



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

Monografía

Revisión de *Piscirickettsia salmonis* y propuesta de un modelo experimental de adhesión *in vitro* del genotipo EM-90 sobre conchas de chorito (*Mytilus chilensis*)

SIMON PABLO TEJEDA VERGARA

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

PROFESOR GUÍA: JULIO LARENAS H.
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2022



Revisión de *Piscirickettsia salmonis* y propuesta de un modelo experimental de adhesión *in vitro* del genotipo EM-90 sobre conchas de chorito (*Mytilus chilensis*)

SIMON PABLO TEJEDA VERGARA

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

Nota Final:

Profesor Guía	Dr. Julio Larenas
Profesor Corrector	Dr. Gustavo Farias
Profesor Corrector	Dr. Eduardo Kessi

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2022

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia: mi madre Edith, mi padre Juan José, mi hermano Juan y mi gata Pelo Lais, quienes me acompañaron por el largo trayecto que fue la universidad.

También dedicar este trabajo a mis amigos “Pipon”, “Acercandro”, “El Cryptobro”, “Afedo”, “El ayudas” y a “El capibara talquino” quienes hicieron de este último trayecto una experiencia bastante agradable.

Mencionar también al canal de YouTube de “Baity”, quien con sus variados videos me ayudo a no perder la paciencia y seguir escribiendo este trabajo.

Finalmente, como mención honrosa a mi amigo Mathias Oroz, quien me ayudo, con mucha paciencia, a redactar este trabajo.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1 -
ABSTRACT	2 -
INTRODUCCIÓN	3 -
REVISION BIBLIOGRÁFICA	5 -
Los desafíos sanitarios que conlleva la exportación de salmónidos en Chile	5 -
Piscirickettsiosis	7 -
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	8 -
Epidemiología	9 -
Métodos de detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	10 -
Supervivencia de <i>P. salmonis</i> en el ambiente marino	11 -
Adhesión de <i>Piscirickettsia salmonis</i> a superficies	12 -
Modelos de adhesión bacteriana a superficies	13 -
OBJETIVOS	17 -
OBJETIVO GENERAL	17 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17 -
MÉTODOS	18 -
Criterios de selección	18 -
Fuentes de información y búsqueda	18 -
Propuesta de un modelo experimental	20 -
RESULTADOS	22 -
Organización de la información	22 -
Propuesta de modelo experimental	24 -
Bases bibliográficas de la propuesta	24 -
Propuesta de un protocolo experimental	27 -
Desafío de conchas de <i>Mytilus chilensis</i>	29 -
Estudio de liberación.	31 -
DISCUSIÓN	33 -
CONCLUSIONES	36 -
BIBLIOGRAFÍA	37 -

RESUMEN

Piscirickettsia salmonis es una bacteria que se caracteriza por generar cuadros clínicos de tipo septicémico con alta mortalidad en salmones de cultivo en Chile. En la actualidad se documentan dos genotipos de este microorganismo, el LF-89 y el EM-90 y múltiples variantes de estos.

Existen escasos conocimientos sobre su ciclo de vida fuera del hospedador en condiciones de agua de mar o estuarina. En condiciones *in vitro* se ha demostrado que sobrevive en agua de mar no así en agua dulce, asimismo, es capaz de adherirse a superficies, capacidad que se evidenció sobre ovas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), conchas de chorito (*Mytilus chilensis*) y sobre algunos polímeros sintéticos utilizados como partes de las infraestructuras de cultivo de salmónidos.

El presente estudio tuvo como principales objetivos el realizar una revisión bibliográfica sobre el genotipo EM-90 de la bacteria y la proposición de un modelo experimental de adhesión. La propuesta pretende aportar información sobre la epidemiología y ciclo de vida de *P. salmonis*.

El modelo experimental que se propone en la presente memoria se origina sobre la base de que existen muy pocos estudios publicados sobre el genotipo EM-90 de *P. salmonis* y consta de dos fases; la primera corresponde a un estudio de adherencia de dicho genotipo y, en la segunda, se propone un estudio de infectividad; esto último permitiría establecer si el microorganismo se puede liberar al medio.

Palabras claves: Salmones; SRS; *Piscirickettsia salmonis*; Piscirickettsiosis; EM-90; Adhesión; *Mytilus chilensis*; Epidemiología.

ABSTRACT

Piscirickettsia salmonis is a bacterium characterized by generating clinical pictures of septicemic type with high mortality in farmed salmon in Chile.

At present, two genotypes of the bacterium are documented, LF-89 and EM-90, together with multiple variants of these.

There is little knowledge about its life cycle outside the host in seawater or estuarine conditions. *In vitro* conditions have shown that it survives in seawater but not in freshwater, and it is also capable of adhering to surfaces, an ability that was demonstrated on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs, Chilean mussel (*Mytilus chilensis*) shells and on some synthetic polymers used in salmonid culture ponds.

The main objectives of the present study were to conduct a literature review on the EM-90 genotype of the bacterium and to propose an experimental model. This model aims to provide information on the epidemiology and life cycle of *P. salmonis*.

The proposal elaborated in this report is since there are very few published studies on the EM-90 genotype of *P. salmonis* and consists of two phases; the first corresponds to an adherence study of this genotype and, in the second phase, an infectivity study is proposed; this would allow establishing whether the microorganism can be released into the environment.

Keywords: Salmonids; SRS; *Piscirickettsia salmonis*; Piscirickettsiosis; EM-90; Adhesion; *Mytilus chilensis*; Epidemiology.

INTRODUCCIÓN

Actualmente Chile ocupa el segundo lugar a nivel mundial, superado sólo por Noruega, en la producción de salmónidos, sin embargo, cada año se producen importantes pérdidas económicas debido a la presencia de la enfermedad infectocontagiosa denominada piscirickettsiosis o septicemia rickettsial del salmón (SRS), causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*.

Desde el primer caso informado en Chile, que data del año 1988 en ejemplares de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), se ha reportado la enfermedad en diversos lugares del mundo como Irlanda, Noruega, Canadá, Estados Unidos, Escocia, Grecia y Croacia, aunque las mortalidades en esos países han sido bajas.

En Chile se han logrado aislar y caracterizar dos genotipos de la bacteria, LF-89 y EM-90, siendo el primero el más estudiado; sin embargo, diversas investigaciones han establecido que el segundo es el predominante en centros de cultivo, siendo no sólo más prevalente, sino que, además, más patógeno y con mayor tasa de letalidad.

Además, el agente etiológico está presente en diferentes especies de peces silvestres, moluscos, crustáceos, ectoparásitos y anélidos, antecedente que complica aún más su posible control en centros de engorda. Por otra parte, algunos estudios *in vitro* han demostrado que se adhiere y mantiene en la concha de chorito (*Mytilus chilensis*). Este último es un molusco de distribución endémica a lo largo del país, lo cual podría convertirlo en un potencial reservorio y, por lo tanto, en una variable a considerar para establecer medidas de control de la enfermedad.

La mayoría de los estudios del agente etiológico se han centrado en las formas de transmisión, patogenia y respuesta inmune, sin embargo, poco se conoce en relación con la supervivencia fuera del hospedador y mantención en un ciclo marino. Entre estos, se ha propuesto que la bacteria se adhiere a la superficie de estructuras de origen biológico, como algunas conchas de moluscos, como no biológicas entre las que se cuentan algunos polímeros sintéticos que se utilizan en la construcción de balsas jaula.

De acuerdo con lo anterior, se hace evidente la necesidad de realizar mayores estudios de *P. salmonis*, en particular sobre la cepa EM-90, para establecer su supervivencia fuera del hospedador y su potencial capacidad de mantenerse como reservorio. Por ello en la presente memoria se realizó una revisión bibliográfica sistemática sobre *P. salmonis*, con énfasis en el genotipo EM-90 y sus posibles mecanismos de adherencia. Con dicha información se elaboró una propuesta de estudio experimental *in vitro* que considera adhesión, liberación y capacidad infectante.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los desafíos sanitarios que conlleva la exportación de salmónidos en Chile

Chile es uno de los principales exportadores de salmónidos a nivel mundial, sus principales especies de exportación son: salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón coho (*O. kisutch*) (SERNAPESCA, 2019).

Otras exportaciones acuícolas de importancia corresponden a moluscos como el chorito (*Mytilus chilensis*), ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) y el abalón rojo (*Haliotis rufescens*) y aquellas relacionadas con algas en donde se destaca la exportación de pelillo (*Gracilaria chilensis*) (SERNAPESCA, 2019).

El Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura de Chile (SERNAPESCA) elabora anualmente informes sectoriales de pesca en los cuales, además de presentar la cantidad de productos extraídos del mar y posteriormente exportados, contiene un apartado con las principales causas de mortalidad de salmónidos cultivados. Éstas se clasifican como: primarias como aquellas que afectan a todo un plantel de salmónidos entre las cuales se encuentran las causas infecciosas, ambientales, por eliminación, por daño mecánico, por desadaptación, por deformidad, entre otras; y secundarias como una subclasificación de todos aquellos salmónidos que cursaron con una causal de eliminación primaria por enfermedad infecciosa, entre las que destacan, sin ser un listado taxativo: piscirickettsiosis, furunculosis, enfermedad bacteriana del riñón (BKD), vibriosis, flavobacteriosis, tenacibaculosis (SERNAPESCA, 2022).

En la tabla 1 se muestran los datos sobre mortalidad en el cultivo de salmónidos que entrega SERNAPESCA entre los años 2012 y 2022.

Tabla 1. Mortalidad en porcentaje producida por causas infecciosas en las principales especies de cultivo en Chile entre los años 2012 al 2021*.

Especie	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Salmón del Atlántico	26,6	20,4	21,1	25,6	7,7	21,6	20,1	22,9	24,4	23,3
Trucha arcoíris	46,5	34,9	35,1	23,8	28,2	23,7	18,9	13,9	15,9	18,8
Salmón coho	15,5	18,9	14,8	16,9	5,3	21	10,4	16,2	14,8	19,5

* Los porcentajes están calculados en relación con el total de mortalidad por causa primaria

Fuentes: SERNAPESCA (2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018a, 2019, 2020, 2021, 2022)

Tabla 2. Mortalidad en porcentaje por causa secundaria asociada a piscirickettsiosis en las principales especies de cultivo en Chile entre los años 2012 a 2021.

Especie	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Salmón del Atlántico	69,4	87,6	74,1	78,9	74,6	69,4	54,5	47,5	47,8	49,2
Trucha arcoíris	94,6	93,6	73,5	82,9	86,8	86,3	83,3	49,5	67,3	29,7
Salmón coho	60,3	39,2	36,7	59,3	13,3	17,8	15,0	12,5	3,2	3,9

Fuentes: SERNAPESCA (2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018a, 2019, 2020, 2021, 2022)

Es así como, entre las causas secundarias, la piscirickettsiosis siempre ocupa, desde el año 2012 hasta el año 2021, uno de los primeros lugares como causa de mortalidad en peces de cultivo, siendo la especie más afectada la trucha arcoíris y el salmón coho la menos afectada (SERNAPESCA, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018a, 2019, 2020, 2021) (Tabla 2).

Piscirickettsiosis

En la actualidad la piscirickettsiosis es uno de los mayores problemas sanitarios de la salmonicultura chilena, provocando pérdidas estimadas de US\$ 750 millones anuales (Aqua, 2017).

La enfermedad, a pesar de encontrarse también en otros países como Noruega, Irlanda o Canadá, es particularmente problemática para la acuicultura de salmón en Chile, el segundo mayor productor mundial, y es responsable del 47,5% de la mortalidad por enfermedades infecciosas y del 10,9% de la mortalidad total en la producción de salmón del Atlántico (Moraleda *et al.*, 2019).

Es una enfermedad que afecta la producción del salmón, con un particular impacto en el sur de Chile. Según Orrego (2015), define que “*Piscirickettsia salmonis* produce una infección agresiva y sistémica, que implica diversos órganos y tejidos, tales como riñón, bazo, hígado, intestino, cerebro, piel, ovario y branquias, produciendo mortalidades severas en diferentes especies de salmónidos”.

Los animales afectados presentan diversos signos y síntomas clínicos, siendo la mayoría de ellos inespecíficos lo que dificulta su diagnóstico. Generalmente, los peces enfermos se ubican en la cercanía de la superficie del agua, preferentemente en las orillas de las balsa-jaulas, tienen un nado lento, errático, descoordinado y a veces en tirabuzón (Bravo y Campos, 1989; Larenas *et al.*, 1995). Presentan coloración corporal oscura y acentuada palidez branquial, lo que refleja una anemia severa, corroborada por niveles de hematocrito que en peces moribundos corresponde a un 27% o menos (Bravo y Campos, 1989). Los peces enfermos presentan lesiones de piel como erosiones cutáneas y extensas áreas descamadas (Larenas *et al.*, 1995).

Piscirickettsia salmonis

Piscirickettsia salmonis es una bacteria intracelular facultativa, aerobia, inmóvil, que pertenece a la familia Piscirickettsiaceae de la clase γ -proteobacteria (Mauel *et al.*, 1996). Es gramnegativa, pleomórfica, de forma predominantemente cocoide, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , que se encuentra dentro de vacuolas citoplasmáticas de las células de los tejidos infectados y se reproduce por fisión binaria. En condiciones de cultivo *in vitro*, *P. salmonis* se multiplica a una temperatura óptima entre 15 a 18 °C, sin embargo, se inactiva por sobre los 20 °C (Fryer *et al.*, 1990). Además, tiene la capacidad de sobrevivir hasta 30 días en medios con agua salada libre de células, sin embargo, no es viable en agua dulce en condiciones *in vitro* (Lannan y Fryer, 1994b). Sólo un estudio reportó bacterias de vida libre después de hasta 50 días en el agua de mar en un centro de engorda que presentaba un brote de la enfermedad (Olivares y Marshall, 2010).

El agente etiológico, inicialmente, fue considerado sólo cultivable en líneas celulares eucariotas, sin embargo, a lo largo del tiempo se han descubierto y desarrollado diversos medios de cultivo libres de células, siendo el más utilizado uno basado en doce aminoácidos que contiene arginina, treonina y al ácido glutámico como principales fuentes de carbono y energía (Mauel *et al.*, 2008; Fuentealba *et al.*, 2020).

En la mayoría de los estudios se ha descrito la existencia de dos genotipos, el LF-89 (cepa tipo) y el EM-90, cuyas principales diferencias se exponen en la tabla 3. Un estudio estableció que los aislados chilenos de *P. salmonis* son en su mayoría pertenecientes al genotipo EM-90 y que, además, dicho genotipo, es más virulento que los aislados noruegos y canadienses en donde predominan el genotipo LF-89 (Rozas-Serri *et al.*, 2017).

Tabla 3. Principales diferencias entre los genotipos LF-89 y EM-90 de *Piscirickettsia salmonis*.

Característica	Genotipo	
	LF-89	EM-90
Especies afectadas/hospederos	Afecta a las tres especies cultivadas.	Afecta exclusivamente a salmón del Atlántico.
Ubicación geográfica	Distribuidos geográficamente de forma amplia y en una proporción similar dentro del territorio chileno.	
Virulencia	Ambos genotipos son considerados altamente virulentos, sin embargo, EM-90 es considerado aún más virulento que LF-89.	
Susceptibilidad a quimioterápicos	Resistencia a quinolonas, florfenicol y oxitetraciclina.	Susceptible
Cinética de crecimiento	Óptima a 18 °C, mayor exigencia nutricional en medio.	Óptima a 18 °C con un intervalo más amplio de temperatura y menor exigencia nutricional del medio.

Fuentes: Rozas-Serri *et al.*, 2017; Saavedra *et al.*, 2017; Bustos, 2018.

Epidemiología

Se ha demostrado, tanto experimentalmente como en condiciones de campo, que la bacteria es eliminada en semen, fluido ovárico, heces, bilis y orina de peces. No hay estudios que comprueben la transmisión por vectores (Salinas *et al.*, 1997; Olivares y Marshall, 2010; Montalico *et al.*, 2021). Como se indicó anteriormente, la transmisión de la infección puede ser tanto vertical como horizontal, siendo las infecciones horizontales en agua dulce poco probables, ya que la bacteria tiene baja sobrevivencia en este medio (Lannan y Fryer, 1994b), en contraste, los peces en agua de mar tendrán mayores probabilidades de infectarse, lo que se explicaría por la sobrevivencia del agente en dicho medio, la cual llega hasta los 50 días, mientras que en sedimento y en biopelícula podría ser mayor (Marshall *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha demostrado que peces que se infectan y no enferman, se vuelven portadores asintomáticos y son fuente de diseminación (Contreras, 1995; Larenas *et al.*, 2002), sin embargo, no se sabe si dichos individuos desarrollarán signos clínicos de la enfermedad luego de una subsiguiente exposición al agente (Larenas *et al.*, 2003).

El agente ingresa al hospedero principalmente a través de la piel y branquias y menos frecuentemente por el sistema gastrointestinal. La transmisión por vía cutánea sería la vía primaria

de entrada (Almendras *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999). Experimentalmente, la transmisión ocurre de forma vertical y horizontal (Larenas *et al.*, 2003). En la transmisión vertical, los reproductores infectados transmiten la infección a través de las ovas, fluido ovárico y/o semen a la progenie. Larenas y colaboradores indicaron también, por medio de un experimento en el año 2005, que alevines de salmón coho, provenientes de la cruce entre reproductores machos y hembras positivos a la enfermedad, pueden actuar como portadores asintomáticos eliminando la bacteria por vía fecal, favoreciendo así la diseminación del agente patógeno en condiciones naturales de cultivo (Larenas *et al.*, 2005).

El periodo de incubación para la piscirickettsiosis depende de una variedad de factores, entre ellos se encuentra el tipo de aislado, la dosis administrada, la ruta de infección, condiciones ambientales y del hospedero. Experimentalmente, la mortalidad asociada a piscirickettsiosis va desde el día 3 al 30 para inoculación intraperitoneal, de 5 a 18 días para infección subcutánea y de 10 a 14 días para infecciones oral y de branquias (Smith *et al.*, 1999). En condiciones de campo, se ha observado que las mortalidades asociadas a piscirickettsiosis comienzan en salmones después de dos semanas de haber ingresado los smolt al mar (Cvitanich *et al.*, 1990).

Métodos de detección de *Piscirickettsia salmonis*

La técnica diagnóstica que es considerada como concluyente es el aislamiento, el cual se realiza a partir de tejido renal proveniente de peces infectados y luego inoculación en diferentes tipos de cultivo, ya sea celulares, los cuales no se recomiendan utilizar de forma rutinaria por su fácil contaminación al tener que ser libres de antibióticos (Fryer *et al.*, 1990), como libres de células, los cuales están compuestos principalmente de sangre de oveja o peces y altos niveles de cisteína (Vera *et al.*, 2012).

Otro método utilizado para la detección de *P. salmonis* es el uso de tinciones como Giemsa, hematoxilina-eosina (HE), Gram, naranja de acridina y azul de toluidina (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995). Estas tinciones funcionan como uno de los métodos de detección de rutina por su rapidez y costo, sin embargo, no son específicas.

También se ha descrito el uso de técnicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que en un principio fue desarrollada por Lannan *et al.* (1991a) y, posteriormente, modificada por Larenas *et*

al. (1996) agregando así el uso de microondas para acelerar el proceso de incubación de anticuerpos sin perder la sensibilidad ni especificidad de la técnica.

Por último, se describe el uso de técnicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) que permite cuantificar *P. salmonis* (Aguayo *et al.*, 2002), la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección, identificación y diferenciación de genotipos (Mauel *et al.*, 1996) y, para concluir, métodos como la microscopía electrónica de transmisión y barrido que son utilizadas como métodos de apoyo diagnóstico para identificar al agente especialmente en algunos estudios experimentales (Larenas *et al.*, 2003; Larenas *et al.*, 2019; Moraleda, 2019).

Supervivencia de *P. salmonis* en el ambiente marino

La preservación de la bacteria en el ambiente marino se conoce de manera imprecisa, con mecanismos probables que involucran la capacidad de ésta para unirse y, potencialmente, formar biopelículas (Marshall *et al.*, 2012).

En cuanto a la formación de biopelículas o biofilms, éstas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Lasa *et al.*, 2005). Las bacterias que crecen dentro de biopelículas tienen la capacidad de proliferar rápidamente debido al aumento de la disponibilidad de nutrientes, de protegerse de factores ambientales hostiles evitando así la desecación y acción de posibles depredadores y, además, presentan una mayor resistencia a los antibióticos (Branda *et al.*, 2005).

Las biopelículas son omnipresentes en los entornos acuáticos, incluidas las superficies acuáticas, desde las condiciones más benignas hasta las más extremas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Equipos sumergidos como cuerdas, redes y otros artículos utilizados en la acuicultura, se colonizan rápidamente por bacterias y otros microorganismos que forman biopelículas (Huggett *et al.*, 2009).

En cuanto a *P. salmonis* se ha descrito que puede adherirse a superficies bióticas, como ovas, conchas de moluscos o macrófagos de salmónidos, así como formar eventualmente biopelículas en sustratos abióticos como vidrios y plásticos (Levipan *et al.*, 2020). Se cree además que la formación de biopelículas por parte de la bacteria estaría involucrada en la aparición de brotes de la enfermedad (Larenas *et al.*, 2003; Lozano *et al.*, 2017), particularmente en asociación a aquellos

casos donde existan lesiones cutáneas en peces que puedan facilitar la transmisión (Levipan *et al.*, 2020).

A la fecha existen solo dos estudios que indican que las biopelículas formadas por *P. salmonis* pueden servir como un medio de supervivencia y resistencia a los factores de estrés ambientales (Marshall *et al.*, 2012; Albornoz *et al.*, 2017). Aun así, expuestos dichos antecedentes, se carece de información suficiente sobre las biopelículas como una faceta fundamental para que *P. salmonis* sobreviva en entornos adversos.

Los brotes de piscirickettsiosis en el salmón de cultivo pueden contribuir a las infecciones en peces silvestres en medio marino. Al respecto, la caracterización genética de *P. salmonis* en la población de peces nativos del sur de Chile ha demostrado que está estrechamente relacionada con el genotipo EM-90. Esto sugiere que las poblaciones de peces silvestres son un reservorio potencial y que pueden contribuir a la evolución de genotipos más virulentos y la transmisión de enfermedades dentro y entre las especies de peces (Contreras-Lynch *et al.*, 2015).

Se ha planteado la hipótesis de que las bacterias presentes en el agua y los sedimentos pueden ser concentradas mecánicamente por pequeños organismos filtradores, como los peces micrófagos, los crustáceos pequeños, los moluscos e incluso algunos protozoos (Drancourt *et al.*, 2002; Kotlowski *et al.*, 2004). Particularmente en Chile existe un molusco bivalvo conocido como *Mytilus chilensis* el cual, además de ser uno de los principales productos acuícolas de exportación del país, ha evidenciado grados de interacción con la bacteria *P. salmonis*. Al respecto, se ha descrito que el genotipo LF-89, es capaz no solo de adherirse a la superficie de conchas de *Mytilus chilensis* bajo condiciones de laboratorio, sino que además presentaría la capacidad de poder liberarse al medio de forma infectiva (Larenas *et al.*, 2019).

Adhesión de *Piscirickettsia salmonis* a superficies

Sobre los estudios de adhesión de *P. salmonis* a un hospedero o a superficies se ha evidenciado que la bacteria forma lo que se conoce como “complejo de adhesión piscirickettsial” (CAP). Dicha estructura fue descrita por Larenas *et al.* (2003) mediante microscopía electrónica de barrido al estudiar el modo de penetración del agente al interior de las ovas de trucha arcoíris. En ese trabajo se describe que *P. salmonis* forma prolongaciones parecidas a pseudópodos para unirse y

posteriormente penetrar las ovas de salmones. Dichas estructuras no sólo se unieron con la superficie blanco, en este caso la ova de trucha arcoíris, sino que también se formaron uniones con otras bacterias a modo de una “estructura en red”.

Posteriormente Quinteros (2005), comparando la cinética de formación del CAP entre los genotipos LF-89 y SLGO-95 de *P. salmonis*, evidenció que la formación de dicho complejo es variable entre diferentes aislados, siendo mayor en la cepa de mayor grado de virulencia.

Asimismo, en el año 2018, SERNAPESCA en uno de sus informes presentó un estudio en el cual se demostraba que *P. salmonis* puede adherirse a algunos de los materiales de los cuales se construyen las balsa jaulas para cultivo de salmónidos, dentro de los cuales se encuentra el politetrafluoretileno (PTFE) y el teflón. Por otra parte, esta adherencia no se observó ni en polietileno de alta densidad (HDPE), policloruro de vinilo (PVC), poliamida (PA) o nylon (SERNAPESCA, 2018b).

En estudios más recientes, Larenas *et al.* (2019) llevaron a cabo un experimento que tuvo por objetivo estudiar la unión de *P. salmonis* sobre la superficie de conchas de chorito (*Mytilus chilensis*), y su capacidad de infectar la línea celular CHSE-214 una vez formado el sistema de adhesión. Como inóculo se utilizó un aislado de campo asociado a un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico. El microorganismo fue cultivado en la línea celular CHSE-214 libre de antibióticos y fungistáticos, a una temperatura de 15 °C, hasta que se produjo un 100% de efecto citopático (ECP). Los resultados de dicho experimento demostraron la unión de la bacteria a la superficie de la concha a partir del primer tiempo estudiado (1 hora). Además, las conchas infectadas por 48 horas, colocadas en la línea celular CHSE-214, mostraron un efecto citopático alrededor de su borde a partir de los 3 días post-infección, para luego a los 14 días producir un efecto citopático de 100%. Estos resultados comprueban la adhesión de *P. salmonis* a la superficie de conchas de chorito y la posibilidad de liberación de bacterias infectantes al medio.

Modelos de adhesión bacteriana a superficies

Dentro del área de microbiología, específicamente sobre el estudio de bacterias, es donde aparece por primera vez el término de adhesión o adherencia; dicho término es esencial en el estudio de estos microorganismos ya que se considera como parte de su ciclo de vida (Carroll *et al.*, 2016).

Esto se define como “proceso por medio del cual las bacterias se unen a las superficies de células hospedadoras” (Carroll *et al.*, 2016).

Si bien esta definición establece que las bacterias necesitan células que actúen como hospedadores, es conocido que estas pueden crear comunidades bacterianas en otras superficies de carácter acelular, pudiendo así encontrarse tanto en materiales artificiales como en superficies naturales (Nazar, 2007).

La adhesión bacteriana depende de factores inespecíficos y factores específicos. Entre los primeros encontramos interacciones fisicoquímicas o eléctricas en la forma de fuerzas, que no están presentes si existe una distancia mayor de 50 nm entre la bacteria y una superficie. Cuando la bacteria se acerca a esta distancia es afectada por una atracción debido a las fuerzas de Van der Waals, que son debidas a un efecto dipolo entre átomos o moléculas. A medida que la bacteria se va acercando a una superficie y a una distancia más corta que la interacción por las Fuerzas de Van der Waals, aparece una fuerza de repulsión debida a la carga negativa de la bacteria y del material que suelen ser del mismo signo. A esta fuerza se le denomina “potencial Z”. De la interacción de estas dos fuerzas dependerá el mayor o menor acercamiento del microorganismo a la superficie del material y es lo que se denomina Energía o Función de Gibbs (Ábalos, 2005).

El “potencial Z” depende de la carga iónica de la bacteria y de la superficie del material, pero también tiene una influencia el medio iónico en el que están sumergidas estas superficies. A modo de ejemplo, dentro de áreas como la odontoestomatología, alrededor de la bacteria y del material, ambos con carga negativa, se forma una concentración de hidrogeniones del medio salivar para neutralizar la carga. Dependiendo de la ionización del medio se necesitará una capa mayor o menor para neutralizar la carga, obteniendo en las dos superficies una doble capa. Así, en medios iónicos altos la doble capa es muy delgada y permite un mayor acercamiento entre las dos superficies. Sin embargo, en medios iónicos medios o bajos, la doble capa es de mayor grosor y la distancia de la bacteria a la superficie sólida es mayor, ya que la bacteria se detiene cuando las dobles capas entran en contacto (Ábalos, 2005).

El resultado de la interacción entre estas dos fuerzas define el mayor o menor acercamiento de una bacteria a la superficie del material y, dicho acercamiento, determina a su vez la posibilidad de adhesión de la bacteria. Incluso así, una vez realizado el proceso de adhesión es posible definir

cuando este es un proceso reversible o no reversible y para esto se describen las siguientes situaciones: a) Cuando la bacteria llega a una distancia de 2 nm se considera una adhesión irreversible; b) a una distancia de 10 nm la situación es variable ya que, dependiendo de su tamaño y otros factores, la bacteria puede adherirse reversible o irreversiblemente; c) a distancias mayores a 10 nm, la adhesión puede considerarse reversible (Ábalos, 2005).

Por otra parte, se ha demostrado que el tipo de superficie ya sea lisa o rugosa, afecta la capacidad de las bacterias para unirse y acumularse. Al respecto, se ha evidenciado que estos microorganismos se acumulan en mayor cantidad sobre superficies rugosas en comparación de aquellas que son lisas (Cordero *et al.*, 2022).

En cuanto a los factores específicos que determinan la adherencia de una bacteria a una superficie, se encuentran las adhesinas y los receptores de una superficie blanco a los cuales se unirán estas moléculas. Los receptores de la superficie blanco incluyen residuos de azúcares y proteínas de la superficie (por ejemplo, la fibronectina) que favorecen la unión de ciertos microorganismos. Otros determinantes de la adherencia son unas estructuras finas de ciertas paredes bacterianas, llamadas fibrillas, por medio de las cuales algunas bacterias se unen a las células epiteliales (Bush, 2020).

Algunas bacterias, como las Enterobacteriaceae (por ejemplo, *Escherichia coli*), tienen sistemas de adhesión específicos llamadas fimbrias o pili. Las fimbrias le permiten al microorganismo unirse a una gran variedad de superficies (Vila *et al.*, 2008).

Luego del proceso de adhesión a una superficie, la bacteria continúa con el proceso de colonización por medio de la formación de una monocapa bacteriana y la producción de una matriz extracelular. Dicha matriz consta de polisacáridos extracelulares, proteínas extracelulares, restos celulares y ácidos nucleicos (Hollman *et al.*, 2014). Una vez formada dicha matriz se favorece el crecimiento bacteriano y, dependiendo de la bacteria, la comunicación célula-célula, también conocida como *quorum sensing* (la cual consta en un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de la población celular) (Miller y Bassler, 2001). Desde este punto en adelante se habla de una biopelícula madura (Hollman *et al.*, 2014).

Finalizada la formación de una biopelícula, algunas células empiezan a liberarse y a dispersarse en el ambiente en la forma de células planctónicas para comenzar el ciclo nuevamente (Hollman *et al.*, 2014) (Figura 1).

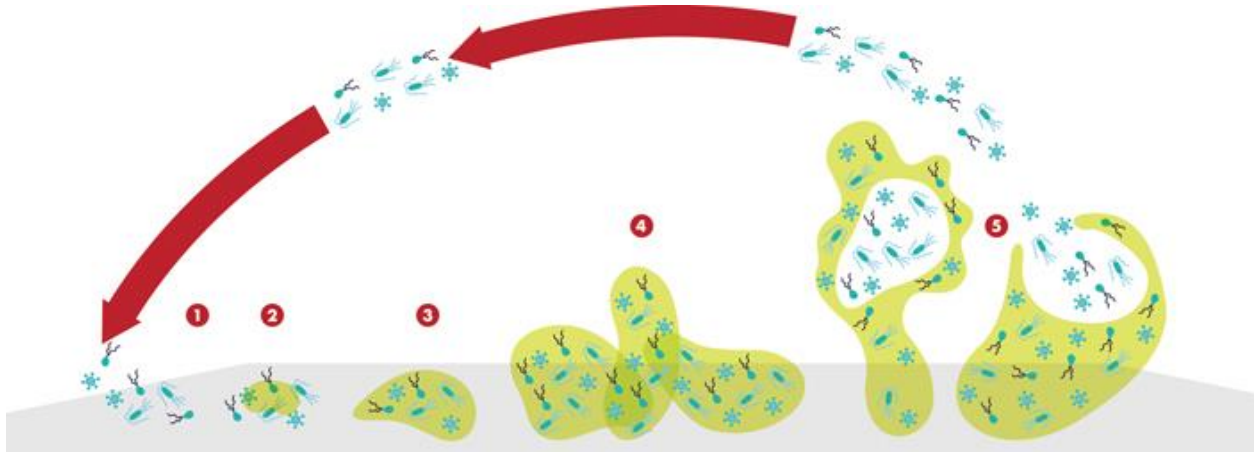


Figura 1. Ciclo de una biopelícula en donde (1) representa la fase de adhesión bacteriana, (2) la fase de formación de monocapa y excreción de matriz celular, (3) y (4) la expansión y formación de la arquitectura de una biopelícula y (5) dispersión bacteriana para iniciar el ciclo nuevamente (Abelson y McLaughlin, 2012; Hollman *et al.*, 2014).

En base a las cifras de mortalidad de salmónidos antes expuesta, los estudios sobre adherencia bacteriana analizados, la escasa información sobre cómo actúa el agente fuera de un hospedador y la importancia de los riesgos que representa la existencia del genotipo EM-90 de *P. salmonis* en la producción acuícola chilena, en la presente memoria se propone la realización de un modelo experimental *in vitro* de adhesión sobre conchas de chorito. Dicho modelo pretende aportar información sobre el ciclo de vida de la bacteria *P. salmonis*.

La presente memoria, además de representar la primera propuesta de estudio sobre el genotipo EM-90 de *P. salmonis*, busca entregar antecedentes sobre las estrategias de sobrevivencia y permanencia de la bacteria en un medio libre de células.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión bibliográfica sobre *Piscirickettsia salmonis*, su supervivencia en el ambiente, con énfasis en la adhesión a superficies de origen biótico. Con dicha información, se pretende proponer un modelo experimental de adhesión *in vitro* que permita estudiar el genotipo EM-90.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una revisión bibliográfica sobre *Piscirickettsia salmonis* con énfasis en la supervivencia en el medio.
- Proponer un modelo experimental *in vitro* que permita estudiar la adhesión del genotipo EM-90 a conchas de chorito (*Mytilus chilensis*).
- Proponer un modelo experimental *in vitro* que permita estudiar la liberación del genotipo EM-90 desde conchas de chorito (*Mytilus chilensis*) a una línea celular.

MÉTODOS

Para la revisión bibliográfica se realizó una recopilación de información proveniente de diversas bases de datos, dentro las cuales se destacan ISI/Web Of Science y SCIELO, sobre *P. salmonis* y sus mecanismos de adhesión *in vitro*.

Criterios de selección

Criterios de inclusión: Para la elaboración del presente escrito se utilizaron fuentes de tipo primarias y secundarias exclusivamente de origen digital; dichas fuentes tratan contenido exclusivamente relacionado con el agente *Piscirickettsia salmonis*, esto incluye tópicos como la morfología del agente *P. salmonis*, los genotipos LF-89 y EM-90, Piscirickettsiosis como enfermedad y epidemiología de esta.

Criterios de exclusión: Para la elaboración del presente escrito no se incluyeron fuentes de tipo primaria y secundaria cuyos orígenes no fuesen digitales y tipo terciario sea está escrita o digital. No se tomaron en cuenta aquellas fuentes que estuviesen escritas en idiomas distintos al inglés o español. En cuanto a contenido, no se incluyeron aquellas fuentes que no tratasen sobre el agente *Piscirickettsia salmonis* o que incluía términos como genotipos “*rickettsia like*”.

Fuentes de información y búsqueda

Para la búsqueda de información se utilizaron variados motores de búsqueda entre los cuales se encuentran Google, Google Scholar, Catálogo Bello, Science Direct, PubMed. En conjunto, además, se utilizó la información que disponía la página web de SERNAPESCA para definir la situación a nivel nacional. Se utilizaron palabras clave en español como: “Enfermedades en salmones”, “*Piscirickettsia salmonis*”, “EM-90”, “LF-89”, “Epidemiología SRS”, “*Mytilus chilensis*”, “Adhesión bacteriana”, “biopelículas”; y en inglés como “*Salmon Diseases*”, “*Piscirickettsia salmonis update*”, “*Epidemiology of piscirickettsiosis*”, “*Piscirickettsia salmonis adhesion*”, “*Mytilus chilensis*”. El periodo de tiempo que tomo la búsqueda de información abarcó desde el primer semestre del año 2020 hasta el primer semestre del año 2022. Adicionalmente se utilizaron operadores de búsqueda para elaborar una investigación más precisa (tabla 4).

Tabla 4. Operadores de búsqueda utilizados para la búsqueda de información en Internet.

Operador	Función
“palabra clave”	Encuentra páginas que contienen exactamente las palabras que están entre las comillas.
or	Encuentra páginas que incluyen cualquiera de las palabras incluidas en la búsqueda.
()	Permite combinar operadores.
–	Excluye cualquier palabra después del guion.
*	Este es un comodín y coincidirá con cualquier palabra.
intitle:	Encuentra páginas con la frase exacta en el título.
allintitle:	Encuentra páginas con cualquiera de las palabras especificadas.
inurl:	Encuentra páginas con la frase exacta en la url.
allinurl:	Incluye páginas con cualquiera de las palabras especificadas.
intext:	Incluye páginas con la frase exacta en el texto o en el cuerpo de la página.
allintext:	Incluye páginas con cualquiera de las palabras especificadas en el texto o cuerpo de la página.
filetype:	Incluye sólo resultados con ese archivo concreto.
related:	Encuentra páginas similares a esa url específica.

Modificado de Hardwick, 2019

Posterior a la búsqueda de información se procedió a implementar el siguiente esquema de acción para organizarla y comenzar el proceso de extracción de datos:

1. Evaluación del tipo de texto

- a. Se utilizaron textos de tipo específico, expositivo y de divulgación según las definiciones de Martínez, 2022.
- b. Orden final de priorización: Texto específico (como publicaciones, trabajos científicos), texto expositivo (como páginas web que tengan orientación a temas científicos o estén a cargo de un experto) y, finalmente, texto de divulgación (como páginas web de público general).

2. Evaluar el origen de la fuente de información

- a. Se priorizaron aquellas fuentes que estuviesen incluidas en las bases de datos ISI (Web of Science) o Scielo por sobre aquellas que no estuvieran presente en dichos servicios en línea.

3. Textos con componentes didácticos (como tablas o esquemas) fueron priorizados por sobre aquellos que no los presentaban.

Posteriormente se procedió a ordenar la información en diferentes temas propendiendo a una estructura que vaya de lo general a lo particular. Considerando lo anterior los datos se ordenaron de la siguiente manera:

1. Organización de la información.
2. Propuesta del modelo experimental.
 - a. Bases bibliográficas de la propuesta.
3. Propuesta de un modelo experimental
 - a. Desafío de conchas de *Mytilus chilensis*.
 - b. Estudio de liberación.

Propuesta de un modelo experimental

Basándose en la literatura revisada y la problemática expuesta se concluye que el modelo experimental debiese centrarse en el estudio de adhesión del genotipo EM-90 de *P. salmonis*, asimismo, fue necesario también definir que parámetros y elementos incluiría dicho modelo.

Para definir aquellos parámetros y elementos se tomaron en consideración trabajos previamente realizados con la bacteria, sin embargo, al no existir estudios experimentales publicados con el genotipo EM-90 se decidió realizar un modelo experimental en condiciones similares a aquellos que utilizaron el genotipo LF-89. Dichos estudios, a grandes rasgos, contemplan modelos de adhesión y liberación en condiciones *in vitro*.

De acuerdo con lo anterior, el modelo propuesto consistió en la utilización de conchas de chorito chileno (*Mytilus chilensis*) en base a los experimentos realizados por Larenas *et al.* (2019) y Moraleda (2019), para evidenciar si la bacteria tiene la capacidad de adherirse a superficies bióticas y posteriormente liberarse a un medio con MEM o de agua salada respectivamente.

En cuanto a los tiempos de estudio, la literatura documenta que tiempos de 1, 24 y 48 h son suficientes para evidenciar el crecimiento de la bacteria en las condiciones experimentales, posteriormente, se definió que la microscopia electrónica de barrido, como técnica para documentar el progreso de dichos experimentos, resulta eficiente.

A modo de corolario la propuesta experimental está centrada en el genotipo EM-90 de *P. salmonis* en condiciones *in vitro*, lo que permitiría estudiar la capacidad del genotipo para adherirse a superficies bióticas usando como modelos conchas de chorito chileno y posteriormente evidenciar si existe liberación al medio.

RESULTADOS

Organización de la información

En primer lugar, se clasificaron las publicaciones utilizadas con relación a su fuente de origen, resultando lo siguiente:

1. Fuentes ISI [*Web of Science*] (Total de 32 publicaciones): Incluyendo revistas como *Diseases of Aquatic Organisms* (DAO); *Fish Pathology*; *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*; *American Fisheries Society Newsletter*; *Journal of Aquatic Animal Health*; *Journal of Fish Diseases* cuyas publicaciones van desde el año 1990 hasta el año 2019.
2. Fuentes SCIELO (Total de 11 publicaciones): Incluyendo revistas como *Avances en Odontostomatología*; *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*; *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; *Archivos de Medicina Veterinaria*. Cuyas publicaciones son de los años 1997, 2005, 2007, 2012.
3. Otras fuentes (Total de 24 publicaciones): Incluyen información proveniente de bases de datos como PubMed; Universidad de Chile, Entidades gubernamentales chilenas (SERNAPESCA); Libros y páginas web públicas.

Posteriormente se agregaron los parámetros de tipo de texto y los temas relacionados que abarcaban las diversas publicaciones en relación con su fuente de origen (tabla 5):

Tabla 5. Organización de la información según fuente de origen y tipo de texto.

Fuente de Texto	Journal/Revista/Fuente	Tipos de texto	Temas incluidos
ISI (web of Science)	- <i>Diseases of Aquatic Organisms (DAO)</i> . - <i>Fish Pathology</i> - <i>Bulletin of the European Association of Fish Pathologists</i> . - <i>American Fisheries Society Newsletter</i> . - <i>Journal of Aquatic Animal Health</i> . - <i>Journal of Fish Diseases</i> .	- Específicos (Científicos) (32 publicaciones)	-Enfermedades en salmónidos. -Piscirickettsiosis. - <i>Piscirickettsia salmonis</i> .
SCIELO	-Avances en Odontostomatología -Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. -Anales del Sistema Sanitario de Navarra. -Archivos de medicina veterinaria	- Específicos (Científicos) (11 publicaciones)	-Adhesión bacteriana. -Biofilms. -Piscirickettsiosis. - <i>Piscirickettsia salmonis</i> .
OTROS	-PubMed -Universidad de Chile -SERNAPESCA -Libros -Páginas Web	- Específicos (Científicos) (5 publicaciones) -Expositivos (15 publicaciones) -Divulgativos (4 fuentes)	-Producción de salmónidos. -Enfermedades en salmónidos. - <i>Piscirickettsia salmonis</i> .

Finalmente, terminada la lectura, selección, priorización y organización de la información el siguiente paso fue la formulación de un modelo experimental que permitiese el estudio del genotipo EM-90 de *P. salmonis*. Para este fin se tomaron como base los experimentos de Larenas *et al.* (2019) y Moraleda (2019) los cuales estudiaron la capacidad que tiene la bacteria, específicamente el genotipo LF-89, de adherirse a superficies de conchas de *Mytilus chilensis* y, posteriormente, liberarse al medio de forma infectiva.

Propuesta de modelo experimental

Bases bibliográficas de la propuesta

Se propone llevar a cabo un estudio de adhesión de *P. salmonis*, específicamente su genotipo EM-90. De acuerdo con la información bibliográfica dicho genotipo no ha sido bien estudiado y, además, ha sido identificado como una variante más virulenta y agresiva. Basado en los estudios realizados con el genotipo LF-89 (Moraleda, 2019; Larenas *et al.*, 2019), los cuales establecieron que la bacteria puede adherirse a conchas de chorito y posteriormente liberarse de estas en una forma infectiva.

La adhesión de *P. salmonis* se ha estudiado utilizando diferentes modelos de superficie de origen biótico y abiótico tales como:

1. Ovas: Los estudios de Larenas *et al.* (2003) demostraron que la cepa LF-89 de *P. salmonis* se adhería a la superficie de ovas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Este modelo experimental se realizó dentro de un contexto de estudio de transmisión vertical donde se realizó la inoculación de reproductores de truchas arcoíris machos y hembras con *P. salmonis*. Posteriormente, la bacteria se detectó, mediante inmunofluorescencia indirecta, en semen y fluido celómico de la mayoría de los reproductores inoculados. El agente también se detectó en alevines, los cuales no presentaron la enfermedad, y en ovas. Para el modelo de adhesión, las ovas fueron obtenidas a partir de hembras, que no fueron inoculadas con *P. salmonis*. Posteriormente se colocaron dos ovas en un tubo Eppendorf de 2,5 ml que contenía 200 μ l de una suspensión de *P. salmonis* ($10^{5.2}$ TCID₅₀/ml) durante 30 segundos. El medio que contenía el agente se filtró previamente a través de filtros Millipore de 5 μ m. Este procedimiento se repitió durante períodos de 45 segundos y durante 1, 5, 10, 30 y 60 min. Otra muestra de ova se colocó en la suspensión bacteriana con 300 μ l de esperma de un macho no inoculado durante los mismos períodos descritos anteriormente. Inmediatamente después de la incubación, todas las muestras de ovas se fijaron en glutaraldehído al 3% (Sigma) en cacodilato de sodio 0,1 M durante 24 h, se deshidrataron en acetona, se sometieron a secado de punto crítico y se cubrieron con 20 nm de oro. Se dispuso de dos ovas para cada periodo de tiempo estudiado: Una intacta con corion o membrana externa, y otra en que la membrana externa fue extirpada

quirúrgicamente inmediatamente después de la fijación. Todas las muestras se hicieron por duplicado. Los óvulos se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Tesla 343 operado a 20 kV. Las imágenes obtenidas se analizaron con un software de procesamiento de imágenes (WinTip, v. 3.1a). Las ovas de la misma hembra, pero no incubados en la suspensión de *Piscirickettsia salmonis* se utilizaron como controles negativos.

2. Conchas de *Mytilus chilensis*: El estudio tuvo como objetivo establecer la unión de *P. salmonis* a la superficie de conchas de chorito y su capacidad de infectar un cultivo con células CHSE-214 de peces una vez formado el sistema de adhesión. Como inóculo se utilizó un aislado de campo asociado a un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). El microorganismo, *P. salmonis*, fue cultivado en la línea celular CHSE-214 libre de antibióticos y fungistáticos, a una temperatura de 15 °C, hasta que se produjo un 100% de efecto citopático (ECP). Se utilizó como inóculo un tercer pasaje, que fue obtenido del sobrenadante, filtrado (2 µm) y titulado en microplacas. El título utilizado correspondió a 10^{5,3} TCID₅₀/ml. Para el desafío se ocuparon trozos de conchas de chorito de aproximadamente 0,5 cm², previamente sometidos a un proceso de limpieza y desinfección. Para el estudio se realizó una cinética de infección, colocando los trozos de concha en la suspensión bacteriana por inmersión en tubos Eppendorf, en tiempos de 1, 24 y 48 horas a temperatura de 15 °C. Cada grupo se realizó en duplicado. Una vez transcurridos los tiempos, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en cacodilato de sodio, sometidas a secado de punto crítico, sombreadas con oro, observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido. Adicionalmente, dos trozos de concha fueron sometidos a 48 h de infección, luego lavadas en tampón PBS (pH= 7,2) estéril y colocadas en una botella de cultivo con la línea CHSE-214, y observadas para detectar el efecto citopático (Larenas *et al.*, 2019). Paralelamente Moraleda (2019), siguiendo un protocolo de trabajo similar al descrito en Larenas *et al.*, (2019), mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM), demostró la adhesión del agente sobre conchas de chorito mantenidos en agua de mar a 10 min, 1 hora y 24 horas post exposición a *P. salmonis*. Por otra parte, en conchas con adhesión positiva que fueron tratadas con celulosa, no se observaron diferencias con los controles sin tratamiento, por lo cual no se demostró la participación de celulosa en esta neoformación bacteriana (Moraleda, 2019).

3. Materiales utilizados en la construcción de balsa jaulas (SERNAPESCA, 2018b): La adhesión de la bacteria a superficies bióticas (como ovas) sugiere que la bacteria también pudiese tener la capacidad de adherirse a otro tipo de superficies con los que entra en contacto, en consecuencia, este proyecto buscó estudiar si *P. salmonis* es capaz de adherirse a superficies de materiales empleados en las balsas jaula de terreno (flotadores, alimentadores, boyas, redes y otros), las cuales pueden convertirse posteriormente en reservorios del agente. El procedimiento se realizó en base al estudio de Larenas *et al.* (2019) modificándose para ser utilizado también en agua de mar (agua de mar + *P. salmonis*). Los materiales que se desafiaron fueron fragmentos de materiales plásticos empleados en balsas jaula: HDPE, PVC, PA-nylon y PTFE-teflón y concha de *M. chilensis*, como control, que fueron expuestos a *P. salmonis* en medio enriquecido MEM-4. El medio de desafío contenía *P. salmonis* en medio enriquecido en MEM-4, con 9 partes de MEM-10 y 1 parte del sobrenadante de ECP de *P. salmonis* en MEM-10. La bacteria fue titulada por el método de punto final dando un título de $10^{5.2}$ TCID₅₀/ml. El experimento se realizó en tubos eppendorf de 2 ml, por triplicado para cada material. La cantidad de medio que se empleó es de 0,5 ml y mantuvieron a una temperatura de 15 °C correspondiente a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Los tiempos de exposición fueron 1, 24 y 48 h. Las muestras fueron luego ser fijadas en glutaraldehído al 2,5%, tamponado en cacodilato de sodio (0,2 M). Las muestras fueron procesadas y/o observadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, empleando un microscopio SEM/EDS marca JEOL® modelo JSM-IT300LV. El estudio demuestra finalmente que la bacteria no tiene la capacidad de adherirse a materiales como HDPE, PVC o PA-nylon y, por otro lado, se demuestra que si tiene la capacidad de adherirse a materiales como PTFE-teflón.

Los estudios mencionados anteriormente fueron realizados en condiciones similares (en condiciones *in vitro*) y se han especializado en generar información sobre el comportamiento de la bacteria sobre una superficie específica. Dichos estudios también evidencian un patrón por parte del genotipo LF-89 respecto a la adhesión a superficies independiente se traten de superficies bióticas o abióticas. Los trabajos mencionados permiten plantear la hipótesis que el genotipo EM-90 podría comportarse de manera similar.

La siguiente propuesta incluye elementos como la bacteria *P. salmonis* (genotipo EM-90) y conchas de *Mytilus chilensis*. Dichas variables no han sido estudiadas de forma simultánea y, un estudio que las contemple generará más información sobre el ciclo de vida de la bacteria y como esta tiene la capacidad de sobrevivir en un medio marino sin un hospedero.

Propuesta de un protocolo experimental

Genótipo EM-90 de *Piscirickettsia salmonis*.

El agente será cultivado en la línea celular CHSE-214, de acuerdo con lo establecido por Fryer *et al.* (1990), a una temperatura de 15 °C. Posteriores procedimientos con el agente, como la titulación de este, deben ser realizados según protocolos ya estandarizados según Reed y Muench (1938), y en condiciones que garanticen la no contaminación de las muestras a trabajar (Fryer *et al.*,1990).

Línea celular (CHSE-214).

Para el cultivo de *P. salmonis* se utilizará la línea CHSE-214 (ATCC® CRL 1681) de acuerdo con lo descrito por Fryer *et al.* (1990). La monocapa de células se cultivará en botellas de cultivo celular (TRP® 90026) de poliestireno de 25 cm², con medio esencial mínimo de Eagle (MEM) con sales de Earle (Biological Industries®), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biological Industries®) (MEM-10), L-glutamina (Biological Industries®) y bicarbonato de sodio (1%) para mantener un pH= 7,4. Las botellas deben ser posteriormente mantenidas a 15 °C en una estufa de cultivo refrigerada (YIH DER LE-509RD). El medio de cultivo no debe contener antibióticos ni fungistáticos.

Conchas de *Mytilus chilensis*

El protocolo de utilización de conchas de chorito, se basa en los estudios previos realizados por Moraleda (2019) y Larenas *et al.* (2019). Se utilizarán conchas, las cuales serán seleccionadas de animales de origen comercial; se elegirán aquellas que presenten una superficie lo más homogénea y lisa posible. De cada concha se obtendrán dos trozos de aproximadamente 0,5 cm² mediante el corte con una sierra para metal (Redline®). Estos trozos se utilizarán como “control pre-limpieza y desinfección” (CPreL), los que serán fijados y procesados para su estudio utilizando microscopía

electrónica de barrido. En una primera etapa el resto de las conchas, a excepción de los CPreL, deben ser lavadas con abundante cantidad de agua, para luego ser sometidas a un procedimiento de limpieza y desinfección, que consiste en sumergirlas por 24 h en amonio cuaternario (Billow®) a una concentración final de 0,02% (200 ppm). Las conchas una vez desinfectadas, serán cepilladas 5 min cada una, con un cepillo dental del tipo suave (sumergidas en el mismo detergente). Finalizado esto, deben ser enjuagadas diez veces en agua destilada. Posteriormente, se mantendrán a una temperatura de -20 °C, por un período mínimo de 24 h. Luego de ese período, serán sometidas a un proceso de limpieza con un *scaler* dental con ultrasonido, utilizado para destartraje en humanos, y trozadas en varios pedazos de aproximadamente 0,5 cm². Los trozos de conchas deben ser posteriormente enjuagados en agua destilada estéril 10 veces, mantenidos en etanol 70% por 24 h y luego almacenados a -20 °C hasta su uso. Posterior a este proceso de limpieza y desinfección, se deben obtener aproximadamente dos trozos de 0,5 cm² de cada concha como “control post-limpieza” (CPosL), los cuales deben ser fijados y procesados para su posterior observación en un microscopio electrónico de barrido, de acuerdo con lo indicado más adelante.

Cinética de infección sobre conchas de chorito

Se propone la utilización de 12 fragmentos de conchas con un tamaño aproximado de 0,5 cm². Se propone también que el procedimiento se realice según lo estipulado por Larenas *et al.* (2019) y Moraleda (2019). Todo el experimento debe realizarse en tubos Eppendorf, uno por cada trozo de concha (en duplicado), a una temperatura de 15 °C correspondiente a la óptima para el crecimiento y desarrollo de la bacteria (Fryer *et al.*, 1990). Los grupos “Desafío” se conformará por trozos de conchas expuestas a *P. salmonis* hasta los tiempos de 1, 24 y 48 h en los medios MEM y agua salada. Además, se conformarían tres grupos controles negativos (ConNeg1, ConNeg2 y ConNeg3) los cuales no deben ser expuestos a *P. salmonis* en ningún tipo de presentación y dos grupos controles positivos (ConPos1 y ConPos2).

Prueba de infectividad

Para demostrar la capacidad de liberación de bacterias desde la superficie de las conchas de chorito, se propone la utilización de dos trozos de conchas que se tratan de igual forma que los grupos “Desafío” del experimento de cinética de infección que, además, se mantengan hasta las 48 h. Después de ese período, estas conchas deben ser lavadas con una solución fosfato salino (PBS

pH= 7,2), colocarse en botellas de cultivo con una monocapa al 100% de la línea celular CHSE-214 e incubar en una estufa de cultivo a 15 °C por un periodo de 48 hrs en medios MEM y de agua salada. Al final del periodo, uno de los trozos de concha será procesado para su observación, para la cual se propone la utilización de microscopia de barrido. Como grupo control, se utilizaría un trozo de concha no desafiada (en duplicado), la cual fue colocada en una botella con la línea celular CHSE-214. Como grupo control positivo se pretende utilizar los resultados estipulados por Larenas *et al.* (2019) en donde la línea celular CHSE-214 fue expuesta a una concha de chorito previamente infectada con el genotipo LF-89 de *P. salmonis*.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, las conchas de *Mytilus chilensis* serán sometidas a dos tipos de tratamiento de acuerdo con lo que se explica a continuación.

Desafío de conchas de *Mytilus chilensis*

Se procederá a trabajar con duplicados de conchas de *Mytilus chilensis*, posterior a un proceso de limpieza y desinfección, serán expuestas en partes iguales a dos medios distintos, el primer medio consta de un medio MEM con la bacteria *P. salmonis* (EM-90) y el segundo medio consta de agua marina con la bacteria *P. salmonis* (EM-90).

Pasado un tiempo de 1, 24 y 48 hrs se evaluará la presencia de la bacteria unida a la superficie de las conchas; dicha adherencia puede confirmarse mediante el uso de microscopia electrónica de acuerdo con lo descrito por Larenas *et al.* (2019) (Figura 2) (Tabla 6).

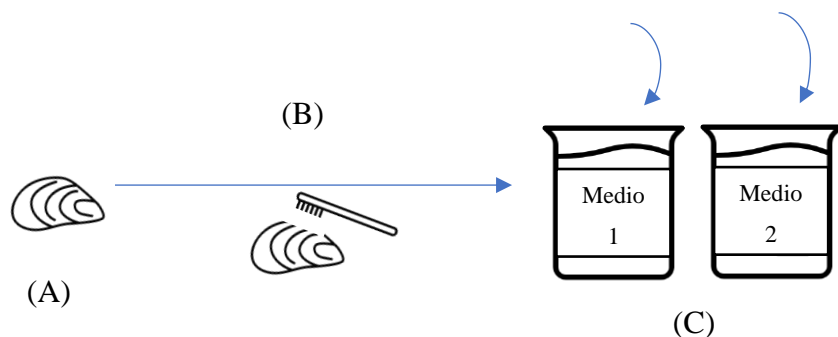


Figura 1. Desarrollo del estudio de adherencia sobre conchas de *Mytilus chilensis*. En (A) se muestran conchas de chorito chileno (*Mytilus chilensis*) las cuales se trabajarán en duplicados. (B): Las conchas son sometidas a un proceso de limpieza y desinfección. (C): Se divide en partes iguales la cantidad de conchas a trabajar y posteriormente se exponen a un medio con la bacteria, siendo el medio (1) MEM con EM-90 y (2) agua salada con EM-90.

Tabla 6. Estudio de adherencia de *P. salmonis* sobre conchas de *Mytilus chilensis*.

Grupos controles y desafíos, experimento de adhesión		Tiempo de exposición		
Grupos*	Elementos	1 h	24 h	48 h
ConNeg 1	- Concha de <i>Mytilus chilensis</i> .	MEB	MEB	MEB
ConNeg 2	- Concha de <i>Mytilus chilensis</i> . - Medio de agua salada.	MEB	MEB	MEB
ConNeg 3	- Concha de <i>Mytilus chilensis</i> . - MEM.	MEB	MEB	MEB
ConPos 1	- Concha de <i>Mytilus chilensis</i> . - MEM. - LF-89.	MEB	MEB	MEB
ConPos 2	- Concha de <i>Mytilus chilensis</i> . - Medio de agua salada. - LF-89.	MEB	MEB	MEB
Desafío 1	- Concha de <i>Mytilus chilensis</i> . - MEM. - EM-90.	MEB	MEB	MEB
Desafío 2	- Concha de <i>Mytilus chilensis</i> . - Medio de agua salada. - EM-90.	MEB	MEB	MEB

*ConNeg: Control negativo; ConPos: Control positivo; MEM: Medio esencial mínimo; MEB: Microscopía electrónica de barrido.

Estudio de liberación.

Posterior al estudio de adherencia y, en caso de que se haya observado algún resultado positivo, se propone evaluar la capacidad de liberación que tienen dichas colonias bacterianas e infectar medios celulares libres de bacterias. Para ello se propone la exposición de conchas infectadas con el agente, provenientes del primer estudio, a una línea celular que no haya sido expuesta con anterioridad a *P. salmonis*. (Figura 3) (Tabla 7).

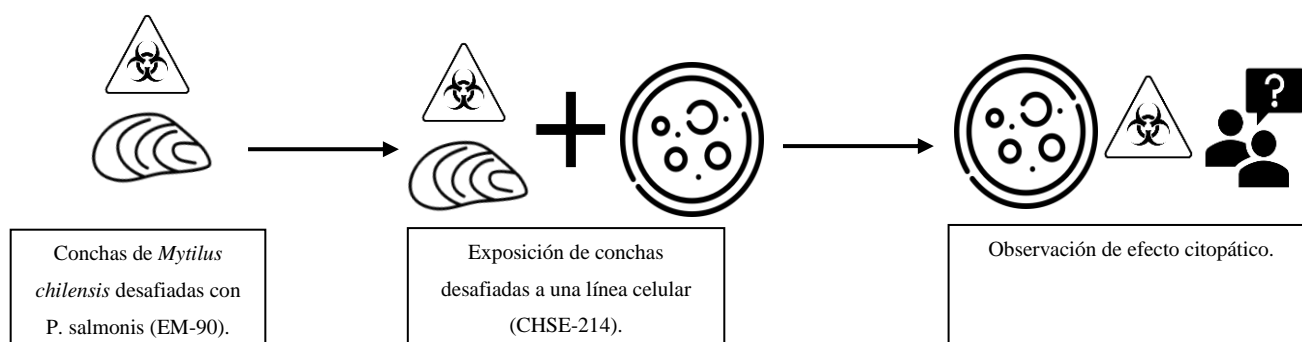


Figura 2. Diagrama representativo del modelo experimental propuesto sobre estudio de infectividad de EM-90. Consta en la exposición de conchas de *Mytilus chilensis* previamente desafiadas con *P. salmonis* (EM-90) a una línea celular (CHSE-214). Luego se evalúa la capacidad que tiene la bacteria de infectar las células mediante la observación de efecto citopático.

Tabla 7. Estudio de liberación de la bacteria *P. salmonis* desde la superficie de la concha *M. chilensis*.

Grupos controles y desafíos, experimento de liberación		Tiempo de exposición**		
Grupos*	Elementos	1 h	24 h	48 h
ConNeg 1	Línea celular CHSE-214 con una concha de <i>M. chilensis</i> sin exposición.	MO	MO	MO
ConPos 1	Línea celular CHSE-214 expuesta a concha de <i>M. chilensis</i> expuesta con anterioridad a LF-89.	MO	MO	MO
Desafío 1	Línea celular CHSE-214 expuesta a concha de <i>M. chilensis</i> expuesta con anterioridad a EM-90 en medio MEM.	MO	MO	MO
Desafío 2	Línea celular CHSE-214 expuesta a concha de <i>M. chilensis</i> expuesta con anterioridad a EM-90 en medio de agua salada.	MO	MO	MO

* ConNeg: Control negativo; ConPos: Control positivo.

MO: Estudio de los cultivos celulares mediante microscopía óptica.

Concluido el tiempo de estudio se procederá a observar las líneas celulares en busca de efecto citopático mediante un microscopio invertido con luz polarizada.

DISCUSIÓN

Mediante diversos estudios se ha determinado que la bacteria *P. salmonis* puede sobrevivir hasta por un periodo de 45 días a diferentes temperaturas en agua de mar (Lannan y Fryer, 1994b; Olivares y Marshall, 2010). Esto puede significar a la vez que, al eliminarse el agente al medio acuático, éste podría estar en contacto con las conchas de choritos.

Existen antecedentes sobre la presencia de la bacteria en variadas superficies, tanto bióticas como abióticas, de las cuales destacan superficies de ovas, conchas de moluscos y materiales de balsa jaula. La mayoría de los antecedentes fueron extraídos de estudios cuya base metodológica fue similar; constaron de un modelo experimental en el cual se expusieron las superficies anteriormente mencionadas a la bacteria y evaluaron la capacidad de esta para poder adherirse a dichas superficies. Todos estos estudios mostraron resultados positivos de adherencia, en otras palabras, se demostró que la bacteria tiene la capacidad de adherirse a diferentes superficies (Larenas *et al.*, 2003; Larenas *et al.*, 2019; Moraleda, 2019; SERNAPESCA, 2020; Moraleda, 2021).

Resultados como los descritos en los estudios anteriormente mencionados plantean la interrogante sobre como la bacteria puede sobrevivir en un ambiente marino sin la necesidad de un hospedador. Al respecto, se describe a uno de los genotipos de *P. salmonis*, el LF-89, con dicha capacidad bajo un ambiente controlado (Larenas *et al.*, 2019; Moraleda, 2019), sin embargo, no existen estudios que documenten un comportamiento similar con el genotipo EM-90 del agente.

En algunos estudios se utiliza el término de “complejo de adhesión piscirickettsial” (CAP) para referirse a la estructura que forma la bacteria para adherirse, sin embargo, al no estar bien definido dicho término en otros estudios no es utilizado (Larenas *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2012; Larenas *et al.*, 2019). Se describe en diversos trabajos que dichas estructuras son similares a biopelículas. Trabajos experimentales realizados especialmente en ovas y conchas de chorito, describen la observación de agrupaciones de bacterias unidas por un material en red que se observa comúnmente en las imágenes proporcionadas por la microscopia electrónica de barrido (Larenas *et al.*, 2003; Quinteros, 2005; Bravo, 2007, Larenas *et al.*, 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que la bacteria produce en cultivo biopelículas bajo condiciones estresantes, siendo detectadas a través de fluorescencia indirecta y microscopía electrónica de barrido (Marshall *et al.*, 2012).

Con respecto a las superficies a las cuales se adhiere la bacteria dentro del territorio chileno, la concha del chorito chileno (*Mytilus chilensis*) ha resultado una de las más relevantes a estudiar debido a que se trata de una especie endémica de dicho territorio y su cultivo, en la mayoría de los casos, se encuentra muy cercano a las jaulas de cultivo de salmónidos lo que podría definirse como un posible factor de riesgo para estos últimos, se han realizado estudios los cuales evaluaron la capacidad que tenía el genotipo LF-89 de *Piscirickettsia salmonis* de poder adherirse a la superficie de estos moluscos y posteriormente liberarse a un medio en forma infectiva (Larenas *et al.*, 2019; Moraleda, 2019). Dicha capacidad de adhesión ha sido estudiada solo en el genotipo LF-89 de *P. salmonis* (Larenas *et al.*, 2003; Larenas *et al.*, 2005; Larenas *et al.* 2019) y no existen publicaciones de adherencia en el genotipo EM-90. Es entonces que, como un genotipo responsable de pérdidas animales y económicas mayores al genotipo LF-89, surge así la propuesta de un modelo experimental que incluya al genotipo EM-90 de *P. salmonis*.

La propuesta experimental fue construida en base a los variados estudios que existen hoy en día sobre los modelos de adhesión bacteriana, dichos estudios trataban temas como los mecanismos de acción propios de una bacteria para lograr adherirse a una superficie determinada (como lo son la presencia de estructuras físicas/químicas que faciliten dicho proceso) y al como influía el tipo y forma de una superficie a la que una bacteria pudiese eventualmente adherirse (Miller y Bassler, 2001; Ábalos, 2005; Vila *et al.*, 2007 Hollman *et al.*, 2014; Bush, 2020; Cordero *et al.*, 2022). Asimismo, se tomaron elementos de los estudios que involucraban específicamente a *P. salmonis* y sus modelos de adhesión a superficies los cuales fueron mencionados anteriormente (Larenas *et al.*, 2003; Quinteros, 2005; Marshall *et al.*, 2012; SERNAPESCA, 2018b; Larenas *et al.*, 2019).

Finalmente se optó por perseguir un modelo experimental similar al descrito en los estudios de Larenas *et al.*, 2019 y Moraleda, 2019 por presentarse de una forma eficiente con el tiempo, replicable y económicamente accesible que además toma en cuenta factores de importancia para Chile como son la presencia de *Mytilus chilensis* como un posible factor de riesgo.

De dicha propuesta experimental se espera que el genotipo EM-90 de *P. salmonis* se comporte de manera similar al genotipo LF-89 en condiciones de laboratorio elaborando así la estructura de un complejo de adhesión sobre diversas superficies con una posterior capacidad de liberarse al medio en el que se encuentra, todo esto en tiempos similares a lo descrito en dichos estudios (Larenas *et al.*, 2003; Larenas *et al.* 2019). Se espera además que el genotipo EM-90 forme dichos complejos de adhesión en un tiempo menor que el genotipo LF-89 (Rozas-Serri *et al.*, 2017; Saavedra *et al.*, 2017; Bustos *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

1. En base a las diversas fuentes de información utilizadas para la redacción del presente escrito se concluye que el genotipo EM-90 de *Piscirickettsia salmonis* es uno de los principales problemas presentes dentro de la acuicultura chilena no solo por su alta diseminación y mortalidad asociada dentro del territorio nacional, sino además por la falta de información que existe de dicho agente.
2. La revisión bibliográfica del presente escrito ha demostrado que son necesarios más estudios para comprender el ciclo de vida de la bacteria *P. salmonis*.
3. La sobrevivencia de *P. salmonis* fuera de un hospedero no está del todo clara lo que dificulta la creación de un plan de acción para frenar sus efectos dentro de la población de salmónidos cultivados.
4. Los estudios de adherencia bacteriana a superficies basados en el genotipo LF-89 de *P. salmonis*, en conjunto a la propuesta experimental expuesta en el presente escrito, podrían generar información respecto a cómo sobrevive el genotipo EM-90 dentro de un ambiente marino carente de un hospedador y, por consecuente, información necesaria para la elaboración de planes de acción con objetivo de mitigar sus efectos negativos dentro de la producción de salmónidos.
5. Los estudios de adherencia mencionados en el escrito describen a estructuras como las balsas de cultivo de salmónidos o incluso otros seres vivos como factores de riesgo ante una posible infección con *P. salmonis*, dado que estos pueden actuar como un potencial reservorio. Dichos resultados no solo demuestran la alta complejidad de la bacteria y su ciclo de vida, sino que, además, complica la elaboración de planes de acción ante la presencia de brotes al incluir más variables a controlar.

BIBLIOGRAFÍA

ÁBALOS, C. 2005. Adhesión bacteriana a biomateriales. Av Odontoestomatol. 21-1: 347-353.

ABELSON, M.B.; MCLAUGHLIN, J. 2012. Of Biomes, Biofilm and The Ocular Surface. [online] Disponible en: <[Of Biomes, Biofilm and The Ocular Surface \(reviewofophthalmology.com\)](http://reviewofophthalmology.com)>

AGUAYO, J.; MIQUEL, A.; ARANKI, N.; JAMETT, A.; VALENZUELA, PDT.; BURZIO, LO. 2002. Detection of *Piscirickettsia salmonis* in fish tissues by an enzyme-linked immunosorbent assay using specific monoclonal antibodies. Dis. Aquat. Org. 49: 33-38.

ALBORNOZ, R.; VALENZUELA, K.; PONTIGO, J.P.; SÁNCHEZ, P.; RUIZ, P.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; ROMERO, A.; OLIVER, C.; YÁÑEZ, A. 2017. Identification of chemotaxis operon cheYZA and cheA gene expression under stressful conditions in *Piscirickettsia salmonis*. Microb. Pathog. 107:436-441.

ALMENDRAS, F.E.; FUENTEALBA I.C.; JONES S.R.M.; MARKHAM, F; SPANGLER, E. 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 20: 409-418.

AQUA. 2017. “Los avances en la lucha contra SRS” [online] aqua.cl. Disponible en: <[Los avances en la lucha contra SRS \(aqua.cl\)](http://aqua.cl)> [Consulta: 10-12-2021]

BRANDA, S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology. 13:20-26. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.006.

BRAVO, S.; M. CAMPOS. 1989. Coho salmon syndrome in Chile. FHS/AFS Newsletter 17:3. Disponible en: <[Newsletter | AFS Fish Health Section \(fisheries.org\)](http://fisheries.org)>

BRAVO, C. 2007. Comparación de la cinética de presentación del complejo de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* en piel y branquias de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 84 p.

BUSH, L. 2020. “Factores que facilitan la invasión microbiana” [Online] msdmanuals.com. Disponible en: <[Factores que facilitan la invasión microbiana - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales \(msdmanuals.com\)](http://msdmanuals.com)> [Consulta: 10-12-2021]

BUSTOS, M.; MANCILLA, M.; SAAVEDRA, J.; BOHLE, H.; BUSTOS, P. 2018. Mecanismos y resistencia clínica de *Piscirickettsia salmonis* a los antibióticos. ADL Diagnostic Chile SpA, Puerto Montt, Chile. 161018. Disponible en: <[PDF Mecanismos resistencia a antibiot P salmonis 161018 \(researchgate.net\)](http://researchgate.net)>

CARROL, K.; MORSE, S.; MIETZNER, T.; MILLER, S. 2016. Traducción al español del libro «Jawetz, Melnick y Adelberg's Medical Microbiology». Edición número 28.

CONTRERAS, J. 1995. Infectividad de *P. salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memória de Título Medicina Veterinaria. Santiago, Chile, U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 71 p.

CONTRERAS-LYNCH, S.; OLMOS, P.; VARGAS, A.; FIGUEROA, J.; GONZALEZ-STEGMAIER, R.; ENRIQUEZ, R.; ROMERO, A. 2015. Identification and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* in native fish from southern Chile. Dis. Aquat. Org. 115: 233-244.

CORDERO, M. L. 2022. Bacterias surfistas, condiciones para que las bacterias ese acumulen en superficies. Disponible en: < [Investigadores descubren condiciones para evitar que bacterias se acumulen en rincones - Universidad de Chile \(uchile.cl\)](#)> [Consulta: 10-06-2022]

CVITANICH, J.; GÁRATE, O.; SMITH, C.E. 1991. Etiological agent in a Chilean coho disease isolated and confirmed by Koch's postulates. Am. Fish. Soc. New. 18:1-2.

DRANCOURT, M.; JARLIER, V.; RAOULT, D. 2002. The environmental pathogen *Mycobacterium ulcerans* grows in amphibian cells at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 68:6403-6404.

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: 107-111.

FUENTEALBA, P.; LATORRE, Y.; GONZÁLEZ, E.; MARTINEZ, I.; SOTO, C.; ALTAMIRANO, C. 2020. Engineering a defined culture medium to grow *Piscirickettsia salmonis* for its use in vaccine formulations. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 47: 299-309.

HARDWICK, J. 2019. Operadores de Búsqueda de Google: Lista Completa (42 Operadores Avanzados) [En línea] <[Operadores de Búsqueda de Google: Lista Completa \(42 Operadores Avanzados\) \(ahrefs.com\)](#)>

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.; STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2: 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>

HOLLMAN, B.; PERKINS, M.; WALSH, D. 2014. Biofilms and their role in pathogenesis. Immunology.org [online] <<https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/biofilms-y-su-papel-en-la-patog%C3%A9nesis>> [Consulta:

05-01-2022] Vasudevan R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. J Microbiol Exp. 2014;1(3):84–98. DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00014

HUGGETT, M.; NEDVED, B.; HADFIELD, M. 2009. Effects of initial surface wettability on biofilm formation and subsequent settlement of *Hydroides elegans*. Biofouling 25:387–399.

KOTLOWSKI, R.; MARTIN, A.; ABLORDEY, A.; CHEMLAL, K.; FONTEYNE, P.A.; PORTAELS, F. 2004. One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs, and fish. J. Med. Microbiol. 53: 927–933.

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

LANNAN, C.N.; FRYER, J.L. 1991a. Recommended methods for inspection of fish for the salmonid rickettsia. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11: 135-136.

LANNAN, C.N.; FRYER, J.L. 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. Cs. Vet. 10: 53-58.

LARENAS, J.; ASTORGA, C.; CONTRERAS, J. ET AL. 1996. Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. Fish Pathol. 31: 231-232.

LARENAS, J.; TRONCOSO, O.; LEDEZMA, H.; FERNÁNDEZ, S.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS.; SMITH, P. 2002. Transmisión vertical experimental de *Piscirickettsia salmonis* y estudio de la forma de penetración a ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante microscopía de barrido. Pág. 199-206. Libro de Comunicaciones Científico-Teóricas Presentadas al I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Editor: Dr. Ignacio Blas. Depósito legal: Z-2450-2002. Zaragoza, España. 973 págs.

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

LARENAS, J. 2005. Visión general sobre la patogenia en la piscirickettsiosis. [en línea] <http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET2-2005/html/Aqua2005.htm>

LARENAS, J.; PEREZ, M.; MORALEDA, C.; GODOY, M.; LARENAS, C.; ACUÑA-RETAMAR, M. 2019. *In vitro* adhesion and infectiveness of *Piscirickettsia salmonis* on mussel shells *Mytilus chilensis*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 39: 111-118.

LASA, I.; DEL POZO, J. L.; PENADÉS, J. R.; LEIVA, J. 2005. Biofilms bacterianos e infección. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 28(2), 163-175. Recuperado en 28 de mayo de 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&tlng=es.

LEVIPAN, H. A.; IRGANG, R.; YÁÑEZ, A. 2020. Improved understanding of biofilm development by *Piscirickettsia salmonis* reveals potential risks for the persistence and dissemination of piscirickettsiosis. Sci. Rep. 10: 12224. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68990-4>

LOZANO, I.; DÍAZ, N. F.; MUÑOZ, S.; RIQUELME, C. 2017. Antibiotics in Chilean aquaculture: a review. in Antibiotic use in animals (ed. Savic, S.). 3, 25–44 (IntechOpen, 2017). Available from: <https://www.intechopen.com/books/antibiotic-use-in-animals/antibiotics-in-chilean-aquaculture-a-review>.

MARTINEZ, E. 2022. "Tipos de textos (y sus características)". En: *Significados.com*. Disponible en: <https://www.significados.com/tipos-de-texto/>.

MARSHALL, S.; GÓMEZ, F.; RAMIREZ, R.; NILO, L.; HENRÍQUEZ, V. 2012. Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* undergrowth stress conditions: a putative in vivo survival/persistence strategy in marine environments. Res. Microbiol. 163: 557–566.

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

MAUEL M., WARE, C., SMITH, P. 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. J. Vet. Diagn. Invest. 20: 213-214.

MILLER, M.; BASSLER, B. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55:165-99

MONTALICO, E., RODRÍGUEZ H., LARENAS, J., ARDITO, F. 2021. Detección y asociación de *Piscirickettsia salmonis* en órganos y heces de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivado en el mar. Rev. Inv. Vet. Perú. 32: e18041.

MORALEDA, C. 2019. Formación del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) de *piscirickettsia salmonis* sobre la superficie de concha de chorito (*Mytilus chilensis*) en agua de mar

y su caracterización mediante el uso de proteasas y celulasa. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.

MORALEDA, C.; ROBLEDO, D.; GUTIÉRREZ, A.; POZO, J.; YÁÑEZ LÓPEZ, J.; HOUSTON, R. 2021. Investigating mechanisms underlying genetic resistance to salmon rickettsial syndrome in Atlantic salmon using RNA sequencing. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/182598>

MURRAY, R. S.; LARRY, J. 2009. Estadística. 4ta edición. Mc Graw-Hill. México, D.F

NAZAR, J. 2007. Biofilms bacterianos. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello. 67: 61-72

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

ORREGO, R. 2015. Variabilidad intraespecífica de *Piscirickettsia salmonis* en Chile - SalmonExpert.cl. [online] Salmonexpert.cl. Disponible en: <https://www.salmonexpert.cl/article/variabilidad-intraespec-iacute-fica-de-piscirickettsia-salmonis-en-chile/> > [Consulta: 23-05-2021]

QUINTEROS, J. 2005. Comparación en la presentación de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 54 p.

ROZAS-SERRI, M.; ILDEFONSO, R.; PEÑA, A.; ENRÍQUEZ, R.; BARRIENTOS, S.; MALDONADO, L. 2017. Comparative pathogenesis of piscirickettsiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt experimentally challenged with LF-89-like and EM-90-like *Piscirickettsia salmonis* isolates. J. Fish Dis. 40: 1451–1472.

SALINAS, G.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.; LARENAS, J. 1997. Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater condition. In: 8th International Conference “Diseases of Fish and Shellfish”. Abstracts Book. (ed. by European Association of Fish Pathologists), pp. 57. Heriot-Watt University, Edinburgh.

SAAVEDRA, J.; HERNANDEZ, N.; OSSES, A.; CASTILLO, A.; CANCINO, A.; GROTHUSEN, H.; NAVAS, E.; HENRIQUEZ, P.; BOHLE, H.; BUSTAMANTE, F.; BUSTOS, P.; MANCILLA, M. 2017. Prevalence, geographic distribution, and phenotypic differences of *Piscirickettsia salmonis* EM-90-like isolates. J. Fish Dis, 40: 1055-1063. <https://doi.org/10.1111/jfd.12581>

SERNAPESCA. 2012. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (sernapesca.cl))> [Consulta: 10-05-2021]

SERNAPESCA. 2013. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-05-2021]

SERNAPESCA. 2014. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-05-2021]

SERNAPESCA. 2015. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-05-2021]

SERNAPESCA. 2016. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-05-2021]

SERNAPESCA. 2017. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-05-2021]

SERNAPESCA. 2018a. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-05-2021]

SERNAPESCA. 2018b. Programa para la gestión sanitaria en la acuicultura (PGSA). Vectores y reservorios de *p. salmonis*. Pgsa.sernapescas.cl. Disponible en: <[Vectores y reservorios de P. salmonis - PGSA \(sernapesca.cl\)](http://vectores.y.reservorios.de.p.salmonis-pgsa.ternapescas.cl)> [Consulta: 20-05-2021]

SERNAPESCA. 2019. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-05-2021]

SERNAPESCA. 2020. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-06-2022]

SERNAPESCA. 2021. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 10-06-2022]

SERNAPESCA. 2022. Informes Sectoriales de Pesca Anuales. Disponible en <[Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura \(sernapesca.cl\)](http://servicio.nacional.de.pesca.y.acuicultura.ternapescas.cl)> [Consulta: 15-06-2022]

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*. Dis. Aquat. Org. 37:165-172

SMITH, P.; LARENAS, J.; VERA, P.; CONTRERAS, J.; VENEGAS, C.; ROJAS, M.E.; GUAJARDO, A. 2002. Principales enfermedades de los peces salmonídea cultivados en Chile. Monografías de Medicina Veterinaria volumen 21(2): 3-19.

VERA, T.; ISLA, A.; CUEVAS, A.; FIGUEROA, J. 2012. Un nuevo medio de cultivo líquido para el patógeno *Piscirickettsia salmonis*. Arch. Med. Vet. 44:273-277. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2012000300010>

VILA, J.; SORIANO, A.; MENSA, J. 2007. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. Servicio de Microbiología. Centro de Diagnóstico Biomédico. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínico. Barcelona. España.