



UNIVERSIDAD DE CHILE

MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA

**DETECCIÓN Y ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Piscirickettsia salmonis* EN
RIÑÓN, HÍGADO, BAZO Y HECES DE SALMÓN COHO (*Oncorhynchus kisutch*)
BAJO CONDICIONES DE CULTIVO EN AGUA DE MAR**

Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias de la Acuicultura

EDERSON JUAN MONTALICO PONGO

Director de Tesis
JULIO LARENAS HERRERA

SANTIAGO - CHILE
2015



UNIVERSIDAD DE CHILE

MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA

**DETECCIÓN Y ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Piscirickettsia salmonis* EN
RIÑÓN, HÍGADO, BAZO Y HECES DE SALMÓN COHO (*Oncorhynchus kisutch*)
BAJO CONDICIONES DE CULTIVO EN AGUA DE MAR**

Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias de la Acuicultura

EDERSON JUAN MONTALICO PONGO

Director de Tesis
JULIO LARENAS HERRERA

Profesores Evaluadores
NELSON DÍAZ PÉREZ
JURIJ WACYK GONZALEZ
JOSÉ YÁÑEZ LÓPEZ

Evaluadora Externa
ANA SANDINO GARCÍA

SANTIAGO - CHILE
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

DETECCIÓN Y ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Piscirickettsia salmonis* EN RIÑÓN, HÍGADO, BAZO Y HECES DE SALMÓN COHO (*Oncorhynchus kisutch*) BAJO CONDICIONES DE CULTIVO EN AGUA DE MAR

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de:
Magister en Ciencias de la Acuicultura

EDERSON JUAN MONTALICO PONGO

	Calificaciones	FIRMA
DIRECTOR DE TESIS		
Julio Larenas Herrera Médico Veterinario. Mag.	
PROFESORES EVALUADORES		
Nelson Díaz Pérez Dr. en Ciencias mención Biología 5.6
Jurij Wacyk González Ingeniero Agrónomo. Ph. D. 5.1
José Yáñez López Médico Veterinario Dr. en Cs. Silvoagropecuarias y Vet. 5.0
CONSEJERO EVALUADOR		
Ana Sandino García Dr. en Ciencias mención Biología 4.0

Santiago - Chile
2015

AGRADECIMIENTOS

Mis más grandes agradecimientos al profesor Dr. Julio Larenas Herrera por guiarme durante el desarrollo de este trabajo, apoyarme en todo momento y ser un gran aporte en mi desarrollo como profesional.

A todos los compañeros del laboratorio de patología de peces que siempre respondieron a mis requerimientos y consultas.

Se agradece al Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies hidrobiológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile por su financiación, gracias a ella se pudo realizar el presente trabajo.

Y a todas las personas que colaboraron desinteresadamente en el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

**Dedico este trabajo a mis padres que siempre creyeron en mí
y me apoyaron incondicionalmente en todos
mis proyectos, contribuyendo
ha alcanzar mis
metas.**

ÍNDICE

Índice de Contenido

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1. Obtención de frotis renales, hígado, bazo y heces.....	12
2. Análisis de las muestras.....	13
3. Controles.....	14
3.1 Control positivo.....	14
3.2 Control negativo.....	14
4. Observación del agente.....	15
5. Análisis estadístico.....	15
5.1 Comparación de diferencias entre todas las muestras.....	15
5.2 Medición de la asociación entre órganos y heces.....	16
RESULTADOS	18
1. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en riñón, hígado, bazo y heces.....	18
2. Análisis estadístico.....	20

2.1 Determinación del grado de asociación entre las muestras de los órganos y heces en forma conjunta mediante la prueba Q de Cochran	20
2.2 Análisis para determinar la asociación entre los órganos y heces mediante la prueba Mc Nemar (χ^2).....	20
2.3 Resumen de asociaciones a la presencia de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en frotis de órganos y heces.....	22
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXOS.....	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Número de alevines de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) según detección por inmunofluorescencia indirecta (IFI) de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en frotis renal y de heces.....	9
Tabla 2. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en frotis de riñón, hígado, bazo y heces de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>).....	18
Tabla 3. Porcentaje de positividad de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en órganos y heces en salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	19
Tabla 4. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en frotis de riñón e hígado de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) afectados por un brote de piscirickettsiosis.....	21
Tabla 5. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en frotis de riñón y bazo de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) afectados por un brote de piscirickettsiosis	21
Tabla 6. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en frotis de riñón y heces de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) afectados por un brote de piscirickettsiosis	21
Tabla 7. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en frotis de hígado y bazo de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) afectados por un brote de piscirickettsiosis	21
Tabla 8. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en frotis de hígado y heces de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) afectados por un brote de piscirickettsiosis	22
Tabla 9. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en frotis de bazo y heces de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>) afectados por un brote de piscirickettsiosis	22
Tabla 10. Resumen de asociación encontrada entre los órganos y heces de salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	22

Índice de Figuras

- Figura 1.** La fotografía muestra signos clínicos propios de la piscirickettsiosis. Se observa abundante cantidad de úlceras correspondientes a *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar..... 41
- Figura 2.** Frotis renal. Se observa abundante cantidad de microorganismos cocoides correspondientes a *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). 1000X..... 41
- Figura 3.** Frotis de hígado. Se observa abundante cantidad de microorganismos cocoides correspondientes a *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). 1000X..... 42
- Figura 4.** Frotis de bazo. Se observa abundante cantidad de microorganismos cocoides correspondientes a *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). 1000X..... 42
- Figura 5.** Frotis de heces. Se observa abundante cantidad de microorganismos cocoides correspondientes a *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). 1000X..... 43

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Porcentaje de positividad de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en órganos y heces en salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>).....	20
Gráfico 2. Porcentaje de detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> según la asociación de órganos para el diagnóstico de piscirickettsiosis.....	26

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	40
--	----

RESUMEN

Piscirickettsia salmonis es el agente causal de piscirickettsiosis, la enfermedad más importante de la salmonicultura en Chile. El microorganismo se encuentra habitualmente en riñón, hígado, bazo, branquias, corazón, piel y encéfalo. Al respecto, la OIE ha establecido que para el diagnóstico con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se utilice de preferencia riñón, hígado y sangre obtenido desde peces infectados. Sin embargo, no existen antecedentes publicados que establezcan cuales son los órganos más adecuados para la detección del agente etiológico.

En el presente trabajo se emplearon 19 peces de la especie salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), con signos clínicos de piscirickettsiosis, provenientes de centros de cultivo en agua de mar con brote de la enfermedad, ubicado en la Región de los Lagos. Como muestras se obtuvieron frotis de tejido renal, hepático, esplénico y de heces, para posteriormente ser procesadas mediante (IFI) para la detección de *Piscirickettsia salmonis*.

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en todos los órganos y heces de salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*), presentando mayor positividad el hígado y riñón con un 68,4% y 52,6% respectivamente. Además, la bacteria fue observada en heces en un 47,4%, significando que la eliminación vía fecal del agente es posible en condiciones de cultivo, lo que plantea nuevas estrategias epidemiológicas.

Por otro lado en este estudio se demuestra que los órganos riñón e hígado sólo detectan el 78,9% de los peces positivos al agente. Al respecto, sólo al utilizar los tejidos hepático, esplénico y las heces se logra detectar el 100% de los peces positivos a *Piscirickettsia salmonis*. Estos resultados pueden implicar una reformulación de los métodos diagnósticos actualmente utilizados.

Palabras claves: Salmón coho, diagnóstico, enfermedad, piscirickettsiosis.

ABSTRACT

Piscirickettsia salmonis is the causative agent of piscirickettsiosis, the most important disease of salmon culture in Chile. The microorganism is commonly found in kidney, liver, spleen, gills, heart, skin and brain. In this regard, the OIE has established that for the diagnosis with indirect fluorescent antibody test (IFAT), kidney, liver and blood obtained from infected fish should preferably be used. However, there is no reported information establishing the most appropriate organs for detection of the etiologic agent.

In this study 19 specimens of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with clinical signs of piscirickettsiosis were used. They were obtained from seawater cultures with outbreak of the disease, located in the Region de los Lagos. Smear samples were obtained from kidney, liver, spleen and fecal tissues and then processed by IFAT for detecting *Piscirickettsia salmonis*.

The results obtained showed the presence of *Piscirickettsia salmonis* in all organs and feces of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), presenting greater positivity in liver and kidney with 68.4% and 52.6%, respectively. In addition, the bacterium was observed in 47.4% of feces, indicating that fecal elimination of the agent is possible under culture conditions, posing new epidemiological strategies.

Furthermore, in this study it is shown that kidney and liver detect only 78.9% of the fish positive to the agent. In this regard, only when using liver and spleen tissues as well as feces, detection of 100% of fish positive to *Piscirickettsia salmonis* is attained. These results may involve a reformulation of the diagnostic methods currently used.

Key words: Coho salmon, diagnosis, diseases, piscirickettsiosis.

INTRODUCCIÓN

En Chile, la salmonicultura se ha desarrollado con tal rapidez que actualmente se ha transformado en uno de los sectores más exitosos de la economía nacional (Bravo y Midtlyng, 2007) y en el segundo productor del mundo de salmónidos de cultivo después de Noruega (Buschmann et al., 2009).

Entre las principales ventajas comparativas que Chile posee para el desarrollo de esta industria, se destacan el clima y la geografía, que permiten cultivos en grandes extensiones, y la calidad de sus aguas, ideales para los peces por su temperatura y salinidad que permiten un adecuado desarrollo de las especies acuícolas salmonídeas (Knapp et al., 2007).

Sin embargo, estas cualidades se han ido perdiendo con el tiempo, debido que al igual que en otros países, las enfermedades infecciosas también empezaron a constituir un serio problema para la industria salmonera (Bravo y Midtlyng, 2007). Esta situación ha tenido un mayor impacto en la fase de engorda de estos peces, efectuada en el agua de mar o estuarina, generando pérdidas económicas que anualmente exceden los 100 millones de dólares (Bravo y Campos, 1989).

Las enfermedades bacterianas corresponden al 42,2% de las pérdidas totales de la salmonicultura en Chile (Bustos et al., 1994). Entre estas enfermedades se encuentran la piscirickettsiosis, descrita por primera vez en Chile en 1989 (Bravo y campos, 1989; Fryer et al., 1990; Cvitanich et al., 1991). Esta enfermedad tiene como agente etiológico a *Piscirickettsia salmonis*, que es considerado el más serio patógeno que afecta a los salmones de cultivo en Chile (Bravo, 1994).

En la actualidad la piscirickettsiosis, no se ha podido controlar y esto es debido a la escasa información que existe acerca de varios aspectos del ciclo de vida de la bacteria, así como la virulencia, patogenicidad, medios de transmisión y medios de excreción del agente. Es por ello que la presente memoria de tesis busca aportar información acerca de la distribución de la bacteria en diferentes órganos y su posible eliminación del agente vía fecal.

En la presente tesis se comparó la presencia y asociación de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de frotis renal, hígado, bazo y contenido intestinal, obtenidos de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) provenientes de centros de cultivo de la Región de los Lagos, que presentaban brotes de piscirickettsiosis. Para la detección del agente etiológico se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. PISCIRICKETTSIOSIS

Actualmente, la piscirickettsiosis es considerada como la principal causa de altas mortalidades en las especies de salmónidos cultivadas en Chile, provocando anualmente pérdidas superiores a los cien millones de dólares. Además, representa la causa primordial y de mayor impacto económico en la salmonicultura en Chile (Bravo et al., 2005).

La piscirickettsiosis es una de las principales enfermedades infecto-contagiosas teniendo un curso agudo o crónico en sus hospederos. Afecta, principalmente a las especies de salmónidos como trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón chinook (*O. tshawytscha*), salmón japonés (*O. masou*) y salmón rosado (*O. gorbuscha*) (Leal y Woywood, 2007). Se sospecha que el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), es la especie más susceptible (OIE, 2006). En su aparición e impacto coexisten una serie de factores propios del agente, de los mismos peces y de los sistemas de cultivo a la que están sometidas las especies (Leal y Woywood, 2007). El agente etiológico fue caracterizado por primera vez en 1989 (Fryer et al. 1990), quienes utilizaron la línea celular CHSE-214 sin antibióticos ni fungistáticos para su aislamiento.

Los brotes de la enfermedad se presentan generalmente entre abril y agosto, 6 a 12 semanas después que los “smolts” son transferidos a la fase marina del ciclo productivo, llegando a durar hasta 10 semanas y luego declinar (Cvitanich et al., 1990). No obstante lo anterior, la enfermedad se puede presentar en peces de todas las edades, incluso hasta los tamaños comerciales (Corbeil y Crane, 2009). Al respecto, se ha propuesto que el proceso de “smoltificación” puede incrementar la susceptibilidad de los peces infectados (Graumann et al., 1997). Originalmente, las epizootias surgían en el otoño y la primavera de cada año (Lannan y Fryer, 1994) cuando las temperaturas de agua fluctuaban entre los 9 y los 16°C (Cvitanich et al., 1995; Lannan y Fryer, 1991), pero en los últimos años su presentación no

ha tenido las características de estacionalidad anteriormente señaladas, puesto que esta enfermedad se produce durante todo el año (Monasterio, 2008).

La piscirickettsiosis se considera básicamente una enfermedad de agua de mar, ya que en este tipo de ambiente acuático es donde se han presentado prácticamente la mayoría de brotes; no obstante lo anterior, excepcionalmente la enfermedad se ha reportado en agua dulce y en la literatura se describen dos hallazgos de este tipo en ambiente acuático, uno de ellos comunicado por Bravo (1994) y el otro por Gaggero et al. (1995). Esta enfermedad ha sido denominada de diversas maneras tales como: “Síndrome de Huito”, “Síndrome del salmón coho”, “Septicemia rickettsial del salmón (SRS)” y “piscirickettsiosis” (Austin et al., 2007; Leal y Woywood, 2007). Para la prevención de esta enfermedad se recomienda algunos manejos en los planteles productivos. Entre estos se describe: la disminución en la densidad de la biomasa (Fryer y Hedrick, 2003).

2. CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE ETIOLÓGICO

El agente etiológico de la piscirickettsiosis es *Piscirickettsia salmonis*, la cual es una bacteria patógena intracelular facultativa, aeróbica, Gram negativa, inmóvil, sin capsula, pleomórfica (aunque generalmente suele observarse como un cocoide) y difícil de cultivar (OIE, 2006). Habitualmente se la observa agrupada en pares o en anillos y de un tamaño que varía de entre 0,5 a 1,5 μm de diámetro (Fryer et al., 1990; Cvitanich et al., 1991; Bravo 1994), aunque se describe que puede generar variantes pequeñas con tamaños inferiores a 0,2 μm (Rojas et al., 2008). El rango de temperatura óptima para la multiplicación de *Piscirickettsia salmonis* está entre los 15 y 18°C, disminuyendo significativamente su replicación bajo los 10°C y sobre los 20°C, además no se multiplica sobre los 25°C (Fryer et al., 1992).

La bacteria se replica en vacuolas intracitoplasmáticas de sus células hospederas, formando un efecto citopático (ECP) característico. La multiplicación bacteriana en la línea celular CHSE-214 se evidencia por la presentación gradual de un ECP, que comienza entre los 5 a 6 días post-inoculación. El ECP se visualiza por la formación progresiva de grupos de células redondeadas, que aumentan tanto en tamaño como en número, similares a racimos de uvas,

hasta lograr finalmente que la monocapa celular se afecte completamente (Fryer et al., 1990; Garcés et al., 1991).

3. ELIMINACIÓN DEL AGENTE

El agente es eliminado por las heces, orina y bilis de los individuos afectados y una vez en el ambiente es capaz de infectar a otros peces, siendo capaz de penetrar piel y branquias intactas (Smith et al., 1999). Se desconoce hasta la fecha si existen vectores marinos implicados en la transmisión. Al respecto, Correal (1995) describió la presencia del agente, usando técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), en el parásito hematófago *Ceratothoa gaudichaudii* y en el ectoparásito *Calligus sp.* Además la observó en algunos peces tales como la Cabrilla (*Paralabrax humeralis*), Jurel (*Trachurus murphyi*), Pejerrey (*Basilichthys australis*), así como en algunos moluscos y crustáceos como Chorito (*Mytilus chilensis*), Picoroco (*Austromegabalanus psittacus*) y copépodos de la vida libre (no identificados).

4. MECANISMO DE TRANSMISIÓN

La transmisión horizontal ocurre tanto en agua salada como dulce. La transmisión vertical ha sido experimentalmente documentada, pero su importancia epidemiológica no es clara (Larenas et al., 2003).

5. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

La patogénesis de la piscirickettsiosis se inicia cuando las barreras físicas de la piel y/o branquias son superadas por la bacteria, produciendo zonas decoloradas en la piel que luego pueden convertirse en úlceras superficiales. La bacteria vía hematogena alcanza posteriormente el parénquima de numerosos órganos (Smith et al., 2004). La naturaleza septicémica de la *Piscirickettsia salmonis* se demuestra también por la presencia de macrófagos infectados visibles en los frotis de sangre de los peces enfermos (Fryer y Hedrick, 2003).

5.1 Signología

Los peces afectados presentan signos clínicos inespecíficos, tales como un desplazamiento cerca de la superficie, errático, descoordinado, lento, y a veces en tirabuzón, lo que refleja alteraciones en el sistema nervioso en estos individuos (Cvitanich et al., 1991; Larenas et al., 1995; Larenas et al., 1996). Además, se ha descrito letargia, anorexia, choque contra las mallas de las balsas-jaulas y orillamiento (Olsen et al., 1997; Larenas et al., 2000).

Las alteraciones macroscópicas externas más relevantes incluyen oscurecimiento y descamación de la piel (Fryer et al., 1997; Larenas et al., 2005; Monasterio, 2008), además de lesiones en este tejido que comprenden desde pequeñas áreas de solevantamiento hasta úlceras hemorrágicas de hasta 2 cm de diámetro (Branson y Nieto Diaz-Muñoz, 1991). También se describe la presencia de petequias y equimosis en la piel de la base de las aletas, del vientre y de la zona perianal y en algunos casos, hemorragias periorbitales, que generalmente son bilaterales (Alvarado et al., 1990; Cubillos et al., 1990). Un signo generalmente presente es la palidez branquial, consecuencia de una anemia significativa. El hematocrito en los peces afectados puede disminuir hasta un 2%, con un promedio de 18,5, siendo el rango normal de 35 a 50% (Fryer y Hedrick, 2003).

Internamente, se presenta severa inflamación y necrosis en el riñón, hígado, bazo, intestino y tejido hematopoyético del riñón inflamado y descolorido, además de una esplenomegalia. También puede presentarse ascitis en la cavidad celómica y hemorragias en la grasa visceral circundante al estómago, en la vejiga natatoria y en la musculatura esquelética (Almendras et al., 1997; Almendras et al., 2000; Fryer y Mauer, 1997).

El hígado se presenta pálido y con nódulos blanquecinos, circulares y opacos de alrededor de 5-6 mm de diámetro (Fryer y Lannan, 2005). Además, puede mostrar un aspecto “moteado”, debido a la presencia de pequeños nódulos subcapsulares blanquecinos a amarillentos distribuidos difusamente en toda su superficie (Larenas et al., 1995; Olsen et al., 1997). También existe un aumento en el volumen del líquido cefalorraquídeo, acompañado en muchos casos de congestión de las meninges (Larenas et al., 1997).

En tanto, el riñón exhibe pérdida de su apariencia brillante, tornándose café-grisáceo opaco (Alvarado et al., 1990) y aumento de su tamaño (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991).

A nivel del bazo, se presenta esplenomegalia en diferentes grados, observándose en reiteradas ocasiones las mismas lesiones blanquecinas descritas en el hígado (Mauel et al., 2002; Cubillos et al., 1990; Fryer et al., 1990). Cabe recalcar que las lesiones histopatológicas más severas se observan en el hígado, riñón y bazo (Cvitanich et al., 1990).

En el estómago, se encuentra un líquido transparente seromucoso (Alvarado et al., 1990; Schäfer et al., 1990), lo cual confiere la impresión de que el pez ha tragado agua (Bravo, 2000). El intestino generalmente no posee alimento (Austin et al., 2011; Venegas, 1996), evidenciándose enteritis en el tercio distal (Garcías et al., 2005); adicionalmente, el lumen de esta víscera puede contener un gran volumen de mucus amarillento (Schäfer et al., 1990; Larenas, 1999). El corazón, en ocasiones, también presenta focos necróticos y hemorragias petequiales de tipo difuso (Cubillos et al., 1990) y en un 2% de los peces moribundos se observa la presencia de una pseudomenbrana que lo cubre, sugiriendo la presencia de pericarditis (Cvitanich et al., 1991). Por la gran variedad de órganos que presentan lesiones se puede desprender que esta enfermedad tiene una naturaleza sistémica (Fryer y Hedrick, 2003), aunque ciertos tejidos tienen un daño más severo, como el inmunopoyético renal (Venegas et al., 2004) y el cardíaco (Monasterio, 2008).

5.2 Lesiones histológicas

Las alteraciones histopatológicas más relevantes son necrosis, proliferación del tejido conectivo y alteraciones vasculares (Larenas et al., 1995; Manneschi, 2011). Además, se observa la formación de trombos, invasión de células inflamatorias, aparición de gránulos basofílicos, así como la aprecia de fibrosis y edema del tejido hematopoyético renal (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Larenas et al., 1997). También se puede encontrar macrófagos conteniendo organismos dentro del citoplasma, coagulación intravascular, inflamación perivascular, pericarditis, endocarditis, lesión inflamatoria crónica en la lámina propia del intestino, incremento del número de células granulares del estrato granuloso

intestinal e hiperplasia y fusión laminillar (Cubillos et al., 1990; Sernapesca, 2013; Stefansson et al., 1991).

6. MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DEL AGENTE

Respecto a los métodos de diagnóstico, la manera de confirmar la presencia del patógeno viable en los tejidos es mediante el aislamiento de este en diferentes líneas celulares o en medios de cultivo libres de célula, como el descrito por Mauel et al. (2008). La confirmación de *Piscirickettsia salmonis* en cultivo celular puede hacerse mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) o por la prueba de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (OIE, 2006). Alternativamente, la bacteria puede detectarse en frotis de tejidos teñidos con Giemsa (OIE, 2006).

Inmunofluorescencia indirecta

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) desarrollada por Lannan et al. (1991), es actualmente la más utilizada y ampliamente implementada en los laboratorios por ser un método rápido, simple y sensible para la detección del agente. No hay requerimientos de estrictas condiciones de asepsia como es el caso del aislamiento. Se puede realizar esta técnica en frotis de tejidos o de sangre las que deben ser fijadas en metanol u otro fijador citológico. Las muestras no utilizadas deben ser almacenadas a -20°C (Lannan et al., 1991). Para el caso de *Piscirickettsia salmonis* al ser observada bajo el microscopio de fluorescencia se ve de un color verde manzana y con su característica morfología cocoide, destacándose su contorno lo cual le confiere una forma de anillo (Lannan et al., 1991; Larenas et al., 1996).

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) incorpora como primer anticuerpo inmunoglobulina IgG de ratón anti *Piscirickettsia salmonis* y como segundo anticuerpo una IgG comercial anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) u otro compuesto fluorescente. Al examinarlo con iluminación de campo oscuro, en un microscopio que tenga una luz ultravioleta, las partículas antigénicas unidas al Ac marcado se observan brillantes y fluorescentes. Además, esta técnica ha sido modificada por Larenas

et al. (1996) mediante el uso de microondas lo cual disminuye el tiempo requerido para la incubación del primer y segundo anticuerpo. Los resultados obtenidos y la calidad de observación alcanzada son buenas, sin afectar la sensibilidad y especificidad de la prueba (Larenas et al., 2005).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según Salinas (1998), en un trabajo experimental utilizando trucha arcoíris que fueron inoculadas vía intraperitoneal con *Piscirickettsia salmonis*, se obtuvo como resultado la presencia del agente en riñón, orina, bilis y heces; significando esto la eliminación y posterior diseminación del agente mediante vía fecal.

De acuerdo a Larenas et al. (2005), en alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados naturalmente vía vertical, se diagnosticó la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en riñón y heces, teniéndose como resultado que sólo un alevín demostró positividad del agente en ambas muestras; 10 presentaban el agente sólo en riñón y 11 sólo en las heces (Tabla 1); indicando en este último caso que se logra eliminar y diseminar el agente vía fecal aun cuando en el riñón resulte negativo a la presencia de *Piscirickettsia salmonis*.

Tabla 1. Número de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) según detección por IFI de *Piscirickettsia salmonis* en frotis renal y de heces (Larenas et al., 2005).

	Riñón (+)	Riñón (-)	Total
Heces (+)	1	10	11
Heces (-)	11	78	89
Total	12	88	100

+ : Presencia de *Piscirickettsia salmonis*

- : Ausencia de *Piscirickettsia salmonis*

En un trabajo realizado por Solis (2002), en reproductores macho y hembra de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), afectados naturalmente por piscirickettsiosis; se comparó la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de tejido renal y de fluido celómico o seminal en hembras y machos respectivamente. La especie salmón coho (*Oncorhynchus*

kisutch) fue la que presentó el mayor porcentaje de positividad siendo las hembras eliminadoras del agente por sus fluidos. Esto podría indicar que existe mayor probabilidad de encontrar a un individuo positivo para su frotis renal que para su frotis de fluido celómico o seminal.

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2006), indica que para diagnosticar la piscirickettsiosis en peces afectados por la enfermedad, se recomienda usar como muestras frotis o improntas tomadas directamente del riñón (parte posterior); en el caso de usar la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

Por otro lado, la excreción de *Piscirickettsia salmonis* mediante las heces sólo se ha demostrado en truchas arcoíris inoculadas vía intraperitoneal en agua dulce; sin embargo no existe información bibliográfica que demuestre si esta vía de eliminación se presenta en la especie salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivada en agua de mar.

De acuerdo a los antecedentes descritos, no se ha establecido que muestra de órgano(s) es el más adecuado para un correcto diagnóstico de la infección. Al respecto, actualmente para el diagnóstico son usados el tejido renal y hepático, de acuerdo a la OIE.

En el presente trabajo se diagnosticó, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), la presencia del agente en muestras de tejido renal, hepático, esplénico y heces de salmónes coho cultivados en agua de mar durante un brote de piscirickettsiosis. Además, mediante las pruebas estadísticas Q de Cochran y Mc Nemar, se estableció una asociación de la presencia de *Piscirickettsia salmonis* entre los órganos y con las heces.

HIPÓTESIS 1

Existe presencia de *Piscirickettsia salmonis* en riñón, hígado, bazo y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), bajo condiciones de cultivo en agua de mar.

HIPÓTESIS 2

Existe asociación de la presencia de *Piscirickettsia salmonis* entre los órganos y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) que presenten signos clínicos de piscirickettsiosis.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la presencia y asociación de la *Piscirickettsia salmonis* en el riñón, hígado, bazo y heces en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) que presenten signos clínicos de piscirickettsiosis.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de la *Piscirickettsia salmonis* en riñón, hígado y bazo mediante la técnica inmunofluorescencia indirecta (IFI).
2. Determinar la excreción de *Piscirickettsia salmonis* en heces mediante la técnica inmunofluorescencia indirecta (IFI).
3. Determinar la asociación de la presencia de *Piscirickettsia salmonis* entre riñón, hígado, bazo y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas, Unidad de Anatomía Patológica, Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

1. OBTENCIÓN DE FROTIS RENALES, HÍGADO, BAZO Y HECES

Se emplearon 19 salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) en etapa adulta moribundos o muertos correspondientes a la mortalidad del día, que presentaban signos clínicos de piscirickettsiosis, provenientes de diferentes jaulas de un mismo centro ubicado en la Región de los Lagos-Chile, zona endémica de la enfermedad. El diagnóstico fue realizado por la empresa de acuerdo a sus protocolos sanitarios y según la normativa de Sernapesca.

Los peces moribundos escogidos se encontraban orillados o con letargia que posteriormente fueron previamente eutanasiados mediante un golpe en la cabeza. Además, se seleccionaron peces muertos que pertenecían a la mortalidad del día recogida por buzos. Todos los peces seleccionados presentaban lesiones macroscópicas evidentes de la enfermedad; donde las úlceras eran la lesión más prominente. Posteriormente los individuos fueron analizados mediante un estudio de necropsia para luego obtener muestras de frotis de órganos y heces.

El procedimiento de necropsia se realizó en una balsa jaula techada y acondicionada para realizar esta operación de acuerdo a la normativa vigente. El proceso de necropsia se realizó de acuerdo a lo descrito por Acuña et al. (2014). Básicamente esta consistió en realizar un corte abdominal ventral desde la zona del opérculo hasta el ano, luego un segundo corte por el lado izquierdo del pez que discurre desde la zona anal hasta el extremo superior del opérculo y un tercero paralelo al opérculo que une a los dos cortes anteriores, de tal manera de facilitar el muestreo de los órganos de interés y evitar una posible contaminación cruzada.

Como muestras se tomaron frotis de tejido renal, hígado, bazo y contenido fecal. Para obtener la muestra de riñón, se realizó un corte longitudinal con un bisturí en la región más posterior del riñón; luego se introdujo un algodón en la zona de la incisión. Posteriormente se realizó el frotis en un portaobjetos debidamente rotulado indicando el número de pez y órgano muestreado. El frotis se fijó con un fijador citológico (Citofix®)¹. El procedimiento de toma de muestras del hígado y bazo fue de forma similar que el riñón. En el caso de la toma de muestra de las heces, se realizó con un corte longitudinal en la parte posterior del intestino procediéndose a realizar un frotis del contenido intestinal.

Luego de obtenerse todas las muestras, éstas fueron refrigeradas. Durante su transporte desde el centro de cultivo hacia Santiago, se mantuvieron en un contenedor con bolsas de hielo, para tratar de mantener la temperatura lo más baja posible. Las muestras fueron recibidas en el laboratorio en mención y almacenadas a temperatura de refrigeración hasta su uso.

2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras obtenidas fueron procesadas mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, de acuerdo a lo previamente establecido por Lannan et al. (1991) y modificada de acuerdo a los protocolos propios del laboratorio (Anexo N°1).

Para el análisis de las muestras se utilizó un “kit” comercial de inmunofluorescencia indirecta (SRS-FluoroTest Indirecto®²) para detectar la presencia de *Piscirickettsia salmonis*.

A cada muestra se añadió 10 µL de solución de trabajo (10^{-2} en PBS) del primer anticuerpo anti-*Piscirickettsia salmonis* producido en ratón. Después cada frotis se procedió a incubar en una cámara cerrada, húmeda y oscura por 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado completo de la muestra con PBS (pH = 7,05), por 5 minutos.

¹ Laboratorio Linsan, Santiago, Chile

² Grupo Bios, Santiago, Chile

En la etapa siguiente, se agregó a la muestra 10 µL de solución de trabajo (10^{-2} en PBS) del segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los frotis se incubaron en una cámara cerrada, húmeda y oscura por 60 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se siguió el mismo procedimiento anterior de lavado.

Los cubreobjetos se montaron usando un medio de montaje acuoso Fluorogel³. Para visualizar las muestras en un microscopio de epifluorescencia se utilizó una longitud de onda de 494 nm, utilizándose un aumento de 1000X.

3. CONTROLES

3.1 Control positivo

Como controles positivos, se usaron frotis de una alícuota de cultivo celular CHSE-214 infectada con *Piscirickettsia salmonis* (100% de efecto citopático). Para confirmar la presencia del agente se realizaron pruebas de tinción Giemsa, Gram, IFI y PCR.

3.2 Control negativo

Como controles negativos de la prueba se utilizaron frotis de los mismos tejidos analizados provenientes de truchas arcoíris clínicamente sanas que provenían de una piscicultura ubicada en la Región de Valparaíso, zona la cual nunca se han presentado o registrado brote de piscirickettsiosis. Para comprobar que estos frotis estuviesen libres de la bacteria se realizó pruebas de Gram, IFI y PCR. Por otra parte, como control negativo se utilizó frotis de cultivos celulares libres de la bacteria. Además, como control de especificidad se obvió el uso del primer anticuerpo en algunas muestras.

³ Empresa Fermelo, Santiago, Chile

4. OBSERVACIÓN DEL AGENTE

Para visualizar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en las muestras, se utilizó un microscopio⁴ de epifluorescencia con una longitud de onda de 494 nm. Para cada muestra se observaron 10 campos microscópicos con un aumento de 1000X, de acuerdo a los descrito por Smith et al. (1999). Las muestras fueron clasificadas como negativas (-) o positivas (+). En este último caso, correspondió a la detección de a lo menos una bacteria dentro de los 10 campos visuales.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante las pruebas estadísticas no paramétricas Q de Cochran y Mc Nemar (que usa la distribución χ^2).

5.1 Comparación de diferencias entre todas las muestras

Primero se realizó la prueba de Cochran (Q), para comparar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en los órganos y heces. Los resultados de la prueba fueron ordenados en un tabla de dos vías que tiene N filas y k columnas, a los resultados positivos se les asignó el número 1 y a los negativos el número 0. La hipótesis nula (H_0) indica que la probabilidad de obtener una respuesta positiva es la misma para cada una de las cuatro muestras y la hipótesis alternativa (H_1) señala que la probabilidad de registrar una respuesta positiva para cada una de las cuatro muestras difiere. La fórmula utilizada para este modelo estadístico, se señala a continuación (Siegel, 1956):

⁴ Nikon, modelo Optiphot-2, Tokio, Japón.

$$X^2_Q = \frac{(K - 1) [K \sum Gn^2 - (\sum Gn)^2]}{K \sum Lc - \sum Lc^2}$$

Donde:

X^2_Q : Estadístico ji cuadrado de la prueba Q de Cochran.

K : Número de tratamientos.

Gn : Número total de respuestas de cambio de cada tratamiento positivas en la columna.

Lc : Número total de respuestas de cambio por individuo de la muestra.

5.2 Medición de la asociación entre órganos y heces

La asociación estadística consiste en determinar que *Piscirickettsia salmonis* esté presente en ambos órganos comparados; para ello se utilizó el método Mc Nemar (χ^2) (Dawson-Saunders y Trapp, 1997; Martin et al., 1997), permitiendo evaluar la concordancia que existe entre dos tratamientos diferentes en un mismo grupo de individuos; utilizándose un nivel de significancia de 0,05 para determinar la asociación entre órganos y heces.

Para las determinaciones de las asociaciones, se utilizó una tabla de contingencia agrupándose en pares de acuerdo a lo señalado por Thrusfield (1990) y Martin et al. (1997).

Una adaptación de esta tabla se ilustra a continuación:

		Estado verdadero		Total
		Infectado	No infectado	
Resultado de la Prueba	Infectado	a	b	a + b
	No infectado	c	d	c + d
Total		a + c	b + d	a + b + c + d

Donde:

a : Son los órganos de los individuos que fueron detectados como positivos por la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI) y que son verdaderamente positivos.

b : Son los órganos de los individuos falsos positivos. La prueba diagnóstica inmunofluorescencia indirecta (IFI) los define como positivos pero en realidad son negativos.

c : Son los órganos de los individuos falsos negativos. La prueba diagnóstica inmunofluorescencia indirecta (IFI) los define como negativos pero en realidad son positivos.

d : Son los órganos de los individuos que fueron detectados como negativos por la prueba diagnóstica inmunofluorescencia indirecta (IFI) y que son verdaderamente negativos.

a + c : Es el total de órganos verdaderamente positivos.

b + d : Es el total de órganos verdaderamente negativos.

a + b : Es el total de órganos de los individuos definidos como positivos por la prueba diagnóstica.

c + d : Es el total de órganos de los individuos definidos como negativos por la prueba diagnóstica.

RESULTADOS

1. DETECCIÓN DE *Piscirickettsia salmonis* EN HÍGADO, RIÑÓN, BAZO Y HECES

Todos los salmones presentaron signos y/o lesiones macroscópicas que han sido descritas para la enfermedad. Dentro de estas se observó principalmente úlceras prominentes en la piel, palidez hepática y hemorragias en órganos abdominales.

Los resultados de positividad o negatividad de los órganos y heces obtenidas por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la totalidad de las muestras, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Detección de *Piscirickettsia salmonis* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en frotis de riñón, hígado, bazo y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*).

PEZ	ÓRGANOS			
	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	HECES
1	-	-	+	-
2	+	-	+	+
3	+	+	-	-
4	-	+	-	-
5	+	+	-	+
6	-	-	-	+
7	-	-	-	+
8	+	+	-	-
9	+	+	-	-
10	+	+	-	-
11	-	+	-	+
12	-	+	-	-
13	-	+	+	-

(Continúa)

(Continuación)

PEZ	ÓRGANOS			
	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	HECES
14	-	-	-	+
15	+	+	-	-
16	-	+	+	+
17	+	+	-	+
18	+	+	-	-
19	+	-	-	+
Total positivos	10	13	4	9
Total negativos	9	6	15	10
TOTAL	19	19	19	19
% positivos	52,6	68,4	21,1	47,4

+ : Presencia de *Piscirickettsia salmonis*

- : Ausencia de *Piscirickettsia salmonis*

En la Tabla 3 se muestra un resumen de la sumatoria de positividad, negatividad y el porcentaje de positividad de los órganos y heces encontrados a la presencia de *Piscirickettsia salmonis*. Para el total de muestras (n=19), se obtuvo un 52,6% de positividad a *Piscirickettsia salmonis* en riñón, un 68,4% en hígado, un 21,1% en bazo y un 47,4% en heces.

Tabla 3. Porcentaje de positividad de *Piscirickettsia salmonis* en órganos y heces en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*).

	Riñón	Hígado	Bazo	Heces
+	10	13	4	8
-	9	6	15	11
% Positividad	52,6 %	68,4 %	21,1 %	47,4 %

En el siguiente gráfico se muestra a manera ilustrativa los resultados de la Tabla 2

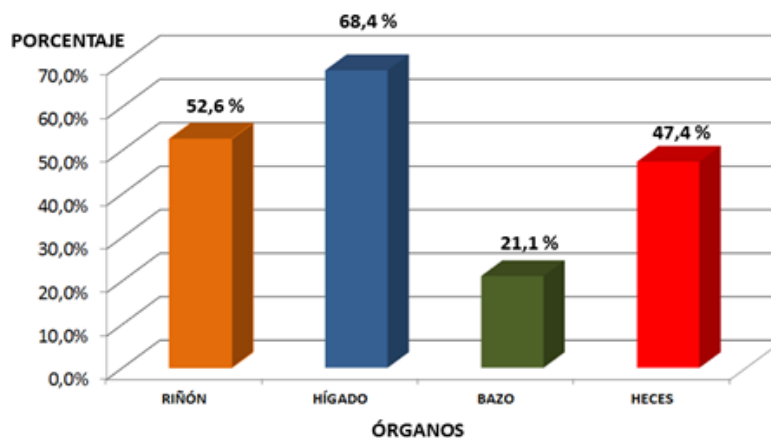


Gráfico 1. Porcentaje de positividad de *Piscirickettsia salmonis* en órganos y heces en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*)

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.1 Determinación del grado de asociación entre las muestras de los órganos y heces en forma conjunta mediante la prueba Q de Cochran (Q)

Para este cálculo se emplearon los resultados de la Tabla 2. En el caso de las muestras analizadas el valor fue de $Q = 5,95$. Este valor es superior al valor crítico de $Q = 5,9$; definido para todas aquellas pruebas con un grado de libertad y un nivel de significancia de un 5%. Por lo tanto, las pruebas difieren al ser analizadas en forma conjunta.

2.2 Análisis para determinar la asociación entre los órganos y heces a través de la prueba Mc Nemar (χ^2)

Para calcular estas asociaciones estadísticas se construyeron las siguientes tablas de contingencia agrupando los órganos en pares (Tablas 4 a 9).

Tabla 4. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de riñón e hígado de salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por un brote de piscirickettsiosis.

RIÑÓN				
		+	-	TOTAL
HÍGADO	+	7	5	12
	-	3	4	7
	TOTAL	10	9	19

Valor 0,125 ($p > 0,01$)

Tabla 5. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de riñón y bazo de salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por un brote de piscirickettsiosis.

RIÑÓN				
		+	-	TOTAL
BAZO	+	2	3	5
	-	8	6	14
	TOTAL	10	9	19

Valor 3,27 ($p > 0,01$)

Tabla 6. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de riñón y heces de salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por un brote de piscirickettsiosis.

RIÑÓN				
		+	-	TOTAL
HECES	+	4	5	9
	-	6	4	10
	TOTAL	10	9	19

Valor 0,36 ($p > 0,01$)

Tabla 7. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de hígado y bazo de salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por un brote de piscirickettsiosis.

HÍGADO				
		+	-	TOTAL
BAZO	+	2	2	4
	-	11	4	15
	TOTAL	13	6	19

Valor 7,69 ($p < 0,01$)

Tabla 8. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de hígado y heces de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por un brote de piscirickettsiosis.

HÍGADO				
		+	-	TOTAL
HECES	+	4	5	8
	-	8	2	11
	TOTAL	12	7	19

Valor 1,23 ($p > 0,01$)

Tabla 9. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de bazo y heces de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por un brote de piscirickettsiosis.

BAZO				
		+	-	TOTAL
HECES	+	2	7	8
	-	3	7	11
	TOTAL	5	14	19

Valor 0,9 ($p > 0,01$)

2.3 Resumen de asociaciones a la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de órganos y heces

En la Tabla 10, se resumen los resultados obtenidos al determinar la asociación existente entre los órganos y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*).

Tabla 10. Resumen de asociación encontrada entre los órganos y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*).

	RIÑÓN	HÍGADO	BAZO	HECES
RIÑÓN		SI	SI	SI
HÍGADO			NO	SI
BAZO				SI
HECES				

SI : Si hay asociación

NO : No existe asociación

DISCUSIÓN

En la salmonicultura en Chile, las enfermedades han significado un serio problema para su desarrollo, constituyéndose en un freno para su avance. Dentro de las principales patologías, la piscirickettsiosis, descrita hace más de 25 años, sigue siendo la principal causa de altas pérdidas económicas por concepto de mortalidad, costos en tratamientos, vacunaciones y en ciertos casos más extremos, por la eliminación completa de “stocks” afectados (Camussetti et al., 2015). Esta enfermedad continúa siendo difícil de controlar y se requiere mayor investigación del ciclo de vida del agente etiológico para desarrollar estrategias efectivas de control (Rozas y Enríquez, 2014).

La fuente y reservorios de *Piscirickettsia salmonis* en el ambiente natural, así como el modo de transmisión aún se desconocen (Rozas y Enríquez, 2014). Si bien se ha determinado que no existe necesidad de vectores para la transmisión de la bacteria en el mar (Olivares et al., 2010). Aunque la transmisión horizontal se ha demostrado en forma experimental, poco se conoce con respecto a la forma que ella ocurre en condiciones de cultivo, especialmente lo relacionado con los mecanismos de eliminación del agente al medio y posterior vía de ingreso al hospedador.

Por otra parte, dentro de los métodos de diagnóstico recomendados para la piscirickettsiosis, el más concluyente es la inoculación de líneas celulares, pero la contaminación de estos es altamente probable (Lannan y Fryer, 1991; Garcés et al., 1991). Otras técnicas descritas son: tinción de Gram, Giemsa, azul de toluidina y naranja de acridina (Bravo y Campos, 1989). Por otra parte según la OIE, como método de diagnóstico se recomienda usar la técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos (IFI) o la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (OIE, 2006).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una prueba que es ampliamente usada para la detección y diagnóstico de enfermedades tanto en medicina humana como animal, demostrando además ser una técnica sencilla, rápida y no requerir condiciones asépticas para la detección del agente y diagnóstico de la enfermedad (Yáñez et al., 2015). La técnica de

inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar *Piscirickettsia salmonis*, fue descrita y desarrollada por primera vez por Lannan et al. (1991), utilizándose un anticuerpo primario específico que reacciona a la presencia de *Piscirickettsia salmonis*, y un anticuerpo secundario que se une con el primer anticuerpo y que además se encuentra marcado con un fluorocromo.

Según Lannan et al. (1991), para demostrar que los anticuerpos usados en IFI no reaccionaban de manera inespecífica, fueron probados en películas de sangre, secciones de tejido, frotis de tejido, y con otras dos bacterias Gram-negativas y dos Gram-positivas patógenas de salmónidos, no existiendo reacción inespecífica o cruzada de los anticuerpos usados y además la bacteria pudo ser claramente diferenciada del material de fondo.

En el presente trabajo se tomaron muestras de riñón, hígado, bazo y heces de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por un brote de piscirickettsiosis. Para ello se escogieron individuos moribundos y provenientes de la mortalidad del día para evitar los procesos propios del *post mortem* temprano que podrían alterar los resultados del diagnóstico (Henríquez, 2013). Además, se observó que las lesiones macroscópicas en todos los peces no eran las mismas lo cual puede indicar diversos estados de la infección (Salinas, 1998). Estos factores antes mencionados podrían alterar o producir alguna variabilidad de resultados entre cada individuo. Se analizaron un total de 19 salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) que provenían de un centro de cultivo en agua de mar los cuales fueron analizados para la detección de *Piscirickettsia salmonis* a través de la prueba diagnóstica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Por otra parte, con el propósito de reducir otros factores de error en el diagnóstico, se utilizó un sólo protocolo y las muestras fueron tomadas siempre en una misma zona determinada para el riñón, hígado, bazo y heces de todos los peces. Al respecto, no existe una publicación que indique área o áreas de los órganos o tejidos que sean más representativos para una buena toma de muestra.

Para realizar el diagnóstico de la presencia de *Piscirickettsia salmonis*, se utilizó el método de diagnóstico de inmunofluorescencia indirecta (IFI) de acuerdo a lo descrito previamente

(Lannan et al. 1991). Dicha prueba, correspondiente a un “kit” comercial, contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales, lo que le confiere a la técnica una mayor sensibilidad y especificidad (Díaz, 1999).

Según Díaz (1999), en un trabajo realizado para comparar las pruebas diagnósticas inmunofluorescencia indirecta (IFI) y dos ensayos inmunoenzimáticos, uno ellos donde se utilizó como primer anticuerpo un monoclonal (ELISAm) y el otro un policlonal (ELISAp) para detectar *Piscirickettsia salmonis*, demostró que la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) presentó mayor sensibilidad y especificidad que los ensayos inmunoenzimáticos. A diferencia, las pruebas de ELISA demostraron un porcentaje elevado de falsos positivos y negativos.

La OIE (2006) ha establecido que al usar la técnica de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la infección, hay que utilizar riñón e hígado, ello basado en publicaciones donde se describe la histopatología de la enfermedad. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún trabajo que indique cual o cuales son los mejores órganos para diagnosticar a los animales infectados.

En el presente trabajo, se comprobó que los órganos que presentaron mayor positividad al agente etiológico mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), fueron el hígado, riñón y heces con un 68,4%, 52,6% y 47,4%, indicando que ningún órgano en forma independiente es capaz de detectar el 100% de los animales con piscirickettsiosis, por ello es necesario asociar los órganos para un efectivo diagnóstico de la enfermedad.

Para analizar los resultados independientemente de la prueba estadística, se asociaron los órganos tomándose las muestras en pares y de a tres, lo que se muestra en el Gráfico 2, para establecer cuál es la mejor asociación capaz de detectar el 100% de los animales infectados con *Piscirickettsia salmonis*.

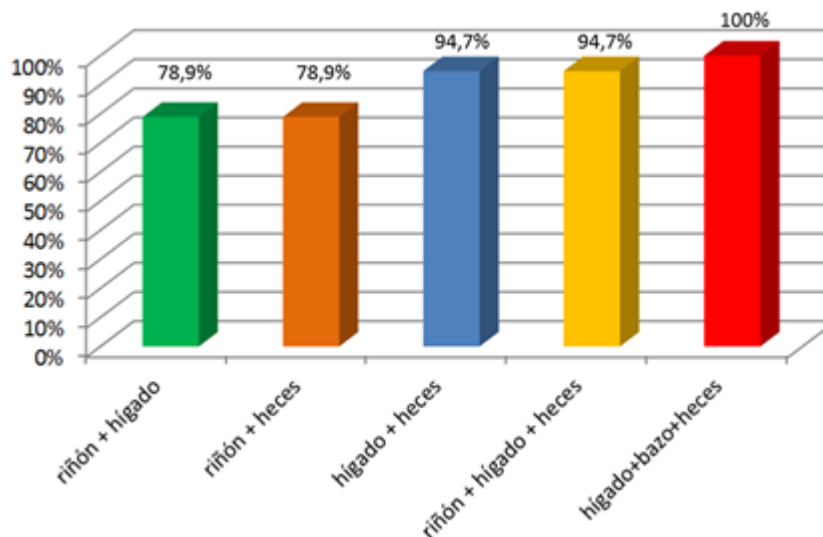


Gráfico 2. Porcentaje de detección de *Piscirickettsia salmonis* según la asociación de órganos para el diagnóstico de piscirickettsiosis

De acuerdo al Gráfico 2, se muestra que la asociación de riñón e hígado sólo es capaz de detectar el 78,9% de los animales positivos al agente; por otro lado se demuestra que la asociación de hígado, bazo y heces detectó el 100% de los animales infectados. Esto no concuerda con que establece la OIE, que indica que los mejores órganos para diagnosticar la piscirickettsiosis son sólo riñón e hígado.

En un trabajo realizado por Larenas et al. (2005), en alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), clínicamente sanos, se realizaron frotis de riñón y de heces obteniéndose como resultado mediante IFI 12% y 11% de positividad a *Piscirickettsia salmonis* respectivamente. Al respecto, en el presente trabajo también realizado en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) pero en etapa adulta se obtuvo 52,6% para el riñón y 47,4% en heces. Estas diferencias, obtenidos en la misma especie, podrían estar dadas por la diferente condición clínica de los animales.

Este trabajo demuestra por primera la eliminación de *Piscirickettsia salmonis* vía fecal al medio marino en salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*), lo que concuerda con trabajos realizados en truchas arcoíris mantenidas en condiciones de cultivo en agua de mar (Peirano, 2015), sin embargo, es necesario establecer si el agente es viable y logra afectar a otras especies susceptibles, tanto salmónidos como no salmónidos. Al respecto, Correal (1995),

demonstró la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en peces silvestres como pejerrey (*Basilichthys australis*), róbalo (*Eliginops maclovinus*), cabrilla (*Paralabrax humeralis*), merluza (*Merluccius sp.*), jurel (*Trachurus murphy*), así como también en moluscos y crustáceos como choritos (*Mytilus chilensis*).

En un estudio realizado por Peirano (2015), realizado en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de un centro de cultivo en agua de mar, en el que buscó la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de riñón, hígado y heces, se obtuvo como resultados 83,3%, 70,8% y 62,5% respectivamente mediante la técnica de Reacción de Cadena en Polimerasa (PCR). Al respecto, los resultados del presente trabajo concuerdan con el estudio de Peirano (2015), al demostrar que los peces cultivados en agua de mar con signología también logran excretar el agente vía fecal, y que ninguno de los órganos y heces presentó el 100% de positividad a la presencia de *Piscirickettsia salmonis*, inclusive usando la técnica molecular PCR que es más sensible y específica que la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Reyes et al, 2006).

Si bien el presente trabajo demuestra que los salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) con signología logran eliminar *Piscirickettsia salmonis* vía fecal, sería interesante determinar y estudiar si los peces infectados, clínicamente sanos también logran eliminar el agente por esta vía.

Según Shannon et al. (1996), existen algunas bacterias, que afectan a las especies de salmónidos y no salmónidos, que son capaces de sobrevivir en el estómago para posteriormente crecer y multiplicarse en el intestino, como en el caso de *Vibrio anguillarum*, agente causal de la vibriosis en los salmónidos. Este agente es capaz de soportar el bajo pH y a las enzimas encontradas en el estómago, para posteriormente desarrollarse en el intestino y ser eliminado vía fecal. Al respecto, no existe publicación que indique si *Piscirickettsia salmonis* es capaz de sobrevivir y soportar el bajo pH y a las enzimas encontradas en el estómago para posteriormente ser eliminada vía fecal y ser viable e infectar así a otros peces.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, se determinó la excreción vía fecal del agente en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), si bien el modo por el cual la bacteria

llegaría al material fecal de los peces infectados se desconoce. Al respecto, en un estudio para conocer las vías de excreción de *Piscirickettsia salmonis*, Salinas et al. (1998) demostró la presencia del microorganismos en riñón, heces, orina y bilis en truchas arcoíris experimentalmente infectados y cultivadas en agua dulce. De acuerdo a ello, la bacteria podría ingresar al intestino y posteriormente ser eliminado vía fecal por medio de la bilis. Por otra parte, no se puede descartar la eliminación por la orina.

Según un trabajo de Solis (2002), realizado en reproductores de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se comparó la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en tejido renal, fluido seminal y celómico en macho y hembra respectivamente. Se encontró que en el salmón del Atlántico había positividad al agente en tejido renal y no en fluido seminal ni celómico; para el caso de la trucha arcoíris no se encontró el agente en el tejido renal y si en el fluido celómico y seminal; y para el salmón coho se presentó positividad en ambos tejidos, indicándose diferencias por especies de salmónidos. Al respecto, sería interesante comprobar si los resultados obtenidos en este trabajo son extrapolables a otras especies de salmónidos cultivados en Chile.

Los resultados de asociación de la presencia de la *Piscirickettsia salmonis* mediante IFI en las muestras de los órganos hígado, bazo y heces encontrados en el presente trabajo, proporcionan un importante avance en la epidemiología de la piscirickettsiosis. Sin embargo, sería recomendable la generación de mayores datos para perfeccionarlos y profundizar la validación de éstos, sobre mayores poblaciones que representen la mayor cantidad de variables de cultivo presentes en los centros de salmonicultura en Chile.

Finalmente este trabajo permite confirmar la eliminación de *Piscirickettsia salmonis* por las heces en salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivado en agua de mar, lo cual sólo se había observado de forma experimental. Por lo tanto, es posible pensar que el agente es viable y existe el riesgo de transmisión horizontal hacia otras especies susceptibles.

CONCLUSIONES

Piscirickettsia salmonis mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se detectó en todos los órganos estudiados y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar.

Se encontró una mayor frecuencia del agente en el hígado con un 68,4% de positividad y en segunda instancia el riñón con un 52,6%, indicando que ninguno de los dos órganos fue suficiente para detectar el 100% de los peces positivos a *Piscirickettsia salmonis*.

El presente trabajo demuestra que en conjunto frotis de hígado, bazo y heces, es posible detectar el 100% de los peces infectados con la bacteria.

Piscirickettsia salmonis se encontró por primera vez en las heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) que presentaban lesiones macroscópicas de piscirickettsiosis provenientes de un cultivo en agua de mar.

Estadísticamente se encontró asociación en la presencia de *Piscirickettsia salmonis* entre todos los órganos a excepción entre hígado y bazo.

BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, M.; LARENAS, J. y OLIVARES, R. 2014. Manual de anatomía y procedimientos diagnósticos en salmónidos. 2013-2014 Ed.FAVET - Universidad de Chile. Santiago. Chile. [en línea] <<http://es.calameo.com/read/00081361607494ca4a527>> [consulta: 15 de mayo 2015].

ALMENDRAS, F. and FUENTEALBA, I. 1997. Salmonids rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. Dis. Aquat. Org. 29:137-144.

ALMENDRAS, F.; FUENTEALBA, I.; MARKHAM, R. and SPEARE, D. 2000. Pathogenesis of liver lesions caused by experimental infection with *Piscirickettsia salmonis* in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Vet. Diag. Invest. 12:552-557.

ALVARADO, V.; SCHAFER, W.; ENRIQUEZ, R.; MONRÁS, M.; CUBILLOS, V.; FARIAS, C. and ALBERDI, A. 1990. Síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de salmonídeos cultivados en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. Pat. Animal. 4:10-13.

AUSTIN, B. 2011. Taxonomy of bacterial fish pathogens. Vet. Res. 42:21.

AUSTIN, B. and AUSTIN, D. 2007. Bacterial Fish Pathogens. Characteristics of the disease, Piscirickettsiosis representative: *Piscirickettsia salmonis*. 4th ed. Springer-Praxis. Chichester, U.K. pp:283-321.

BRANSON, E. and NIETO DÍAZ-MUÑOZ, D. 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in South America. J. Fish Dis. 14:147-156.

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

BRAVO, S. 2000. Previendo las enfermedades en la industria salmonera. Chile Acuícola: 21-25.

BRAVO, S. y CAMPOS, M. 1989. Síndrome del salmón coho. Chile Pesquero. 54: 47-48.

BRAVO, S.; DOLZ, H.; SILVA, M.; LAGOS, C.; MILLANAO, A. y URBINA, M. 2005. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Informe final de proyecto Fondo de Investigación Pesquera (FIP) N° 2003-28. Universidad Austral de Chile. Facultad de Pesquerías y Oceanografía. Instituto de Acuicultura. Puerto Montt. Chile. 256p.

BRAVO, S. and MIDTLYNG, P. 2007. The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry. 1999-2003, Aquaculture. 270:36-42.

BUSCHMANN, A.; CABELLO, F.; YOUNG, K.; CARVAJAL, J.; VARELA, D. y HENRIQUEZ, L. 2009. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. Ocean Coast. Manage. 52:243-249.

BUSTOS, P.; ENTRALA, P.; MONTAÑA, J. y CALBUYAHUE, J. 1994. Septicemia rickettsial salmonidea (SRS): Estudio de transmisión vertical en salmón Coho, *Oncorhynchus kisutch*. Puerto Montt, Chile. In: Resúmenes de Seminario de Patología y Nutrición en el Desarrollo de la Acuicultura: Factores de éxito. 3-7 Octubre. Puerto Montt. Chile. Fundación Chile. pp. 33-40.

CAMUSSETTI, M.; GALLARDO, A.; AGUILAR, D y LARENAS, J. Piscirickettsiosis: Análisis de los costos por la utilización de quimioterápicos y vacunas en la salmonicultura. Número Especial de Piscirickettsiosis. Salmonexpert 4: 46 – 49.

CORBEIL, S.; and CRANE, M. 2009. *Piscirickettsia salmonis*. [en línea] <http://www.scahls.org.au/assets/pdf_file/0005/1516514/Piscirickettsia_salmonis.pdf>. [consulta: 01 de setiembre del 2014].

CORREAL, P. 1995. Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo en salmónidos. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago. Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 62p.

CUBILLOS, V.; FARÍAS, C.; ALBERDI, A.; ALVARADO, V.; SCHÄFER, W. y MONRÁS, M. 1990. Características anatomopatológicas del “Síndrome del salmón coho”, nueva enfermedad de los salmónidos. Pat. Anim. 4:14-17.

CVITANICH, J.; GÁRATE, O. and SMITH, C. 1990. Etiological agent in a Chilean coho disease isolated and confirmed by Koch`s postulates. AFS/FHS Newsletter 18:1-2.

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

CVITANICH, J.; GARATE, N.; SILVA, P.; ANDRADE, V. and FIGUEROA, P. 1995. Isolation of a new rickettsia like organism from Atlantic salmon in Chile. AFS/FSH Newsletter 23:1-3.

DAWSON-SAUDERS, B. y TRAPP, R. 1997. Bioestadística Médica. D.F. El manual moderno. 403p.

DÍAZ, C. 1999. Comparación de las pruebas diagnósticas inmunofluorescencia indirecta y ensayo-inmunoenzimático, para la detección de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago. Chile. U de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 97p.

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

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

FRYER, J. and MAUEL, M. 1997. The Rickettsia: an emerging group of pathogens in fish. Emerg. Infect. Dis. 3:137-144.

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

FRYER, J. and LANNAN, C. 2005. Family II. *Piscirickettsiaceae* fam. Nov. In: Garrity, G.M. (ed). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2th ed, vol II The *Proteobacteria*, Part B The *Gammaproteobacteria*. Springer. New York, USA. pp:180-184.

GAGGERO, A.; CASTRO, H. and SANDINO, A. 1995. First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during the freshwater stage of their life cycle. J. Fish Dis. 18:277-279.

GARCÍAS, F.; MENDOZA, J. and CARVAJAL J. 2005. Posible susceptibilidad de *Oncorhynchus kisutch* a adquirir piscirickettsiosis en la fase de engorda debido al estrés fisiológico que le produce la alimentación a saciedad. AQUATIC 22: 11-19.

GARCÉS, L.; LARENAS, J.; SMITH, P.; SANDINO, S.; LANNAN, C. and FRYER, L. 1991. Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Dis. Aquat Org. 11:93-97.

GRAUMANN, R.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M.; BROWN, A. and ROSENTHAL, H. 1997. Experimental challenge of *Piscirickettsia salmonis* in postsmolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: 8th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Edinburg, Scotland. September, 14-19. European Association of Fish Pathologists (EAFP). pp:56.

HENRÍQUEZ, A. 2013. Cambios cadavéricos e inmunohistoquímica para estimación de intervalo post mortem en ratas de laboratorio. Tesis de Grado Académico de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago. Chile. U de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 118p.

KNAPP, G.; ROHEIM, C. and ANDERSON, J. 2007. The World Salmon Farming Industry. In: The Great Salmon Run: Competition between Wild and Farmed Salmon. World Wildlife Fund. Washington DC, USA. pp:57-76.

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

LANNAN, C. and FRYER, J. 1991. Recommended methods for inspection of fish for the salmonis rickettsia. Bull. Eur. Assoc. Fish Path. 11:135-136.

LANNAN, C. and FRYER, J. 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. J. Fish Dis. 17:545-548.

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

LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J. y SMITH, P. 1996. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas fertilizadas provenientes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) experimental infectados. Arch. Med. Vet. 28:161-166.

LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; MORALES, M. y SMITH, P. 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. Arch. Med. Vet. 29. 1:113-119.

LARENAS, J. 1999. Evaluación experimental clínico patológica del efecto de la densidad poblacional, temperatura e infección concomitante con *Renibacterium salmoninarum* sobre

la presentación de piscirickettsiosis. Memoria Grado Magister en Ciencias Animales y Veterinarias, Mención Patología Animal. Santiago, Chile. U de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 149p.

LARENAS, J.; CONTRERAS, J. y SMITH, P. 2000. Piscirickettsiosis: uno de los principales problemas en cultivos de salmones en Chile. *Tecnovet* 6:28-30.

LARENAS, J.; BARTHOLOMEW, J.; TRONCOSO, O.; FERNÁNDEZ, S.; LEDEZMA, H.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS, J. and SMITH, P. 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Dis. Aquat. Org.* 56:25-30.

LARENAS, J.; ZAMORANO, E. y SMITH, P. 2005. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. *Mon. Electr. Patol. Vet.* 56-67.

LEAL, J. y WOYWOOD, D. 2007. Piscirickettsiosis en Chile; avances y perspectivas para su control [en línea] <<http://www.salmonchile.cl/salmociencia/002/Paper1.pdf>> [consulta: 07 de mayo del 2014].

MANNESCHI, G. 2011. Desafío experimental con *Piscirickettsia salmonis* en familias de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile. Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 52p.

MARTIN, S.; MEEK, A. y WILLEBERG, P. 1997. Epidemiología Veterinaria: Principios y Métodos. Madrid. España. Acribia. 384p.

MAUEL, M. and MILLER, D. 2002. Piscirickettsiosis an piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. *Vet. Microbiol.* 87:279-289.

MAUEL, W.; WARE, C. and SMITH, P. 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *J. Vet. Diagn.* 20:213-215.

MONASTERIO, M. 2008. Descripción patológica en salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) coinfectados para reproducir experimentalmente piscirickettsiosis y anemia hemolítica del salmón. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago. Chile. U de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 98p.

OIE, WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. 2006. Piscirickettsiosis. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. 5:250-256.

OLIVARES, J. and MARSHALL, S. 2010. Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. J. Fish Dis. 33:261-266.

OLSEN, A.; MELBY, H.; SPEILBERG, L.; EVENSEN, O. and HASTEIN, T. 1997. *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway-epidemiological, pathological and microbiological findings. Dis. Aquat. Org. 31:35-48.

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 de Título Médico Veterinario. Santiago. Chile. U de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 28p.

REYES, M.; ARISTIZÁBAL, G. y LEAL, F. 2006. Neumología Pediátrica. Infección, alergia y enfermedad respiratoria en el niño. Bogotá. Colombia. Médica Internacional. 729p.

ROJAS, M.; OLIVARES, J.; DEL RÍO, R. and MARSHALL, S. 2008. Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*. Microb. Pathog. 44:370-378.

ROZAS, M. and ENRÍQUEZ, R. 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. J. Fish Dis. 37:163:188.

SALINAS, G.; CONTRERAS, J.; SMITH, P. and LARENAS, J. 1998. Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water condition. 57p.

SCHÄFER, J.; ALVARADO, V.; ENRÍQUEZ, R. and MONRÁS, M. 1990. The “coho salmon syndrome” (CSS): a new disease in Chilean salmon, reared in seawater. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 10:130-132.

SERNAPESCA. 2013. Nuevo programa sanitario de vigilancia y control en la salmonicultura. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=1573:sernapesca-presento-nuevo-programa-sanitario-de-vigilancia-y-control-en-la-salmonicultura&catid=1:ultimas&Itemid=69> [consulta: 12 de octubre del 2014].

SHANNON, A. and HOPE, T. 2014. *Antibody Fc:Linking Adaptive and Innate Immunity. Mechanisms of Immunoglobulin-Mediated Mucus Entrapment of Pathogens at Various Mucosal Surfaces.* Elsevier. [en línea]. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123948021000200>>. [consulta: 07 de Junio del 2015].

SIEGEL, S. 1956. The case of k Related Samples. In: Nonparametric Statistic for the Behavioral Sciences. Tokyo. Japan. Mc Graw-Hill. p. 159-173.

SOLIS A. 2002. Comparación del nivel de la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de frotis renal, fluido celómico y seminal de reproductores de salmónidos de la Décima Región de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. p-67.

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

SMITH, P.; ROJAS, M.; GUAJARDO, A.; CONTRERAS, J.; MORALES, M. and LARENAS, J. 2004. Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. Dis. Aquat. Org. 21:53-57.

STEFANSSON, S.; MCGINNITY, P.; BJÖRNSSON, B.; SCHRECK, C. and McCORMICK, S. 2003. The importance of smolt development to salmon conservation, culture, and management: perspectives from the 6th International Workshop on Salmonid Smoltification The Importance of Smolt. Aquaculture 222:1-14.

THRUSFIELD, M. 1990. Epidemiología Veterinaria. Madrid. España, Acribia. 339p.

VENEGAS, C. 1996. *Piscirickettsia salmonis*. Prospección en faunas marina asociada a cultivos de salmónidos infectadas. Periodo invierno-primavera. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago. Chile. U. de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 95p.

VENEGAS, C.; CONTRERAS, J.; LARENAS, J. and SMITH, P. 2004. DNA hybridization assays for the detection of *Piscirickettsia salmonis* in salmonid fish. J. Fish Dis. 27:431-433.

YÁÑEZ, A.; NUALART, D.; SANDOVAL, R.; SILVA, H.; OLIVER, C.; AVENDAÑO, R.; MANCILLA, J.; ROMERO, A.; FIGUEROA, J. y CÁRCAMO, J. 2015. Desarrollo de kits de Elisa para la evaluación y determinación de la calidad de las vacunas comerciales contra piscirickettsiosis utilizadas por la industria salmoniculora. Piscirickettsiosis: Una enfermedad sin contrapeso. Salmonexpert

ANEXOS

ANEXO N° 1

Protocolo inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de *Piscirickettsia salmonis*

1. Aplicar 10 µl del 1er anticuerpo monoclonal anti-*Piscirickettsia. salmonis* (Grupo Bios®) hecho en ratón diluido en una solución 10^{-2} .
2. Incubar la muestra en una cámara oscura y húmeda durante 60 minutos a temperatura ambiente. Evitando que se seque los anticuerpos
3. Lavar completamente la muestra con PBS (pH: 7,0) mediante el uso de una botella de lavado por 5 minutos
4. Aplicar 10 µl del 2do anticuerpo anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido en una solución 10^{-2} .
5. Incubar las muestras en una cámara oscura y húmeda durante 60 minutos a temperatura ambiente. Evitando que se seque los anticuerpos
6. Lavar completamente la muestra con PBS (pH: 7,0) mediante el uso de una botella de lavado por 5 minutos.
7. Montar la muestra con un medio de montaje acuoso (Fluorogel II®).
8. Ver la muestra en un microscopio de epifluorescencia utilizando 10 campos visuales y un aumento de 1000X.

FIGURAS



Figura 1. La fotografía muestra signos clínicos propios de la piscirickettsiosis. Se observa abundante cantidad de úlceras correspondientes a *Piscirickettsiosis salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar.



Figura 2. Frotis renal. Se observa abundante cantidad de microorganismos cocoides correspondientes a *Piscirickettsiosis salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). 1000X.

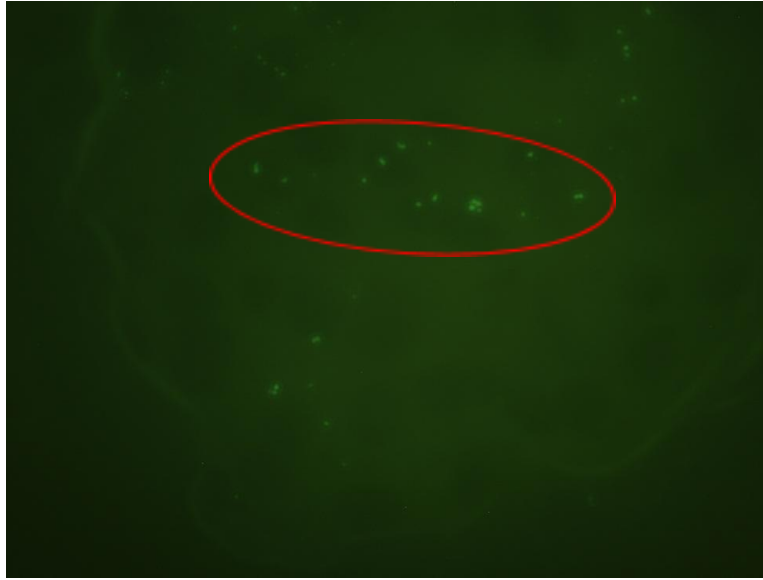


Figura 3. Frotis de hígado. Se observa abundante cantidad de microorganismos coccoides correspondientes a *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). 1000X.



Figura 4. Frotis de bazo. Se observa abundante cantidad de microorganismos coccoides correspondientes a *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). 1000X.

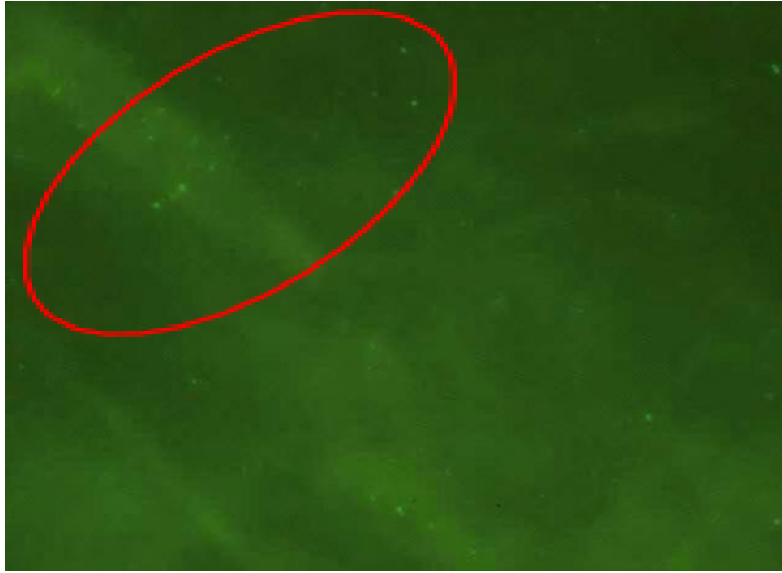


Figura 5. Frotis de heces. Se observa abundante cantidad de microorganismos cocoides correspondientes a *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivados en agua de mar. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). 1000X.