de cada una de las muestras se utilizará el “*kit*” de extracción Wizard® de Promega. El procedimiento se realizará cumpliendo con las instrucciones del fabricante para la extracción de DNA desde el tejido animal siguiendo la estandarización del protocolo hecha por el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas de la Universidad de Chile. Los materiales que se emplearán en la extracción de DNA se exponen en el anexo 1.

Cuantificación de DNA.

Para cuantificar el DNA de las muestras extraídas se utilizará el “*kit*” comercial QuantiFluor® (Promega). El fabricante describe que dicho “*kit*” contiene un colorante fluorescente que se une preferentemente a DNA de doble hebra y permite su cuantificación con alta sensibilidad.

PCR anidado

Durante la etapa de PCR anidado las muestras serán procesadas al interior de una campana de bioseguridad (BIOBASE, modelo 11231 BCC 86). Se utilizarán los insumos y materiales descritos en el anexo 2. Luego se preparará un tubo Eppendorf de 2 mL para contener la mezcla de PCR a utilizar en cada amplificación. Por cada muestra a amplificar (vale decir

DNA de las muestras extraídas y cuantificadas, controles negativos y positivos de la técnica) se dispondrá en dicho tubo 6,5 µL de agua libre de nucleasas, 12,5 µL de GoTaq Colorless Mastermix 2X y 2,5 µL de cada uno de los dos partidores (Eub-A y Eub-B para la primera amplificación y PS2S y PS2AS para la segunda amplificación).

Por cada muestra a procesar se dispondrá de un microtubo de 0,2 mL debidamente rotulado, al cual se le agregarán 24 µL de la mezcla de PCR previamente preparada y homogenizada y 1 µL de cada muestra a procesar (controles y muestras de DNA extraído) o muestra DNA amplificado (en el caso de la segunda amplificación).

Cada ciclo de PCR será amplificado en un termociclador *PCR Touch 960* marca Hangzhou Jingle Scientific Instrument Co., Ltd. Antes de la primera amplificación se configurará una desnaturalización previa a los 35 ciclos a 94°C durante 2 minutos y luego cada ciclo de PCR tendrá 1 minuto de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 2 minutos de hibridación a 60°C y 3 minutos de extensión a 72°C. La segunda amplificación tendrá también 35 ciclos en iguales condiciones salvo con la temperatura de hibridación que fue aumentada a 65°C.

Para la primera amplificación se utilizarán los partidores universales de DNAr 16S bacteriano Eub-B (27F) (5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3') y Eub-A (1518R) (5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAN-CCR-CA-3') y la segunda amplificación será específica para el DNA de *P. salmonis*, por lo que se utilizarán los partidores específicos PS2S (223F) (5'-CTA-GGA-GAT-GAG-CCC-GCG-TTG-3') y PS2AS (690R) (5'-GCT-ACA-CCT-GAA-ATT-CCA-CTT-3') descritos por la OIE (2003) y diseñados a partir de la secuencia de 16S del DNAr de 5 cepas de *P. salmonis* (LF-89, EM-90, ATL-4-91, NOR-92, SGLO-94) (Mauel *et al.*, 1996).

De la primera y segunda amplificación resultarán fragmentos de DNA de 1491 y 467 pb, respectivamente. Una vez terminadas las amplificaciones y por lo tanto obtenido el DNA amplificado se procederá a analizar las muestras mediante electroforesis en gel TBE de agarosa al 2%. Para la detección de material genético en el gel de agarosa se utilizará la tinción GelRed®.

Electroforesis

Las muestras amplificadas serán retiradas del termociclador y almacenadas a -20 °C de temperatura hasta la realización de la electroforesis. Los materiales e instrumentos a utilizar en la electroforesis se detallan en el anexo 3.

Las electroforesis se realizarán en gel TBE (Tris, Borato y EDTA) y agarosa al 2%. Se medirán 75 mL de solución buffer TBE 1X (Promega ®) en un matraz de 100 mL y se agregarán 1,5 g de agarosa 1,5 Lafken®. Con estas proporciones se considerará la concentración de gel de agarosa al 2%. Se dispuso la solución en un horno microondas y se colocará a alta temperatura hasta alcanzar la ebullición. Alcanzado dicho punto, se colocará el matraz a temperatura ambiente y se dejará enfriar, controlando la temperatura con un termómetro destinado a tal efecto hasta los 65 °C, momento en el cual se debe agregar 7,5 µL de la tinción GelRed® (Biotium) como tinción fluorescente de geles, procurando homogeneizar el contenido. Una vez hecho esto, se depositará la mezcla en el molde y se instalará la peinetas de dientes hasta conseguir la formación del gel a temperatura ambiente.

Una vez formado el gel, se depositará las muestras en él. En el primer bolsillo se cargará una solución compuesta por 2 µL de un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Maestrogen) y por 2 µL de Orange/Blue (Promega) como colorante de carga. Los demás bolsillos se cargarán con una mezcla de 2 µL de Orange/Blue y 5 µL del DNA amplificado diluido 1:5 en buffer TBE 1X.

La electroforesis se realizará a 70 voltios durante 90 minutos, utilizando una fuente de poder *Voltronic* (Nyxtechnik). Para visualizar las bandas de DNA se utilizará un transiluminador *UV WiseUV* (WUV-L10 – Wisd) y se fotografiarán los geles.

6. DISCUSIÓN

En Chile, la piscirickettsiosis corresponde a la enfermedad con mayor mortalidad y mayores pérdidas económicas en la industria de la salmonicultura, desde su brote en que fue descrita en 1989 ha sido año a año causa de retiro de salmones muertos, menores ventas por baja en calidad del producto final y los costos que implican el tratamiento con antimicrobianos. La severidad que posee esta enfermedad en nuestro país en términos de mortalidad o impacto económico dista mucho de los casos reportados en países del hemisferio norte como Canadá, EEUU, Turquía, etc., en los que la piscirickettsiosis está controlada, hasta el día de hoy se desconoce la razón de esto (Bravo y Campos, 1989; SERNAPESCA 2012, SERNAPESCA 2018).

Es importante destacar que dentro de los microorganismos algunas estrategias de supervivencia y diseminación más utilizadas consiste en adoptar un estado de animación suspendida de bajo gasto metabólico como por ejemplo los quistes parasitarios y *biofilms* para preservarse adherido a un sustrato ante la disminución de recursos nutritivos o la pérdida de las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de los microorganismos, este estado suele ser reversible. En el caso del *biofilm*, algunas bacterias (principalmente gramnegativas) en contacto con el sustrato secretan una matriz extracelular que cubre al complejo bacteriano además de materia orgánica en el medio ambiente, se establece una interacción la cual permite el crecimiento y maduración del *biofilm*. Una vez restablecidas estas condiciones favorables en el medio ambiente, las bacterias son capaces de despegarse de esta matriz para adherirse a otros sustratos o llegar a sus hospederos intermedios o definitivos (Pacheco, 2017).

Los centros de cultivo de salmones se encuentran inmersos en el medio acuático, están en constante exposición a una gran variedad de microorganismos, se han encontrado bacterias patógenas adheridas a materiales estructurales como *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio*. Las jaulas pueden ser metálicas o plásticas, estas son visibles en su parte superficial donde la estructura es semirrígida para dar estabilidad y que sea capaz de moverse con el oleaje o vientos sin colapsar, estas jaulas están conectadas entre ellas por pasarelas o pasillos

principalmente compuestos por polietileno de alta densidad (HDPE). Este esqueleto semirrígido conecta con un sistema de redes hechas de Poliamida (Nylon), que se disponen en redes para los salmones, redes loberas (depredadores marinos) y pajareras. Otro compuesto presente en tuberías, válvulas, mangueras, etc., es el poli cloruro de vinilo (PVC) y finalmente se utiliza el poli tetrafluoretileno (PTFE) como material antiadherente y recubre otros materiales expuestos al medio ambiente (Olivares, 2009; Li *et al.*, 2014; Steven *et al.*, 2018; SERNAPESCA, 2021).

El ciclo productivo de las salmoneras se divide en tres etapas: la primera, es la crianza en agua dulce donde se obtienen los gametos a partir de reproductores hasta que los alevines maduran a *smolts*. La segunda etapa comprende desde la recepción de los *smolts* ya adaptados al agua salada, hasta alcanzar la madurez y peso comercial aproximadamente a los 4,5 kg para ser cosechados, La tercera y última etapa consiste en la etapa de procesamiento. Las salmoneras se encuentran principalmente en el mar o estuario, se distribuyen en la zona sur-austral del país, concentrando la mayoría de las salmoneras en aguas de mar de la Región de Los Ríos (SUBPESCA, 2013; Dresdner *et al.*, 2016).

Uno de los antecedentes principales en los que se sustenta esta investigación es la capacidad de adhesión de la bacteria a diversos sustratos. Dentro de los sustratos bióticos demostrados a través de experimentos de adhesión de *P. salmonis in vitro* destaca en primer lugar las ovas de salmón, siendo observado el CAP a través de MEB. Otros sustratos bióticos son las branquias y piel de salmón los cuales fueron expuestos a *P. salmonis* en suspensión y evidenciado a través de inmunofluorescencia directa (Smith *et al.*, 1999; Larenas *et al.*, 2003).

Por otra parte, como sustrato abiótico se ha demostrado el vidrio durante un experimento en el cual se cultivó la *P. salmonis* en placas Petri y posteriormente fue detectada a través de inmunofluorescencia directa. Además, se ha demostrado su adhesión a algunos polímeros como lo son el nylon y poliestireno en experimentos en condiciones de campo y siendo detectado por PCR y electroforesis (Steven *et al.*, 2018; Levipan *et al.*, 2020).

También la adhesión de *P. salmonis* a polímeros artificiales se propone en base a los antecedentes que existen sobre adhesión a materiales plásticos por parte de otras bacterias patógenas marinas, más estudiadas en *Pseudomonas* y *Vibrio*. Los estudios de adhesión de *P. salmonis* han sido realizados casi en su totalidad en condiciones *in vitro*, siendo aun desconocidos algunos aspectos como lo es su sobrevivencia en el medio extracelular (Li *et al.*, 2014; Fernández, 2015).

El modelo de adhesión propuesto en condiciones de campo proporcionará información más realista acerca de la sobrevivencia de la bacteria en el medio ambiente marino. El retiro del modelo experimental definido en tres extracciones está fundamentado principalmente en los antecedentes de adhesión que entrega Steven *et al.* (2018) en el cual se extrajo el modelo experimental en 7 días al igual que el modelo actual, para realizar una comparación entre ambas extracciones. El segundo instante del retiro está programado al día 60 post inmersión, en base a los antecedentes de sobrevivencia extracelular de *P. salmonis* la cual indica que no superaría los 40 días en el medio ambiente marino. Finalmente, la tercera extracción al día 90 para así considerar los manejos sanitarios en los centros de cultivo de peces, específicamente el *all in all out* que tiene una duración aproximada de 90 días (SERNAPESCA, 2008; Olivares y Marshall, 2010).

En base a los antecedentes entregados por Steven *et al.* (2018) se puede esperar que *P. salmonis* se adhiera a poliamida y a las conchas de choritos, sin embargo, no podría descartarse su adhesión a los otros polímeros con la información actual. También es probable que la bacteria se encuentre adherida durante los tiempos de extracción de las muestras, para determinar una concentración y establecer parámetros de supervivencia será necesario realizar estudios de cuantificación.

La presente memoria de título busca establecer un protocolo de adhesión mediante un modelo experimental de campo que permita el contacto de la *P. salmonis* con los polímeros de uso común en salmonicultura. Esto tiene importancia para disminuir los potenciales reservorios de *P. salmonis* que presentan los materiales inmersos en el mar de los planteles de cultivo, también es relevante para mejorar los planes de vigilancia previo a los brotes estacionales

conociendo mejor los factores medioambientales, los polímeros que favorecen la supervivencia de la bacteria fuera de su hospedero para reemplazarlos por materiales de menor adhesión y el tiempo en que estos reservorios mantendrían al agente adherido.

La proyección del presente modelo de adhesión en condiciones de campo es que este pueda ser utilizado tanto en agua de mar como estuarina, también variar los sustratos interviniendo en sus características físico-químicas o utilizando otros polímeros artificiales para evaluar su rol como sustrato de *P. salmonis*.

7. CONCLUSIONES

- 1.** Respecto a los antecedentes de adhesión de *P. salmonis* en sustratos bióticos como abióticos, la gran mayoría de los estudios fueron realizados en condiciones *in vitro*, por lo que es necesario contar con un mayor número de estudios en condiciones de campo para realizar una mejor aproximación a las condiciones ambientales en que se desarrolla la piscirickettsiosis.
- 2.** Los materiales utilizados en centros de engorda de salmones refleja un acotado grupo de polímeros artificiales termoplásticos como son el polietileno de alta densidad (HDPE), policloruro de vinilo (PVC), poliamida o nylon (PA) y poli tetrafluoretileno o teflón (PTFE).
- 3.** Para el modelo experimental de adhesión se propone el uso de los polímeros antes descritos en un centro de engorda durante un brote de piscirickettsiosis, mantenidos en cuelgas por un periodo de entre 7 hasta 90 días.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ALDAY-SANZ, V.; RODGER, H.; TURNBULL, T.; ADAMS, A.; RICHARDS, R. H.** 1994. An Immunohistochemical Diagnostic Test for Rickettsial Disease. *Journal of Fish Diseases* 17:189-191.
- ALMENDRAS, F. E.; FUENTEALBA, I. C.** 1997. Salmonid Rickettsial Septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 29:137-144.
- ALMENDRAS, F. E.; FUENTEALBA, I. C.; JONES, S. M. R; ARKHAM, F.; SPANGLER, E.** 2003. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater- raised Atlantic salmon, *Salmo salar*. L. *Journal of Fish Diseases* 20:409-418.
- ARKUSH, K. D.; MCBRIDE, A. M.; MENDONCA, H. L.; OKIHIRO, M.; ANDREE, K. B.; MARSHALL, S.; HENRÍQUEZ, V.; HEDRICK, R. P.** 2005. Genetic characterization and experimental pathogenesis of *Piscirickettsia salmonis* isolated from white seabass *Atractoscion nobilis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 63:139- 49.
- ATHANASOPOULOU, F.; GROMAN, D.; PRAPAS, T. H.; SABATAKOU, O.** 2004. Pathological and epidemiological observations on rickettsiosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) from Greece. *Journal of Applied Ichthyology* 20:525-529.
- BRANSON, E. J.; NIETO, D. D.** 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (walbaum), in South America. *Journal of Fish Diseases* 14:147-156.
- BRAVO, S.; CAMPOS, M.** 1989. Síndrome del Salmón Coho. *Chile Pesquero* 54:47-48.
- CABELLO, C. F.; GODFREY, P. H.** 2019. Salmon aquaculture, *Piscirickettsia salmonis* virulence, and One Health: Dealing with harmful synergies between heavy antimicrobial use and piscine and human health. *Aquaculture* 507: 451-456.
- CARDONA, D.; LAVERNIA, C. J.; ALCERRO, J. C.** 2010. Polietileno. *Acta ortopédica mexicana*, 24:123-128.
- CARTON, F. L.; IRANZO, E. J. O.; NAVARRO, R. B.; TORMO, C. L.** 2011. Control de la presencia de *biofilms* en las industrias alimentarias. *Alimentación, equipos y tecnología*, 264:43-47.
- CHEN, H.; LIU, S.; XU, X. R.; LIU, S. S.; ZHOU, G. J.; SUN; K. F.; ZHAO, J. L.; YING, G.G.** 2015. Antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding Hailing Island, South China: occurrence, bioaccumulation and human dietary exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 90:181-7. [online] Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00914/full>. [Consulta 08-09-22].

CONTRERAS-LYNCH, S.; OLMOS, P.; VARGAS, A.; FIGUEROA, J.; GONZÁLEZ-STEGMAIER, R.; ROMERO, A. 2015. Identification and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* in native fish from southern Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* 115:233-244.

CRISTI, M. A. 2003. Evaluación de la eficacia de dos vacunas experimentales bivalentes para el control de Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile.

DRESDNER, J.; CHÁVEZ, C.; ESTAY, M.; GONZÁLEZ, N.; SALAZAR, C.; SANTIS, O.; FIGUEROA, Y., LAFON, A.; LUENGO, C.; QUEZADA, F. 2016. Evaluación socioeconómica del sector salmonicultor, en base a las nuevas exigencias de la Ley General de Pesca y Acuicultura. Fondo de Investigación Pesquera y de Acuicultura (Proyecto FIPA 2015-42 N° 42; Informe Final, p. 436). [online] Disponible en: <http://www.subpesca.cl/fipa/613/w3-article-92098.html> [Consulta 26-04-2023].

ESTACIO, W.; OVALLE, A.; JIMÉNEZ, J.; ALFONSO, B. 2019. Análisis de muestra de tapa de Pony malta por método de calorimetría diferencial de barrido. Técnicas de caracterización A, Programa de Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. [online] Disponible en: https://www.academia.edu/40722839/An%C3%A1lisis_de_muestra_de_tapa_de_Pony_malta_por_m%C3%A9todo_de_calorimetr%C3%ADa_diferencial_de_barrido [Consulta 13-06-2023].

FERNÁNDEZ, M. A. 2015. Riesgo microbiológico asociado a plásticos sumergidos en agua de mar. [online] Disponible en: <https://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/4282> [Consulta 18-07-2022].

FRYER, J. L.; LANNAN, C. N.; GARCES, L. H.; LARENAS, J. J.; SMITH, P. A. 1990. Isolation of a rickettsial-like organism from diseased coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in Chile. *Fish Pathology* 25:107-114.

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

HUANG, Y.; ZHANG, L.; TIU, L.; WANG, H. H. 2015. Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 6:914. [online] Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00914/full>. [Consulta 08-09-22].

JAKOB, E.; STRYHN, H.; YU, J.; MEDINA, M.; REES, E.; SANCHEZ, J.; ST-HILAIRE, S. 2014. Epidemiology of *Piscirickettsiosis* on selected Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*O. mykiss*) saltwater aquaculture farms in Chile. *Aquaculture* 433: 288 - 294.

- LANNAN, C. N.; BARTHOLOMEW, J. L.; FRYER, J. L.** 1999. Rickettsial and chlamydial infections. **In:** Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders* 3:245-267.
- LANNAN, C. N.; EWING, S. A.; FRYER, J. L.** 1991. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. *Journal of Aquatic Animal Health* 3:229-234.
- LANNAN, C. N.; FRYER, J. L.** 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. Department of Microbiology. *Journal of Fish Diseases* 17:545-548.
- LARENAS, J.; HIDALGO, V.L.; GARCÉS, A.H.; FRYER, J.L.; SMITH, P.** 1995. Piscirickettsiosis: Lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Avances en Ciencias Veterinarias* 10.
- LARENAS, J.; BARTHOLOMEW, J.; TRONCOSO, O.; FERNÁNDEZ, S.; LEDEZMA, H.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms* 56:25-30.
- LARENAS, J.; PÉREZ, M.; MORALEDA, C.; GODOY, M.; LARENAS, C.; ACUÑA-RETAMAR, M.** 2019. *In vitro* adhesion and infectiveness of *Piscirickettsia salmonis* on mussel shells *Mytilus chilensis*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 39:114-121.
- LEVIPAN, A. H.; IRGANG, R.; YAÑEZ, A. y AVENDAÑO-HERRERA, R.** 2020. Improved understanding of biofilm development by *Piscirickettsia salmonis* reveals potential risks for the persistence and dissemination of piscirickettsiosis. *Scientist Reports* 10:1-16.
- LI, Y.; GUO, X.; YANG, J.; LIANG, X.; BAO, W.; SHEN, P.; SHI, Z.; LI, J.** 2014. Effects of bacterial biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. *Aquaculture* 33:434-441.
- LIDE, D. R.** 2004. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 84: 2475.
- LÓPEZ, C. F.** 2005. Fundamentos de polímeros. VII Escuela Venezolana para la enseñanza de la química. U. de los Andes, Facultad de Ciencias Departamento de Química. 49-51. [online] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262639386_FUNDAMENTOS_DE_POLIMERO_S. [Consulta 13-06-2023].
- MARSHALL, S. H.; GÓMEZ, F. A.; RAMÍREZ, R.; NILO, L.; HENRÍQUEZ, V.** 2012. Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth stress conditions: a putative *in vivo* survival/persistence strategy in marine environments. *Research in Microbiology* 163:557-566.

- MAUEL, M. J.; GIOVANNONI, S. J.; FRYER, J. L.** 1996. Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 26:189-195.
- MAUEL, M. J.; MILLER, D. L.** 2002. Review Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. *Veterinary Microbiology* 87:279-289.
- MAUEL, M. J.; MILLER, D. L.; FRAZIER, K.; LIGGETT, A. D.; STYER, L.; MONTGOMERY-BROCK, D.; BROCK, J.** 2003. Characterization of a piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. *Diseases of Aquatic Organisms* 53:249-255.
- MAUEL, M. J.; WARE, C.; SMITH, P. A.** 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 20:213. [online] Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/104063870802000211> [Consulta: 24-08-2022].
- MOHAPATRA, B. C.; SARKAR, B.; BARIK, N. K.; JAYASANKAR, P.** 2011. Application of Plastics in Aquaculture. Cooperating Centre at Central Institute of Freshwater Aquaculture. Pp 120. [online] Disponible en: <https://krishi.icar.gov.in/jspui/bitstream/123456789/1840/1/Book%20on%20Application%20of%20Plastics%20in%20Agriculture.pdf> [Consulta: 12-06-2022].
- OLIVARES, E. A.** 2009. Reconocimiento e inspección de centros de cultivo. Memoria para optar al Título Ingeniero Naval. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile. Facultad de Ciencias de Ingeniería. 54 p.
- OLIVARES, J.; MARSHALL, S. H.** 2010. Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a following period in salmon farms. *Journal of Fish Diseases* 33:261–266.
- OLSEN, A. B.; MELBY, H. P.; SPEILBERG, L.; EVENSEN, Ø.; HASTEIN, T.** 1997. *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway-epidemiological, pathological, and microbiological findings. *Diseases of Aquatic Organisms* 31:35-48.
- PACHECO, Q. B.** 2017. Detección de Enterobacterias Blee Positivas Productoras de *Biofilm* en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco”. Memoria para optar al título de Licenciado en Tecnología Médica. [online] Disponible en: <https://repositorio.uap.edu.pe/handle/20.500.12990/2011> [Consulta: 13-06-2023].
- PÉREZ, M. A.** 2017. Evaluación *in vitro* de la formación del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) de *Piscirickettsia salmonis* en conchas de choritos (*M. chilensis*) y su capacidad infectiva. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Universidad de Chile.
- PEIRANO, P.** 2015. 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. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Universidad de Chile.

PONCE, M.; MALDONADO, A. S.; ORO, P. 2014. Material teórico (Investigación en Internet-Parte I). Tecnología de la Comunicación I. [online]. Disponible en: <http://tec-comunicacion.unsl.edu.ar/Tecno%20I/2014/material%20teorico/Teor%EDa%20Investigaci%F3n%20en%20Internet.pdf> [Consulta: 22-06-2021].

DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD DEL BANCO NACIONAL DE ADN. 2020. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III, Universidad de Salamanca. [online] Disponible en: <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf> [Consulta 16-06-2023].

QUINTEROS, G. J. 2005. Comparación en la presentación del complejo de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Universidad de Chile.

RAMÍREZ SALAS, E. 2019. Caracterización de muestras de textil para su reciclaje con espectroscopía de infrarrojo medio y módulo ATR. (Tesis de grado). [online]. Disponible en: <https://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/66740/eramirez.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Consulta 12-04-2022].

SALINAS, G.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.; LARENAS, J. 1997. Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater condition. VIIIth International Conference. Diseases of Fish and Shellfish. Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh, European Association of Fish Pathologists 57.

SERNAPESCA. 2008. Resolución N° 2638 establece programa sanitario específico de vigilancia y control de la anemia infecciosa del salmón (PSEC-ISA). [online] Disponible en: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/resolucion_2638_0.pdf. [Consulta 03-05-23].

SERNAPESCA. 2012. Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-Piscirickettsiosis). Unidad de Salud Animal. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. [online] Disponible en: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/importacion/Acuicultura/resex_3174_2012.pdf [Consulta: 18-04-21].

SERNAPESCA. 2018. Informe Final. Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura (PGSA)- Sernapesca. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Universidad de Chile. [online] Disponible en: <http://pgsa.sernapesca.cl/wp-content/uploads/2019/02/Informe-Final-INTA-2017-2018.pdf> [Consulta 27-11-21].

SERNAPESCA. 2021. Manual de Buenas Prácticas en el uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura chilena. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. [online] Disponible en:

http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/manual_de_buenas_practicas_20210217.pdf
[Consulta 28-06-2022].

SERNAPESCA. 2022. Listado de centros de cultivo inscritos. Programa para la optimización del uso de antimicrobianos (Certificación PROA-salmón). [online] Disponible en:

http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/listado_de centros_de_cultivo_inscritos_proa-salmon_20220225.pdf [Consulta 25-04-2023].

SMITH, P.; PIZARRO, P.; OJEDA, P.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; LARENAS, J. 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 37:165-172.

STEVEN, A.; SIDHU, J.; CONTRERAS, S.; LARENAS, J., BERNAL, P.; VAQUERO, P.; OCAMPO, D.; ACUÑA, M.; ARAYA, C.; GODOY, M.; MORALEDA, C.; NEIRA, A.; NÚÑEZ, E. 2018. Dinámica ambiental de *P. salmonis* FIE V014- Programa para la Gestión Sanitaria de la Acuicultura. Informe de avance. CSIRO Australia. [online]. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/pgsa-03-final_srs_reporte_dic_2018.pdf [Consulta: 16-05-21].

SUBPESCA. 2013. Resolución Exenta N° 2713-2013 Modifica Resolución N° 1503-2013 establece profundidad estimada de redes peceras y peso de cosecha de los ejemplares. (F.D.O. 16-10-2013). [online]. Disponible en: <https://www.subpesca.cl/portal/615/w3-article-81470.html> [Consulta: 26-04-23].

VERA, T.; ISLA, A.; CUEVAS, A.; FIGUEROA, J. 2012. Un nuevo medio de cultivo líquido para el patógeno *Piscirickettsia salmonis*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 44: 273-277. [online]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2012000300010> [Consulta 24-08-22].

WANG, R.; XU, G.; HE, Y. 2017. Structure and properties of polytetrafluoroethylene (PTFE) fibers. *e-Polymers*, 17:215-220. [Online]. Disponible en: <https://doi.org/10.1515/epoly-2016-0059> [Consulta 12-06-22].

ZETTLER, E. R.; MINCER, T. J.; AMARAL-ZETTLER, L. A. 2013. Life in the 'Plastisphere': Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental science & technology*. 47:7137-7146. [online] Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23745679/> [Consulta 13-03-22].

ANEXOS

Anexo 1. Materiales utilizados en la extracción del DNA.

EXTRACCIÓN DE DNA	
“Kit” de extracción Wizard® Promega	Gradillas plásticas
Micropipeta de 2 a 20 μL	Contenedor de hielo con “ice packs”
Micropipeta de 20 a 200 μL	Papel absorbente
Micropipeta de 100 a 1000 μL	Tubos Eppendorf de 1,5 mL
Puntas de micropipeta de 20, 200 y 1000 μL	Tijeras y pinzas
Pistilos para homogeneización	Cloro 3%
Vórtex (Type 16700 Mixer Maxi-Mix 1)	

Anexo 2. Materiales utilizados en la técnica de PCR anidado.

INSUMOS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN PCR	
Termociclador PCR Touch 960 (Hangzhou Jingle Scientific Instrument Co., Ltd.)	Micropipeta de 0,1 a 2 μ L
Campana de bioseguridad	Micropipeta de 20 a 200 μ L
Súper Mini Centrífuga (Modelo Mini – 14K)	Micropipeta de 100 a 1000 μ L
Promega GoTaq Colorless 2X PCR Mastermix)	Agua libre de DNAsas (Promega ®)
Partidores Eub-A y Eub-B (primera amplificación)	Microtubos de 0,2 mL
Partidores PS2S y PS1AS (segunda amplificación)	Puntas de micropipeta (2, 20, 200 y 1000 μ L)
Guantes desechables	Tubos Eppendorf de 2 mL

Anexo 3. Materiales utilizados en la electroforesis en gel de agarosa 2%.

Materiales utilizados en electroforesis	
TBE 1X (Promega)	Termómetro digital
Agar 1,5 Lafken (Fermelo)	Molde y peineta de dientes para geles
Matraz 100 mL	Microondas
Micropipeta 2-20 μ L	GelRed® (Biotium)
Puntas 20 μ L	Fuente de poder <i>Voltronic</i> (Nyxtechnik)
Balanza digital	