



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

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

ERIKA ANGELINE LILLO CUEVAS

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

PROFESOR GUÍA: DR. JULIO LARENAS HERRERA.

Financiamiento:

Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies
Hidrobiológicas, U. de Chile.

Salmones Humboldt Ltda.

SANTIAGO, CHILE

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

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

ERIKA ANGELINE LILLO CUEVAS

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

Nota final:

Julio Larenas Herrera

Mariana Acuña Retamal

Carlos Navarro Venegas

SANTIAGO, CHILE

2016

Listón de madera de palo.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

Resumen	v
Abstract.....	vi
Introducción.....	1
Revisión Bibliográfica.....	2
Hipótesis 1	6
Hipótesis 2	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos	6
Materiales y Métodos	7
1.- Selección de los peces	8
2.- Obtención de las muestras y controles negativos	8
3.- Procesamiento de las muestras	9
a) Aislamiento de material genético.....	10
b) Cuantificación de ADN.....	11
c) PCR anidado.....	11
d) Electroforesis.	13
4.- Análisis de los resultados	14
Resultados.....	15
Análisis estadístico	19
Discusión	21
Conclusión	26
Bibliografía.....	27
Anexos.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales utilizados en la extracción del ADN.....	10
Tabla 2. Materiales utilizados en la técnica de PCR anidado.....	12
Tabla 3. Materiales utilizados en la electroforesis en gel de agarosa (EGA) 2%.....	13
Tabla 4. Cuantificación del ADN de las muestras extraídas.	15
Tabla 5. Resultados PCR anidado luego de realizada la electroforesis.....	16
Tabla 6. Valores de Kappa para fracciones distintas de hígado.	20
Tabla 7. Valores de Kappa para fracciones distintas de riñón.....	20
Tabla 8. Valores de Kappa para la asociación de órganos y heces.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Necropsia de salmón coho (<i>O. kisutch</i>) afectado por piscirickettsiosis.....	7
Figura 2. Visualización de electroforesis en gel de agarosa (EGA) al 2%.....	17
Figura 3. Electroforesis con bandas que no migraron.. ..	18

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Presencia de <i>P. salmonis</i> por individuo en hígado, riñón y heces.....	18
Gráfico 2. Porcentaje de individuos positivos y negativos a <i>P. salmonis</i> en riñón, hígado y heces de salmón coho.	19

RESUMEN

La piscirickettsiosis es una enfermedad bacteriana producida por *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*) que provoca severas pérdidas económicas a la industria del salmón en el sur de Chile por conceptos de mortalidad, tratamientos antimicrobianos y el uso de vacunas. Debido a que su signología no es patognomónica se debe recurrir a pruebas de laboratorio para determinar la presencia de su agente etiológico con el fin de establecer medidas de control y tratamientos adecuados. A pesar de que la enfermedad fue descrita en 1989, la patogénesis y las vías de transmisión de la bacteria se encuentran insuficientemente descritas, por lo que la presente Memoria de Título tuvo como uno de sus objetivos determinar la presencia y asociación de *P. salmonis* en distintas muestras de 19 peces de la especie salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) afectados por piscirickettsiosis.

En esta Memoria de Título se determinó la presencia de *P. salmonis* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (PCR anidado) en el 79%, 95% y 87% de las muestras de hígado, riñón y heces respectivamente. El análisis estadístico realizado mediante el coeficiente de Kappa, determinó que hígado-riñón y riñón-heces están considerablemente asociados, mientras que hígado-heces poseen una moderada asociación.

Adicionalmente, de cada órgano estudiado se realizó un análisis por separado de tres fragmentos de tejido con el fin de establecer si existía consistencia en el diagnóstico entre ellas. Los resultados (analizados también con el coeficiente de Kappa), indicaron débil asociación entre las muestras analizadas, lo que sugiere un riesgo para la detección del agente según el fragmento que se utiliza. Al aumentar la cantidad de tejido analizado se demostró que aumenta la posibilidad de detección de la bacteria.

Por otra parte, este estudio constituye el primer reporte de la presencia de la bacteria en heces de salmón coho en condiciones de cultivo en mar a través de la técnica de PCR anidado. No obstante lo anterior, son necesarios más estudios para establecer la viabilidad de la bacteria en el contenido fecal.

Palabras clave: Enfermedades del salmón, diagnóstico, Piscirickettsia salmonis, Piscirickettsiosis, SRS.

ABSTRACT

Piscirickettsiosis is a bacterial disease caused by *Piscirickettsia salmonis*. It causes severe economic losses in the salmon industry in southern Chile by concepts of mortality, antimicrobial treatments and the use of vaccines. The clinical signs are not pathognomonic and because of that laboratory tests are required to determine the presence of its causative agent in order to establish control measures and treatments. Piscirickettsiosis was described in 1989 but up to this day, the pathogenesis and transmission routes of the bacteria are still inadequately described, because of that reason one of the main objectives of this work was to determine the presence and association of *P. salmonis* in different samples of 19 coho salmon (*O. kitsuch*) affected by piscirickettsiosis. The presence of *P. salmonis* was determined by the technique of Nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) in 79%, 95% and 87% of the samples of liver, kidney and feces respectively. The statistical analysis performed using the Cohen's Kappa coefficient, found that liver-kidney and kidney-feces are significantly associated, whereas liver-feces have a moderate association. Additionally, separate analysis was made of three pieces of tissue in order to establish whereas the diagnosis between them was consistent. The results (also analyzed with Cohen's Kappa coefficient) indicated weak association between the samples analyzed, suggesting a detection risk according to the fragment analyzed. It was demonstrated that increasing the amount of analyzed tissue increases the detectability of the bacteria. Moreover, this study is the first report about the presence of *P. salmonis* in coho salmon feces in sea farming conditions through technical of nested PCR. Further studies are necessary to establish the viability of the bacteria in the fecal content.

Keywords: Fish disease, diagnosis, Piscirickettsia salmonis, Piscirickettsiosis, SRS.

INTRODUCCIÓN

La piscirickettsiosis es causada por *Piscirickettsia salmonis*, una bacteria intracelular facultativa muy contagiosa, que fue reportada por primera vez en nuestro país y el mundo a finales de la década de los años 80. Sin embargo, el conocimiento que se tiene de la enfermedad aún es insuficiente para controlar los daños que causa en la industria.

La autoridad sanitaria ha tomado medidas que buscan evitar la diseminación del agente y controlar aquellos centros que supongan un riesgo para otros productores, por lo que en el año 2013 se estableció el Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-Piscirickettsiosis) del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) que tiene como objetivo disminuir el impacto de la enfermedad a través de una vigilancia robusta y la aplicación de medidas de control oportunas y graduales, obteniéndose recientemente los primeros resultados de esta intervención.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) establece que la confirmación diagnóstica de esta enfermedad se obtiene mediante el aislamiento de *P. salmonis* en cultivo celular y posterior detección a través de inmunofluorescencia indirecta (IFI) o mediante la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidado), siendo también factible que este último ensayo se realice directamente desde el tejido sospechoso, recomendándose el uso de riñón e hígado como muestra.

Sobre la diseminación del agente, la literatura señala que *P. salmonis* en condiciones experimentales puede liberarse al medio a través de las heces del animal portador y recientemente se han publicado dos estudios que detectaron la bacteria en heces salmónidos en condiciones de cultivo. El primero, utilizando PCR anidado y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el segundo trabajo mediante IFI en salmón coho (*O. kisutch*).

La presente Memoria de Título buscó determinar la presencia de la bacteria en hígado, riñón y heces salmónidos clínicamente afectados por piscirickettsiosis en condiciones de cultivo a través de la técnica de PCR anidado, técnica que se caracteriza por tener mayor sensibilidad que IFI. Junto con ello, se evaluó la presencia del agente en distintas fracciones del mismo órgano, con el objetivo de determinar si la distribución de *P. salmonis* en hígado y riñón influye en la detección para el diagnóstico mediante la técnica de PCR anidado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La piscirickettsiosis es una enfermedad septicémica reportada por primera vez en Chile a fines de la década de los 80' (Fryer *et al.*, 1990). A pesar de que el nombre oficial reconocido por la OIE corresponde al inicialmente señalado, también se le ha denominado “UA” (“unknown agent” por sus siglas en inglés), síndrome del salmón coho, síndrome de Huito y septicemia rickettsial salmonídea (SRS). Esta enfermedad ocurre principalmente en centros de cultivo en agua de mar o estuarios y experimentalmente se ha podido reproducir en agua dulce (Larenas y Acuña, 2014).

El agente etiológico, *P. salmonis*, corresponde a una bacteria gramnegativa e inmóvil, de características pleomórficas con predominio cocoide. El tamaño de la bacteria varía entre 0,5 y 1,5 μm . La temperatura óptima de replicación de este agente en el laboratorio oscila entre 15 °C y 18 °C (Fryer *et al.*, 1990) mientras que los brotes de la enfermedad ocurren con mayor frecuencia en otoño y primavera cuando la temperatura del agua promedia entre los 9 °C a 16 °C (Lannan y Fryer, 1994). La bacteria fue considerada inicialmente como de crecimiento intracelular obligado, sin embargo, estudios posteriores han demostrado que es facultativa (Rozas y Henríquez, 2014). Con el uso de microscopía electrónica se ha determinado que *P. salmonis* posee en su superficie dos membranas que son similares a las que se presentan en algunos agentes rickettsiales: una externa ondulada y una interna citoplasmática (Fryer *et al.*, 1990).

En 1995 se evidenció que *P. salmonis* se puede localizar en el citoplasma de células de hígado, riñón, bazo, branquias, encéfalo, corazón, intestino y ciegos pilóricos, demostrándose la inespecificidad del agente por diferentes tipos celulares. En el mismo estudio, se establece la posibilidad de distribución no homogénea de la bacteria en los tejidos dada la diversidad y frecuencia de presentación de lesiones a nivel histopatológico (Larenas *et al.*, 1995).

Todas las especies de salmónidos cultivadas en Chile pueden ser afectadas (Bravo, 1994), teniéndose evidencia en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*O. mykiss*), salmón chinook (*O. tshawytscha*) y salmón cereza (*O. masou*). En Chile, además, la presencia del agente sin causar enfermedad se ha demostrado

en varias especies silvestres, moluscos y también en el parásito *Caligus rogercresseyi* (Larenas y Acuña, 2014). En un estudio hecho por Larenas *et al.* (1997) en trucha arcoíris, se determinó que la densidad poblacional y la temperatura del agua son factores importantes para la presentación de la enfermedad.

Los signos clínicos y lesiones descritos para la infección natural y experimental en peces son similares, pudiendo estar ausentes en peces infectados. Las lesiones en piel incluyen hemorragias perianales, perioculares y petequias en el abdomen. También puede presentarse exoftalmia bilateral y estomatitis ulcerativa. El hígado puede presentar nódulos amarillentos de hasta 2 cm de diámetro (Cvitanic *et al.*, 1991). La signología externa en animales levemente infectados es inexistente, mientras que aquellos peces que cursan con la enfermedad propiamente tal pueden presentar color oscuro, letargo, orillamiento o nado irregular (OIE, 2003).

Las pérdidas económicas asociadas a la piscirickettsiosis son altas, estimándose para el año 2012 en US\$ 450.643.229, considerando mortalidad, tratamientos antimicrobianos y el uso vacunas (Camussetti, 2014). Dado el impacto de la enfermedad, la autoridad sanitaria nacional, representada por SERNAPESCA, estableció en el año 2013 el Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-Piscirickettsiosis) que planteó como objetivos disminuir el impacto de la enfermedad mediante la detección temprana y seguimiento de los casos, aplicando para ello medidas de control oportunas y graduales. Para lograr lo anterior, se establecieron criterios de clasificación de centros según la evolución clínica de la piscirickettsiosis: Centro de Alta Distribución (CAD), Centros de Alerta y Centros de Vigilancia. Los primeros resultados de este programa indican que los centros CAD que fueron evaluados positivamente una vez terminado el periodo de seguimiento fijado por el Programa, poseían medidas efectivas de biocontención y eliminación del foco (eliminación temprana de las jaulas más afectadas y extracción de peces moribundos) (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 2013a).

Entre las dificultades para la contención de la bacteria, SERNAPESCA plantea como interrogantes el rol en la dispersión pasiva del agente mediante biopelículas y la participación de animales silvestres como diseminadores de *P. salmonis* (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 2013b). Otros autores señalan que el desconocimiento de aspectos

relevantes del ciclo de vida, virulencia y patogénesis del agente etiológico, impiden el desarrollo de medidas preventivas más efectivas (Rozas y Enríquez, 2014).

En relación a la transmisión de la bacteria de forma natural, el proceso aún está insuficientemente descrito (Rozas y Enríquez, 2014). Bajo condiciones de laboratorio, la piscirickettsiosis se ha reproducido posterior a la inoculación intraperitoneal en salmón coho y salmón del Atlántico (Cvitanich *et al.*, 1991; Garcés *et al.*, 1991). Los brotes de la enfermedad por lo general ocurren pocas semanas después de la transferencia de “smolts” a agua de mar (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanic *et al.*, 1991), lo que hace suponer que la vía oral podría ser especialmente importante como forma de infección (Almendras y Fuentealba, 1997).

La transmisión vertical del agente ha sido demostrada de manera experimental en machos y hembras de trucha arcoíris, demostrándose la presencia de la bacteria al estado de ova ojo. La posterior persistencia del agente no se estableció (Larenas *et al.*, 1996a).

De manera experimental, se ha comprobado la transmisión horizontal a través de heces y orina de peces infectados (Larenas y Acuña, 2014). Recientemente se demostró la presencia de *P. salmonis* en heces de trucha arcoíris mantenidas en condiciones de cultivo a través de PCR anidado (Peirano, 2015) y se detectó también en heces de salmón coho mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Montalico, 2015).

En condiciones experimentales Smith *et al.* (1999) demostraron la penetración de *P. salmonis* a través de piel y branquias intactas, obteniéndose mortalidad y lesiones propias a nivel macroscópico e histopatológico. No obstante lo anterior, la forma de ingreso del agente al individuo aún es desconocida.

Como se indicó, inicialmente la piscirickettsiosis fue descrita en Chile, pero posteriormente ha sido reportada en otras áreas geográficas como Canadá, Irlanda y Noruega (Almendras y Fuentealba, 1997). Es importante destacar que a pesar de la presencia del agente y la manifestación de la enfermedad, las mortalidades reportadas mundialmente son muy inferiores a las reportadas en Chile (Larenas *et al.*, 1997).

Las técnicas diagnósticas establecidas para la detección de *P. salmonis* en Chile según el PSEVC-P son la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y la Reacción de la Polimerasa en

Cadena anidada (PCR anidado) (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 2013b). Junto con ello, las muestras que se deben utilizar corresponden a hígado, riñón o cerebro (OIE, 2003). En 1996 Mael *et al.* desarrollaron una técnica de PCR anidado para la detección de piscirickettsiosis que utiliza partidores que detectan cinco cepas de *P. salmonis*. Esta técnica es relativamente rápida, sensible y específica e indica como positivas a aquellas muestras de DNA amplificado de 467 pares de bases (pb).

La posibilidad de utilizar estas técnicas diagnósticas para determinar la presencia de la bacteria ofrece la oportunidad de estudiar aspectos aún desconocidos sobre la diseminación de esta. Es por lo anterior, que la presente Memoria de Título buscó determinar la presencia y asociación de *P. salmonis* en hígado y riñón de salmón coho bajo condiciones de cultivo en agua de mar con el objetivo de establecer la real competencia de dichos tejidos como indicadores de la presencia del agente. Por otra parte, se investigó la presencia de la bacteria en heces en forma similar a lo que ha sido descrito por Peirano (2015) en trucha arcoíris.

HIPÓTESIS 1

Existe asociación entre la presencia de *P. salmonis* en heces, hígado y riñón de salmónes coho (*O. kisutch*) afectados por piscirickettsiosis en condiciones de cultivo.

HIPÓTESIS 2

P. salmonis se presenta en contenido fecal de salmónes coho afectados por piscirickettsiosis en condiciones de cultivo.

OBJETIVO GENERAL

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de *P. salmonis* en muestras de hígado, riñón y heces de peces afectados por piscirickettsiosis.
2. Establecer si existen diferencias en la detección de *P. salmonis* en diferentes fracciones de muestras de hígado y riñón.
3. Establecer si existe una asociación entre la presencia de *P. salmonis* en hígado, riñón y heces en salmón coho

MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente Memoria de Título, se utilizaron muestras de riñón, hígado y heces provenientes de salmón coho (*O. kisutch*) afectados por brotes de piscirickettsiosis. Dichas muestras se encontraban adecuadamente conservadas en etanol al 70% y almacenadas a -20°C de temperatura en el Laboratorio Nacional de Referencia Para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El trabajo de laboratorio se extendió entre julio y noviembre del año 2015. Las muestras se obtuvieron de tres centros de cultivo de la Región de Los Lagos que se encontraban con brotes de piscirickettsiosis al momento de la toma de muestra. Cada centro fue previamente considerado como positivo de acuerdo a los protocolos de diagnóstico de la empresa y los reglamentos sanitarios de SERNAPESCA.

Una vez que las muestras fueron obtenidas se almacenaron a temperatura de congelación en un contenedor con “ice packs” y se trasladaron hasta las dependencias del laboratorio en Santiago.

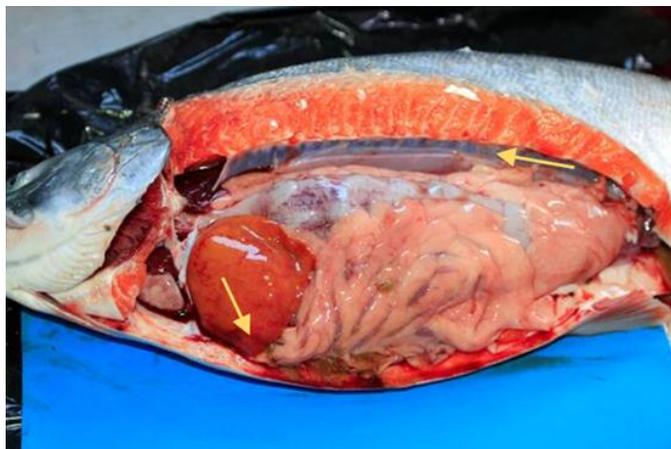


Figura 1 Fotografía de necropsia de salmón coho (*O. kisutch*) afectado por piscirickettsiosis. Las flechas amarillas indican la zona de muestreo de riñón posterior e hígado utilizadas en el estudio.

En el caso de hígado y riñón posterior, desde las muestras ya obtenidas (Figura 1), se utilizaron tres zonas por cada órgano, que comprendió dos bordes de los tejidos, lo más alejados posibles entre sí, y una zona central. Esto se realizó para determinar si existen

diferencias diagnósticas dentro del mismo tejido para *P. salmonis* según el fragmento que se utiliza para su detección con la técnica de PCR anidado.

1.- Selección de los peces.

Se seleccionaron aquellos individuos, sin importar su tamaño, en los que se evidenció una tendencia a orillarse y signología tanto externa como interna de piscirickettsiosis. Así, aquellos animales que estando orillados hayan presentado lesiones en piel tipo pápulas, máculas o úlceras, fueron retirados con quechas destinadas para tal efecto y eutanasiados con sobredosis anestésica (benzocaína) según lo recomendado por la American Veterinary Medical Association (2013).

Luego, en el mismo centro de cultivo se procedió a realizar necropsias a cada uno de los peces en el lugar destinado a tal efecto según los reglamentos de SERNAPESCA, los cuales indican que este tipo de procedimientos han de realizarse en un área exclusiva para ese fin, con barreras sanitarias tanto al ingreso como a la salida del sector, estando la zona adecuadamente iluminada y con barreras físicas que imposibiliten el acceso de predadores. Asimismo, la superficie sobre la que se trabaje ha de ser lavable y desinfectable, asegurándose que los fluidos resultantes del proceso sean canalizados al sistema de tratamiento de la mortalidad prohibiendo que estos sean esparcidos en el medio (SERNAPESCA, 2012). Se tuvo especial cuidado para evitar la contaminación entre muestras. En las necropsias, se encontraron algunas de las siguientes lesiones anatomopatológicas: úlceras en la piel, renomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, petequias en grasa visceral, congestión intestinal y en ciegos pilóricos, hemorragias en la mucosa gástrica y licuefacción muscular (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanic *et al.*, 1991; OIE, 2003; Larenas y Acuña, 2014). Con la presencia de al menos una de estas lesiones se procedió a tomar las muestras de hígado, riñón y heces. Todos los individuos seleccionados cumplieron al menos alguna de las condiciones señaladas anteriormente.

2.- Obtención de las muestras y controles negativos.

Las muestras fueron obtenidas a través de necropsias sobre un mesón de acero inoxidable. Tanto el mesón, como el instrumental fueron desinfectados con cloro al 0,5% entre cada

procedimiento. Se utilizaron guantes desechables únicos para la manipulación de cada pez. Tras cada muestreo, se desinfectó la mesa de necropsia y se colocó una bolsa de basura de polietileno nueva para trabajar sobre ella.

A cada individuo se le extrajeron trozos de hígado y riñón de no más de 0,5 mm de diámetro, guardándose en tubos de 2 mL con 1,5 mL de etanol como fijador de la muestra. Es importante señalar que con el fin de evitar la contaminación entre muestras, se utilizó instrumental quirúrgico diferente para la toma de muestra de cada uno de los órganos. En el caso del muestreo de heces, se procedió a desinfectar y secar el área de la abertura anal para posteriormente por compresión mecánica de la cavidad celómica vaciar el contenido intestinal directamente en el tubo con 1,5 mL de etanol. Cada tubo fue rotulado indicando el número de pez y el contenido mediante la terminología H, R ó HE según se tratase de hígado, riñón o heces respectivamente.

Una vez hecho lo anterior, los tubos se dispusieron en gradillas dentro de un “*cooler*” con “*ice packs*” para luego ser trasladarlos hasta el laboratorio.

Mediante el procedimiento descrito se obtuvieron diecinueve individuos, por lo que considerando siete análisis por cada uno de ellos (tres de hígado, tres de riñón y uno de heces), el tamaño muestral del presente estudio fue de 133 análisis más los controles negativos.

3.- Procesamiento de las muestras.

Una vez en el laboratorio, dado que de las muestras completas de hígado y riñón se debían extraer tres fracciones de órgano distantes entre sí, se procedió a asignar adicionalmente al número ordinal y la inicial “H” de hígado y “R” de riñón la letra “a”, “b” y “c” para diferenciar los tubos. En el caso de las muestras de heces, se mantuvo la nomenclatura inicial dado que se procesó sólo una muestra de heces por pez.

Se dispuso de controles a distintos niveles:

- Control negativo de contaminación de toma de muestra: hígado de pollo.
- Control negativo de contaminación durante la extracción de ADN: hígado de pollo.

- Controles de PCR anidado: agua libre de DNAsas (Promega ®) como control de reactivos, extracto de ADN de perro como control negativo de la técnica de PCR anidado y una muestra de tejido con *P. salmonis* como control positivo.

Todos los controles fueron procesados igual que las muestras de hígado, riñón y heces.

Cada muestra fue sometida a cuatro etapas: primero se aisló el ADN mediante el “*kit*” de extracción Wizard® (Promega), luego se cuantificó el ADN extraído utilizando el “*kit*” QuantiFluor® (Promega), en tercer término se realizaron las amplificaciones correspondientes a la técnica de reacción en cadena de polimerasa anidada (PCR anidado) descrita por Mauel *et al.* (1996) con las modificaciones hechas por Peirano (2015) y finalmente se evidenciaron los resultados del PCR anidado en electroforesis en gel TBE de agarosa al 2%.

a) Aislamiento de material genético.

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

Tabla 1. Materiales utilizados en la extracción del ADN.

EXTRACCIÓN DE ADN	
“ <i>Kit</i> ” de extracción Wizard® Promega	Gradillas plásticas
Micropipeta de 2 a 20 µL	Contenedor de hielo con “ <i>ice packs</i> ”
Micropipeta de 20 a 200 µL	Papel absorbente
Micropipeta de 100 a 1000 µL	Tubos Eppendorf de 1,5 mL
Puntas de micropipeta de 20, 200 y 1000 µL	Tijeras y pinzas
Pistilos para homogenización	Cloro 0,5%
Vórtex (Type 16700 Mixer Maxi-Mix 1)	

b) Cuantificación de ADN.

Para cuantificar el ADN de las muestras extraídas se utilizó el “*kit*” comercial QuantiFluor® (Promega). El fabricante describe que dicho “*kit*” contiene un colorante de unión a ADN fluorescente que permite la cuantificación sensible de pequeñas cantidades de ADN de doble cadena (dsDNA) en solución (Promega, 2015).

Todos los valores de cuantificación obtenidos se consideraron suficientes para proceder a la siguiente etapa.

c) PCR anidado.

Durante la etapa de PCR anidado las muestras fueron procesadas al interior de una campana de bioseguridad (BIOBASE, modelo 11231 BCC 86). Se utilizaron los insumos y materiales descritos en la tabla N°2. Se preparó un tubo Eppendorf de 2 mL para contener la mezcla de PCR a utilizar en cada amplificación. Por cada muestra a amplificar (vale decir ADN de las muestras extraídas y cuantificadas y controles de la técnica) se dispusieron en dicho tubo 6,5 µL de agua libre de nucleasas, 12,5 µL de GoTaq Colorless Mastermix 2X y 2,5 µL de cada uno de los dos partidores (Eub-A y Eub-B para la primera amplificación y PS2S y PS2AS para la segunda amplificación). Todos los reactivos señalados se encontraban almacenados a -20°C en las dependencias del laboratorio, por lo que al emplearlos se trabajó con ellos sobre “*iso freeze*”, procurando mantenerlos fuera del congelador durante el menor tiempo posible.

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

Cada ciclo de PCR fue amplificado en un termociclador *PCR Touch 960* marca Hangzhou Jingle Scientific Instrument Co., Ltd. Antes de la primera amplificación se configuró una desnaturalización previa a los 35 ciclos a 94°C durante 2 minutos y luego cada ciclo de PCR tuvo 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 2 minutos de hibridación a 60°C y 3

minutos de extensión a 72°C. La segunda amplificación tuvo también 35 ciclos en iguales condiciones salvo con la temperatura de hibridación que fue aumentada a 65°C.

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

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

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

INSUMOS Y EQUIPOS UTILIZADOS EN PCR	
Termociclador PCR Touch 960 (Hangzhou Jingle Scientific Instrument Co., Ltd.)	Micropipeta de 0,1 a 2 µL
Campana de bioseguridad (BIOBASE, modelo 11231 BCC 86)	Micropipeta de 20 a 200 µL
Súper Mini Centrífuga (Modelo Mini – 14K)	Micropipeta de 100 a 1000 µL
Promega GoTaq Colorless 2X PCR Mastermix)	Agua libre de DNAsas (Promega ®)
Partidores Eub-A y Eub-B (primera amplificación)	Microtubos de 0,2 mL
Partidores PS2S y PS2AS (segunda amplificación)	Puntas de micropipeta (2, 20, 200 y 1000 µL)
Guantes desechables	Tubos Eppendorf de 2 mL

d) Electroforesis.

Las muestras amplificadas fueron retiradas del termociclador y almacenadas a -20 °C de temperatura hasta la realización de la electroforesis. Los materiales e instrumentos utilizados en la electroforesis se detallan en la tabla N°3.

Tabla 3. Materiales utilizados en la electroforesis en gel de agarosa (EGA) 2%.

MATERIALES UTILIZADOS EN ELECTROFORESIS	
TBE 1X (Promega)	Termómetro digital
Agarosa Lafken (Fermelo S.A)	Molde y peineta de dientes para geles
Matraz 100 mL	Microondas
Micropipeta 2-20 µL	GelRed® (Biotium)
Puntas 20 µL	Fuente de poder <i>Voltronic</i> (Nyxtechnik)
Balanza digital	

Las electroforesis se realizaron en gel TBE (Tris, Borato y EDTA) y agarosa al 2%. Se midieron 75 mL de solución buffer TBE 1X (Promega ®) en un matraz de 100 mL y se agregaron 1,5 g de agarosa Lafken (Fermelo). Con estas proporciones se consideró la concentración de gel de agarosa al 2%. Se dispuso la solución en un horno microondas y se colocó a alta temperatura hasta alcanzar la ebullición. Una vez sucedido lo anterior se colocó el matraz a temperatura ambiente y se dejó enfriar, controlando la temperatura con un termómetro destinado a tal efecto hasta los 65 °C, momento en el cual se agregaron 7,5 µL de la tinción GelRed® (Biotium) como tinción fluorescente de geles, procurando homogenizar el contenido. Una vez hecho esto, se depositó la mezcla en el molde y se instaló la peineta de dientes hasta conseguir la formación del gel a temperatura ambiente.

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

La electroforesis se realizó a 70 voltios durante 90 minutos, utilizando una fuente de poder

Voltronic (Nyxtechnik). Para visualizar las bandas de ADN se utilizó un transiluminador *UV WiseUV* (WUV-L10 – Wisd) y se fotografiaron los geles.

Las muestras que resultaron negativas fueron nuevamente sometidas a electroforesis, cargándose el ADN amplificado esta vez sin diluir, vale decir se utilizaron 5 μL de muestra y 2 μL de Orange/Blue por bolsillo en el gel de agarosa.

4.- Análisis de los resultados.

Cada individuo fue considerado como positivo a *P. salmonis* si una o más muestras del mismo animal fue(ron) positiva(s) a través de la técnica de PCR anidado.

La asociación estadística de la presencia de *P. salmonis* en muestras de heces con la presencia de la bacteria en muestras de riñón e hígado, por separado, fue analizada mediante el coeficiente de Kappa, como índice de asociación, interpretando el resultado de dicho coeficiente con la tabla de Landis y Koch (1997). En los anexos 1, 2 y 3 encuentra el cálculo de los valores de Kappa para los diversos análisis y en el anexo 4 se expone la tabla de Landis y Koch para evaluar el nivel de acuerdo.

RESULTADOS

Una vez obtenido el extracto de ADN, se realizó la cuantificación de ADN mediante el “*kit*” de cuantificación Quantifluor® de Promega obteniéndose los valores que se exponen en la tabla 4. Tanto la extracción como la cuantificación del ADN se realizaron siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante bajo el protocolo estandarizado del Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas de la Universidad de Chile.

Tabla 4. Cuantificación del ADN de las muestras extraídas.

Pez	Hígado*			Riñón*			Heces*
	Ha	Hb	Hc	Ra	Rb	Rc	
1	15	2,91	134	50	97	21	0,0193
2	56	5,2	70	17	50	136	0,523
3	24	19	13	29	52	5,9	24
4	0,134	0,117	147	0,469	0,365	1,11	1,89
5	0,206	2,13	10	2	1,37	23	4,12
6	0,157	0,209	4,5	3,48	2,3	195	54
7	50	8,5	3,21	157	7,5	218	7,3
10	70	16	68	166	19	60	3,68
11	36	122	121	11	161	155	23
12	2,7	120	30	33	91	160	3,53
13	33	54	67	57	186	78	173
14	6,7	18	20	106	1,31	5,5	8,1
15	3,88	72	0,199	201	86	42	4,36
16	189	105	4,69	5,6	4,25	2,22	15
17	1,35	0,369	1,57	10	4,32	2	14
18	15	0,661	3,14	0,0401	2,55	2,17	16
19	3,55	1,63	9,7	2,48	8,4	2,94	4,69
20	4,58	0,4	0,0206	0,484	1,46	0,791	1,86
21	28	14	4,5	11	3,93	0,327	0,694

*Los valores se expresan en ng/uL.

Luego de haber realizado la primera amplificación con partidores generales para eubacterias y luego la segunda amplificación con los partidores específicos para cinco

cepas de *P. salmonis*, se logró determinar la presencia del agente en muestras de hígado, riñón y heces. Todos los peces del estudio fueron considerados como positivos en al menos una de las muestras analizadas a través de la técnica de PCR anidado. La tabla N°5 agrupa todos los resultados obtenidos.

Tabla 5. Resultados PCR anidado luego de realizada la electroforesis.

Pez	Hígado*			Riñón*			Heces*
	Ha	Hb	Hc	Ra	Rb	Rc	
1	-	-	Ind.	-	-	Ind.	+
2	+	-	-	+	+	+	-
3	+	+	-	+	+	Ind.	+
4	-	-	+	-	-	-	-
5	-	-	-	+	-	-	+
6	+	-	-	+	-	-	+
7	-	+	-	-	+	+	-
10	-	-	+	+	-	-	Ind.
11	-	+	+	+	Ind.	+	+
12	-	Ind.	Ind.	-	-	+	Ind.
13	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+
15	-	-	-	Ind.	+	-	Ind.
16	-	+	+	+	+	+	+
17	+	-	+	+	+	+	+
18	+	-	+	+	+	-	+
19	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	-	+	+
21	+	+	+	+	-	+	+

*El signo (+) significa animal positivo, el signo (-) implica animal negativo e “Ind” significa “Indeterminado” (se aplica a aquellas muestras en las que no se pudo concluir el resultado).

Mediante la visualización del gel de agarosa, se determinó la positividad de las muestras al observarse una banda en el gel de agarosa al 2% cercana a los 500 pb, de acuerdo a lo publicado por Mauel *et al.* (1996). A modo de ejemplo se indica la figura 2.

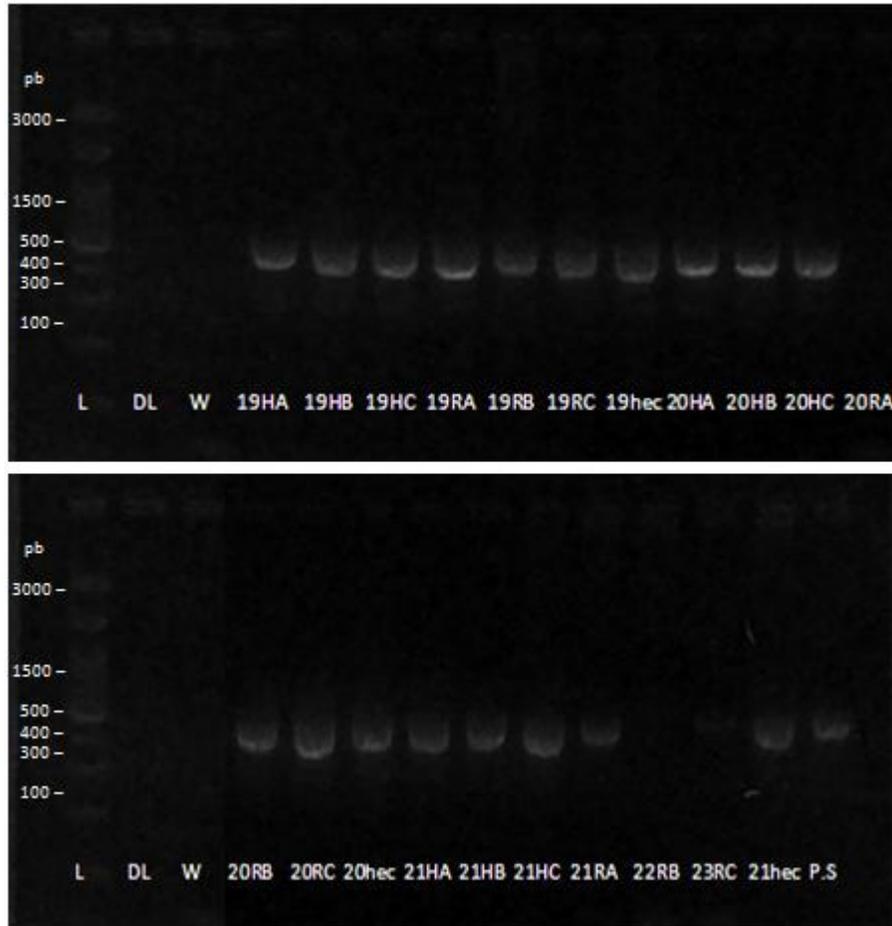


Figura 2. Visualización de electroforesis en gel de agarosa al 2%. L= *Ladder* (Marcador de peso molecular); DL= Dog liver (hígado de perro, control negativo); W= Agua libre de DNAsas (control negativo); del cuarto al penúltimo bolsillo corresponden a muestras; PS= *P. salmonis* (control positivo).

No obstante lo anterior, de las 133 muestras analizadas, en 10 de ellas no se observó migración por el gel de agarosa, observándose las bandas en el bolsillo dentro del cual fueron cargadas. Estas muestras fueron nuevamente sometidas a la extracción del ADN. Sin embargo, el resultado del PCR anidado fue nuevamente indeterminado, como se expone en la figura N°3.

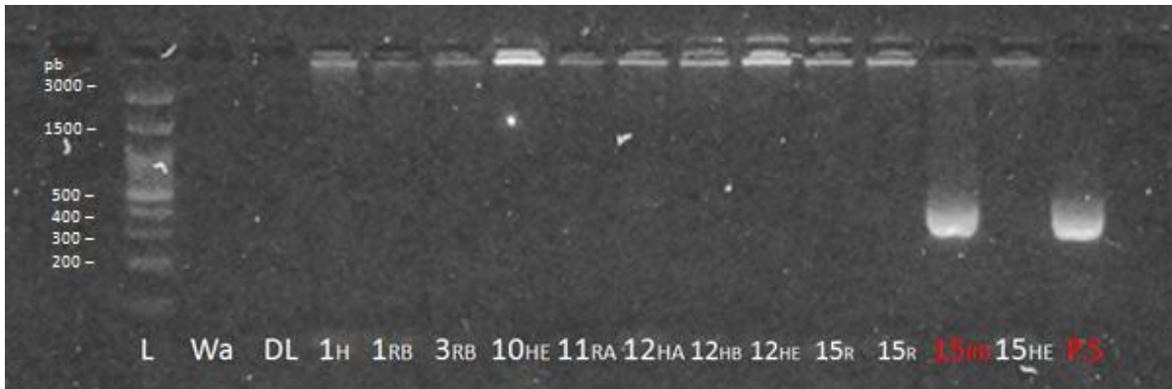
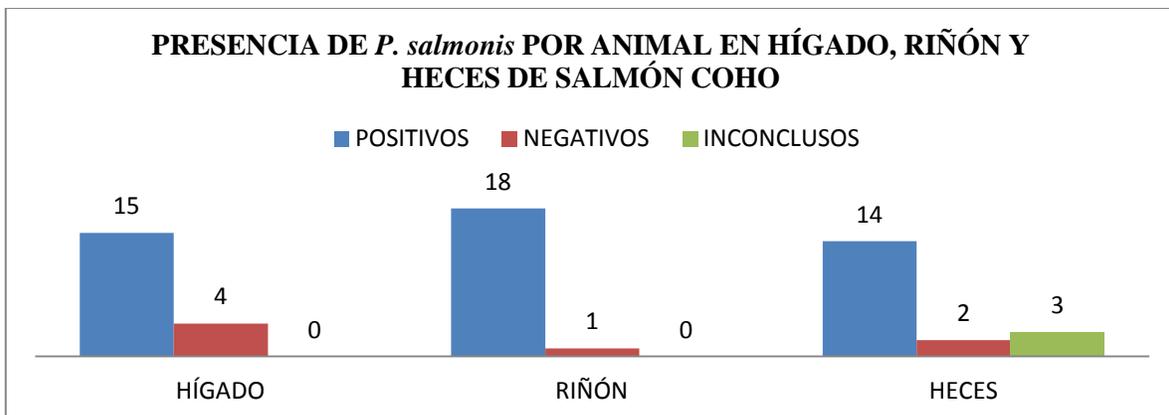


Figura 3. Electroforesis con bandas que no migraron. Electroforesis. L = *Ladder* (marcador de peso molecular); W= Agua libre de DNAsas (control de reactivos); DL=dog liver (hígado de perro, control negativo); 1H, 1RB, 3RB, 10HE, 11RA, 12HA, 12HB, 12HE, 15R, 15HE = muestras indeterminadas; 15RB= muestra positiva; P.S= *P. salmonis* (control positivo).

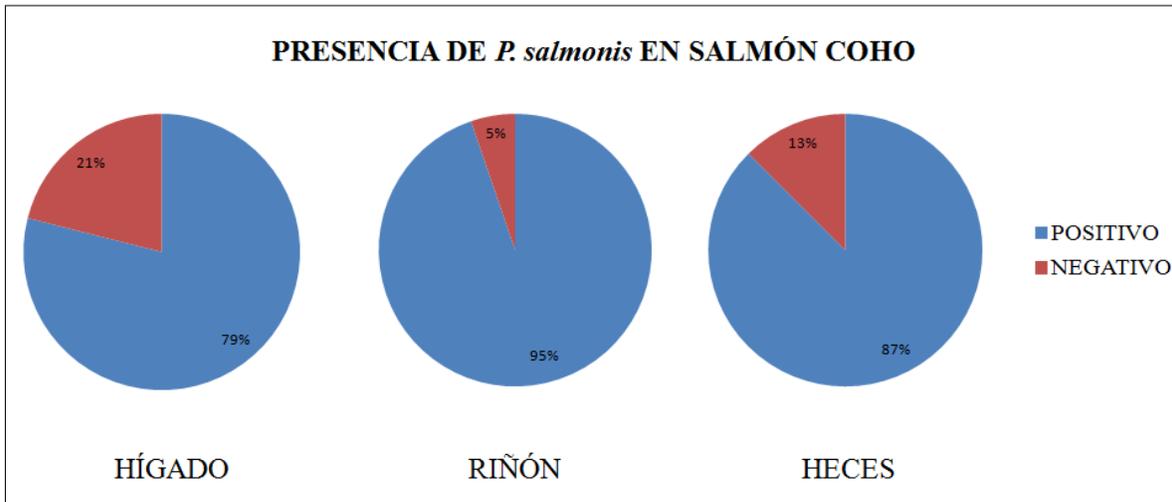
El gráfico N°1 expone resume los resultados obtenidos en los 19 peces del estudio. Para el caso de riñón e hígado se consideró como positivo al órgano cuando al menos una de las tres muestras analizadas de cada uno lo fue. En el caso de las heces se incluye a aquellos individuos en los que el resultado fue inconcluso.

Gráfico 1. Presencia de *P. salmonis* por individuo en hígado, riñón y heces.



El gráfico 2 muestra el porcentaje de positividad y negatividad a *P. salmonis* por órgano y heces. Se excluyen los resultados inconclusos de heces.

Gráfico 2. Porcentaje de individuos positivos y negativos a *P. salmonis* en salmón coho.



Análisis estadístico.

La asociación estadística de la presencia de *P. salmonis* entre muestras de hígado y riñón por individuo de manera separada y la asociación estadística entre los resultados obtenidos para hígado/riñón, hígado/heces y riñón/heces se analizaron con el Índice de Kappa (κ), el cual permite evaluar el acuerdo de variables categóricas y con ello establecer si existe o no asociación entre tales variables (Carleta, 1996; Landis y Koch, 1997). Dichos cálculos se encuentran expuestos en los anexos 1, 2 y 3.

Dado que uno de los objetivos de esta Memoria de Título es establecer si existen diferencias en la detección de *P. salmonis* en fracciones distintas de hígado y de riñón y tomando en consideración que algunos individuos presentaron resultados inconclusos en dichos órganos, para calcular el valor de Kappa se excluyeron de la operación las muestras de aquellos animales con resultado indeterminado. Dicho lo anterior, y de acuerdo al objetivo específico 2 y según lo propuesto por Landis y Koch (1997), los valores calculados de Kappa para las diferentes fracciones de hígado junto a la interpretación del valor obtenido (anexo 4) se exponen en las tablas N° 6, 7 y 8.

Tabla 6. Valores calculados de Kappa para fracciones distintas de hígado.

FRAGMENTOS	κ	ASOCIACIÓN
A - B	0,2222	Débil
A - C	0,1764	Pobre
B - C	0,2941	Débil
Promedio	0,2309	Débil

Tabla 7. Valores calculados de Kappa para fracciones distintas de riñón.

FRAGMENTOS	κ	ASOCIACIÓN
A - B	0,2941	Débil
A - C	0,1250	Pobre
B - C	0,5000	Considerable
Promedio	0,3063	Débil

Para evaluar la asociación entre hígado, riñón y heces se utilizó de forma separada el Coeficiente de Kappa. En el caso riñón e hígado, cada órgano se consideró como positivo cuando al menos una de las muestras analizadas para él lo fue. La tabla N°8 agrupa los resultados obtenidos para estos cálculos.

Tabla 8. Valores calculados de Kappa para la asociación de órganos y heces.

RELACIÓN	κ	ASOCIACIÓN
Hígado-Riñón	0,6842	Considerable
Hígado-Heces	0,5	Moderada
Heces-Riñón	0,625	Considerable

DISCUSIÓN

La piscirickettsiosis es una enfermedad bacteriana que provoca severas pérdidas a la industria del salmón en nuestro país (Bravo, 1994; Camussetti, 2014). Su presentación se asocia a momentos de estrés, por lo que la transferencia de agua dulce a mar se relaciona con la presentación de la enfermedad (Gaggero *et al.*, 1995)

La confirmación diagnóstica de esta enfermedad se obtiene a través del aislamiento de la bacteria en cultivos celulares (OIE, 2003), pero debido a lo complejo de este procedimiento, ya que debe realizarse en medios sin antibióticos (Fryer *et al.*, 1990), se utilizan como técnicas diagnósticas el PCR anidado e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

A pesar de que diversos autores describen que la especie más afectada por la piscirickettsiosis es el salmón coho (*O. kitsuch*), los resultados del PSEVC-Piscirickettsiosis para el primer semestre del año 2013 indican que en Chile la trucha arcoíris (*O. mykiss*) destaca como la más afectada por la enfermedad (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 2013c).

Este es el primer trabajo que ha realizado un estudio de la zona de muestreo por órgano en hígado y riñón en salmónidos, lo cual es relevante dado que se observaron diferencias en los resultados obtenidos según el fragmento que se utilizó. Tanto la OIE como SERNAPESCA señalan que las muestras para análisis de *P. salmonis* deben provenir de hígado o riñón, pero sin especificar la zona de muestreo de cada uno de estos órganos (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 2013; OIE, 2003). Además, el mayor número de fracciones analizadas aumentó posibilidad de detección de *P. salmonis* con PCR anidado.

A consecuencia de los resultados obtenidos, se hace necesario sugerir la utilización de hígado, riñón y heces para detectar al 100% de los animales positivos. A modo de ejemplo, en este estudio se presentó un pez positivo únicamente en heces y un animal con positividad sólo en riñón. De haberse prescindido de tales muestras que presentaban la bacteria, se hubiese subdiagnosticado la presencia de *P. salmonis*.

La signología clínica descrita por la literatura para la piscirickettsiosis (Fryer *et al.*, 1990; Larenas y Acuña, 2014) fue hallada en los peces utilizados para la realización del presente estudio. Del mismo modo, las lesiones anátomo-patológicas evidenciadas en la realización de cada procedimiento de necropsia durante esta investigación (datos no recopilados) también se condicen con lo descrito por varios autores (Cvitanich *et al.*, 1991; Almendras y Fuentealba, 1997; Larenas y Acuña, 2014).

En la actualidad se han desarrollado diversos métodos diagnósticos para la de *P. salmonis*, desde cortes histológicos o improntas de tejido (Fryer *et al.*, 1990; Larenas *et al.*, 1995), técnicas diagnósticas inmunológicas (Larenas *et al.*, 1996b), técnicas moleculares tales como PCR convencional, (Mauel *et al.*, 1996), PCR en tiempo real (Karatatou *et al.*, 2008) y el PCR anidado descrito por Mauel *et al.* (1996), siendo esta última técnica la que se utilizó en el presente estudio, con lo cual se probó que *P. salmonis* se encontraba en el 87% de las muestras de heces de salmónes coho (*O. kisutch*) afectados naturalmente por la enfermedad en condiciones de cultivo en mar. Este trabajo ha sido el primero en describir la presencia del ADN bacteriano del agente en heces de salmónes coho mediante el uso de la técnica de PCR anidado.

Según lo descrito por Mauel *et al.* (1996), la técnica de PCR anidado aumenta la sensibilidad del PCR convencional de 60 DICT₅₀ (Dosis infectiva media en cultivo de tejido) a 1 DICT₅₀, lo que permitiría detectar la presencia de la bacteria en estadios iniciales de la enfermedad, lo que podría favorecer manejos y tratamientos a la biomasa.

Los resultados obtenidos en esta investigación en lo relativo a las heces son concordantes con los publicados por varios autores (Peirano, 2015; Montalico, 2015; Zamorano, 2003; Salinas, 1998). Así, Peirano (2015) detectó la presencia de *P. salmonis* en el 70,8% de las muestras de heces de trucha arcoíris (*O. mykiss*) mantenidas en condiciones de cultivo en mar a través de la técnica de PCR anidado. Montalico (2015) detectó a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) la presencia de *P. salmonis* en el 47,4% de heces de salmónes coho (*O. kisutch*) con signología clínica compatible con la enfermedad provenientes de centros de mar en brote de piscirickettsiosis al momento de la toma de muestra. En 2003, Zamorano describió la excreción de *P. salmonis* a través de las heces de alevines de salmón coho provenientes de reproductores de cultivo machos y hembras

positivos renales a *P. salmonis*. Por su parte, Salinas (1998) publicó el primer reporte de la presencia de *P. salmonis* en heces de salmónidos bajo condiciones experimentales al inocular intraperitonealmente la bacteria en 50 alevines de trucha arcoíris (*O. mykiss*), obteniendo positividad mediante IFI en el 32% de las muestras de heces a los 13 días post inoculación. En el mismo estudio se reportó también que *P. salmonis* se excreta a través de heces, bilis y orina de peces inoculados clínicamente sanos y en mayor porcentaje en aquellos peces con signos de piscirickettsiosis (Salinas, 1998).

A pesar de que esta investigación determinó la presencia de *P. salmonis* en heces de salmón coho, la vía a través de la cual el agente se localiza en la materia fecal de los peces afectados no está dilucidada. Sabiendo que esta enfermedad es septicémica (Larenas *et al.*, 2003) la presencia del agente a nivel de intestino podría deberse a la infección sistémica o al ingreso de la bacteria vía oral, aunque esta última hipótesis contrasta con los resultados obtenidos por Smith *et al.* (1999) quienes determinaron que la vía oral de *P. salmonis* tiene sólo un 2% de mortalidad asociada en truchas arcoíris (*O. mykiss*) de 12 gramos.

La técnica de PCR anidado se caracteriza por permitir un diagnóstico rápido, de alta sensibilidad y especificidad para la detección de *P. salmonis* (Mauel *et al.*, 1996), lo que se reflejó en el presente estudio. No obstante lo anterior, con esta prueba diagnóstica no es posible determinar la excreción viable de la bacteria a través de las heces, con el potencial riesgo de infección a otros peces que tal supuesto implica. Lo anterior, dado que la técnica de PCR anidado es capaz de detectar el material genético de la bacteria, pero sin otorgar información relativa a si esta se encuentra viva e íntegra para poder continuar con su ciclo de vida en el ambiente marino o en las especies susceptibles.

En este estudio se determinó por primera vez la presencia del ADN de *P. salmonis* en heces de salmón coho mantenidos en condiciones de cultivo en mar a través de la técnica de PCR anidado. Este hallazgo, permitiría sugerir la diseminación de la bacteria en caso de que esta se encuentre viable en las deposiciones, dado que la literatura describe que la bacteria puede sobrevivir hasta un mes en condiciones de agua de mar (Lannan y Fryer, 1994). Es necesario realizar investigaciones que permitan dilucidar tal dilema.

Los resultados de asociación obtenidos del presente estudio se contraponen parcialmente con los obtenidos por Peirano (2015) en truchas arcoíris utilizando PCR anidado también

como técnica diagnóstica, pues en esa investigación se determinó nula asociación entre hígado-riñón y heces-riñón (en este estudio se obtuvo considerable asociación en ambas), mientras que la asociación entre heces e hígado fue débil (en este estudio se determinó moderada asociación). Las diferencias entre dicho estudio y la presente Memoria de Título podrían deberse a que se trabajó con distintas especies de salmónidos.

Por otra parte, un reciente estudio de Montalico (2015) en salmón coho logró determinar la presencia de *P. salmonis* a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en hígado, riñón, bazo y heces en el 68,4%, 52,6%, 21,1% y 47% de las muestras respectivamente.

Es importante tener presente que *P. salmonis* puede estar presente en riñón, fluidos celómicos o seminales en ausencia de signos clínicos de piscirickettsiosis (Solís, 2002), lo que supone un riesgo de diseminación del agente por parte de individuos clínicamente sanos que operan como portadores de la bacteria.

Además, considerando que los resultados obtenidos en esta investigación indican que la positividad a *P. salmonis* depende del fragmento que se utiliza para su detección a través de la técnica de PCR anidado, es menester proponer la posibilidad de que se estudie cada órgano de manera completa a fin de poder definir qué zona de los órganos es más representativa para realizar el diagnóstico de la enfermedad, pues tanto SERNAPESCA (2013b) como la OIE (2003) indican que para diagnosticar la presencia de *P. salmonis* en salmónidos se debe tomar una muestra de hígado o riñón sin especificar un área de ellos, por lo que se debería considerar la posibilidad de estudiar ambos órganos completamente para asegurar la detección del agente mediante el uso de la técnica de PCR anidado.

En relación a los resultados inconclusos, donde no se logró migración a través del gel de agarosa, esta situación presumiblemente se podría deber a algún defecto en la extracción del ADN, razón por la cual las muestras fueron re-extraídas, vale decir, la totalidad del ADN aislado de las muestras que no migraron por el gel de agarosa, fueron nuevamente sometidas a la extracción del ADN. La única diferencia que tuvo este tratamiento con el inicial de extracción, fue que las muestras no se sometieron a la etapa inicial de lisis celular. El objetivo de esta decisión fue remover eventuales proteínas o lípidos que estuviesen interfiriendo con la correcta migración del ADN a través del gel de agarosa. Se decidió

utilizar las muestras que ya habían sido extraídas y no otros fragmentos dado que uno de los objetivos de esta Memoria de Título es determinar la presencia de *P. salmonis* en fracciones distintas y lo más alejadas entre sí de los órganos muestreados. El ADN aislado fue sometido a la técnica de PCR anidado y tras ello el resultado fue nuevamente indeterminado, dado que las muestras no migraron por el gel como se pudo apreciar en la Imagen N°3.

CONCLUSIÓN

Se determinó la presencia de *P. salmonis* en hígado y riñón de salmónes coho afectados por piscirickettsiosis y por primera vez en las heces de esta especie en cultivo en aguamar con la técnica de PCR anidado.

Existen diferencias en la detección de *P. salmonis* con la técnica de PCR anidado en hígado y riñón según la fracción de órgano que se utilice como muestra en salmón coho.

La presencia de la bacteria entre hígado-riñón y riñón heces está considerablemente asociada.

La asociación entre hígado-heces existe, pero con una intensidad moderada.

Si bien es cierto a través de la técnica de PCR anidado utilizada en este estudio fue posible determinar la presencia del ADN de la bacteria en las muestras analizadas, es necesario realizar estudios de viabilidad particularmente en el contenido fecal.

BIBLIOGRAFÍA

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

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition [en línea] <<https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>> [consulta: 20-12-2015].

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

CARLETTA, J. 1996. Assessing Agreement on Classification Tasks: The Kappa Statistic. [en línea] <<http://web.archive.org/web/20120526213354/http://acl.ldc.upenn.edu/J/J96/J96-2004.pdf>> [consulta: 31-12-2015].

CAMUSSETTI, M. 2014. Piscirickettsiosis: análisis de la investigación, reglamentación, quimioterápicos y vacunas utilizadas en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 41p.

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

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

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

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

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

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

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

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

LARENAS, J.; ZAMORANO, E.; SMITH, P. 1996a. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. [en línea]. <<http://www.patologiveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET1-2005/PDF/Mepavet10.pdf>> [consulta: 30-05-2014].

LARENAS, J.; HIDALGO, L.; GARCÉS, H.; FRYER, J.; SMITH, P. 1996b. Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. Fish Pathol. 31: 231-232.

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

LARENAS, J.; ACUÑA, M. 2014. Manual de Piscirickettsiosis. [en línea] <<http://es.calameo.com/read/0008136160a8f2b92eb83>> [consulta: 06-04-2015].

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

MONTALICO, E. 2015. Detección y asociación de la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en riñón, hígado, bazo y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kitsutch*) bajo condiciones de cultivo en agua de mar. Tesis Magíster en Ciencias de la Acuicultura. Santiago, Chile. U. Chile. 43p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2003. Piscirickettsiosis (*Piscirickettsia salmonis*). [en línea]. <http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/2.1.13_Piscirickettsiosis.pdf> [consulta: 28-05-2015].

PEIRANO, P. 2015. Determinación de la presencia y asociación de *Piscirickettsia salmonis* en heces, hígado y riñón de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en condiciones de cultivo en mar. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 28p.

PROMEGA. 2015. Quantus™ Fluorometer. [en línea]. <https://worldwide.promega.com/products/instruments/fluorometers/quantus-fluorometer-simple-quantitation/#page_0_content_0_contentmid_0_ComponentListListView_ctrl2_ctl00_TabsListView_ctrl2_TabsContentDiv> [consulta: 31-12-2015].

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

SALINAS, G. 1998. Efecto de la densidad poblacional sobre la presentación y transmisión horizontal de piscirickettsiosis en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas experimentalmente. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 65p.

SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. 2013a. Primer informe de seguimiento (enero-mayo), Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (SRS) [en línea] <https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=7387> [consulta: 01-06-2015].

SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. 2013b. Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-Piscirickettsiosis) [en línea] <https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=6737> [consulta: 30-05-2015].

SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. 2013c. PSEVC-Piscirickettsiosis - Resultados Semestre 1 2013. [en línea] <https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=7647> [consulta: 20-12-2015].

SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. 2012. Res.Ex. N° 1468 - 28.06.2012. [en línea] <https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=6089> [consulta: 22-12-2015].

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

SOLIS, A. 2002. Comparación del nivel de presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de frotis renal, fluido celómico y seminal de reproductores de salmónidos de la Décima Región de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 62p.

ZAMORANO, E. 2003. Susceptibilidad de peces juveniles de salmón coho (*Oncorhynchus kitsutch*) y del Atlántico (*Salmo salar*), provenientes de reproductores de cultivos infectados y de no infectados, a la infección con *Piscirickettsia salmonis*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 65p.

ANEXOS

Anexo 1. Cálculo de los valores de Kappa para la asociación hígado-riñón, hígado-heces y riñón-heces en salmón coho.

HIGADO V/S RIÑÓN				HIGADO V/S HECES				RIÑÓN V/S HECES			
		Riñón				Heces				Heces	
Hígado	POSITIVO	NEGATIVO	Total	Hígado	POSITIVO	NEGATIVO	Total	Riñón	POSITIVO	NEGATIVO	Total
POSITIVO	15	0	15	POSITIVO	12	2	14	POSITIVO	13	2	15
NEGATIVO	3	1	4	NEGATIVO	2	0	2	NEGATIVO	1	0	1
Total	18	1	19	Total	14	2	16	Total	14	2	16
Total Acuerdo			16	Total Acuerdo			12	Total Acuerdo			13
Proporción Acuerdo			0,84210526	Proporción Acuerdo			0,75	Proporción Acuerdo			0,8125
Proporción Azar			0,5	Proporción Azar			0,5	Proporción Azar			0,5
Kappa			0,68421053	Kappa			0,5	Kappa			0,625
Excluidos por inconclusos: 10, 12 y 15											

Anexo 2. Cálculo de los valores de Kappa para la asociación entre fracciones distintas de hígado en salmón coho (fracciones A, B y C).

HIGADO A V/S B				HIGADO A V/S C				HIGADO B V/S C			
		B				C				C	
A	POSITIVO	NEGATIVO	Total	A	POSITIVO	NEGATIVO	Total	B	POSITIVO	NEGATIVO	Total
POSITIVO	6	4	10	POSITIVO	7	3	10	POSITIVO	7	2	9
NEGATIVO	3	5	8	NEGATIVO	4	3	7	NEGATIVO	4	4	8
Total	9	9	18	Total	11	6	17	Total	11	6	17
Total Acuerdo			11	Total Acuerdo			10	Total Acuerdo			11
Proporción Acuerdo			0,61111111	Proporción Acuerdo			0,58823529	Proporción Acuerdo			0,64705882
Proporción Azar			0,5	Proporción Azar			0,5	Proporción Azar			0,5
Kappa			0,2222222	Kappa			0,1764706	Kappa			0,2941176
Excluidos por inconclusos: 12				Excluidos por inconclusos: 1 y 12				Excluidos por inconclusos: 1 y 12			

Anexo 3. Cálculo de los valores de Kappa para la asociación entre fracciones distintas de riñón en salmón coho (fracciones A, B y C).

RIÑÓN A V/S B				RIÑÓN A V/S C				RIÑÓN B V/S C					
		B				C				C			
A	POSITIVO	NEGATIVO	Total	A	POSITIVO	NEGATIVO	Total	B	POSITIVO	NEGATIVO	Total		
POSITIVO	9	4	13	POSITIVO	9	4	13	POSITIVO	9	1	10		
NEGATIVO	2	2	4	NEGATIVO	3	0	3	NEGATIVO	3	3	6		
Total	11	6	17	Total	12	4	16	Total	12	4	16		
Total Acuerdo		11		Total Acuerdo		9		Total Acuerdo		12			
Proporción Acuerdo		0,64705882		Proporción Acuerdo		0,5625		Proporción Acuerdo		0,75			
Proporción Azar		0,5		Proporción Azar		0,5		Proporción Azar		0,5			
Kappa		0,29411765		Kappa		0,125		Kappa		0,5			
Excluidos por inconclusos: 11 y 15				Excluidos por inconclusos: 1, 3 y 15				Excluidos por inconclusos: 1 y 3					

Anexo 4. Medida de acuerdo entre variables por datos categóricos. (Landis y Koch, 1997).

VALOR DE KAPPA	NIVEL DE ACUERDO
0 - 0,20	Pobre
0,21 - 0,40	Débil
0,41 - 0,60	Moderado
0,61 - 0,80	Considerable
0,80 - 1	Casi perfecto