



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

DETECCIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE *Piscirickettsia salmonis* EN CORTES DE TEJIDO DE *Caligus rogercresseyi*

Tesis para optar al grado académico de Magíster en Ciencias de la Acuicultura.

OSCAR YONI MAQUERA MAQUERA

Director de Tesis
JULIO LARENAS HERRERA
MV, MSc

SANTIAGO – CHILE
2017

**DETECCIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE *Piscirickettsia salmonis*
EN CORTES DE TEJIDO DE *Caligus rogercresseyi***

Tesis para optar al grado académico de Magíster en Ciencias de la Acuicultura.

OSCAR YONI MAQUERA MAQUERA

	Calificaciones	FIRMAS
DIRECTOR DE TESIS		
Julio Larenas H. MV, MSc		
PROFESORES CONSEJEROS		
Sergio Bucarey V. BQ., MSc. Dr. 6,1
Mariana Acuña R. MV, MSc 6,7
Nelson Díaz P. Dr. en Ciencias mención Biología 6,0
EVALUADOR EXTERNO		
Sandra Bravo S. Ing. Pesquero, MSc. Dra. PhD. 7,0

Santiago, Chile

2017

La presente tesis fue financiada por el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas dependiente de la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile y la empresa Salmones Humboldt Ltda.

Dedicatoria y agradecimientos

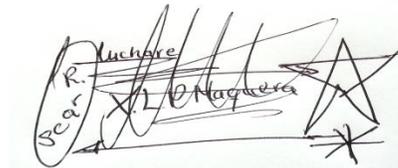
Los años han sido testigos de la lucha constante en búsqueda de un sueño que siempre ha perdurado en mí. Muchas veces cuando uno nace y crece en medio de la pobreza las necesidades se convierten en la mejor arma de superación, ahí el único sendero que queda a un humilde campesino es la educación. Recuerdo muchas derrotas y hazañas en búsqueda de una educación justa; recuerdo haber recorrido las calles de una ciudad durante años vendiendo pan para subsistir y educarme, recuerdo haber limpiado los servicios higiénicos de una preparatoria a cambio de educación, recuerdo que comer mañana y educarme dependían de una beca universitaria, recuerdo haber dejado mi País en búsqueda de una mejor educación y estará en mis recuerdos siempre la educación científica dada en esta prestigiosa Universidad.

Quiero dedicar este estudio de tesis a cada uno de los investigadores del Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas, Laboratorio de Anatomía Patológica, Laboratorio de Histopatología de las Facultades de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) y Ciencias Agronómicas (FCA) de la Universidad de Chile, a la empresa de acuicultura Salmones Humboldt y a PRONABEC - PERÚ. Sin la colaboración de dichas instituciones hubiese sido muy difícil concretar y alcanzar la meta trazada.

En el caminar de la vida se conocen personas maravillosas, es como si Dios ordenara al universo para que mi camino sea iluminado por aquellos seres humanos que enseñan y te orientan, a un camino más ideal, esas personas siempre estarán en mi corazón y en mis agradecimientos. Quiero agradecer mirando al cielo a mi madre por esa fuerza de lucha que me ha dado, agradecer a Dr. Julio Larenas H. por la guía constante en culminar este estudio y por haberme encaminado en la investigación científica, agradecer al TM. Miguel Sepúlveda A. por el apoyo incondicional brindada y agradecer a mi familia por apoyar siempre mis proyectos atípicos.

Nairakkataru sarantapjañani chicaoqui hhilatanaka kullakanaka, jallalla Aymara marka.

Santiago, Chile, 30 de marzo del 2017.

A handwritten signature in black ink on a light background. The signature is written in a cursive style and includes the name 'Oscar Y. Maquera Maquera'. To the right of the signature is a hand-drawn five-pointed star with a small circle at its center. There are some scribbles and lines around the signature.

Oscar Y. Maquera Maquera.

ÍNDICE DE CONTENIDO

TITULO	i
FINANCIAMIENTO	ii
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	iii
CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA	1
DETECCIÓN DE <i>Piscirickettsia salmonis</i> EN EL ECTOPARÁSITO <i>Caligus rogercresseyi</i>	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	1
Principales hospederos de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	1
Diagnóstico de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en <i>Caligus rogercresseyi</i>	2
Medios de cultivo para <i>Piscirickettsia salmonis</i>	2
<i>Caligus rogercresseyi</i>	2
Ciclo biológico de <i>Caligus rogercresseyi</i>	3
Distribución geográfica de <i>Caligus rogercresseyi</i>	3
Hospedadores naturales y especies susceptibles a <i>Caligus rogercresseyi</i>	3
Pérdidas económicas causadas por el piojo de mar	3
Piojo de mar vector de enfermedades	4
Asociación de <i>Piscirickettsia salmonis</i> y <i>Caligus rogercresseyi</i>	5
Tejidos y tipos de células en copépodos de la familia Caligidae	5
Inespecificidad de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	6
LITERATURA CITADA	7
CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO	13
DETECCIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE <i>Piscirickettsia salmonis</i> EN CORTES DE TEJIDO DE <i>Caligus rogercresseyi</i>	13
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVO ESPECÍFICOS	17

MATERIALES Y MÉTODOS	18
Realización del estudio.....	18
Material biológico	18
Procesamiento, inclusión y corte.....	18
Tinción hematoxilina y eosina (HE) y azul toluidina	19
Inmunohistoquímica.....	19
Evaluación de la presencia de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	20
Microscopía electrónica de barrido	21
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22
Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en cortes de tejido de chalimus IV y adultos de <i>Caligus rogercresseyi</i> mediante inmunohistoquímica	22
Presencia de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en el sistema muscular, digestivo y reproductor de <i>Caligus rogercresseyi</i>	25
Detección e identificación de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en huevos de hembras adultas de <i>Caligus rogercresseyi</i>	28
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES	35
LITERATURA CITADA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	13
Figura 1. Presencia de <i>P. salmonis</i> en tejidos de <i>C. rogercresseyi</i> expresado en porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C). Los individuos fueron detectados mediante técnica de inmunohistoquímica. Se analizó un total 50 individuos por categoría. Las muestras fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis en el período verano-otoño de 2016.	22
Figura 2. Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a un grupo de bacterias ubicadas en los microfilamentos de un miembro torácico de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™ SG. 1000X.	24
Figura 3. Cefalotórax. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en <i>Caligus rogercresseyi</i> . Se observa inmunorreacción positiva (flecha) en una agrupación de bacterias en tejido muscular en Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™ SG. 400X	24

Figura 4. Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flechas) a <i>P. salmonis</i> en la superficie y dentro de la pared cuticular. Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 1000X.	24
Figura 5. Pared del tubo digestivo. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> debajo de las células epiteliales de revestimiento. Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 1000X.	24
Figura 6. Presencia de <i>P. salmonis</i> en tejidos de <i>C. rogercresseyi</i> expresado en porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C), de acuerdo al tejido afectado. Los individuos fueron detectados mediante técnica de inmunohistoquímica. Los datos están referidos a 40 <i>Caligus</i> infectados con la bacteria mostrados en la tabla 3. Las muestras fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis en el período verano-otoño de 2016.	26
Figura 7. Tracto Digestivo. Se observa inmunorreacción positiva (flechas) a un grupo de <i>P. salmonis</i> en el sistema digestivo de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. 1000X. Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 1000X.	27
Figura 8. Músculo Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> en el tejido muscular del cefalotórax de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 1000X.	27
Figura 9. Ovario. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> en los ovocitos del sistema reproductor de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 400X.	27
Figura 10. Huevo. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> en el huevo dentro de la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 1000X.	28
Figura 11. Huevos en cistos. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> en el huevo dentro los cistos de la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 1000X.	28
Figura 12. Bolsa Ovígera. Capa Externa Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> externo a la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 1000X.	29
Figura 13. Borde Externo. Bolsa Ovígera. MEB. Se observa un conglomerado de bacterias uniéndose a la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> (flecha) de una hembra adulta. La zona es la misma que se aprecia en la figura 12 pero sin anticuerpos.	29
Figura 14. Bolsa Ovígera. Capa Externa. Se observa inmunorreacción positiva a <i>P. salmonis</i> en la zona externa de la bolsa ovígera. Las bacterias se disponen en forma individual (flecha) y grupal (círculo). Tinción con peroxidasa ImmPACT™MSG. 1000X.	29
Figura 15. Bolsa Ovígera. Capa Externa. MEB. Se observa <i>P. salmonis</i> en el borde externo de la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. La zona es la misma que se aprecia en la figura 14 pero sin anticuerpos.	29

Figura 16. Borde Externo. Bolsa Ovígera. MEB. Se observa *P. salmonis* unido a la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. La zona es la misma que se aprecia en la figura 14 pero sin anticuerpos.30

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO.....13

Tabla 1. Presencia de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi* expresado como total y porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C).....23

Tabla 2. Presencia de *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica en *C. rogercresseyi* adultos y chalimus IV según su ubicación en el interior o exterior del parásito.23

Tabla 3. Presencia de *P. salmonis* intra o extracelular en *C. rogercresseyi* mediante inmunohistoquímica.....25

CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA

DETECCIÓN DE *Piscirickettsia salmonis* EN EL ECTOPARÁSITO *Caligus rogercresseyi*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Piscirickettsia salmonis

La piscirickettsiosis es una enfermedad que afecta principalmente a salmónidos y cuyo agente etiológico es *Piscirickettsia salmonis* y que fue descubierto por primera vez en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) en 1989 en Chile (Fryer *et al.*, 1990). Es un agente bacteriano, gramnegativo, intracelular facultativo (Karatas *et al.*, 2008), aeróbico y altamente patógeno (Fryer y Hedrick, 2003). Morfológicamente corresponde a un microorganismo inmóvil, sin cápsula, pleomórfico, habitualmente cocoide, que se encuentra en forma de pares o en anillo y de un tamaño que varía entre 0,5 y 1,5 μm de diámetro (Fryer *et al.*, 1990, Cvitanich *et al.*, 1991). Mediante microscopía electrónica se ha observado que el agente posee en la superficie dos capas: una membrana externa ondulada que forma parte de la pared celular y una membrana interna citoplasmática (Fryer *et al.*, 1990). Se relaciona filogenéticamente con el género *Coxiella* y *Francisella* y se agrupa con la subdivisión Gamma de las proteobacterias. *Piscirickettsia salmonis* se ha detectado en el salmón coho, salmón rey (*O. tshawytscha*), salmón japonés (*O. masou*), trucha arcoíris (*O. mykiss*), salmón rosado (*O. gorbuscha*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Fryer *et al.*, 1992). Cuando la enfermedad fue recién descrita se describió una mortalidad en las jaulas de engorda de entre un 30% a un 90% entre los salmones criados en Chile (Bravo y Campos, 1989).

Principales hospederos de *Piscirickettsia salmonis*

Los principales hospederos de *P. salmonis* corresponden a salmónidos. En este contexto, la bacteria ha sido observada en peces en extensas áreas geográficas (Fryer y Lannan, 1996) como en Canadá/Costa Atlántica (*Salmo salar*), Canadá/Costa Pacífico (*O. gorbuscha*, *O. tshawytscha*, *S. salar*), Chile (*O. kisutch*, *O. mykiss*, *O. tshawytscha*, *S. salar*, *O. masou*), Irlanda (*S. salar*), Noruega (*S. salar*), Estados Unidos (*Atractoscion nobilis*) y Grecia (*Dicentrarchus labrax*) (Fryer y Hedrick, 2003; Mikalsen *et al.*, 2008). El agente etiológico también ha sido aislado en peces no salmónidos (Chen *et al.*, 2000a). En estudios realizados en organismos silvestres la bacteria ha sido reportada en cabrilla (*Sebastes capensis*), jurel (*Trachurus murphyi*), choritos (*Mytilus chilensis*), picorocos (*Megabalanus psittacus*), *Caligus* (*Caligus spp* y *C. rogercresseyi*) (Correal, 1995; Venegas, 1996; Gonzales, 2014).

Diagnóstico de *Piscirickettsia salmonis* en *Caligus rogercresseyi*

La identificación definitiva de la presencia de *P. salmonis* en los ejemplares de *Caligus* afectados se puede realizar a través de técnicas inmunológicas como inmunofluorescencia (Correal, 1995; Venegas, 1996), inmunohistoquímica (González, 2014) o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (González, 2014; Campalans, 2011; Contreras-Lynch *et al.*, 2015).

Medios de cultivo para *Piscirickettsia salmonis*

La bacteria es nutricionalmente exigente y de crecimiento lento en sistemas de cultivo en el laboratorio (Mancilla y Bustos, 2015). El desarrollo de los primeros medios de cultivo libres de células capaces de permitir el crecimiento de *P. salmonis* tomó alrededor de 10 años (Mikalsen *et al.*, 2008). Éste debe estar suplementado con cisteína y sales de hierro que son los componentes imprescindibles que permiten el crecimiento de la bacteria (Yañez *et al.*, 2012). Hasta el año 2006, la bacteria era aislada exclusivamente en líneas celulares, utilizando diferentes tipos de células derivadas de salmónidos (CHSE-214, RTS-11, RTG2, SHK-1, ASK, CSE-119, CHH-1), de carpa (EPC) y una de insecto (Sf21) (Fryer *et al.*, 1990; Almendras *et al.*, 1997a; Almendras *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2009). La factibilidad de cultivar *P. salmonis in vitro*, en células de insectos y ranas sugiere que la bacteria podría persistir en invertebrados y poiquiloterms que no son peces (Birkbeck *et al.*, 2004).

Caligus rogercresseyi

Caligus rogercresseyi (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) (Boxshall y Bravo, 2000) es la especie de copépodo dominante que afecta a los centros de cultivo de salmónidos durante la etapa de crecimiento en el mar y es uno de los principales problemas sanitarios que enfrenta la industria del salmón en Chile (González y Carvajal, 2003, Bravo *et al.*, 2012, Johnson *et al.*, 2004). Los daños económicos provocados por *Caligus* están relacionados con la pérdida de calidad del producto final, crecimiento retardado de los peces parasitados, incremento de la susceptibilidad frente a otros patógenos y costos generados por los tratamientos (Bravo, 2003; Johnson *et al.*, 2004; Costello, 2009). La acción del piojo de mar no sólo altera el crecimiento de los peces y ocasiona daños en el animal, también produce inmunodepresión por el estrés generado y con ello facilita la coinfección con otros agentes bacterianos y víricos, provocando la muerte del hospedador (Bravo *et al.*, 2012). El piojo de mar además del severo daño mecánico provocado por sus apéndices y aparato bucal bien desarrollado, provoca lesiones en el sitio de fijación del hospedador, lo que permite el ingreso de otros patógenos, siendo hasta ahora el de mayor peligrosidad *P. salmonis*, cuya puerta de entrada es también la superficie corporal (Smith *et al.*, 1999; Bravo *et al.*, 2012). Considerando que un vector es una especie no susceptible que es capaz de dispersar un patógeno aumentando la infección en huéspedes susceptibles (Berthe y Alfonso, 2009), se ha asumido que *C. rogercresseyi* pueda actuar facilitando la diseminación de patógenos de impacto en

los cultivos de salmones (Carvajal *et al.*, 1998; Carvajal *et al.*, 2001; Bravo, 2003; Boxshall & Bravo, 2000; González *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2004).

Ciclo biológico de *Caligus rogercresseyi*

El parásito presenta ocho estados de desarrollo, tres planctónicos (dos de nauplius y un copepodito) y cinco parasitarios (cuatro de chalimus y uno de adulto). Las etapas de nauplius y copepodito (estado infeccioso) son fases móviles, mientras que los chalimus (juveniles) y adultos son inmóviles. A los 10 °C y 14 °C de temperatura del agua, el ciclo de vida es de 48 y 28 días respectivamente (González y Carvajal, 2003).

El salmón del Atlántico y la trucha arcoíris son las especies de salmónidos que han mostrado ser altamente susceptibles a *C. rogercresseyi*. Por el contrario, el salmón coho presenta resistencia bajo las mismas condiciones de cultivo, siendo parasitado solo por estados juveniles, que no logran alcanzar el estado adulto (Pino-Marambio *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2010).

Distribución geográfica de *Caligus rogercresseyi*

Los primeros reportes de *Caligus* en peces silvestres parasitados en Chile, datan de 1940 (Fagetti y Stuardo, 1961). Desde el comienzo de la actividad salmonera local se ha reportado la presencia de cáligus en Chile (*Caligus teres*, 1985; *Caligus flexispina*, 1998, posteriormente descrito como *Caligus rogercresseyi*, 2000) (Bravo *et al.*, 2009). A partir de 1998 se tienen registros de esta especie en la zona de Río Gallegos, Argentina (Bravo *et al.*, 2008). En el 2001, *C. rogercresseyi* fue reportado parasitando a ejemplares de tilapias cultivadas en el norte del Perú, lo que documenta una amplia distribución en el hemisferio sur (Bravo *et al.*, 2011).

Hospedadores naturales y especies susceptibles a *Caligus rogercresseyi*

El género *Caligus* incluye a una serie de parásitos generalistas, que se encuentran en más de 80 especies de peces de todo el mundo (Kabata, 2003). Los hospedadores naturales son los peces marinos nativos como el pejerrey (*O. regia*), el lenguado (*Parlichthys microps*), que presentan normalmente cargas parasitarias relativamente bajas, a diferencia de los salmones de cultivo (Carvajal *et al.*, 1998). El róbalo, de acuerdo a los antecedentes, sería el transmisor de *Caligus* a los salmones. En Chile, el parásito se encuentra en el 99% de las jaulas de cultivo y se distribuye tanto en salmónidos y peces nativos (Boxshall y Bravo 2000).

Pérdidas económicas causadas por el piojo de mar

Los piojos de mar (*Lepeophtheirus* Nordmann 1832 y *Caligus* Müller 1785) son los principales patógenos de salmónidos cultivados en el hemisferio norte y tienen un impacto significativo en muchas áreas de producción (Pike y Wadsworth, 1999). Se

ha estimado que puede producir una pérdida de US\$ 0,1 a US\$ 0,2 por kg de salmón producido, llegando a alcanzar un total de US\$ 300 millones al año (Costello, 2009). *Lepeophtheirus salmonis* es la principal especie de piojo de mar que afectan a las operaciones acuícolas en el hemisferio norte, mientras *C. rogercresseyi* ejerce la mayor influencia en el hemisferio sur (Boxshall y Bravo, 2000, Bravo, 2003, Bravo *et al.*, 2009 y González y Carvajal, 2003). Las pérdidas anuales atribuidas a *C. rogercresseyi* se estiman sobre los 178 millones de dólares (Costello, 2009; Rozas y Ascencio, 2007) con costo asociado a los tratamientos antiparasitarios que estaría cercanos a los US\$ 160 millones anuales (Carvajal *et al.*, 1998; Costello, 2009). Las infestaciones con *C. rogercresseyi* puede conducir a una reducción del crecimiento y la salud de los peces (Bravo, 2003 y Johnson *et al.*, 2004). Carvajal *et al.* (1998), reportaron pérdidas económicas por efecto de la desparasitación de *Caligus* de US\$ 0,3 por kg de pez. En el 2002 los costos de los tratamientos con benzoato de emamectina, considerando dos tratamientos por período de crianza en el mar, fueron de US\$ 0,022 por kg de pez, sin considerar los costos generados por la pérdida de calidad del producto, gastos incurridos en prevención y pérdida de peso entre otros (Bravo, 2003; Johnson *et al.*, 2004). Los costos generados solo por la compra de pesticidas para el control de *Caligus* en 2013, fueron alrededor de US\$80 millones, equivalente a US\$ 0,10 por kg pez, cifra que fue 112% más alta que el año anterior. Estos valores no consideran los costos generados por la aplicación de los tratamientos ni otros efectos causados por la Caligidosis (Bravo *et al.*, 2014).

Piojo de mar vector de enfermedades

Lepeophtheirus salmonis se alimenta de la piel, mucosa y la sangre de salmón, tiene el potencial de actuar como vector mecánico de enfermedades virales (Nylund *et al.*, 1993) como el virus de la anemia infecciosa del salmón (Danneving *et al.*, 1995 y Hovland *et al.*, 1994). Por su parte *C. rogercresseyi*, se ha especulado que promueve el contagio de enfermedades al producir lesiones en la piel del pez e inmunosupresión (Almendras *et al.*, 1997; Nolan *et al.*, 1999). Como se nutre de mucus, piel y probablemente de sangre de los peces, produce daños por erosión, generando una serie de efectos negativos, entre ellos, estrés, disminución del apetito y mayor vulnerabilidad a enfermedades secundarias bacterianas o virales (Bravo, 2008).

Con respecto a la participación de vectores biológicos similares, en la bacteria Gram negativa *Coxiella burneti*, de la familia Rickettsiaceae (Burnet y Freedman, 1937; Davis y Cox, 1938), agente infeccioso de la fiebre Q, utiliza como fuente de reservorios una gran variedad de garrapatas. Las garrapatas duras (Ixodides) representan posiblemente el reservorio natural más genuino y evolutivamente más antiguo de *C. burneti*. El microorganismo está perfectamente adaptado a vivir en el interior del ectoparásito y su virulencia va aumentando conforme realiza pases sucesivos a los demás hospederos (Blanco, 2004). Crece exclusivamente en las células eucariotas, vive en las vacuolas ácidas (pH=4,8) de macrófagos y monocitos, inhibiendo la actividad fagolisosómica y los mecanismos de apoptosis celular y es capaz de formar fuera de la célula unas pseudoesporas metabólicamente inactivas, lo

que explica su extrema resistencia a variaciones ambientales y condiciones físico-químicas. Esta bacteria puede crecer sólo en células vivas, incluyendo cultivos celulares, huevos embrionados y animales susceptibles (Fariñas y Collado, 2010). Las garrapatas ocupan un lugar central en el mantenimiento de la viabilidad de este microorganismo en la naturaleza, transmitiéndolo de unos animales a otros (Fariñas y Collado, 2010). Una garrapata que contenga *C. burnetii* puede diseminar la infección a través de heces desecadas, un gramo puede contener hasta un billón de gérmenes viables (Field *et al.*, 2002). Algunos autores citan también que se ha identificado *C. burnetii* en artrópodos, peces, reptiles y anfibios, pero sin aportar demasiadas precisiones (Fariñas y Collado, 2010).

Asociación de *Piscirickettsia salmonis* y *Caligus rogercresseyi*

Los estudios sobre la dinámica de infección de piojos de mar en los centros de cultivo de salmón en Noruega y Chile, sugieren que estos parásitos pueden ser transmitidos hasta una distancia de 40 km (Jansen *et al.*, 2012, Kristoffersen *et al.*, 2013). Lhorente *et al.* (2014) demostraron que el piojo de mar *C. rogercresseyi* reduce significativamente la resistencia del salmón del Atlántico a la bacteria *P. salmonis*. Esto explica la frecuente asociación entre estos dos patógenos que constituyen los dos principales problemas patológicos de salmón cultivado en Chile (Sernapesca, 2013). Se ha propuesto que *C. rogercresseyi* no causa la muerte directa, sino más bien produce estrés crónico, reduce el apetito, provoca inmunosupresión y daño a la piel (Bravo *et al.*, 2008).

Tejidos y tipos de células en copépodos de la familia Caligidae

En trabajos realizados en copépodos mostraron, que la estructura interna de los organismos zooplanctónicos se puede observar con mayor facilidad, en los cortes histológicos resultando en una mayor resolución de los tejidos mostrando detalles del sistemas muscular, nervioso, digestivo y tejido conjuntivo, fibras musculares, fibras nerviosas, la estructura de los apéndices y características celulares. Los hemocitos se hallan inmersos en el tejido conjuntivo y es posible observar en estas células un núcleo grande, céntrico con un citoplasma estrecho. El sistema muscular es muy prominente en los copépodos de órdenes calanoidea y cyclopoidea, los músculos estriados se encuentran rodeados por epimisio. En las células musculares se pueden observar estriaciones cruzadas, tanto en cruz y longitudinales.

Las células del sistema nervioso se observan en secciones del cefalotórax anterior donde se pueden observar haces de fibras nerviosas, a menudo rodeadas por las células-hemocitos (Melo *et al.*, 2007).

El sistema reproductor de la hembra del ectoparásito *C. rogercresseyi*, está formado por un par de ovarios ubicados en la zona media del cefalotórax; un par de oviductos que se extienden a lo largo del sistema digestivo hasta llegar al segmento genital, donde se encuentran un par de glándulas cementantes y un receptáculo seminal. El sistema reproductor del macho, es similar y consta de un par de testículos ubicados

en la zona media del cefalotórax, un par de vasos deferentes, glándulas cementantes y los sacos del espermatóforo ubicados en el segmento genital (Levicoy, 2013).

Inespecificidad de *Piscirickettsia salmonis*

Piscirickettsiosis es una enfermedad transmisible, que afecta a salmónidos y peces marinos, estuarinos y ocasionalmente algunos de agua dulce (Almendras *et al.*, 1997b; Karatas *et al.*, 2008). Los estudios realizados por Chen *et al.* (2000) a partir de tejido de lubina blanca (*Atractoscion nobilis*) concluyeron que *P. salmonis* es capaz de afectar otras especies diferentes a salmónidos. Además, en condiciones *in vitro*, se ha demostrado que *P. salmonis* puede proliferar en las líneas celulares de insecto Sf21, derivada del gusano del maíz (*Spodoptera frugiperda*), y de ranas, lo que sugiere que la bacteria podría persistir en invertebrados y poiquiloterms que no son peces (Birkbeck *et al.*, 2004).

Para desarrollar un plan eficaz de prevención y control de Piscirickettsiosis, es necesario conocer la presencia de *P. salmonis* en *C. rogercresseyi* desde diversos ángulos, como la identificación del agente en diversos órganos del ectoparásito.

LITERATURA CITADA

- Almendras, F. E., Fuentealba, I. C., Jones, S. R. M., Markham, F., & Spangler, E. (1997a). Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 20, 409-418.
- Almendras, F. E., Jones, S. R., Fuentealba, C., & Wright, G. M. (1997b). *In vitro* infection of a cell line from *Ictalurus nebulosus* with *Piscirickettsia salmonis*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61, 66.
- Berthe, F. C., & Afonso, A. (2009). International Epidemiology of Mollusc Diseases: Learning the lessons from two recent assessments on susceptible and vector species by the European Food Safety Authority. *Fish Pathologists*, 44, 115-119.
- Birkbeck, T. H., Griffen, A. A., Reid, H. I., Laidler, L. A., & Wadsworth, S. (2004). Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 72, 3693-3694.
- Blanco, G. M., Aguado, B. G., Sanz, J. C., Nieto, A. G., & Gómez, S. G. (2004). Una revisión sobre la fiebre Q. *Profesión Veterinaria*, 15, 68-77.
- Boxshall, G. A., & Bravo, S. (2000). Caligidae from salmonid netpen systems in southern Chile. *Contributions to Zoology*, 69, 137-146.
- Bravo, S. (2010). The reproductive output of sea lice *Caligus rogercresseyi* under controlled conditions. *Experimental Parasitology*, 125, 51-54.
- Bravo, S. (2003). Sea lice in Chilean salmon farms. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23, 197-200.
- Bravo, S., & Campos, M. (1989). Coho salmon syndrome in Chile. *AFS/FHS Newsletter*. 17:3.
- Bravo, S., Boxshall, G. A., & Conroy, G. (2011). New cultured host and a significant expansion in the known geographical range of the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 31, 156-160.
- Bravo, S., Erranz, F., & Lagos, C. (2009). A comparison of sea lice, *Caligus rogercresseyi*, fecundity in four areas in southern Chile. *Journal of Fish Diseases*, 32, 107-113.

- Bravo, S., Sevatdal, S., & Horsberg, T. E. (2008). Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture*, 282, 7-12.
- Bravo, S., Sevatdal, S., & Horsberg, T. E. (2010). Sensitivity assessment in the progeny of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 30, 99-105.
- Bravo, S. (2008). Coordinación es la mejor forma de enfrentar al Caligus. Aqua. <http://www.aqua.cl/entrevista/entrevista.php?doc=186>. (Consultado: 01- 06 – 2017).
- Bravo, S., Silva, M. T., & Monti, G. (2012). Efficacy of emamectin benzoate in the control of *Caligus rogercresseyi* on farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Chile from 2006 to 2007. *Aquaculture*, 364, 61-66.
- Burnet, F. M., & Freeman, M. (1937). Experimental Studies on the Virus of "Q" Fever. *Medical Journal of Australia*, 2, 299-305.
- Carvajal, J., Ruíz, G. & Sepúlveda, F. (2001). Symbiotic relationship between *Udonella* sp. (monogenea) y *Caligus rogercresseyi* (copepoda), a parasite of the chilean rock cod *Eleginops maclovinus*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 33, 31-36
- Carvajal, J., Gonzalez, L., & George-Nascimento, M. (1998). Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. *Aquaculture*, 166, 241-246.
- Chen, S. C., Wang, P. C., Tung, M. C., Thompson, K. D., & Adams, A. (2000a). A *Piscirickettsia salmonis*-like organism in grouper, *Epinephelus melanostigma*, in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 23, 415-418.
- Chen, M. F., Yun, S., Marty, G. D., McDowell, T. S., Appersen, M. L. H. J. A., Guenther, T. A., & Hedrick, R. P. (2000). A *Piscirickettsia salmonis*-like bacterium associated with mortality of white seabass *Atractoscion nobilis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43, 117-126.
- Contreras-Lynch, S., Olmos, P., Vargas, A., Figueroa, J., González-Stegmaier, R., Enríquez, R., & Romero, A. (2015). Identification and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* in native fish from southern Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115, 233-244.
- Correal, P. (1995). Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos. Memoria título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile.

Costello, M. J. (2009). The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases*, 32, 115-118.

Cvitanich, J. D., Garate N, O., & Smith, C. E. (1991). The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *Journal of Fish Diseases*, 14, 121-145.

Dannevig, B. H., Falk, K., & Namork, E. (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *Journal of General Virology*, 76, 1353-1359.

Davis, G. E., Cox, H. R., Parker, R. R., & Dyer, R. E. (1938). A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public Health Reports*, 53, 2259-2311.

Fagetti, E. & J. Stuardo. (1961). Copépodos parásitos chilenos III. *Gayana, Zool.*, 3: 5-14.

Fariñas, M. T. F., & Collado, C. M. (2010). Infección por *Coxiella burnetii* (fiebre Q). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 29-32.

Fast, M. D., Burka, J. F., Johnson, S. C., & Ross, N. W. (2003). Enzymes released from *Lepeophtheirus salmonis* in response to mucus from different salmonids. *Journal of Parasitology*, 89, 7-13.

Field, P. R., Santiago, A., Chan, S. W., Patel, D. B., Dickeson, D., Mitchell, J. L., & Murphy, A. M. (2002). Evaluation of a novel commercial enzyme-linked immunosorbent assay detecting *Coxiella burnetii*-specific immunoglobulin G for Q fever prevaccination screening and diagnosis. *Journal of clinical microbiology*, 40, 3526-3529.

Fryer, J. L., & Hedrick, R. P. (2003). *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of fish diseases*, 26, 251-262.

Fryer, J. L., & Lannan, C. N. (1996). Rickettsial infections of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 6, 3-13.

Fryer, J. L., Lannan, C. N., Garcés, L. H., Larenas, J. J., & Smith, P. A. (1990). Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol*, 25, 107-114.

Fryer, J. L., Lannan, C. N., Giovannoni, S. J., & Wood, N. D. (1992). *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of an Epizootic Disease in Salmonid Fishes†. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42, 120-126.

- Gonzales, N. A. (2014). Detección de *Piscirickettsia salmonis* en Peces Silvestres del Sur de Chile y en *Caligus Rogerresseyi*. Tesis (Licenciado en Bioquímica). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Valdivia – Chile. 147.
- González, L., & Carvajal, J. (2003). Life cycle of *Caligus rogerresseyi* (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220, 101-117.
- González, L., Carvajal J., & George-Nascimento, M. (2000). Differential infectivity of *Caligus flexispina* (Caligidae: Copepoda) in 3 salmonid host species cultivated in Chile. *Aquaculture*, 183:13-23.
- Hovland, T., Nylund, A., Watanabe, K., Endresen, C. (1994). Observation of infectious salmon anemia virus in *Atlantic salmon*, *Salmo Salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 17: 291- 296.
- Jansen, P. A., Kristoffersen, A. B., Viljugrein, H., Jimenez, D., Aldrin, M., & Stien, A. (2012). Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 27, 2330-2338.
- Johnson, S. C., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., Hwang, J. S., Ho, J. S., & Shih, C. T. (2004). A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological Studies*, 43, 229-243.
- Kabata, Z. (2003). Copepods parasitic on fishes. Key and notes for the identification of British species. *Synopses of the British fauna (New series)*. Canada, 274.
- Karatas, S., Mikalsen, J., Steinum, T. M., Taksdal, T., Bordevik, M., & Colquhoun, D. J. (2008). Real time PCR detection of *Piscirickettsia salmonis* from formalin-fixed paraffin embedded tissues. *Journal of fish diseases*, 31, 747-753.
- Kristoffersen, A. B., Rees, E. E., Stryhn, H., Ibarra, R., Campisto, J. L., Revie, C. W., & StHilaire, S. (2013). Understanding sources of sea lice for salmon farms in Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, 111, 165-175.
- Levicoy, C.G. (2013). Estudio histológico de las estructuras reproductivas de dos géneros de ectoparásitos caligidos de *Eleginops maclovinus* en el sur de Chile. *Memoria de título*, Escuela de Biología Marina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Lhorente, J. P., Gallardo, J. A., Villanueva, B., Carabaño, M. J., & Neira, R. (2014). Disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*): coinfection of the intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis* and the sea louse *Caligus rogerresseyi*. *PLoS one*, 9, e95397.

- Mancilla, M., & Bustos, P. (2015). Desafíos para avanzar a un control efectivo de la Piscirickettsiosis. ¿Por qué podríamos llegar a estar optimistas a mediano plazo? *Revista salmonexpert*, 4: 61.
- Melo, R. C., Rosa, P. G., Noyma, N. P., Pereira, W. F., Tavares, L. E., Parreira, G. G., & Roland, F. (2007). Histological approaches for high-quality imaging of zooplanktonic organisms. *Micron*, 38, 714-721.
- Messick, G. A., Vanderploeg, H. A., Cavaletto, J. F., & Tyler, S. S. (2004). Histological characteristics of abnormal protrusions on copepods from Lake Michigan, USA. *Zoological Studies*, 43, 314-322.
- Mikalsen, J., Skjærvik, O., Wiik-Nielsen, J., Wasmuth, M. A., & Colquhoun, D. J. (2008). Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiology Letters*, 278, 43-47.
- Nolan, D. T., Reilly, P., & Bonga, S. W. (1999). Infection with low numbers of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* induces stress-related effects in postsmolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 947-959.
- Nylund, A., Bjorknes, B., & Wallace, C. (1991). *Lepeophtheirus salmonis* a possible vector in the spread of diseases on salmonids. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11, 213-216.
- Nylund, A., Wallace, C., & Hovland, T. (1993). The possible role of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) in the transmission of infectious salmon anaemia. *Pathogens of Wild and Farmed Fish: Sea Lice*, 28, 367-373.
- Omair, M., Naylor, B., Jude, D. J., Quddus, J., Beals, T. F., & Vanderploeg, H. A. (2001). Histology of herniations through the body wall and cuticle of zooplankton from the Laurentian Great Lakes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77, 108-113.
- Ostergaard, P. (2004). Does male *Chondracanthus lophii* (Crustacea: Copepoda) feed? *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 84, 711-716.
- Pastorinho, R., Vieira, L., Ré, P., Pereira, M., Bacelar-Nicolau, P., Morgado, F., & Azeiteiro, U. (2003). Distribution, production, histology and histochemistry in *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) as means for life history determination in a temperate estuary (Mondego estuary, Portugal). *Acta Oecologica*, 24, S259-S273.
- Pike, A. W., & Wadsworth, S. L. (1999). Sealice on salmonids: their biology and control. *Advances in Parasitology*, 44, 233-337.

Pino-Marambio, J., Mordue, A. J., Birkett, M., Carvajal, J., Asencio, G., Mellado, A., & Quiroz, A. (2007). Behavioural studies of host, non-host and mate location by the Sea Louse, *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). *Aquaculture*, 271, 70-76.

Rojas, V., Galanti, N., Bols, N. C., & Marshall, S. H. (2009). Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108, 631-637.

Rozas, M., & Asencio, G. (2007). Evaluación de la situación epidemiológica de la Caligiasis en Chile: Hacia una estrategia de control efectiva. *Salmociencia*, 2, 43-59.

Sernapesca, 2013. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos Available at: <http://www.sernapesca.cl>. (Consultado: 25-09-16)

Smith, P. A., 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.

Venegas, C. (1996). *Piscirickettsia salmonis*. Prospección en faunas marina asociada a cultivos de salmónidos infectadas. Periodo invierno-primavera Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, U. de Chile.

Yañez, A. J., Valenzuela, K., Silva, H., Retamales, J., Romero, A., Enriquez, R., & Carcamo, J. G. (2012). Broth medium for the successful culture of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97, 197-205.

CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO

DETECCIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE *Piscirickettsia salmonis* EN CORTES DE TEJIDO DE *Caligus rogercresseyi*

RESUMEN

La piscirickettsiosis, cuyo agente etiológico es la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, y la caligidosis, una ectoparasitosis producida por *Caligus rogercresseyi*, constituyen los principales problemas sanitarios que afectan a la industria del cultivo del salmón en Chile. Diversos autores han sugerido que el parásito pueda ser vector y/o reservorio para *P. salmonis*. En el presente trabajo, se recolectaron muestras de *Caligus rogercresseyi*, durante el período verano-otoño de 2016, desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), ubicado en la Región de Los Lagos. El lugar presentaba un brote de piscirickettsiosis en el momento de la toma de muestra, con una mortalidad semanal superior a 5%. Para el muestreo se eligieron peces parasitados (n=50) con *Caligus*, con un peso promedio de 3 kg, seleccionando aquellos en los que se evidenciaban signos y síntomas concordantes con piscirickettsiosis. De los peces se seleccionaron los parásitos al azar, considerando cinco hembras (H), cinco machos (M) y cinco chalimus IV (C), resultando un total de 15 parásitos por jaula (n=10), lo que dio un total de 150 individuos muestreados. Las muestras fueron procesadas para cortes incluidos en parafina para realizar estudios histológicos e inmunohistoquímicos para la detección de *P. salmonis* en los tejidos del parásito. Del total de individuos analizados un 32,6% fueron positivo a *P. salmonis*, de los cuales un 42% fueron hembras, 28% machos y 28% chalimus IV. Además, la bacteria fue detectada en sistema muscular, digestivo y reproductor. Adicionalmente, las hembras positivas, se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido, observándose que *P. salmonis* se encontraba formando conglomerados de bacterias unidas por un material amorfo, que además, lo adhería al borde exterior de la bolsa ovígera. En conclusión, los resultados demuestran que el agente está presente en distintos tejidos del ectoparásito, por ende, existe la posibilidad de que éste pueda participar en el ciclo de la piscirickettsiosis, constituyéndose como un vector de *P. salmonis* en el medio marino.

Palabras clave: Enfermedades del salmón, Caligidosis, *Caligus rogercresseyi*, Piscirickettsiosis, *Piscirickettsia salmonis*, inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Piscirickettsiosis, whose etiological agent is the bacterium *Piscirickettsia salmonis*, and caligidosis, an ectoparasitosis caused by *Caligus rogercresseyi*, constitute the major health problem affecting the salmon farming industry in Chile. Various authors have suggested that the parasite might be a vector and/or reservoir for *P. salmonis*. For this study, samples of *Caligus rogercresseyi* were collected during the 2016 summer-autumn period from an Atlantic salmon (*Salmo salar*) growing center, located in the Region de Los Lagos. The site exhibited a piscirickettsiosis outbreak at the sampling time with a weekly mortality of over 5%. For the sampling procedure, fish (n = 50) parasitised by *Caligus rogercresseyi* with a 3 kg average weight and showing signs and symptoms concordant with piscirickettsiosis were chosen. Parasites selected at random from the fish included five females, five males and five chalimus IV, with a total of 15 parasites per cage (n = 10), and a total of 150 sampled individuals. The samples were processed for paraffin-embedded sections to carry out histological and immunohistochemical analyses for *P. salmonis* detection in the parasite tissues. Out of the total of analysed individuals, 32.6% proved positive to *P. salmonis*, 42% of which were females, 28% males and 28% chalimus IV. Besides, the bacterium was detected in the muscular, digestive and reproductive systems of the parasite. Moreover, in examining the *C. rogercresseyi* females positive to *P. salmonis* by scanning electron microscopy it was observed that *P. salmonis* appeared forming conglomerates of bacteria held together by an amorphous material that also attached itself to the outer layer of the egg capsule. To conclude, the results demonstrated that the bacterial agent occurs in different tissues of the ectoparasite and, therefore, it is likely that this latter takes part in the piscirickettsiosis cycle, thus being a potential vector for *P. salmonis*.

Key words: Salmon diseases, caligidosis, *Caligus rogercresseyi*, piscirickettsiosis, *Piscirickettsia salmonis*, immunohistochemistry

INTRODUCCIÓN

Las principales enfermedades responsables de altas mortalidades en salmónidos en Chile, corresponden a la piscirickettsiosis o SRS, un cuadro bacteriano producido por *Piscirickettsia salmonis*, una bacteria patógena Gram negativa, intracelular facultativa, (Camussetti, 2014; Fryer y Hedrick, 2003; Rozas y Enríquez, 2014) y la caligidosis producida por *Caligus rogercresseyi*, ectoparásito marino que infesta la piel de varias especies de salmónidos (Bravo *et al.*, 2008; González y Carvajal, 2003; Johnson, 2004; Muñoz y Olmos, 2007). Las frecuentes asociaciones entre ambos agentes constituyen uno de los principales problemas patológicos del salmón cultivado en Chile (Sernapesca, 2013). Ha sido posible comprobar la presencia de *P. salmonis* en el ectoparásito *Caligus sp.*, lo cual indica que podría actuar como eventual vector o reservorio marino del agente (Larenas *et al.*, 1999). El reservorio natural de *P. salmonis* es desconocido, pudiendo incluir a una o más especies de peces u otros organismos acuáticos (Fryer y Hedrick, 2003; Rozas y Enríquez, 2014). Al respecto, se conoce que muchas especies de salmónidos pueden actuar como reservorios naturales de algunos patógenos (Nylund y Jakobsen, 1995; Rolland y Nylund, 1998).

Existe un consenso que define a un vector como una especie no susceptible, que es capaz de dispersar a un patógeno, aumentando la infección en huéspedes susceptibles (Berthe y Alfonso, 2009). Al respecto, se ha sugerido que *C. rogercresseyi* podría cumplir un rol de vector mecánico para *P. salmonis* (Campalans, 2011) y posiblemente para otros agentes patógenos (Oelckers *et al.* 2014). Los primeros estudios que se realizaron en el ectoparásito *Caligus sp.* en búsqueda de *P. salmonis*, fueron realizados por Venegas (1996) y Correal (1996), quienes mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, demostraron su presencia en frotis. Posteriormente, estudios por PCR han reportado el material genético de *P. salmonis* en *C. rogercresseyi* (Campalans, 2011; Gonzales, 2014). Por lo tanto, se ha propuesto que el parásito podría facilitar la diseminación de este patógeno y actuar como su reservorio (Bravo, 2003; Boxshall y Bravo, 2000).

Existen bacterias del género *Rickettsia* que incluye bacterias del orden rickettsiales, subdivisión alfa de la clase Proteobacteria, intracelulares obligadas (Labruna *et al.*, 2011), como *C. burnetii* que es capaz de crecer en artrópodos, peces, reptiles y anfibios. Este agente infeccioso se sitúa en el endotelio de los vasos sanguíneos, cerebro, piel, corazón de su hospedador (Fariñas y Collado, 2010). Debido a la cercanía filogenética, cabe la posibilidad de que *P. salmonis* tenga un comportamiento similar que *C. burnetii*, por lo tanto, se le encuentre intracelularmente en diversos tejidos, huevos y cápsulas ovígeras del ectoparásito *C. rogercresseyi*.

Por otra parte, se ha demostrado que *P. salmonis* puede proliferar en distintas líneas celulares; como de insecto Sf21, derivada del gusano del maíz (*Spodoptera frugiperda*) y de ranas, lo que sugiere que la bacteria podría persistir en invertebrados y poiquiloterms que no son peces (Birkbeck *et al.*, 2004).

De acuerdo a lo anterior, existen algunos trabajos que han demostrado la presencia de *P. salmonis* en *Caligus rogercresseyi*, sin embargo, no se ha estudiado si esta bacteria está presente en algunos órganos o tejidos propios de este parásito. El estudio de la ubicación intra o extracelular, permitiría establecer con mayor precisión si existe un papel más activo del parásito en el ciclo de la infección con *P. salmonis* en condiciones de cultivo. La información permitiría entender mejor la patogenia de la piscirickettsiosis y establecer nuevas estrategias de manejo y prevención de la enfermedad. De acuerdo a lo anterior, en el presente estudio, se presentan los resultados de la detección de *P. salmonis* en cortes de tejido de *C. rogercresseyi*, detectado mediante inmunohistoquímica. Los individuos muestreados provinieron de salmones del Atlántico (*Salmo salar*) afectados naturalmente por un brote de piscirickettsiosis.

HIPÓTESIS

Piscirickettsia salmonis se encuentra intracelularmente en diversos tejidos del ectoparásito *Caligus rogercresseyi*.

OBJETIVO GENERAL.

Detectar e identificar a *Piscirickettsia salmonis* en cortes de tejido de *Caligus rogercresseyi* provenientes de salmón Atlántico (*Salmo salar*) afectados por piscirickettsiosis.

OBJETIVO ESPECÍFICOS.

Determinar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en cortes de tejido de los estadios chalimus IV y adultos de *Caligus rogercresseyi* mediante inmunohistoquímica.

Establecer la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en el sistema muscular, digestivo y reproductor de *Caligus rogercresseyi*.

Detectar e identificar de forma interna y externa a *Piscirickettsia salmonis* en huevos de las hembras adultas de *Caligus rogercresseyi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Realización del estudio

El trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas dependiente de la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile.

Material biológico

Se recolectaron muestras del ectoparásito *Caligus rogercresseyi*, durante el período verano-otoño de 2016, desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), ubicado en la Región de Los Lagos. El lugar presentaba un brote de piscirickettsiosis en el momento de la toma de muestra, con una mortalidad semanal superior a un 5%. El centro fue considerado como positivo a *P. salmonis* de acuerdo a los protocolos de diagnóstico de la empresa y de Sernapesca.

Para el muestreo se eligieron peces parasitados (n=50) con *Caligus*, con un peso promedio de 3 kg, seleccionando aquellos en los que se evidenciaban signos y síntomas concordantes con piscirickettsiosis, tales como: tendencia a orillarse, nado lento y errático, úlceras y oscurecimiento de la piel, dentro de los más característicos. De los peces se seleccionaron los parásitos que fueron muestreados al azar, considerando cinco hembras (H), cinco machos (M) y cinco chalimus IV (C), resultando un total de 15 parásitos por jaula (n=10), lo que dió un total de 150 individuos muestreados. Los salmones fueron recolectados en bolsas de polietileno para facilitar la extracción de los parásitos, que inmediatamente fueron colocados en tubos Eppendorf de 50 ml, que contenían formalina tamponada (pH=7,0) al 3,7%, identificados y mantenidos a temperatura ambiente hasta su procesamiento para el análisis histológico e inmunohistoquímico.

Procesamiento, inclusión y corte

Las muestras fueron procesadas para cortes histológicos incluidos en parafina de acuerdo a técnicas estándar (Levicoy, 2013; Lynch *et al.*, 1972). En forma resumida los parásitos fueron deshidratados en una serie graduada de alcoholes, 70%, 95% y 100%, sometidos a tres baños de xilol y embebidos en dos baños de parafina líquida a una temperatura de 56 °C a 58 °C, seguida por un proceso de inclusión. Las muestras incluidas en parafina fueron seccionadas a 4 µm utilizando un micrótopo Leitz. Todos los cortes fueron identificados y montados sobre portaobjetos previamente silanizados. Por cada individuo de *Caligus*, se obtuvieron cuatro cortes seriados a los cuales se les realizó tinciones con hematoxilina y eosina (HE), azul de toluidina, inmunohistoquímica. A los que resultaron con inmunorreacción positiva en las bolsas ovígeras, se les realizó un procedimiento para ser analizados en un microscopio electrónica de barrido según se describe posteriormente.

Tinción hematoxilina y eosina (HE) y azul toluidina

Las secciones histológicas, fueron teñidas con hematoxilina y eosina (HE) y azul toluidina de acuerdo a técnicas estándar (Levicoy, 2013; Lynch *et al.*, 1972). En forma resumida, las muestras fueron desparafinadas en tres baños de xilol por 3 min, hidratadas en tres baños de alcohol 100%, 95%, 70% por 3 min, un baño con agua corriente y destilada por 1 min. Luego las muestras fueron teñidas con hematoxilina de Harris por 4 min, lavadas con agua corriente seguida por inmersiones rápidas en alcohol ácido, lavado en abundante agua corriente, inmersiones en carbonato de litio, enjuague en agua corriente por 5 min, teñido con eosina por 4 min, lavado rápido en agua corriente y posteriormente fueron deshidratados en tres baños de alcohol 70%, 95% y 100% por 3 min. Luego se aclaró el tejido en tres baños de xilol por 3 min y finalmente los cortes fueron montados. Los mismos procedimientos se realizaron para la tinción con azul toluidina de acuerdo a protocolos estándar (Levicoy, 2013; Lynch *et al.*, 1972).

Inmunohistoquímica

Las muestras fueron montadas en portaobjetos silanizados que previamente fueron sometidos a un proceso de desenmascaramientos antigénico, basado en uso de calor en presencia de una solución de recuperación tampón citrato pH=6,0 (Cattoretti *et al.*, 1992; Suurmeijer y Boon, 1993; Shi *et al.*, 1997), a temperatura de 120 °C por 29 min en una olla a presión, según el protocolo estandarizado del fabricante (Prolab). Posteriormente, para inhibir la actividad de las peroxidases endógenas se utilizó un bloqueo con peróxido de hidrógeno (solución de bloqueo Bloxall™) por 30 min a temperatura ambiente en una cámara de incubación. Luego, para impedir uniones inespecíficas de los anticuerpos, se realizó un bloqueo utilizando 2,5% de suero normal de caballo (Vector R.T.U.™) por 30 min a temperatura ambiente.

Se utilizó un primer anticuerpo anti *P. salmonis* de origen comercial (SRS fluorotest, Grupo Bios) correspondiente a un oligoclonal producido en ratón. El proceso de incubación se realizó según el protocolo establecido previamente por Larenas *et al.* (1996) con un tiempo de 60 min a temperatura ambiente en una cámara de incubación, posteriormente se realizó un lavado en tampón TBS. Para la amplificación de la reacción se utilizó un “kit” de origen comercial (ImmPRESS™ Excel Amplified HRP Polymer Staining Kit AntiMouse IgG), que utiliza un segundo anticuerpo anti ratón producido en cabra, el cual fue incubado durante 60 min de acuerdo a especificaciones del fabricante. Posteriormente, después de un lavado con TBS, la muestra fue incubada con un tercer anticuerpo anti cabra unido a un micropolímero que además contiene una peroxidasa (ImmPRESS™ Excel). Este conjugado se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Como sistema de detección se utilizó como sustrato un cromógeno que precipita de color azul (ImmPACT™ SG) por un tiempo de 30 s. Los núcleos no fueron contrastados con hematoxilina de Mayer para no generar confusiones con el marcaje del sustrato. Las muestras fueron finalmente deshidratadas, aclaradas y montadas en resina sintética

permanente. Los procedimientos mencionados se realizaron de acuerdo a las especificaciones indicadas por los fabricantes.

Para el proceso de desenmascaramiento se utilizó controles positivos correspondientes a muestras de órganos de peces fijados en formalina provenientes de peces afectados naturalmente por piscirickettsiosis y diagnosticados previamente mediante PCR e inmunofluorescencia indirecta (IFAT). Los controles negativos correspondieron a órganos (hígado) de salmón del Atlántico (*S. salar*), de peces de la Región del Maule, zona donde hasta la fecha nunca se ha identificado la presencia de *P. salmonis*. Como controles negativos de *Caligus*, se utilizaron parásitos del Centro de Maricultura Hueihue del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), ubicada en la provincia de Chiloé. Para cada ensayo inmunohistoquímico se contó con los siguientes controles y sus respectivos procedimientos:

1. Control de bloqueo de actividad endógena de peroxidasa. Las muestras fueron comparadas utilizando muestras de tejidos con y sin bloqueo con solución Bloxall™.
2. Control de bloqueo con proteínas. Las muestras fueron comparadas con y sin bloqueo con suero de caballo utilizando todos los anticuerpos del sistema sobre muestras controles negativos y positivos de órganos.
3. Control de anticuerpos. Para demostrar que no existe inespecificidad de los anticuerpos, la técnica fue estandarizada como sigue:
 - a. Incubación con el segundo anticuerpo + ImmPRESS™ Excel + ImmPACT™ SG
 - b. Incubación con ImmPRESS™ Excel + ImmPACT™ SG
4. Como controles positivos adicionales se utilizarán muestras de cultivos celulares (CHSE214) inoculadas con *P. salmonis*, las cuales fueron comparadas con la línea sin inocular.
5. Control negativo de *Caligus*. Se obtuvieron ejemplares de centro experimental Hueihue - Chiloé, instalaciones pertenecientes a IFOP, en donde los *C. rogercresseyi* fueron diagnosticados como negativos a *P. salmonis* mediante PCR.

Evaluación de la presencia de *Piscirickettsia salmonis*

Los parásitos incluidos en parafina, fueron cortados en sentido longitudinal y cada corte fue evaluado para detectar la presencia o ausencia de *P. salmonis* en los estadios adultos (hembra y macho) o juveniles (Chalimus IV) de *C. rogercresseyi* mediante inmunohistoquímica. Se consideró como positivo cuando el tejido presentaba un precipitado de color azul.

Los cortes evaluados por inmunohistoquímica fueron complementados con tinción de hematoxilina y eosina (HE), azul toluidina y un análisis con microscopia electrónica de barrido; esto último cuando los cortes resultaron inmunopositivos a *P. salmonis* en bolsas ovígeras. Se evaluaron por inmunomarcación 150 cortes de tejido

de *C. rogercresseyi* (50 machos, 50 hembras y 50 chalimus IV) y por tinción 300 (150 HE, 150 azul toluidina).

Microscopía electrónica de barrido

Como se mencionó anteriormente, solamente se evaluaron los cortes en serie de las hembras de *Caligus rogercresseyi* que dieron positivo por inmunohistoquímica en las bolsas ovígeras. Todas las muestras se fijaron bajo el protocolo estándar usado por Larenas *et al.* (2003). Las muestras, luego de ser incubadas durante sus correspondientes tiempos y tratamientos, fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio (0,2 M) y mantenidas a temperatura ambiente durante al menos 24 h. Posteriormente las muestras se procesaron en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Pontificia Universidad Católica de Chile, donde se realizaron lavados con agua destilada. Luego fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), llevadas a secado de punto crítico y sombreadas con oro con un espesor de 20 nm. Las muestras se guardaron al vacío en un desecador hasta el momento de su observación en un microscopio de barrido en la misma unidad (Jeol, JSM 25 SII), donde se capturaron y digitalizaron las imágenes. Se realizó un análisis descriptivo de las muestras para establecer las diferencias en la formación de CAP entre los grupos, de acuerdo a lo establecido por (Quinteros, 2005).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la presencia y ausencia de *P. salmonis* en los cortes de tejido de *C. rogercresseyi* en estadios adultos (machos y hembras) y juvenil (chalimus IV). Los resultados fueron analizados usando modelos lineales generalizados y mixtos (MLGM) de respuesta Binomial y función de enlace logit con un criterio de decisión del pvalor menor a 0.05, donde las medias de los tratamientos son significativamente diferentes. Los datos se analizaron a través de la librería lme4 (Bates *et al.*, 2015) en el lenguaje de programación R (R Core Team - 2016). Los códigos fueron ejecutados a través del “software” estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016), para lo cual la variable respuesta fue codificada en presencia = 1, ausencia = 0 y los porcentajes (%) de presencia de *P. salmonis* fueron representados por gráficos de barras.

El cumplimiento de los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianza se comprobó mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, que indica que las muestras han sido tomadas de forma independiente.

RESULTADOS

Detección de *Piscirickettsia salmonis* en cortes de tejido de chalimus IV y adultos de *Caligus rogercresseyi* mediante inmunohistoquímica

En el presente estudio se analizó un total de 150 parásitos que fueron procesados para cortes histológicos, inmunohistoquímica y eventualmente microscopía electrónica de barrido (MEB). Del total, 49 ejemplares resultaron positivos a *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica, lo que representa un 32,6 %. La distribución porcentual según las categorías fue de un 42% ($\pm 0,07$) en hembras, 28% ($\pm 0,06$) en machos y de un 28% ($\pm 0,06$) en chalimus IV (Figura 1), aunque no se demostró diferencias significativas entre los grupos estudiados (Tabla 1).

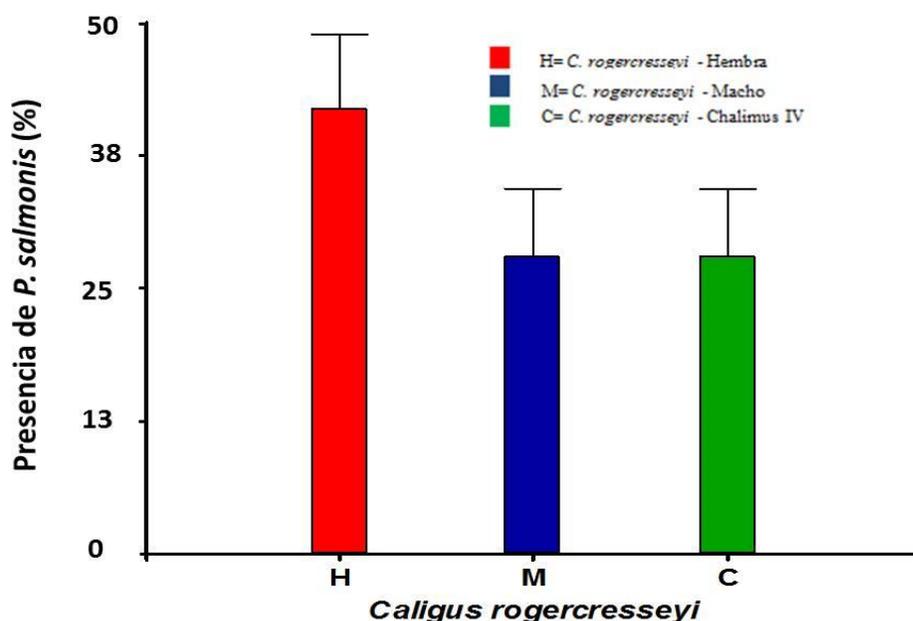


Figura 1. Presencia de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi* expresado en porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C). Los individuos fueron detectados mediante técnica de inmunohistoquímica. Se analizó un total 50 individuos por categoría. Las muestras fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis en el período verano-otoño de 2016.

Tabla 1. Presencia de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi* expresado como total y porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C).

Categoría de <i>Caligus</i>	Presencia	Media	E.E.
H	21 (42%)	0,42	± 0,07*
M	14 (28%)	0,28	± 0,06*
C	14 (28%)	0,28	± 0,06*

EE representa el error estándar de acuerdo a la prueba de modelos lineales generalizados y mixtos (MLGM) de respuesta binomial y función de enlace logit con un criterio de decisión del p-valor menor a 0.05. El asterisco muestra que no existen diferencias entre los grupos. Las muestras de *Caligus rogercresseyi* fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis en el período verano-otoño de 2016.

Del total de cada categoría, 21 hembras, 14 machos y 14 chalimus IV resultaron positivos a *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica, de los cuales en 40 ejemplares se detectó el agente en el interior del parásito, ya sea en forma intra o extracelular. En un caso, la bacteria se detectó sólo en el exterior, adosado a la cutícula. En ocho individuos el microorganismo se observó tanto en el interior como sobre la superficie del *Caligus* (Tabla 2).

Tabla 2. Presencia de *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica en *C. rogercresseyi* adultos y chalimus IV según su ubicación en el interior o exterior del parásito.

Categoría de <i>Caligus</i>	Ubicación			Total
	Interno	Externo	Int-Ext	
H	19	0	2	21
M	12	1	1	14
C	9	0	5	14
Total	40	1	8	49

H = Hembra, M = Macho, C = Chalimus IV. Externo: Presencia de *P. salmonis* en la superficie del parásito. Interno: Detección de *P. salmonis* en tejidos de *Caligus rogercresseyi* intra o extracelular. Int-Ext: Presencia de la bacteria tanto en el interior como en la superficie del parásito.

Las bacterias fueron identificadas en distintos sectores del ectoparásito, tanto en estadios adultos (hembra y macho) y juveniles (chalimus IV). Se identificó el agente en una serie de muestras en el interior del ectoparásito como se muestra en las figuras 3, 4 y 5, ya sea en forma intra o extracelular. También fue posible identificar el agente en el exterior del ectoparásito, adosado a la cutícula (Figura 2). En un caso se detectó el agente tanto en la superficie como dentro de la pared cuticular (Figura 4).



Figura 2. Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a un grupo de bacterias ubicadas en los microfilamentos de un miembro torácico de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™ SG. 1000X.



Figura 3. Cefalotórax. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en *Caligus rogercresseyi*. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) en una agrupación de bacterias en tejido muscular en Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™ SG. 400X



Figura 4. Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flechas) a *P. salmonis* en la superficie y dentro de la pared cuticular. Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000X.

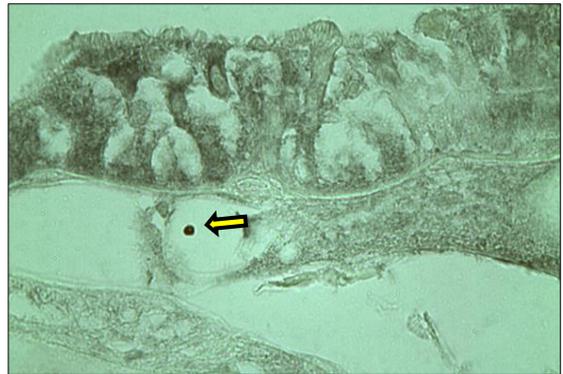


Figura 5. Pared del tubo digestivo. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* debajo de las células epiteliales de revestimiento. Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000X.

Presencia de *Piscirickettsia salmonis* en el sistema muscular, digestivo y reproductor de *Caligus rogercresseyi*

De los 49 ectoparásitos que presentaron inmunorreacción positiva a *P. salmonis*, 40 individuos presentaron la bacteria en algún tipo de tejido del *Caligus*, ya sea en forma intra o extracelular. De estos, en 20 parásitos la bacteria fue detectada en alguna zona del sistema muscular, en 11 en el sistema digestivo y en 9 en el sistema reproductor. En cuanto a la presencia de *P. salmonis* por estadios, 19 hembras, 12 machos y 9 chalimus IV fueron positivos (Tabla 3).

Tabla 3. Presencia de *P. salmonis* intra o extracelular en *C. rogercresseyi* mediante inmunohistoquímica.

Categoría de <i>Caligus</i>	Sist. Muscular	Sist. Digestivo	Sist. Reproductor	TOTAL
H	6	4	9	19
M	9	3	0	12
C	5	4	0	9
TOTAL	20	11	9	40

H = Hembra, M = Macho, C = Chalimus IV. Presencia de *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica en tejidos de *Caligus rogercresseyi* en forma intra o extracelular. Las muestras del parásito fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis en el período verano-otoño de 2016.

Al analizar en porcentaje la positividad de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi*, se observó que en un 22,5% de las hembras el agente se encontró en el sistema reproductor (Figura 9), seguido por un 15% en el sistema muscular (Figura 8) y un 10% en sistema digestivo (Figura 7). Con respecto a los machos, la bacteria fue observada en un 22,5% de los individuos en el sistema muscular, un 7,5% en el sistema digestivo y no fue detectada en el sistema reproductor. Por otra parte, en los chalimus IV, el agente se observó en un 12,5% en el sistema muscular, en un 10% en sistema digestivo y no fue encontrado en el sistema reproductor. Los resultados por categorías y sistema afectado se muestran en la figura 6.

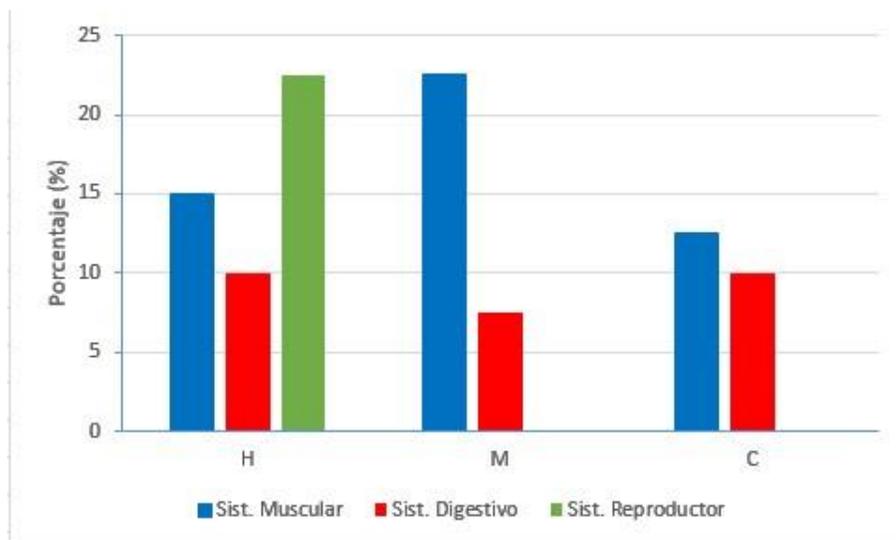


Figura 6. Presencia de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi* expresado en porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C), de acuerdo al tejido afectado. Los individuos fueron detectados mediante técnica de inmunohistoquímica. Los datos están referidos a 40 *Caligus* infectados con la bacteria mostrados en la tabla 3. Las muestras fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis en el período verano-otoño de 2016.



Figura 7. Tracto Digestivo. Se observa inmunorreacción positiva (flechas) a un grupo de *P. salmonis* en el sistema digestivo de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. 1000X. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000X



Figura 8. Músculo Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* en el tejido muscular del cefalotórax de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000X.



Figura 9. Ovario. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* en los ovocitos del sistema reproductor de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 400X.

Detección e identificación de *Piscirickettsia salmonis* en huevos de hembras adultas de *Caligus rogercresseyi*

Como se mostró en la tabla 3 y figura 6, en el presente estudio se detectó la presencia de *P. salmonis* en el sistema reproductivo de hembras adultas, lo que se corresponde anatómicamente a la bolsa ovígera. La bacteria fue observada asociado a los huevos y en la superficie de la cápsula de la bolsa ovígera. En total, se analizaron 50 *Caligus* hembras de las cuales nueve fueron positivos a *P. salmonis* en la zona de los huevos y en dos casos se ubicaron sobre la superficie (Figuras 10 y 11).

En las imágenes de la figura 12 y 13 se muestran los resultados de los cortes en serie analizados por inmunohistoquímica (Figura 12) y por microscopía electrónica de barrido (Figura 13). De la misma manera las imágenes de las figuras 14, 15 y 16 corresponden a los cortes en serie de un mismo parásito analizados por inmunohistoquímica (Figura 14) y por MEB (Figura 15 y 16).

En relación a la ubicación externa de la bacteria, está fue detectada mediante azul toluidina, hematoxilina eosina, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido (MEB) (Figuras 12, 13, 14, 15 y 16). La bacteria fue observada ya sea en forma individual (Figuras 14 y 15) o bien formando agrupaciones que se unían a la superficie de la bolsa ovígera (Figuras 12, 13, 14 y 16). En este último caso y mediante MEB, se observó que los grupos de bacterias se encontraban inmersos en una sustancia amorfa y que emitía prolongaciones hacia la superficie (Figuras 13 y 16).



Figura 10. Huevo. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* en el huevo dentro de la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACTTMSG. 1000X.

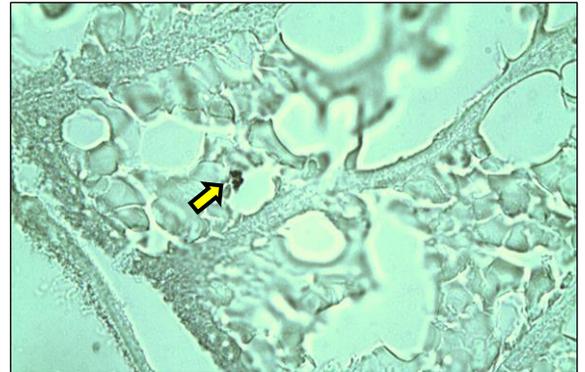


Figura 11. Huevos en cistos. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* en el huevo dentro los cistos de la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACTTMSG. 1000X.



Figura 12. Bolsa Ovigerá. Capa Externa
Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* externo a la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000X.

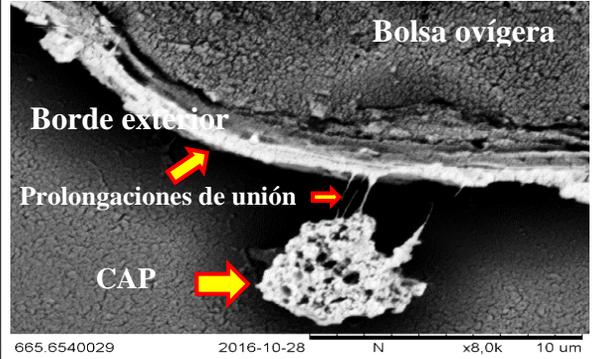


Figura 13. Borde Externo. Bolsa Ovigerá. MEB. Se observa un conglomerado de bacterias uniéndose a la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* (flecha) de una hembra adulta. La zona es la misma que se aprecia en la figura 12 pero sin anticuerpos.



Figura 14. Bolsa Ovigerá. Capa Externa. Se observa inmunorreacción positiva a *P. salmonis* en la zona externa de la bolsa ovígera. Las bacterias se disponen en forma individual (flecha) y grupal (círculo). Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000X.

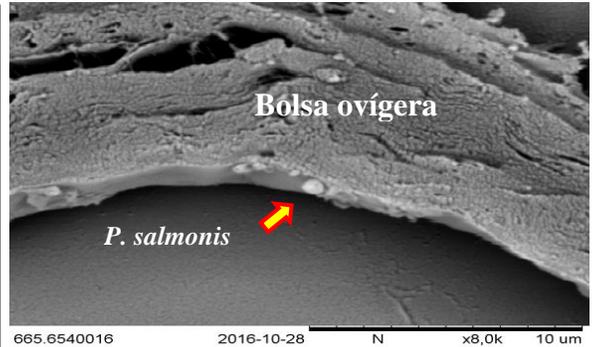


Figura 15. Bolsa Ovigerá. Capa Externa. MEB. Se observa *P. salmonis* en el borde externo de la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. La zona es la misma que se aprecia en la figura 14 pero sin anticuerpos.

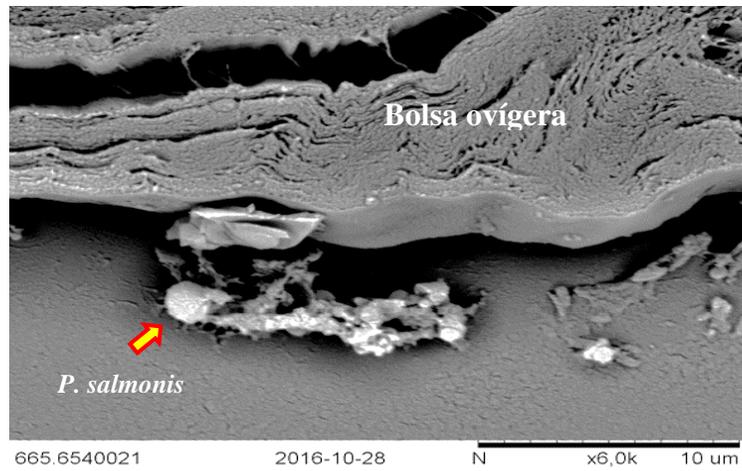


Figura 16. Borde Externo. Bolsa Ovígera. MEB. Se observa *P. salmonis* unido a la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. La zona es la misma que se aprecia en la figura 14 pero sin anticuerpos.

DISCUSIÓN

La piscirickettsiosis, producida por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, es una de las enfermedades que ha causado las condiciones sanitarias más severas en la acuicultura en Chile (Smith *et al.*, 2011) conjuntamente con el ectoparasitismo producido por *Caligus rogercresseyi*, un tipo de copépodo (Oelckers *et al.*, 2014). Este último puede promover la transmisión de enfermedades ya que es capaz de producir heridas en la piel del pez y además los deprime inmunológicamente (Johnson, *et al.*, 2004). Por otra parte, diversos estudios han reportado la detección de *P. salmonis* en el ectoparásito *C. rogercresseyi* (Garcés *et al.*, 1994; Correal, 1995; Venegas, 1996; González, 2014) sin establecer si esta bacteria se encuentra en la superficie o en el interior de este.

En la presente tesis, un 32,6% de las muestras de *Caligus* resultaron positivas a la presencia de *P. salmonis*. Este valor es muy superior a lo observado por Venegas (1996), quien encontró un 2,8% de positividad en muestras tomadas en verano-otoño o Correal (1995), que detectó un 6,9% en muestreos realizados en invierno primavera. En ambos casos, la técnica utilizada fue la detección en frotis, obtenidos a partir de macerados de parásitos, mediante inmunofluorescencia indirecta. Por otra parte, los estudios realizados por Campalans (2008), mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en distintas zonas de cultivo de salmónidos, reporta la prevalencia de *P. salmonis* en *Caligus*, entre un 1,5% y en un 51%. Estas diferencias las atribuye a los tratamientos realizados en el primer caso contra *P. salmonis* lo que explicaría la baja proporción de positivos.

Al parecer, en los centros de cultivo de salmónidos, existe una alta prevalencia de *P. salmonis* en *C. rogercresseyi*. Al respecto, estudios realizados por Gonzalez (2014), con PCR anidado, reporta un 70% de muestras positivas (7/10), de los cuales tres (30%) fueron hembras, dos (20%) machos y dos (20%) de sexo indeterminado. Lo anterior, es el primer estudio que señala la presencia de *P. salmonis* por sexo de *Caligus*, en donde se observa un mayor porcentaje de hembras positivos al agente. De manera similar, es interesante señalar que los resultados obtenidos en la presente tesis reflejan una mayor proporción de hembras infectadas (42%), en comparación con los machos (28%) y chalimus IV (28%). Además, llama la atención que la mayoría de las hembras infectadas presentaron una mayor positividad en el sistema reproductor con ubicación en la zona interna de la bolsa ovígera (18%).

De acuerdo a lo anterior, la ubicación del *P. salmonis* en ovocitos, hace sospechar que pueda existir transmisión vertical, como se ha establecido por ejemplo para *Coxiella burnetii*, una bacteria que se encuentra cercana filogenéticamente.

Coxiella burnetii, es una bacteria Gram negativa de la familia Coxiellaceae (Derrick, 1939; Philip, 1948), que utiliza como reservorio una gran variedad de garrapatas, en donde el agente se multiplica, se transmite verticalmente y pasa una parte de su ciclo de vida adaptada en el interior del ectoparásito. Además, su virulencia va aumentando conforme realiza pasajes sucesivos en las garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2008). Diversos estudios han reportado infecciones de *Coxiella burnetii* en muchas especies de animales silvestres, entre ellos marsupiales, roedores, lagomorfos y peces (OIE, 2015). Asimismo, se ha comprobado la infección natural en más de 40

especies de garrapatas (de las familias ixodidae y argasidae), como también en otros artrópodos que se alimentan sobre animales (Kawar, 2002).

Mayores estudios se necesitan para establecer si *P. salmonis* presenta un comportamiento similar a *C. burnetii*. Esto sería de importancia en el rol o participación que pueda tener el parásito como reservorio y/o vector biológico de la bacteria.

De acuerdo a los resultados de este estudio, se observó que *P. salmonis* estaba presente en diversos órganos y tejidos del parásito; especialmente en los músculos del cefalotórax, seguido por tracto digestivo y por último en tejido ovárico. Aunque no existen otros estudios realizados con los que se pueda comparar, se ha demostrado que la bacteria es altamente inespecífica de especie. Al respecto, los estudios realizados por Birkbeck *et al.* (2004) demostraron que *P. salmonis* es capaz de crecer en líneas celulares de insectos y ranas, sugiriendo por parte de los autores, que este microorganismo podría persistir en invertebrados y poiquilotermos que no son peces.

En relación a la inespecificidad de *P. salmonis*, se ha establecido, además, que puede ser encontrado en diversos hospedadores, como salmónidos, diversas especies silvestres (Almendras *et al.*, 1997a; Karatas *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2000) y en *Caligus* (Correal, 1995; Venegas, 1996; Mauel *et al.*, 1996; Campalans, 2011, González, 2014). Además, se ha demostrado que esta bacteria puede proliferar en distintas líneas celulares derivadas de salmónidos (CHSE-214, RTS-11, RTG-2, SHK-1, ASK, CSE-119, CHH-1), de carpa (EPC), de insecto (Sf21) y rana (XTC-2) (Fryer *et al.*, 1990; Almendras *et al.*, 1997; Almendras y Fuentealba, 1997; Birkbeck *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2009).

En la presente tesis, los cortes de tejido que dieron positivos a *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica (IHQ) y que se encontraban en la superficie del parásito en la zona de la bolsa ovígera, fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). En nueve individuos la bacteria fue observada en alguna zona de la superficie de los ejemplares de *Caligus*, pero sólo en dos fue posible detectarlo en la bolsa ovígera. Mediante IHQ, la bacteria se presentó en forma individual o formando agrupaciones sobre la cutícula (Figuras 12 y 14). Estas muestras al ser analizadas por MEB, se observó que las bacterias se presentaban unidas entre ellas por un material amorfo y que a su vez emitía varias prolongaciones que lo unían a la superficie de la bolsa ovígera. También fue posible hallar bacterias individuales adheridas a la bolsa (Figura 15). Las estructuras amorfas encontradas, son similares al “Complejo de Adhesión Piscirickettsial” o CAP, descrito por Larenas *et al.* (2003), en ovas de trucha arcoíris y por Perez *et al.* (2016) sobre la superficie de conchas de chorito (*Mytilus chilensis*). Este CAP correspondería a un factor de virulencia (Quinteros, 2005) y aparentemente mantiene su capacidad infectiva (Perez *et al.*, 2016).

De acuerdo a Marshall *et al.* (2012), concluyen que *P. salmonis*, produce estructuras muy complejas denominadas “biofilms” o biopelículas. Estas estructuras están unidas por una matriz de polisacáridos cuando se cultivan bajo alto contenido de sal y condiciones de nutrientes limitantes (caldo marino). Se conoce que las biopelículas bacterianas en medio natural son producidas como una estrategia importante para persistir en el medio ambiente, así como para la transmisión de enfermedades

(Margolis *et al.*, 2010; Simojoki *et al.*, 2012; Twomey *et al.*, 2012). Muchos tipos de microorganismos forman biopelículas que se incrustan en sustancias poliméricas extracelulares y ofrecen un micronicho con disposiciones estables y un cierto grado de homeostasis, garantizando la difusión de oxígeno, nutrientes y productos de desecho (Donlan, 2002; Rollet *et al.*, 2009). Generalmente las bacterias que componen una biopelícula se ubican dentro de una matriz que ellas mismas producen y que está constituida por azúcares complejos del tipo exopolisacáridos, proteínas y ADN. Estas se unen a una superficie inerte o a un tejido vivo (Costerton, 1999).

Los resultados de la presente tesis, sugieren que las estructuras observadas sobre la superficie de *Caligus* son consistentes con lo descrito para el CAP (Larenas *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2016). Por otra parte, no es descartable que este sea además un tipo de biopelícula de acuerdo a lo sugerido por Marshall *et al.* (2012).

De acuerdo a lo anterior, Sauer (2003) describe las etapas de formación de biopelículas adheridas a un sustrato en: (1) algunas bacterias se adhieren a un sustrato; (2) unión débil entre las bacterias; (3) formación de microcolonias; (4) desarrollo de macrocolonias con una estructura interna compleja y (5) biopelícula madura, del que se desprenden bacterias que regresan a la vida libre. Adicionalmente, la importancia de las biopelículas bacterianas es que estas son capaces de liberar y dispersar las células en el medio ambiente con el fin de colonizar nuevos sitios (Kaplan y Fine, 2002). Por ejemplo, es posible detectar la liberación de células de la matriz en las primeras etapas de formación de biopelículas en la cepa CT07 de *Pseudomonas sp.* cuando las condiciones ambientales, nutricionales y otras favorecen el crecimiento celular (Bester *et al.*, 2005). Es concebible que, en un punto dado, la biopelícula alcanzará una masa crítica y como consecuencia, la capa más externa de la estructura puede comenzar a liberar los organismos planctónicos para colonizar otras superficies (Marshall *et al.*, 2012).

Los resultados de esta tesis, sugieren la posibilidad de que *Caligus rogercresseyi* sea un vector de *P. salmonis*. Sin embargo, no fue posible establecer si la bacteria se multiplica en el parásito o si se produce una transmisión vertical en las progenies de estos.

Resulta interesante mencionar que en garrapatas ha sido demostrado la infección con patógenos múltiples. Algunos investigadores han establecido que la coinfección de garrapatas con varios microorganismos puede aumentar la gravedad de la enfermedad en los seres humanos por ejemplo en 240 pacientes diagnosticados con la enfermedad de Lyme, el 11 % estaban coinfectados (Krause *et al.*, 1996), en el ganado vacuno de 286 animales analizados por PCR el 90 % de los animales presentaron una coinfección (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004). Es probable que pueda ocurrir esta misma situación en *C. rogercresseyi*, ya que diversos autores han reportado la presencia concomitante de virus ISA y *P. salmonis* en el parásito. Los estudios realizados por Oelckers *et al.* (2015) corroboran que *C. rogercresseyi* es vector del virus ISA y tiene la capacidad de infectar salmones sanos. En forma similar, en el hemisferio norte el ectoparásito *Lepeophtheirus salmonis* se ha demostrado que podría portar pasivamente el virus ISA y actuaría como vector transmisor (Nylund *et al.*, 1993). Es más, Nylund *et al.* (1993), demostraron que el

virus ISA estaba presente en el intestino de *L. salmonis*, pero no existe información acerca de cuánto tiempo permanece el virus en el parásito y si éste tiene capacidad de replicar en él.

Generalmente, los ectoparásitos marinos de peces se alimentan de mucus de su hospedador. En la presente investigación se observó inmunoreacción positiva a grupos de *P. salmonis* en el tracto digestivo de *C. rogercresseyi* en forma similar a lo descrito para virus ISA en *Lepeophtheirus salmonis*. Ello hace suponer que la bacteria ingresa al tubo digestivo conjuntamente con restos de partículas que componen el detritus y posiblemente junto a los restos de mucus. Cabe señalar que *L. salmonis* y *C. rogercresseyi* pasan la fase parasítica completa de su ciclo de vida en contacto con el mucus de la piel de su pez hospedero (Johnson y Albright, 1992) y en la fase de chalimus se alimentan exclusivamente de mucus y epidermis, pero los estadios preadulto y adulto son capaces también de alimentarse de sangre (Carvajal, 2009; Brandal *et al.*, 1976). Cabe señalar, que los ectoparásitos del presente estudio fueron obtenidos desde un centro de cultivo de salmón del Atlántico positivo a piscirickettsiosis, por ende, cabe la posibilidad de que *C. rogercresseyi* se haya alimentado de mucus o sangre de peces infectados con el agente, lo cual explicaría la presencia de *P. salmonis* en el sistema digestivo. Al respecto, de acuerdo a los estudios publicados por Olsen *et al.* (1997), es posible encontrar *P. salmonis* en la sangre de peces infectados. Trabajos realizados en *L. salmonis* han determinado que es posible observar una coloración rojiza oscura en el tracto digestivo; asumiendo que correspondería a sangre del pez hospedador (Johannessen, 1975). Brandal *et al.* (1976) demostraron la presencia de sangre del hospedador en el tracto digestivo de una hembra adulta, mínimas cantidades en un macho y post chalimus de *L. salmonis*. Hasta el momento no existen estudios que describan el ingreso de *P. salmonis* a *C. rogercresseyi* ni tampoco como ingresa a los tejidos del cefalotórax. Sin embargo, en estudios realizados *in vitro* a distintas bacterias de salmónidos observaron que éstas son capaces de adherirse tanto a células como al mucus de los peces; esto entrega una evidencia indirecta de la potencialidad de colonización de la superficie corporal de los hospederos (Smith *et al.*, 2001).

De acuerdo a los resultados de este trabajo, *C. rogercresseyi* probablemente pueda actuar como reservorio marino de *P. salmonis* manteniendo el agente infeccioso tanto interna como externamente. Además, el hecho que la fase móvil del parásito puede moverse entre peces, hace que este parásito sea un posible vector para la bacteria. Estos antecedentes llevan a plantear la importancia de realizar futuros estudios que definan la importancia del parásito en el ciclo de la piscirickettsiosis.

CONCLUSIONES

- El agente patógeno *Piscirickettsia salmonis* se observó en el interior y sobre la superficie de *Caligus rogercresseyi* en un 42 % de las hembras, 28 % de machos y 28 % de chalimus IV.
- La bacteria fue observada en 40 individuos en el interior del parásito, asociada al sistema muscular en un 50 %, digestivo 27,5 % y reproductor 22,5 %.
- No se pudo establecer daños celulares en los ectoparásito infectados con *P. salmonis*.
- La mayor proporción de parásitos infectados con *P. salmonis*, correspondió a hembras, donde se ubicó principalmente en alguna zona de la bolsa ovígera.
- De las 50 *Caligus* hembras analizadas, nueve fueron positivos a *P. salmonis* en la zona de los huevos y en dos casos se ubicaron sobre la superficie.

LITERATURA CITADA

Almendras, F. E., Fuentealba, I. C., Jones, S. R. M., Markham, F., & Spangler, E. (1997a). Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 20, 409-418.

Almendras, F. E., Jones, S. R., Fuentealba, C., & Wright, G. M. (1997b). *In vitro* infection of a cell line from *Ictalurus nebulosus* with *Piscirickettsia salmonis*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61, 66.

Brandal, P. O., Egidius, E., & Romslo, I. (1976). Host Blood-Major Food Component for Parasitic Copepod *Lepeophtheirus salmonis* Kroyeri, 1838 (Crustacea-Caligidae). *Norwegian Journal of Zoology*, 24, 341-343.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. *R package version*, 1,7.

Berthe, F. C., & Afonso, A. (2009). International epidemiology of mollusc diseases: Learning the lessons from two Recent assessments on susceptible and vector species by the European Food Safety Authority. *Fish Pathologists*, 44, 115-119.

Bester, E., Wolfaardt, G., Joubert, L., Garny, K., & Saftic, S. (2005). Planktonic-cell yield of a pseudomonad biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7792-7798.

Birkbeck, T. H., Griffen, A. A., Reid, H. I., Laidler, L. A., & Wadsworth, S. (2004). Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 72, 3693-3694.

Boxshall, G. A., & Bravo, S. (2000). Caligidae from salmonid netpen systems in southern Chile. *Contributions to Zoology*, 69, 137-146.

Blanco, G. M., Aguado, B. G., Sanz, J. C., Nieto, A. G., & Gómez, S. G. (2004). Una revisión sobre la fiebre Q. *Profesión Veterinaria*, 15, 68-77.

Bravo, S. (2003). Sea lice in Chilean salmon farms. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 23, 197-200.

Bravo, S., & Campos, M. (1989). Coho salmon syndrome in Chile. *AFS/FHS Newsletter*. 17:3.

- Bravo, S., Sevatdal, S., & Horsberg, T. E. (2008). Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture*, 282, 7-12
- Burnet, F. M., & Freeman, M. (1937). Experimental Studies on the Virus of " Q" Fever. *Medical Journal of Australia*, 2, 299-305.
- Campalans, M. (2008). "Determinación de patógenos de importancia en la salmonicultura, en caligus y moluscos bivalvos", Fip 2008-66, Escuela de Ciencias del Mar, Facultad de recursos naturales, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Campalans, M. (2011). "Determinación de patógenos de importancia en la salmonicultura en caligus y moluscos bivalvos. Informe final, Escuela de Ciencias del Mar, Facultad de recursos naturales, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 238.
- Camussetti, M. (2014). Piscirickettsiosis: Análisis de la investigación, reglamentación, quimioterápicos y vacunas utilizadas en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 41.
- Carlson, L. E., Speca, M., Faris, P., & Patel, K. D. (2007). One year pre-post intervention follow-up of psychological, immune, endocrine and blood pressure outcomes of mindfulness-based stress reduction (MBSR) in breast and prostate cancer outpatients. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21, 1038-1049.
- Cattoretti, G., Becker, M. H., Key, G., Duchrow, M., Schlüuter, C., Galle, J., & Gerdes, J. (1992). Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki. 67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *The Journal of Pathology*, 168, 357-363.
- Carvajal, J., Gonzalez, L., & George-Nascimento, M. (1998). Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. *Aquaculture*, 166, 241-246.
- Carvajal, J., Ruíz, G. & Sepúlveda, F. (2001). Symbiotic relationship between *Udonella* sp. (monogenea) y *Caligus rogercresseyi* (copepoda), a parasite of the chilean rock cod *Eleginops maclovinus*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 33, 31-36.
- Carvajal, P. (2009). ISA and the Reshaping of Chile's Salmon Industry. *Intrafish Industry Report.*, May. Bergen: Intrafish
- Chen, M. F., Yun, S., Marty, G. D., McDowell, T. S., Appersen, M. L. H. J. A., Guenther, T. A., & Hedrick, R. P. (2000). A *Piscirickettsia salmonis*-like bacterium

associated with mortality of white seabass *Atractoscion nobilis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43, 117-126.

Correal, P. (1995). Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos Memoria título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 62p..

Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 217-221.

Davis, G. E., Cox, H. R., Parker, R. R., & Dyer, R. E. (1938). A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public Health Rep*, 53, 2259-2311.

DeLeo, F. R. (2004). Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis*, 9, 399-413.

de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., & Sonenshine, D. E. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*, 13, 6938-6946.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Versión, C.R. I. (2016). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>. (Consultado: 25- 08-2016).

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 167-193.

Durán, M. V. R., Marshall, S., & Galanti, N. (2000). *Relación del proceso apoptótico con la infección productiva del patógeno intracelular Piscirickettsia salmonis en células de salmónidos de cultivo*. (Tesis Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Santiago, Chile). 1-148.

Evelyn, TPT. (1996) Infection and disease. In: Iwawa G, Nakanisi T (eds). The fish immune system. Organism, pathogen, and environment. Academic Press. Hoar WS, Randall DJ, Farrel AP (series eds) Vol 15 Fish Physiology Series, San Diego, 339–366.

Fariñas, M. T. F., & Collado, C. M. (2010). Infección por *Coxiella burnetii* (fiebre Q). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 29-32.

Figueroa, Denise Haussmann, Matías Muñoz, Alejandro Yañez, Juan Guillermo Carcamo y Alex Romero. (2016). En salmón Atlántico, E. D. T. Rol de los receptores tipo Toll en infección *in vitro* con *Piscirickettsia salmonis* en salmón

Atlántico y trucha arcoíris. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Fryer, J. L., Lannan, C. N., Garcés, L. H., Larenas, J. J., & Smith, P. A. (1990). Isolation of a rickettsiales-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.

Garcés, L. H., Correal, P., Larenas, J. J., Contreras, J., Oyanedel, S., Fryer, J. L., & Smith, P. A. (1994). Finding of *Piscirickettsia salmonis* on *Ceratothoa gaudichaudii*. In *International Symposium on Aquatic Animal Health. Seattle, Washington, USA* 109.

Gracia, R. D. C. R., Zarain, P. L., & Laguna, Y. M. (2004). *Mecanismos de patogenicidad e interacción: Parásito-Hospedero*. Buap. Universidad Autónoma de Puebla. México. 119.

Gómez, F., Henríquez, V., & Marshall, S. H. (2009). Evidencia adicional de la naturaleza intracelular facultativa del patógeno bacteriano de peces *Piscirickettsia salmonis*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 41, 261-267.

Gonzales, N. A. (2014). Detección de *Piscirickettsia Salmonis* en peces silvestres del Sur de Chile y en *Caligus Rogerresseyi*. Tesis (Licenciado en Bioquímica). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Valdivia – Chile. 147.

González, L., & Carvajal, J. (2003). Life cycle of *Caligus rogerresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220, 101-117.

González, L., J. Carvajal & M. George-Nascimento. (2000). Differential infectivity of *Caligus flexispina* (Caligidae: Copepoda) in three salmonid host species cultivated in Chile. *Aquaculture*, 183:13-23.

González, M., & Gradín, F. C. (2004). Macroinvertebrados en las aguas continentales ibéricas: algunas consideraciones sobre el estado de conocimiento, la biodiversidad y el problema de las especies invasoras. *Ríos con vida AEMS*, 75, 52-55.

Hofmann-Lehmann, R., Meli, M. L., Dreher, U. M., Gönczi, E., Deplazes, P., Braun, U., & Griot, C. (2004). Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 8, 3775-3780.

Jaramillo, R., Garrido, O., Asencio, G., Barría, P., & Mancilla, J. (2015). Caracterización morfológica de la cápsula ovígera del parásito *Caligus rogercresseyi*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47, 193-199.

Johannessen, A. (1975). Salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* Krøyer (Copepoda, Caligidae). Independent larval stages, growth and infection in salmon (*Salmo salar* L.) from breeding plants and commercial catches in west Norwegian waters 1973–1974. Thesis in Fish Biology, Norway's Fisheries High School, The University of Bergen (Norway). 113

Johnson, S. C., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., Hwang, J. S., Ho, J. S., & Shih, C. T. (2004). A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological Studies*, 43, 229-243.

Johnson, S. C., & Albright, L. J. (1992). Comparative susceptibility and histopathology of the response of naive Atlantic, chinook and coho salmon to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda Caligidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 14, 179-193.

Kawar, B. Y. (2002). Fiebre Q: *Detección de anticuerpos IgG frente a Coxiella Burnetti en población sana del medio rural*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. 1-120.

Kaplan, J. B., & Fine, D. H. (2002). Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4943-4950.

Karatas, S., Mikalsen, J., Steinum, T. M., Taksdal, T., Bordevik, M., & Colquhoun, D. J. (2008). Real time PCR detection of *Piscirickettsia salmonis* from formalin fixed paraffin embedded tissues. *Journal of Fish Diseases*, 31, 747-753.

Krause, P. J., Telford, S. R., Spielman, A., Sikand, V., Ryan, R., Christianson, D., & Persing, D. H. (1996). Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increased severity and duration of illness. *Jama*, 276, 1657-1660.

Labruna, M. B., Mattar, S., Nava, S., Bermudez, S., Venzal, J. M., Dolz, G., & ZavalaCastro, J. (2011). Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*, 16, 2435-2457.

Lannan, C. N., & Fryer, J. L. (1994). Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis* L. *Journal of Fish Diseases*, 17, 545-548.

Larenas, J. J., Bartholomew, J., Troncoso, O., Fernández, S., Ledezma, H., Sandoval, N., ... & 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., Contreras, J., & Smith, P. (1999). Estado actual de la Piscirickettsiosis en salmones. *AquaTIC*, 5, 1-18.

Larenas, J., Astorga, C., Contreras, J., Garcés, H., Fryer, J., & Smith, P. (1996). Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. *Fish Pathology*, 31, 231-232.

Larenas, J., Hidalgo, L. V., Garcés, 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, 53-58.

Larenas, J., Gatica, C., Galleguillos, M., Adármes, H., & Smith, P. (2012). Comparación de la cinética de la infección de ovas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* detectada mediante dot-blot. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 27, 2.

Levicoy, C. (2013). Estudio histológico de las estructuras reproductivas de dos géneros de ectoparásitos caligidos de *Eleginops maclovinus* en el sur de Chile. Memoria para optar al Título de Biólogo Marino. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología Marina. Universidad Austral de Chile. 43.

Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., & Inwood, J. H. (1972). Tinción de los cortes. *Métodos de Laboratorio*. DF México, México. Nueva editorial interamericana SA de CV. 1145-1154.

Mansilla, G., D. A., Váldez Anabalón, J., Suárez, R., Antonio, J., & González Díaz, W. K. (2013). Análisis genómico comparativo de borradores genómicos para el estudio de diversidad genética en cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Tesis Doctoral. Talca, Chile. Escuela de Bioinformática. Universidad de Talca. 48.

Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 137-151.

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.
- McCarthy, U., Steiropoulos, N.A., Thompson, K.D., Adams, A., Ellis, A.E., & Ferguson, H.W. (2005). Confirmation of *Piscirickettsia salmonis* a pathogen in European sea bass *Dicentrarchus labrax* and phylogenetic comparison with salmonids strains. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64, 107–119.
- Margolis, J. J., El-Etr, S., Joubert, L. M., Moore, E., Robison, R., Rasley, A. & Monack, D. M. (2010). Contributions of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* chitinases and secretion system to biofilm formation on chitin. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 596-608.
- Mikalsen, J., Skjærvik, O., Wiik-Nielsen, J., Wasmuth, M. A., & Colquhoun, D. J. (2008). Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiology Letters*, 278, 43-47.
- Nolan, D. T., Reilly, P., & Bonga, S. W. (1999). Infection with low numbers of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* induces stress-related effects in postsmolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 947-959.
- Nylund, A., Bjorknes, B., & Wallace, C. (1991). *Lepeophtheirus salmonis* a possible vector in the spread of diseases on salmonids. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11, 213-216.
- Nylund, A., Wallace, C., & Hovland, T. (1993). The possible role of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) in the transmission of infectious salmon anaemia. *Pathogens of Wild and Farmed Fish: sea lice*, 28, 367-373.
- Nylund, A. & P. Jakobsen. 1995. Sea trout as a carrier of infectious salmon anaemia virus. *Journal of Fish Biology*, 47, 174-176.
- Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., Gonzalez, J., Wadsworth, S., & Nylund, A. (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*, 420, 126-132.
- OIE, World Organization For Animal Health (2015). Q fever. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.1.12. 58, 696–697.
- Olsen, A. B., Melby, H. P., Speilberg, L., Evensen, Ø., & Håstein, T. (1997). *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway

epidemiological, pathological and microbiological findings. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31, 35-48.

Peirano, H., 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 título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 29.

Pérez, M. (2016). Evaluación *in vitro* de la formación del Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP) de *Piscirickettsia salmonis* en conchas de chorito *Mytilus chilensis* y su capacidad infectiva. Memoria para optar título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 38

Quinteros J. (2005). Comparación En la presentación del Complejo de Adhesión Piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria para optar título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 54.

Rolland, J. B., & Nylund, A. (1998). Sea running brown trout: carrier and transmitter of the infectious salmon anemia virus (ISAV). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 18, 50-55.

Rollet, C., Gal, L., & Guzzo, J. (2009). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 290, 135-142.

Rojas, V., Galanti, N., Bols, N. C., & Marshall, S. H. (2009). Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108, 631-637.

Rozas, M., & Enríquez, R. (2014). Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 37, 163-188.

Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4, 1- 219.

Sernapesca, 2013. Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos Available at:
<http://www.sernapesca.cl>. (Consultado: 3-01-17).

- Secombes, C. J., & Chappell, L. H. (1996). Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. *Annual Review of Fish Diseases*, 6, 167-177.
- Schäfer, A., Kalinowski, J. O. R. N., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H., & Pühler, A. (1990). High-frequency conjugal plasmid transfers from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *Journal of Bacteriology*, 172, 1663-1666.
- Smith, P. A., 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.
- Smith, P., Larenas, J., Vera, P., Contreras, J., Venegas, C., Rojas, M. E., & Guajardo, A. (2001). Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 21, 3-19.
- Smith, P. A., Rojas, M. E., Guajardo, A., Contreras, J., Morales, M. A., & Larenas, J. (2004). Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61, 53-57.
- Smith, P. A. (2016). Patogenia de piscirickettsiosis: estudio sobre la infectividad de *Piscirickettsia salmonis* y el efecto de sus productos extracelulares. Doctoral dissertation. Córdoba, España. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Córdoba. 114
- Simojoki, H., Hyvönen, P., Ferrer, C. P., Taponen, S., & Pyörälä, S. (2012). Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Veterinary Microbiology*, 158, 344-352.
- Shi, S. R., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (1997). Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45, 327-343.
- Suurmeijer, A. J. H., & Boon, M. E. (1993). Optimizing keratin and vimentin retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue with the use of heat and metal salts. *Applied Immunohistochemistry*, 1, 143-148.
- Twomey, K. B., O'Connell, O. J., McCarthy, Y., Dow, J. M., O'Toole, G. A., Plant, B. J., & Ryan, R. P. (2012). Bacterial cis-2-unsaturated fatty acids found in the cystic fibrosis airway modulate virulence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *The ISME Journal*, 6, 939-950.

Vargas-Chacoff, L., Martínez, D., Oyarzún, R., Nualart, D., Olavarría, V., Yáñez, A., & Mancera, J. M. (2014). Combined effects of high stocking density and *Piscirickettsia salmonis* treatment on the immune system, metabolism and osmoregulatory responses of the Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 40, 424-434.

Venegas, C. (1996). *Piscirickettsia salmonis*. Prospección en faunas marina asociada a cultivos de salmónidos infectadas. Periodo invierno-primavera. Memoria para optar título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 27.