

Vectores y reservorios de *P. salmonis* FIE V014 – Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura

Informe final

Andy Steven, Jatinder Sidhu, Sergio Contreras, Julio Larenas, Patricio Bernal, Paula Vaquero, Diego Ocampo, Mariana Acuña, Carolina Araya, Marcos Godoy, Carolina Moraleda, Andrónico Neira y Ensminger Núñez.
Diciembre 2018

Reporte para SERNAPESCA



Cita

Andy Steven, Jatinder Sidhu, Sergio Contreras, Julio Larenas, Patricio Bernal, Paula Vaquero, Diego Ocampo, Mariana Acuña, Carolina Araya, Marcos Godoy, Carolina Moraleda, Andrónico Neira y Ensminger Núñez. (2018) *Dinámica ambiental de P. salmonis* FIE V014- Programa para la Gestión Sanitaria de la Acuicultura. Informe de avance. CSIRO Australia.

Copyright

© Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation 2016. To the extent permitted by law, all rights are reserved and no part of this publication covered by copyright may be reproduced or copied in any form or by any means except with the written permission of CSIRO.

Important disclaimer

CSIRO advises that the information contained in this publication comprises general statements based on scientific research. The reader is advised and needs to be aware that such information may be incomplete or unable to be used in any specific situation. No reliance or actions must therefore be made on that information without seeking prior expert professional, scientific and technical advice. To the extent permitted by law, CSIRO (including its employees and consultants) excludes all liability to any person for any consequences, including but not limited to all losses, damages, costs, expenses and any other compensation, arising directly or indirectly from using this publication (in part or in whole) and any information or material contained in it.

CSIRO is committed to providing web accessible content wherever possible. If you are having difficulties with accessing this document please contact Patricio.Bernal@csiro.au.

Tabla de contenido

| | |
|--------------------------|---|
| Tabla de contenido | 3 |
|--------------------------|---|

| | |
|----------------------------|-----------|
| Figuras | 8 |
| Tablas | 12 |
| Lista de Acrónimos | 14 |
| Glosario Técnico | 15 |
| Resumen Ejecutivo | 17 |
| Executive Summary | 20 |
| 1 Introducción | 23 |

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Sobre este informe..... | 23 |
| 1.2 | Antecedentes..... | 26 |
| 1.3 | Etiología del síndrome de Rickettsia del salmón (SRS) | 26 |
| 1.4 | Modo de transmisión de <i>P. salmonis</i> | 27 |
| 1.5 | Prevalencia de patógenos de peces en ambientes acuáticos | 27 |
| 1.6 | El agua y los sedimentos como fuente de <i>P. salmonis</i> | 28 |
| 1.7 | Biopelícula marino como reservorio potencial de <i>P. salmonis</i> | 28 |
| 1.8 | Los salmónidos silvestres un reservorio potencial de <i>P. salmonis</i> | 28 |
| 1.9 | Moluscos como reservorio potencial de <i>P. salmonis</i> | 29 |
| 1.10 | Bacterioplancton y zooplancton como reservorios de <i>P. salmonis</i> | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 2 Identificación y cuantificación de reservorios (bióticos y abióticos) de vectores de <i>P. salmonis</i> | 30 |
|---|-----------|

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Selección de centros de cultivo y coordinación de muestreos..... | 30 |
| 2.2 | Ejecución de muestreos en centros de cultivo. | 32 |
| | Recolección de muestras de agua de mar para la detección de <i>P. salmonis</i> y metagenómica..... | 32 |
| | Recolección de muestras de sedimento marino para la detección de <i>P. salmonis</i> y metagenómica. | 33 |
| | Recolección de muestras de biopelícula para la detección de <i>P. salmonis</i> y metagenómica. | 33 |
| | Recolección de muestras de moluscos para la detección de <i>P. salmonis</i> | 33 |
| | Recolección de muestras de zooplancton para la detección de <i>P. salmonis</i> | 34 |
| | Obtención de peces silvestres y asilvestrados en inmediaciones del centro. | 34 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| | Obtención de aislados bacterianos desde centros de cultivo en brote..... | 34 |
| 2.3 | Procesamiento de muestras..... | 35 |
| | Concentración de muestras de agua en el laboratorio..... | 35 |
| | Procesamiento de muestras de biopelícula en el laboratorio..... | 36 |
| | Procesamiento de muestras de moluscos en el laboratorio..... | 37 |
| | Procesamiento de muestras de zooplancton en el laboratorio..... | 37 |
| | Aislamiento y confirmación de presencia de <i>P. salmonis</i> | 37 |
| 2.4 | Análisis de las muestras..... | 38 |
| | Extracción de material genético..... | 38 |
| | Análisis por PCR tiempo real sonda Taqman para detección de <i>P. salmonis</i> | 39 |
| | Aislamiento de <i>P. salmonis</i> desde peces..... | 43 |
| 2.5 | Resultados..... | 44 |
| | Detección qPCR de <i>P. salmonis</i> en agua, sedimentos y las biopelículas..... | 45 |
| | Detección de <i>P. salmonis</i> viable mediante PMA-qPCR..... | 47 |
| 2.6 | Discusión..... | 49 |
| | Agua..... | 49 |
| | Biopelículas..... | 52 |
| | Sedimentos..... | 53 |
| | Peces silvestres y otros animales como reservorios..... | 54 |
| | Moluscos..... | 54 |
| 2.7 | Posibles reservorios y rutas de difusión..... | 57 |
| 3 | Determinación de la dinámica poblacional genómica de cepas de <i>P. salmonis</i> | 59 |
| 3.1 | Análisis de pangenómica..... | 59 |
| 3.2 | Diseño de ensayos moleculares para la detección de patógenos bacterianos..... | 60 |
| 3.3 | Genotipia molecular..... | 60 |
| 3.4 | Predicción del fenotipo..... | 61 |
| | 3.4.1 Detección de resistencia a los antimicrobianos..... | 61 |
| | 3.4.1 Identificación de factores de virulencia..... | 61 |
| 3.5 | Objetivos del presente proyecto..... | 61 |
| 3.6 | Materiales y métodos..... | 62 |
| | 3.6.1 Cultivo de cepas bacterianas..... | 62 |
| | 3.6.2 Confirmación de la identificación de la cepa mediante secuenciación 16S rRNA..... | 62 |
| | 3.6.3 Preparación de ADN genómico..... | 62 |
| | 3.6.4 Secuenciación y ensamblaje del genoma..... | 63 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.6.5 | Anotación genómica y comparación..... | 63 |
| 3.6.6 | Detección de marcadores de virulencia y resistencia antimicrobiana..... | 64 |
| 3.7 | Resultados y discusión | 64 |
| | Secuenciamiento completo..... | 64 |
| | Anotación genómica y comparación..... | 68 |
| | Genes de resistencia a antibióticos..... | 69 |
| | Genes de virulencia..... | 77 |
| | Análisis metagenómico de agua, sedimento y biopelículas | 77 |

4 Establecimiento de los mecanismos y rutas de diseminación de *P. salmonis* 79

| | | |
|-----|--|----|
| 4.1 | Colecta y análisis de muestras de moluscos..... | 79 |
| 4.2 | Colecta y análisis de tejidos coninfectados con <i>P. salmonis</i> | 79 |
| 4.3 | Estudio de <i>Caligus</i> coinfectado con <i>P. salmonis</i> | 82 |
| | Realización del estudio..... | 82 |
| | Material biológico. | 82 |
| | Procesamiento, inclusión y corte..... | 82 |
| | Evaluación de la presencia de <i>Piscirickettsia salmonis</i> | 84 |
| | Análisis estadístico | 84 |
| | Resultados | 85 |

5 Determinación de la importancia biológica de reservorios y vectores: en ameba, piojo de mar y moluscos 91

| | | |
|--|--|----|
| | Aislamiento de amebas | 91 |
| | Selección de peces | 91 |
| | Necropsia de peces | 91 |
| | Muestras de branquia para aislamiento | 92 |
| | Extracción de muestras..... | 92 |
| | Colección de las amebas | 92 |
| | Cultivo de Ameba..... | 92 |
| | Reacción de la polimerasa en cadena para <i>Piscirickettsia salmonis</i> | 92 |

6 Conclusiones y recomendaciones 94

| | | |
|-----|------------------------|----|
| 6.1 | Agua | 94 |
| 6.2 | Sedimentos..... | 96 |
| 6.3 | Peces silvestres | 98 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.4 | Materiales plásticos | 98 |
| A.1 | Línea Celular CHSE 214..... | 99 |
| A.2 | Cepa LF-89 <i>Piscirickettsia salmonis</i> | 100 |
| A.3 | Cepa EM-90 de <i>Piscirickettsia salmonis</i> | 100 |
| A.4 | Conchas de <i>Mytilus chilensis</i> | 100 |
| A.5 | Agua de mar..... | 100 |
| A.6 | Proteinasas y celulasa. | 101 |
| A.6.1 | Tripsina:..... | 101 |
| A.6.2 | Proteinasa K:..... | 101 |
| A.6.3 | Celulasa: | 101 |
| A.7 | Formación de CAP en concha de chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) en agua de mar..... | 101 |
| A.8 | Evaluación de la formación de CAP sobre la superficie de conchas de chorito tratadas con proteasas. | 102 |
| A.9 | Evaluación de CAP formado sobre la superficie de conchas de chorito post tratamiento con celulasa. | 104 |
| A.10 | Ensayo de actividad enzimática..... | 104 |
| A.10.1 | Ensayo proteinasas: | 104 |
| A.10.2 | Ensayo celulasa:..... | 105 |
| A.11 | Resultados | 105 |
| A.11.1 | Formación de CAP en concha de chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) en agua de mar. | 105 |
| A.12 | Ensayo formación de complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) en medio agua de mar..... | 107 |
| A.13 | Viabilidad de <i>P. salmonis</i> en formación de CAP de 24 horas en agua de mar. | 108 |
| A.13.1 | Ensayo de actividad enzimática | 109 |
| B.1 | Lugar de procesamiento de muestras..... | 110 |
| B.2 | Línea Celular CHSE 214..... | 111 |
| B.3 | <i>Piscirickettsia salmonis</i> | 111 |
| B.4 | Agua de mar..... | 111 |
| B.5 | Materiales plásticos empleados | 111 |
| B.6 | Conchas de <i>Mytilus chilensis</i> | 112 |
| B.7 | Adhesión de <i>P. salmonis</i> en superficies de materiales plásticos empleados en la construcción de balsas jaula y posterior liberación al medio..... | 113 |
| B.7.1 | Controles negativos..... | 113 |
| B.7.2 | Desafío de muestras a <i>P. salmonis</i> en medio MEM-4..... | 113 |
| B.7.3 | Desafío de muestras a <i>P. salmonis</i> en agua salada..... | 114 |
| B.7.4 | Prueba de infectividad (Desafío + línea celular CHSE-214). | 114 |
| B.8 | Resultados | 115 |

| | | |
|-------|--|-----|
| B.8.1 | Controles negativos..... | 115 |
| B.9 | Desafío de muestras a <i>P. salmonis</i> en agua salada..... | 116 |
| B.9.1 | Desafío de muestras a <i>P. salmonis</i> en MEM-4..... | 118 |
| B.9.2 | Ensayos de Viabilidad..... | 121 |
| C.1 | <i>P. salmonis</i> | 124 |
| C.2 | Materiales plásticos desafiados..... | 124 |
| C.3 | Formación de Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP)..... | 124 |
| C.4 | Microscopía electrónica de barrido y microanálisis mediante energía dispersiva de rayos X (SEM-EDS) | 124 |
| C.5 | Resultados y Discusión..... | 125 |
| C.5.1 | Formación de complejo de adhesión Piscirickettsial (CAP) en los materiales..... | 125 |
| C.5.2 | Microanálisis elemental del CAP, mediante SEM-EDS..... | 125 |
| D.1 | Procesamiento de las muestras..... | 134 |
| D.2 | Aislamiento de material genético..... | 134 |
| D.3 | Cuantificación de ADN..... | 134 |
| D.4 | PCRa. | 134 |
| D.5 | Electroforesis..... | 135 |
| D.6 | Reultados..... | 135 |

Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2-1 Mapa ubicación de los sitios de muestreo y control utilizados en el presente estudio..... | 30 |
| Figura 2-2 Diagrama que muestra la ubicación de los puntos de muestreos para la recolección de muestras de agua en las cercanías a las balsas jaula con brotes activos de SRS..... | 32 |
| Figura 2-3 Draga tipo Van Veen para la obtención de muestras de sedimento..... | 33 |
| Figura 2-4 Diagrama de circulación del agua en el filtro de membrana. Fuente: Hill et al., 2005 | 35 |
| Figura 2-5 Filtros de diálisis Hemoflow FX80 para la concentración de muestras de agua con la configuración correcta de las mangueras..... | 36 |
| Figura 2-6 Cámaras de difusión con sus piezas y orden de montaje..... | 42 |
| Figura 2-7 Tinción Gram (negativo) (100x) aplicada a las colonias bacterianas puras obtenidas en terreno para el muestreo del centro de cultivo 1..... | 44 |
| Figura 2-8 Cuantificación de <i>P. salmonis</i> utilizando qPCR, basándose en las muestras positivas de agua recolectada en todos los sitios y reportadas en la Tabla 2-6. Las muestras denominadas HU1, HU2 y HU3 corresponden al centro 1, las muestras denominadas RO1, RO2 y RO3 corresponden al centro 2, las muestras denominadas RA1, RA2 y RA3 corresponden al centro 3, las muestras denominadas KI1, KI2 y KI3 corresponden al centro 4, las muestras denominadas JO1, JO2 y JO3 corresponden al centro 5 y las muestras denominadas PA1, PA2 y PA3 corresponden al centro 6..... | 46 |
| Figura 2-9 Cuantificación de <i>P. salmonis</i> utilizando qPCR, basándose en las muestras positivas de sedimento recolectada en todos los sitios y reportadas en la Tabla 2-6. Las muestras denominadas HU1, HU2 y HU3 corresponden al centro 1, las muestras denominadas RO1, RO2 y RO3 corresponden al centro 2, las muestras denominadas RA1, RA2 y RA3 corresponden al centro 3, las muestras denominadas KI1, KI2 y KI3 corresponden al centro 4, las muestras denominadas JO1, JO2 y JO3 corresponden al centro 5 y las muestras denominadas PA1, PA2 y PA3 corresponden al centro 6..... | 47 |
| Figura 2-10 Cuantificación de <i>P. salmonis</i> utilizando qPCR, basándose en las muestras positivas de biopelícula recolectada en todos los sitios y reportadas en la Tabla 2-6. Las muestras denominadas HU1, HU2 y HU3 corresponden al centro 1, las muestras denominadas RO1, RO2 y RO3 corresponden al centro 2, las muestras denominadas RA1, RA2 y RA3 corresponden al centro 3, las muestras denominadas KI1, KI2 y KI3 corresponden al centro 4, las muestras denominadas JO1, JO2 y JO3 corresponden al centro 5 y las muestras denominadas PA1, PA2 y PA3 corresponden al centro 6..... | 47 |
| Figura 2-11. Microfotografías electrónicas de PTFE-teflón a 500x (D1) y 3000x (D2). Diversos cúmulos de conglomerados que se corresponde al CAP se muestran con flechas de color azul..... | 53 |
| Figura 2-12. Microfotografías electrónicas de concha de chorito a 500x (E1) y concha de chorito a 3000x (E2). Diversos cúmulos de conglomerados que se corresponde al CAP se muestran con flechas de color azul. | 55 |
| Figura 2-13. Las microfotografías de microscopio invertido con luz polarizada corresponden a: cultivo celular normal de la línea CHSE-214 (A), efecto citopático (ECP) característico del crecimiento y desarrollo de <i>P. salmonis</i> en células CHSE-214 (B), ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que presentaba CAP en medio agua de mar (C) y ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que presentaba CAP en medio MEM-4 (D). C= Concha. Los focos de iniciación de ECP se muestran con flechas negras..... | 56 |
| Figura 3-1. Gráfico circular que muestra la desagregación de la frecuencia de genes en 55 aislados de <i>P. salmonis</i> | 68 |

| | |
|---|----|
| Figura 3-2. Frecuencia de los genes en los 55 aislados analizados de <i>P. salmonis</i> | 69 |
| Figura 3-3 Dendrograma que muestra la distribución filogenética de 55 cepas de <i>P. salmonis</i> en 2 grupos principales y distantes..... | 69 |
| Figura 3-4. Presencia comparativa de genes de resistencia a antibióticos en 55 aislados de <i>P. salmonis</i> | 70 |
| Figura 4-1 Salmón del Atlántico (<i>S. salar</i>), afectado por amebiasis branquial (<i>N. perurans</i>). Se observa palidez branquial y la presencia de "parches" manchas de color blanco característicos de la infección. | 80 |
| Figura 4-2 Salmón del Atlántico (<i>S. salar</i>), afectado por amebiasis branquial (<i>N. perurans</i>). En las branquias se observa la presencia de "parches" o manchas de color blanquecino característicos de la infección..... | 80 |
| Figura 4-3 Distribución de centros según categoría PSEVC-Piscirickettsiosis Región de Los Lagos, enero 2016 a junio 2017. Fuente SERNAPESCA 2017. | 81 |
| Figura 4-4. Distribución de centros de acuerdo brote de amebiasis Región de Los Lagos. Fuente SERNAPESCA 2017. | 81 |
| Figura 4-5 Presencia de <i>P. salmonis</i> en tejidos de <i>C. rogercresseyi</i> expresado en porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C). Los individuos fueron detectados mediante técnica de inmunohistoquímica. Se analizó un total 50 individuos por categoría. Las muestras fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis | 86 |
| Figura 4-6. Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a un grupo de bacterias ubicadas entre los microfilamentos de un miembro torácico de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™ SG. 1000x..... | 88 |
| Figura 4-7. Cefalotórax. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en <i>Caligus rogercresseyi</i> . Se observa inmunorreacción positiva (flecha) en una agrupación de bacterias en tejido muscular en Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™ SG. 400x..... | 88 |
| Figura 4-8. Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flechas) a <i>P. salmonis</i> en la superficie y dentro de la pared cuticular. Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000x..... | 88 |
| Figura 4-9. Pared del tubo digestivo. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> debajo de las células epiteliales de revestimiento. Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000X..... | 88 |
| Figura 4-10. Presencia de <i>P. salmonis</i> en tejidos de <i>C. rogercresseyi</i> expresado en porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C), de acuerdo con el tejido afectado. Los individuos fueron detectados mediante técnica de inmunohistoquímica. Los datos están referidos a 40 <i>Caligus</i> infectados con la bacteria mostrados en la tabla 12. Las muestras fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis..... | 89 |
| Figura 4-11. Huevo. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> en el huevo dentro de la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000x..... | 90 |
| Figura 4-12. Huevos en cistos. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> en el huevo dentro los cistos de la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000x..... | 90 |
| Figura 4-13. Bolsa Ovígera. Capa Externa. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a <i>P. salmonis</i> externo a la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000x. | 90 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4-14. Borde Externo. Bolsa Ovígera. MEB. Se observa un conglomerado de bacterias uniéndose a la bolsa ovígera de <i>C. rogercresseyi</i> (flecha) de una hembra adulta. La zona es la misma que se aprecia en la Figura 4-13 pero sin anticuerpos..... | 90 |
| Figura 6-1 (a) Intercambio a través del canal de Chacao desde Barrio 5 a Barrio 6 (lanzamiento del 1 al 5 de enero de 2015, tiempo de dispersión 7 días). (b) Puntaje de riesgo de propagación para SRS (infectar). (c) Puntaje de riesgo de recepción de SRS (ser infectado). Todas las estimaciones se promediaron a lo largo de 2015 y 2016..... | 94 |
| Figura 6-2 Puntajes promedio en la granja para 2015 y 2016 (a) Puntaje de riesgo de propagación para SRS (infectar) (b) Puntaje de riesgo de recepción de SRS (ser infectado). | 95 |
| Figura 6-3 Cuatrocientos centros de cultivo de la Region de Los Lagos clasificados a partir de predicciones de conectividad acuática estimadas en Junio de 2016. Área verde representa bajo riesgo de infectar, ser infectado o ambos. Área amarilla representa un riesgo intermedio. Área roja representa un alto riesgo..... | 96 |
| Figura 6-4 Curva de Hjulström. Gráfico utilizado para determinar si un río erosiona, transporta o deposita sedimentos. El gráfico toma en consideración el tamaño de los sedimentos y la velocidad del canal. El eje X muestra el tamaño de las partículas en mm (milímetros)..... | 97 |
| Figura 6-5 Matriz para estimar el riesgo de re-suspensión y re-infección..... | 98 |
| Figura 6-6. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de concha de chorito post limpieza. Se observan diferentes zonas de la superficie de una concha control negativo. No se observan microorganismos. A. Concha incubada en medio L-15 por 24 h (150x). B. Grieta de concha incubada en medio L-15 por 24 h (5000x). C. Concha incubada en agua de mar por 24 h (150x). D. Grieta de concha incubada en agua de mar por 24 h (2000x). P= Periostraco. G= Grieta. | 106 |
| Figura 6-7. Control positivo. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de conchas de chorito desafiadas con <i>P. salmonis</i> en medio de cultivo L-15. Se observan diferentes zonas con la presencia de la bacteria unida a la superficie formando el complejo de adhesión piscirickettsial (CAP). Las flechas negras indican la presencia de la bacteria. Las flechas blancas indican la presencia del CAP. A y B. Concha incubada en medio L-15 con <i>P. salmonis</i> por 1 h (150x y 5000x). C y D. Concha incubada en medio L-15 con <i>P. salmonis</i> por 24 h (150x y 5000x). La. P= Periostraco. G= Grieta. | 107 |
| Figura 6-8. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de conchas de chorito desafiadas con <i>P. salmonis</i> en agua de mar. Se observan diferentes zonas con la presencia de la bacteria unida a la superficie formando el complejo de adhesión piscirickettsial (CAP). Las flechas negras indican la presencia de la bacteria. Las flechas blancas indican la presencia del CAP. A y B. Concha incubada en agua de mar con <i>P. salmonis</i> por 10 min (150x y 5000x). C y D. Concha incubada en agua de mar con <i>P. salmonis</i> por 1 h (150x y 5000x). E y F. Concha incubada en agua de mar con <i>P. salmonis</i> por 24 h (150x y 5000x)..... | 108 |
| Figura 6-9. Cultivo celular línea CHSE-214. Microscopio invertido con luz polarizada. La figura A muestra un cultivo normal. La figura B presenta efecto citopático característico del crecimiento y desarrollo de <i>P. salmonis</i> . La línea celular en B fue expuesta con una concha cuyo duplicado presentaba la formación de CAP de 24 h. Las barras indican 10 µm. | 109 |
| Figura 6-10 Micrografías electrónicas de control negativo de los materiales de balsas jaulas y concha de chorito incubadas en agua salada por 48 h. Control negativo de HDPE MEB 1000x (5A), control negativo de PVC MEB 1000x (5B), control negativo de PA-Nylon MEB 1000x (5C), control negativo de PTFE-teflón MEB 1000x (5D), control negativo de concha de chorito MEB 1000x (5E) y control negativo de concha de chorito MEB 3000x (5F). Las barras indican 10 µm. | 116 |
| Figura 6-11. Micrografías electrónicas de HDPE, PVC, PA-nylon, PTFE-teflón y concha de chorito desafiados a <i>P. salmonis</i> en medio agua de mar incubados por 48 h a 15 °C. Las micrografías electrónicas corresponden a HDPE a 500x (A1), HDPE a 3000x (A2), PVC a 500x (B1), PVC a 3000x (B2), PA-nylon a 500x (C1), PA-nylon a | |

| | |
|---|-----|
| 3000x (C2), PTFE-teflón a 500x (D1), PTFE-teflón a 3000x (D2), concha de chorito a 500x (E1) y concha de chorito a 3000x (E2)..... | 118 |
| Figura 6-12. Microfotografías electrónicas de HDPE, PVC, PA-nylon, PTFE-teflón y concha de chorito desafiados a <i>P. salmonis</i> en medio MEM-4 incubados por 48 h a 15 °C. Las figuras corresponden a HDPE a 500x (A1), HDPE a 3000x (A2), PVC a 500x (B1), PVC a 3000x (B2), PA-nylon a 500x (C1), PA-nylon a 3000x (C2), PTFE-teflón a 500x (D1), PTFE-teflón a 3000x (D2), concha de chorito a 500x (E1) y concha de chorito a 3000x (E2)..... | 120 |
| Figura 6-13. Las microfotografías de microscopio invertido con luz polarizada corresponden a: cultivo celular normal de la línea CHSE-214 (8A), efecto citopático (ECP) característico del crecimiento y desarrollo de <i>P. salmonis</i> en células CHSE-214 (8B), ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que presentaba CAP en medio agua de mar (8C) y ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que presentaba CAP en medio MEM-4 (8D). C= Concha..... | 122 |
| Figura 6-14 Micrografías SEM de <i>P. salmonis</i> cultivados en medio sólido (IFOP-PsM11). 1A a un aumento de 1000x. 1B aumento a 3000x. Flechas azules zonas de aglomeración bacterias y flecha negra bacteria <i>P. salmonis</i> | 126 |
| Figura 6-15. Micrografía SEM de la colonia de <i>P. salmonis</i> (A), SEM-EDS de la colonia de <i>P. salmonis</i> (B), microanálisis de EDS de la colonia de <i>P. salmonis</i> (C)..... | 127 |
| Figura 6-16 Micrografía SEM de CAP en la superficie de concha de chorito (11A), SEM-EDS del CAP (11B), SEM-EDS de la superficie de la concha de chorito (11C), microanálisis de EDS del CAP (11D) y microanálisis de EDS de la superficie de la concha de chorito (11E)..... | 128 |
| Figura 6-17 Micrografía SEM de CAP en la superficie de PTFE-teflón (12A), SEM-EDS del CAP (12B), SEM-EDS de la superficie libre de CAP del PTFE-teflón (12C), microanálisis de EDS del CAP (12D) y microanálisis de EDS de la superficie del PTFE-teflón (12E)..... | 130 |
| Figura 6-18. Esquema de cuelga que fue utilizada para disponer diversos polímeros y conchas de chorito en el centro de cultivo..... | 133 |
| Figura 6-19. Cuelga que fue utilizada para disponer diversos polímeros y conchas de chorito en el centro de cultivo. Cada material fue previamente limpiado, desinfectado y esterilizado mediante UV y luego protegido mediante un embalaje utilizado para autoclave..... | 133 |
| Figura 6-20. Cuelga. Se observa la cuerda, el material envuelto y la pesa que lo sostiene..... | 133 |
| Figura 6-21. Cuelga. Se observa el material que fue sumergido. Se han retirado las envolturas. T= Teflón, P=Polietileno, C=Conchas, HDPE, Ny=Nylon..... | 133 |
| Figura 6-22 Detección de <i>P. salmonis</i> mediante PCR en conchas de chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) y algunos polímeros. L: Ladder, H2O: Control interno negativo, C+: Control positivo, Co(N°)i: Concha número cara interna, Co(N°)x: Concha número cara externa, Te: Teflón, PVC, Ny: Nylon, Pe: Polietileno. Se observa positividad en Co2i, Co3x y Ny..... | 136 |

Tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 2-1 Detalles del muestreo de sitios control realizados en la X Región de Los Lagos, Chile..... | 32 |
| Tabla 2-2 Detalle de especies y número de ejemplares capturados por centro muestreado | 34 |
| Tabla 2-3 Tipo y número de muestras para extracción de material genético obtenidas desde 6 centros de cultivo y 3 sitios control. Las muestras de moluscos fueron tomadas en duplicado. (*) Indica muestras en duplicado..... | 38 |
| Tabla 2-4 Tipo y número de muestras para extracción de material genético obtenidas desde 6 centros de cultivo y 3 sitios control. | 39 |
| Tabla 2-5 Cebadores, sondas y parámetros de ciclo para ensayos de PCR..... | 40 |
| Tabla 2-6 Resultados de los análisis de PCR binario para <i>P. salmonis</i> , e diferentes centros y para las diferentes matrices estudiadas. | 45 |
| Tabla 2-7 Resultados de Ct por de microcosmos y tiempo de evaluación..... | 48 |
| Tabla 2-8 Comparaciones múltiples por pares..... | 49 |
| Tabla 2-9 Metadata utilizada para la identificación de reservorios de <i>P. salmonis</i> en Chile..... | 51 |
| Tabla 3-1 Listado de aislados secuenciados y georreferenciados fue entregado al Cepario Nacional | 65 |
| Tabla 3-2 Ejemplo de proteínas que codifican para la resistencia a antibióticos en el aislado PC108..... | 72 |
| Tabla 3-3 Patógenos identificados en las muestras de agua, sedimento y biopelículas | 78 |
| Tabla 4-1 Presencia de <i>P. salmonis</i> en tejidos de <i>C. rogercresseyi</i> expresado como total y porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C)..... | 86 |
| Tabla 4-2. Presencia de <i>P. salmonis</i> mediante inmunohistoquímica en <i>C. rogercresseyi</i> adultos y chalimus IV según su ubicación en el interior o exterior del parásito..... | 87 |
| Tabla 4-3. Presencia de <i>P. salmonis</i> intra o extracelular en <i>C. rogercresseyi</i> mediante inmunohistoquímica..... | 89 |
| Tabla 5-1 Centro, código SIEP, especie y fecha de las visitas realizadas a los centros de cultivo en la X y XI región para aislamiento de Amebas. | 91 |
| Tabla 6-1 Diseño experimental de formación de complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) en superficie de concha de chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) en medio agua de mar. | 102 |
| Tabla 6-2. Diseño experimental de formación de CAP en concha de chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) tratadas con proteinasas..... | 103 |
| Tabla 6-3. Tratamiento del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) de 24 h con celulasa. | 104 |
| Tabla 6-4 Descripción de materiales de cultivo de balsas jaula empleados en el experimento. | 112 |
| Tabla 6-5. Controles negativos de muestras de materiales de balsas jaulas y concha de chorito..... | 113 |
| Tabla 6-6. Materiales de cultivo de balsas jaula y concha de chorito expuestos a MEM-10 con <i>Piscirickettsia salmonis</i> | 114 |
| Tabla 6-7. Materiales de cultivo de balsas jaula y concha de chorito expuestos a MEM-10 con <i>P. salmonis</i> | 114 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 6-8 Microanálisis elemental del conglomerado de <i>P. salmonis</i> cultivado en medio sólido correspondiente a la Fig. 6-10C..... | 127 |
| Tabla 6-9. Microanálisis elemental del CAP presente en superficie de la concha de chorito correspondiente a la Fig. 6-11B. | 128 |
| Tabla 6-10. Microanálisis elemental del CAP presente en superficie de la concha de chorito correspondiente a la Fig. 6-11C. | 129 |
| Tabla 6-11 Microanálisis elemental del CAP presente en superficie del PTFE-teflón correspondiente a la Fig. 6-12B..... | 130 |
| Tabla 6-12 Microanálisis elemental de la superficie del PTFE-teflón correspondiente a la Fig. 6-12C..... | 131 |
| Tabla 6-13 Presencia de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en conchas de chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) y en materiales plásticos utilizados en la salmonicultura y que fueron expuestos en un centro de cultivo de engorda afectado por piscirickettsiosis..... | 136 |

Lista de Acrónimos

| ACRONYM | MEANING |
|------------|--|
| AAA | Areas Aptas para la Acuicultura (Appropriate Areas for Aquaculture) |
| ACS | Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (AKA “barrios” or “neighbourhoods”) |
| ARG | Genes de resistencia a los antibióticos |
| CAD | Centro de Alta Diseminación |
| CSIRO | Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation |
| FIE | Fondo de Inversión Estratégica |
| GIS | Sistema de información geográfica |
| HAB | Florecimiento algal nocivo |
| IFOP | Instituto de Fomento Pesquero |
| INFA | Información ambiental |
| INTESAL | Instituto Tecnológico del Salmón |
| LBGMA | Ley sobre Bases Generales del Medio Ambiente, General Law on the Environment |
| LGPA | Ley de Pesca y Acuicultura |
| MINECON | Ministerio de Economía, Fomento y Turismo |
| MMA | Ministerio del Medio Ambiente |
| PSEVC | Programas Sanitarios Específicos de Vigilancia y Control |
| qPCR | PCR en tiempo real (cuantitativa) |
| RAMA | Reglamento Ambiental para la Acuicultura (Aquaculture Environmental Regulations) |
| RCAA | Reglamento de Arrendamiento y Permisos de Acuicultura |
| RESA | Reglamento de Medidas de Protección, Control y Erradicación de Enfermedades de Alto Riesgo Sanitario para las especies hidrobiológicas |
| RT-PCR | Transcriptasa reversa PCR |
| RT-qPCR | Transcriptasa inversa PCR en tiempo real |
| SAG | Servicio de Agricultura y Cría de Animales |
| SEIA | Evaluación de Impacto Ambiental del Sistema Nacional |
| SERNAPESCA | Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura |
| SIFA | Sistema de Fiscalización de la Acuicultura |
| SRS | <i>Síndrome rickettsial del salmón causado por infección con <i>Piscirickettsia salmonis</i></i> |
| SUBPESCA | Subsecretaría de Pesca y Acuicultura de MINECOM |
| MWCO | Molecular weight cut off |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| PBS | |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| CFU | |

Glosario Técnico

En el contexto de la fase de implementación del proyecto FIE V014 - Programa para la Gestión Sanitaria en Acuicultura - Dinámica ambiental de *P. salmonis*, se ha desarrollado el siguiente glosario para mejorar la comprensión de las actividades del equipo administrativo y contribuir a una comunicación más fluida entre equipos técnicos y administrativos.

| TÉRMINO | SIGNIFICADO |
|--------------------------------------|--|
| Actividad | Cualquier trabajo realizado en un proyecto. Puede ser sinónimo de tarea, pero en algunos casos, puede ser un nivel específico en la WBS (por ejemplo, una fase se divide en un conjunto de actividades, las actividades en un conjunto de tareas). Una actividad debe tener una duración y dará como resultado uno o más entregables. Una actividad generalmente tendrá requisitos de costo y recursos. |
| Dato | Información que puede ser analizada o utilizada en un esfuerzo por adquirir conocimiento o tomar decisiones. En nuestro caso, las mediciones de temperatura, salinidad y otra información ambiental, sanitaria o de producción se consideran datos. |
| Tomador de decisión | Una persona que toma decisiones. Un tomador de decisiones puede tomar decisiones en diferentes niveles jerárquicos. |
| Proceso de toma de decisiones | El proceso de pensamiento de seleccionar una opción lógica de las opciones disponibles. Al tratar de tomar una buena decisión, una persona debe sopesar los aspectos positivos y negativos de cada opción y considerar todas las alternativas. Para una toma de decisiones efectiva, una persona también debe poder pronosticar el resultado de cada opción, y en base a todos estos elementos, determina qué opción es la mejor para esa situación en particular. |
| Entregable | Cualquier artículo producido como el resultado de un proyecto o cualquier parte de un proyecto. El entregable del proyecto se diferencia de entregas provisionales que resultan de actividades dentro del proyecto. Un entregable debe ser tangible y verificable. Cada elemento de la WBS (actividad o tarea) debe tener uno o más entregables. |
| Implementación | Puede ser una fase en el ciclo de vida del proyecto en el que un producto se pone en uso. Además, un término utilizado como sinónimo de desarrollo. |
| Entrada | Algo puesto en un sistema o gastado en su operación para lograr y producir o un resultado. En nuestro caso, las entradas son diferentes datos, mapas o procesos de toma de decisiones. |
| Modelo | Un modelo puede venir en muchas formas, tamaños y estilos. Es importante enfatizar que un modelo no es el mundo real sino simplemente una construcción humana para ayudarnos a comprender mejor los sistemas del mundo real. En general, todos los modelos tienen una entrada de información, un procesador de información y una salida de resultados esperados. |
| Salidas | La salida se define como el acto de producir algo, la cantidad de algo que se produce o el proceso en el que se entrega algo. |
| Oceanógrafo | Científico que estudia y explica las complejas interacciones entre el agua de mar, el agua dulce, los casquetes polares, la atmósfera y la biosfera. Su trabajo principal es predecir cómo funcionan los océanos, así como averiguar cómo hacer un uso más eficiente y sostenible de sus recursos. |
| Director de proyecto | Un director de proyecto es un rol de gestión de proyectos en el que un individuo supervisa, supervisa y administra estratégicamente un proyecto desde un nivel ejecutivo. El director del proyecto es responsable de gestionar un proyecto a nivel estratégico. El director también revisa los informes de progreso periódicos y realiza ajustes de personal, financieros u otros para alinear el proyecto en desarrollo con objetivos de resultados más amplios. |

| TÉRMINO | SIGNIFICADO |
|---|--|
| Requerimientos | La declaración de los objetivos detallados del producto que describe las características y funciones y las limitaciones de rendimiento que se entregarán en el producto. Los requisitos proporcionan la base para aceptar el producto. |
| Riesgo | Una probabilidad o amenaza de daño, lesión, responsabilidad, pérdida o cualquier otro acontecimiento negativo causado por vulnerabilidades externas o internas, y que se puede evitar mediante una acción preventiva. |
| Modelamiento científico | La actividad científica cuyo objetivo es hacer que una parte o característica particular del mundo sea más fácil de entender, definir, cuantificar, visualizar o simular, haciendo referencia a los conocimientos existentes y generalmente aceptados. Requiere seleccionar e identificar aspectos relevantes de una situación en el mundo real y luego usar diferentes tipos de modelos para diferentes objetivos, tales como modelos conceptuales para comprender mejor, modelos operativos para operacionalizar, modelos matemáticos para cuantificar y modelos gráficos para visualizar el tema. |
| Stakeholder | Cualquiera y todos los interesados en el proyecto: clientes, patrocinadores, artistas intérpretes o ejecutantes, el público en general e incluso la familia y amigos de los participantes directos pueden considerarse partes interesadas. |
| Tarea | Un trabajo que requiere esfuerzo, recursos y que tiene un resultado concreto (un entregable). Una tarea puede ser de cualquier tamaño (un proyecto es una tarea muy grande). A veces, el término se usa para denotar un trabajo en un nivel particular en una jerarquía de Estructura de Desglose del Trabajo (WBS), por ejemplo, una fase se divide en un conjunto de actividades y una actividad en un conjunto de tareas. Excepto por este uso jerárquico, la actividad es sinónimo de tarea. |
| Dependencia de la tarea | Una relación en la que una tarea o hito se basa en otras tareas que deben realizarse (total o parcialmente) antes de que pueda realizarse. También se conoce como una relación lógica. |
| Estructura de desglose del trabajo (WBS) | Una tarea en un nivel bajo de la Estructura de Desglose del Trabajo en la que se realiza la contabilidad del proyecto. Por lo general, aproximadamente una semana de duración y la realiza un grupo de trabajo individual o pequeño. |
| Paquete de trabajo | Una tarea en un nivel bajo de la Estructura de Desglose del Trabajo en la que se realiza la contabilidad del proyecto. Por lo general, aproximadamente una semana de duración y la realiza un grupo de trabajo individual o pequeño. |
| Botella Niskin | Dispositivo para la obtención de muestras de agua de mar a una profundidad específica. |
| Sonicación | Ley de aplicación de energía de sonido para agitar partículas en una muestra, para diversos fines, como la extracción de múltiples compuestos de plantas, microalgas y algas marinas. |

Resumen Ejecutivo

La acuicultura en Chile es una actividad económica de alta relevancia para el país, cuya expansión ha generado importantes ingresos económicos, principalmente en la zona sur-austral. El significativo incremento de la producción acuícola durante las últimas tres décadas, y el cultivo de salmones en particular, ha traído consigo un incremento en la aparición de enfermedades de diversos tipos en los centros de producción. Piscirickettsiosis, la enfermedad causada por la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis*, es la enfermedad bacteriana más importante del cultivo de salmónidos en agua de mar en Chile y es considerada una seria amenaza a la sustentabilidad de esta importante industria. Esta bacteria representa la mayor causa de uso de antibióticos a nivel del cultivo industrial de salmónidos, producto de las pocas e inefectivas herramientas profilácticas de control para manejar la patología.

P. salmonis es una bacteria compleja, y a pesar de los importantes avances logrados en el conocimiento del agente durante los últimos años, su epidemiología aún tiene un gran número de factores desconocidos, involucrados en la mantención del agente dentro de las unidades productivas y el medioambiente en general. El desarrollo del presente estudio representa un apoyo a la compleja resolución del problema de controlar esta enfermedad, realizando estudios de los posibles reservorios y vectores involucrados en la mantención y diseminación de la enfermedad.

Este informe presenta los detalles del análisis de las muestras y los resultados de la detección de *P. salmonis* en diferentes matrices bióticas y abióticas recolectadas en los centros de producción de salmón bajo brotes activos de Piscirickettsiosis. Se realizaron seis campañas de muestreo en la región Austral de Chile (X, XI y XII regiones) con el apoyo del equipo IFOP liderado por el Dr. Sergio Contreras, en el que se recolectaron 36 muestras de agua, 36 muestras de sedimentos, 36 muestras de biopelícula, 94 muestras de peces, 3 muestras de zooplancton y 150 muestras de moluscos, las que posteriormente fueron utilizadas para la cuantificación, aislamiento, cultivo y secuenciamiento completo de *P. salmonis*. Adicionalmente se utilizaron muestras históricas de *P. salmonis* de colección de IFOP para el establecimiento de la dinámica poblacional de la bacteria en Chile. Se tomaron 6 muestras de agua de sitios geográficamente alejados de los centros de producción y cultivo de salmón, para ser usadas como controles negativos.

Las bacterias patógenas excretadas por los peces enfermos pueden acumularse en el agua, sedimento y biopelículas. En este estudio, todos los sitios fueron positivos para la presencia de *P. salmonis* con números que variaron de 10 a 9×10^3 células por litro de agua. Además, las muestras de agua recolectadas en tres de los seis centros tenían números de *P. salmonis* > 200 células L^{-1} . Vale la pena señalar que cuando se compararon los metadatos de los centros con los datos de *P. salmonis* en el agua, el centro 6 tiene el mayor índice de mortalidad reportado una semana antes y en el momento de la recolección de las muestras de agua. Por lo tanto, el mayor número de bacterias observadas en el agua es probablemente en respuesta a la prevalencia de la enfermedad en el centro y las bacterias desprendidas por peces infectados. De manera similar, el centro 2 tiene una alta mortalidad debido a SRS antes del muestreo y el número observado de *P. salmonis* en las muestras de agua corresponde a la prevalencia de la enfermedad en el centro.

Considerando que, *P. salmonis* se detectó constantemente en los sedimentos variando en números de 30 a 300 células por gramo de sedimentos. En este estudio, se detectaron niveles bajos de *P. salmonis* en las muestras de sedimentos recolectadas de todos los centros muestreados con el número más bajo encontrado en los sedimentos del centro 2. Cuando se compararon los metadatos del centro con los números de *P. salmonis* en el sedimento es evidente que en el ciclo anterior, dicho centro presentó las mortalidades más bajas debido a SRS, en comparación con otros centros muestreados. Por otro lado, el centro 1, que tenía tasas de mortalidad altas en el ciclo anterior, tenía el mayor número de *P. salmonis* en los sedimentos. Los resultados apuntan hacia la acumulación de *P. salmonis* en los sedimentos en respuesta a la prevalencia de la enfermedad. Además, se requiere un trabajo de investigación para determinar la duración de *P. salmonis* en los sedimentos, ya que los sedimentos pueden ser un reservorio importante de *P. salmonis*.

En comparación, solo una muestra de biofilm de un sitio (centro 6) tenía un número cuantificable de *P. salmonis* (200 células por gramo). En el momento del muestreo, este centro tenía el mayor número de mortalidad informada (aproximadamente el 3% de los peces). Es probable que *P. salmonis* de las jaulas con brote activo de la enfermedad se haya adherido a las biopelículas en las superficies más cercanas a las jaulas enfermas. En las muestras de biopelículas alejadas de las jaulas, no se detectó *P. salmonis*. Un estudio *in vitro* realizado por la Universidad de Chile reveló la presencia del complejo de adhesión Piscirickettsial (CAP) en teflón. Al relizar un estudio en campo, introduciendo cuerdas con distintos materiales utilizados en la salmicultura al interior de una jaula de cultivo de salmónes que presentaba mortalidades por SRS, el equipo de la Universidad de Chile encontró la presencia de *P. salmonis* en pequeños trozos de nylon sometidos a PCR tradicional. Esto sugiere que las biopelículas más cercanas a las jaulas con enfermedades pueden ser reservorios de *P. salmonis*, pero las biopelículas marinas alejadas de las jaulas tienen un potencial limitado para los reservorios de *P. salmonis*.

P. salmonis ha sido reportado de las especies de peces nativos de Chile *Eleginops maclovinus*, *Odontesthes regia*, *Sebastes capensis* y *Salilota australis*. En este estudio, hemos detectado sistemáticamente *P. salmonis* en las branquias de peces silvestres capturados alrededor de los centros de producción en el momento del muestreo. Se encontró que *Eleginops maclovinus* y *Sebastes capensis* portaban *P. salmonis*. De todos los órganos internos de los peces, solo se encontró un pez salvaje que muestra la presencia de infección por *P. salmonis*. El papel de la población de peces silvestres en la propagación de *P. salmonis* sigue sin estar claro y debe investigarse más a fondo.

En este estudio, se recolectaron y analizaron 150 muestras de moluscos alrededor de 5 centros de cultivo de salmón y no detectamos la presencia de *P. salmonis* en las muestras de tejido. La presencia de *P. salmonis* en los moluscos no se puede descartar por completo, ya que el tamaño de la muestra para este estudio es relativamente pequeño. Un estudio *in vitro* realizado por la Universidad de Chile reveló mediante MEB la presencia del complejo de adhesión Piscirickettsial (CAP) y de la bacteria *P. salmonis* en trozos de conchas de *Mytilus chilensis*. Al realizar estudios de infectividad, éstos resultaron positivo. Al relizar un estudio en campo, introduciendo cuerdas con trozos *Mytilus chilensis* al interior de un centro de cultivo que presentaba mortalidades por SRS, el equipo de la Universidad de Chile detectó la presencia de *P. salmonis* mediante PCR tradicional. Los resultados sugieren que *P. salmonis* posee la capacidad de adherirse formando CAP en la superficie de conchas de chorito y que la cercanía a las jaulas que presentan la enfermedad jugaría un rol en la difusión de la enfermedad. Sin embargo, se sugiere realizar investigaciones de campo adicionales, con un mayor número de centros y más moluscos, considerando la incorporación de análisis de viabilidad de la bacteria.

Recolectamos muestras de zooplancton con una red de barridos netos de 73 µm en tres ubicaciones seleccionadas al azar alrededor del centro de cultivo para determinar la presencia de *P. salmonis* en el zooplancton. Nuestro objetivo fue determinar si el zooplancton podría ser una fuente importante de *P. salmonis*, nuestros resultados de PCR fueron negativos para todas las muestras analizadas, lo que sugiere que es poco probable que el zooplancton sea un reservorio significativo de *P. salmonis*.

En el presente proyecto, nuestro objetivo fue comprender la dinámica poblacional de las cepas de *Piscirickettsia salmonis* que infectan los centros de cultivo de salmón en Chile, así como descifrar la virulencia y la resistencia a los antibióticos que tienen sus genomas. Para esto, seleccionamos 60 cepas de *P. salmonis* para la secuenciación completa del genoma. Los resultados del trabajo genómico llevado a cabo en el laboratorio del profesor Pierre-Edouard Fournier en la Universidad de Aix-Marsella sugieren la existencia de dos grupos filogenéticamente distantes. En resumen, el pan genoma de *P. salmonis* consistió en 1480 genes centrales, 2122 genes externos y 2434 genes únicos en la nube específicos para cepas individuales. Los genomas principales se dividen en dos grupos distintos. El aislado bacteriano PC100 fue de particular interés debido a la aparición de un gran número de genes de resistencia a los antibióticos presentó una agrupación de aislados con un conjunto de genes del núcleo diferenciado distintivo.

Para el establecimiento de los mecanismos y vías de difusión de *P. salmonis*, el grupo de la Universidad de Chile liderado por el Dr. Julio Larenas, realizó la recolección y análisis de muestras del ectoparásito *Caligus rogercresseyi*, desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) ubicado en la Región de Los Lagos, que presentaba un brote activo de SRS para detectar la presencia de la bacteria al interior del

ectoparásito. Se utilizó un tamaño muestral de 50 individuos por categoría (hembras, machos y chlimus IV), a los cuales se les realizó un análisis de tejido mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se determinó que un 42% de las hembras, un 28% de los machos y un 28% de los Chalimus IV presentaron una reacción positiva a la inmunohistoquímica. Un 81,6% de los individuos positivos presentaron la bacteria a nivel de tejido. Esto sugiere que *Caligus rogercresseyi* desempeña algún papel en la difusión de *P. salmonis*.

Con el apoyo del Grupo Etecma liderado por el Dr. Marcos Godoy, se realizaron también 8 campañas de muestro en centros de cultivo con brotes activos de SRS e historial de amebiasis branquial en años previos o diagnosticados previamente con Enfermedad Proliferativa Branquial (PGD) para la obtención de peces con signos clínicos de infección concomitante de *P. salmonis* y *P. perurans*, su posterior cultivo en laboratorio y estudio de tiempo de sobrevida de *P. salmonis* en ameba. El aislamiento y cultivo de *P. salmonis* a partir de las muestras de ameba resultaron negativos en todos los casos. Esto sugiere que la ameba no sería un vector de la enfermedad.

Executive Summary

Aquaculture in Chile is an economic activity of high relevance for the country, whose expansion has generated important economic income, mainly in the southern-austral zone. The significant increase in aquaculture production during the last three decades, and salmon farming in particular, has brought about an increase in the occurrence of diseases of various types in the production centers. Piscirickettsiosis, the disease caused by the intracellular bacterium *Piscirickettsia salmonis*, is the most important bacterial disease of salmonid culture in seawater in Chile and is considered a serious threat to the sustainability of this important industry. This bacterium represents the main cause of the use of antibiotics at the industrial salmon culture level, product of the few and ineffective prophylactic control tools to manage this pathology.

P. salmonis is a complex bacterium, and despite the important progress in knowledge about the agent during the last years, its epidemiology still has a large number of unknown factors, involved in the maintenance of the agent within the productive units and in the environment. The development of the present study is an important support to the resolution of the complex problem of controlling this disease, carrying out studies of the possible reservoirs and vectors involved in the maintenance and dissemination of the disease.

This report presents the details of the analysis of samples and results of the detection of *P. salmonis* in different biotic and abiotic matrices collected in the centers of production of salmon under active outbreaks of Piscirickettsiosis. Six sampling cruises were done in southern regions of Chile (X, XI and XII regions) supported by the IFOP team led by Dr. Sergio Contreras, in which 36 water samples, 36 sediment samples, 36 biofilm samples, 94 fish samples, 3 samples of zooplankton and 150 samples of molluscs were collected, which were later used for the quantification, isolation, culture and complete sequencing of *P. salmonis* to ascertain different aspects of the population dynamics of the bacteria in Chile. Additionally, historical samples of *P. salmonis* from the IFOP collection were completely sequenced. Six water samples were taken from sites geographically far from the salmon production and culture centers, to be used as negative controls.

Pathogenic bacteria excreted by diseased fish can accumulate in water, sediment and biofilms. In this study, all sites were positive for the presence of *P. salmonis* with numbers ranging from 10 to 9×10^3 cells per liter of water. In addition, water samples collected in three of the six centers had numbers of *P. salmonis* > 200 cells L^{-1} . It is worth noting that when center metadata were compared with the *P. salmonis* data in the water, center 6 had reported the highest mortality rate a week before and at the time of the water samples collection. Therefore, the greatest number of bacteria observed in water is due probably in response to the prevalence of the disease in the center and the bacteria released by infected fish. Similarly, center 2 has a high mortality due to SRS before sampling and the observed number of *P. salmonis* in the water samples corresponds with the prevalence of the disease in the center.

Whereas, *P. salmonis* was constantly detected in the sediments, varying in numbers from 30 to 300 cells per gram of sediments, in this study, relatively low levels of *P. salmonis* were detected in sediment samples collected from all the sampled centers, with the lowest number found in the sediments of center 2. When center metadata were compared with the numbers of *P. salmonis* in the sediment it became evident that in the previous production cycle, center 2 presented the lowest mortalities due to SRS, in comparison with other sampled centers. On the other hand, center 1, which had high mortality rates in the previous production cycle, had the highest number of *P. salmonis* in the sediments. These results point towards the accumulation of *P. salmonis* in the sediments in response to the prevalence of the disease. In addition, further research is required to determine the persistence in time of *P. salmonis* in the sediments, since the sediments can be an important reservoir of *P. salmonis*.

In comparison, only one sample of biofilm from one site (center 6) had a quantifiable number of *P. salmonis* (200 cells per gram). At the time of sampling, this center had the highest mortality reported (approximately 3% of the fish). It is probable that *P. salmonis* of the cages with an active outbreak of the disease has adhered to biofilms on the surfaces closest to the cages with disease. In biofilm samples removed from the cages themselves, *P. salmonis* was not detected. However, an in vitro study conducted by the University of Chile

team, revealed the presence of the *Piscirickettsial adhesion complex* (CAP) in Teflon. When carrying out a study in the field, introducing ropes with different materials used in salmon farming inside a salmon culture cage that showed mortalities due to SRS, the team from the University of Chile found the presence of *P. salmonis* in small pieces of nylon subject to traditional PCR. This suggests that the biofilms closest to disease cages may be reservoirs of *P. salmonis*, but marine biofilms far away from cages have limited potential to be *P. salmonis* reservoirs.

P. salmonis has been reported from several native fish species of Chile: *Eleginops maclovinus*, *Odontesthes regia*, *Sebastes capensis* and *Salilota australis*. In this study, we systematically detected *P. salmonis* in the gills of wild fish caught around production centers at the time of sampling. It was found that *Eleginops maclovinus* and *Sebastes capensis* carried *P. salmonis*. Of all the internal organs of the fish, only one wild fish was found with evidence of *P. salmonis* infection. The role of wild fish populations in the spread of *P. salmonis* remains unclear and should be further investigated.

In this study, 150 mollusc samples were collected around 5 salmon culture centers. When analyzed, the presence of *P. salmonis* was not detected in the tissue samples. The presence of *P. salmonis* in molluscs cannot be ruled out completely, since the sample size in this study is relatively small. An in vitro study conducted by the University of Chile team using SEM, revealed the presence of the *Piscirickettsial adhesion complex* (CAP) and the bacteria *P. salmonis* in pieces of the shell of the mussel *Mytilus chilensis*. When carrying out studies of infectivity, they turned out to be positive. When carrying out a study in the field, introducing ropes with chunks of *Mytilus chilensis* inside a culture center that showed mortalities by SRS, the team of the University of Chile detected the presence of *P. salmonis* by means of traditional PCR. The results suggest that *P. salmonis* has the ability to adhere forming CAP on the surface of mussel shells and that the proximity to the cages that present the disease would play a role in the spread of the disease. However, additional field investigations are suggested, that contemplate a greater number of centers and more molluscs, considering the incorporation of viability analyzes for the bacteria.

Samples of zooplankton were collected towing a net of 73 µm in three randomly selected locations around the culture center to determine the presence of *P. salmonis* in the local zooplankton. The objective was to determine if zooplankton could be an important source of *P. salmonis*. PCR results were negative for all samples analyzed, which suggests that it is unlikely that zooplankton is a significant reservoir of *P. salmonis*.

In the present project, one objective was to understand the population dynamics of the *Piscirickettsia salmonis* strains that infect the salmon culture centers in Chile, as well as to decipher the virulence and resistance to antibiotics displayed by their genomes. For this, 60 strains of *P. salmonis* were selected for the complete sequencing of their genome. The results of the genomic work carried out in the laboratory of Professor Pierre-Edouard Fournier at the University of Aix-Marseille suggest the existence of two phylogenetically distant groups. In summary, the pan-genome of *P. salmonis* consisted of 1480 central genes, 2122 external genes and 2434 unique genes in the cloud specific for individual strains. The main genomes are divided into two distinct groups. The bacterial isolate PC100 was of particular interest because the appearance of a large number of antibiotic resistance genes presented a cluster of isolates with a set of distinctive differential core genes.

For the establishment of the mechanisms and routes of diffusion of *P. salmonis*, the team of the University of Chile led by Dr. Julio Larenas, collected and analysed samples of the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*, from a production center of Atlantic salmon (*Salmo salar*) located in the Los Lagos Region, which had an active outbreak of SRS with the aim to detect the presence of the bacteria inside the ectoparasite. A sample size of 50 individuals per category was used (females, males and chalimus IV), to which an immunohistochemical analysis of their a tissue was carried out. It was determined that 42% of females, 28% of males and 28% of Chalimus IV presented a positive reaction to immunohistochemistry. 81.6% of the positive individuals presented the bacterium at the tissue level. This suggests that *Caligus rogercresseyi* does play a role in the spread of *P. salmonis*.

With the support of the Etecma Group led by Dr. Marcos Godoy, 8 sampling campaigns were also carried out in production centers with active outbreaks of SRS and a history of branchial amebiasis in previous years or previously diagnosed with Branchial Proliferative Disease (PGD). The aim of this effort was to obtain fish with

clinical signs of concomitant infection of *P. salmonis* and *P. perurans*, for their subsequent laboratory culture and study of the survival time of *P. salmonis* in the amoeba. The isolation and culture of *P. salmonis* from the amoeba samples were negative in all cases. This suggests that the amoeba would not be a vector of the disease.

1 Introducción

1.1 Sobre este informe

El síndrome de *Rickettsia* del salmón (SRS), causado por *Piscirickettsia salmonis*, sigue siendo un problema importante para la sostenibilidad de la industria del salmón en Chile (Saavedra et al., 2017). Las altas tasas de mortalidad debidas a las infecciones por *P. salmonis* han provocado graves pérdidas económicas para la industria de la acuicultura de salmónidos en Chile, causando cientos de millones de dólares estadounidenses en pérdidas. SRS sigue siendo una gran amenaza para la acuicultura de agua salada y salobre en Chile (Bustos, 2006). Esto se debe principalmente a la falta de buenas vacunas, las vacunas actuales tienen una eficacia variable a largo plazo, ya que la bacteria tiene una naturaleza intracelular (Carryn et al., 2003). Además, es difícil controlar la infección con antibióticos, probablemente debido a la dificultad para mantener una concentración insuficiente de antibióticos dentro del huésped (Mikalsen et al., 2008).

Se ha informado SRS en especies de salmónidos que incluyen trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), salmón chinook, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), salmón coho, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) y salmón del Atlántico, *Salmo salar* (Fryer and Hedrick, 2003a). Sin embargo, se informa que los brotes de la enfermedad son más graves en la trucha arco iris (Jakob et al., 2014). Además, las bacterias similares a *Piscirickettsia* que causan mortalidad en peces no salmónidos también se han reportado en lubina blanca (*Atactoscion nobilis*), lubina negra (*Dicentrarchus sp.*), Tilapia (*Oreochromis niloticus* y *Sarotherodon spp.*) Y panaque de ojos azules (*Panaque suttoni*) (Mauel and Miller, 2002a). Entre las causas infecciosas de mortalidad en el cultivo del salmón del Atlántico en 2015, el 78,9% se asoció con brotes de enfermedad de *Piscirickettsiosis* (SERNAPESCA, 2016a).

Actualmente, no existen vacunas comerciales de alta eficacia y suficiente cobertura temporal para el control de la *piscirickettsiosis* (Rozas y Enríquez, 2014), por lo que la terapia con antibióticos se ha utilizado ampliamente en los centros marinos para reducir las pérdidas debidas a esta enfermedad. En 2015, se usaron aproximadamente 557.2 toneladas de antibióticos en la industria del salmón y la mayoría de los antibacterianos utilizados (94%) se administraron para tratar infecciones por *P. salmonis* (SERNAPESCA, 2016b).

El SRS ha sido principalmente reportado en agua de mar y agua de estuario (Branson and DIAZ-MUNOZ, 1991; Cvitanich et al., 1995; Rozas and Enríquez, 2014). La prevalencia de SRS se asocia con la temperatura del agua, el tiempo de cultivo en el mar, la distancia y el número de centros vecinos con SRS (Rees et al., 2014a). Se ha informado que una correlación positiva entre la temperatura del agua, el tiempo en el agua salada y el número de vecinos infectados con SRS predice una alta probabilidad de que un centro reporte el SRS (Rees et al., 2014b).

En los últimos 20 años, se han realizado innumerables esfuerzos públicos y privados para desarrollar tecnologías y enfoques para controlar enfermedades, incluida la *piscirickettsiosis*. Estos esfuerzos han sido financiados con recursos privados y fiscales, lo que ha dado como resultado iniciativas que han buscado desarrollar vacunas de todo tipo, incluidas: inactivadas, subunidades y en vivo. Desafortunadamente, los resultados de estos esfuerzos no siempre han sido adecuados para el sector. Asimismo, se han financiado investigaciones y desarrollos en los campos de: selección genética para enfermedades, terapias alternativas a los antimicrobianos tradicionales, desarrollo de dietas funcionales, inmunoestimuladores, estudios epidemiológicos y bioseguridad. Nuevamente, estos esfuerzos no siempre han logrado el impacto deseado de disminuir los efectos de la *piscirickettsiosis* en los salmónidos cultivados.

Aunque en los últimos años ha habido un claro progreso en la calidad de la investigación aplicada en el sector de la acuicultura, así como en el número de grupos de investigación especializados que presentan resultados relevantes en términos de genética y microbiología del patógeno, no ha sido posible transferir estos avances para mejorar la producción en el campo.

Los principales vacíos en nuestro conocimiento que limitan nuestra capacidad para controlar adecuadamente la enfermedad SRS a nivel del centro de producción ha sido nuestro limitado conocimiento del ciclo de vida de las bacterias, en particular: su persistencia en el medio ambiente en diversas condiciones y su capacidad para generar reservorios. El grado en que se transmite a los centros de producción de salmón mediante vectores mecánicos o biológicos, y su interacción con la fauna marina salvaje (peces o no peces) es en gran parte desconocido. El trabajo de investigación propuesto sobre *P. salmonis* apunta a obtener información muy necesaria sobre la dinámica poblacional de las cepas de *P. salmonis* que infectan los centros de salmón en Chile.

Los objetivos generales en relación a Vectores y Reservorios de *P. salmonis* incluyen: la detección cuantitativa de *P. salmonis* en reservorios o bancos bióticos potenciales (peces, artrópodos, moluscos y amebas), reservorios abióticos (agua, sedimentos y biopelículas), mecanismos potenciales de diseminación de la enfermedad desde los reservorios y la importancia biológica de los reservorios. En resumen, este proyecto intenta alcanzar los siguientes cuatro objetivos:

1. Identificación de reservorios (bióticos y abióticos) y de vectores de *P. salmonis*
2. Determinación de la dinámica poblacional genómica de cepas de *P. salmonis*.
3. Establecimiento de los mecanismos y rutas de diseminación de *P. salmonis* y su relación con variables ambientales.
4. Determinar la importancia biológica de los reservorios de *P. salmonis*

| Nº | Nombre Etapa | Descripción | Nº | Actividades a Realizar por Etapa | Ubicación en el informe |
|----|--|--|------|---|--------------------------------|
| 1 | Vectores y reservorios de <i>P. salmonis</i> | Identificación y cuantificación de reservorios (bióticos y abióticos) de vectores de <i>P. salmonis</i> . | 1.1 | Colecta y análisis de peces | Sección 2 del presente informe |
| | | | 1.2 | Colecta y análisis de artrópodos | Sección 2 del presente informe |
| | | | 1.3 | Colecta y análisis de moluscos | Sección 2 del presente informe |
| | | | 1.4 | Colecta y análisis de muestras agua | Sección 2 del presente informe |
| | | | 1.5 | Colecta y análisis de muestras de sedimentos | Sección 2 del presente informe |
| | | | 1.6 | Muestreo y análisis de Biopelículas | Sección 2 del presente informe |
| | | Establecimiento de mecanismos y vías de difusión de <i>P. salmonis</i> . Cuantificación del número de <i>P. salmonis</i> en moluscos, piojo de mar, amebas y otros para determinar posibles mecanismos de diseminación | 1.7 | Colecta y análisis de muestras de moluscos (~100) | Sección 4 del presente informe |
| | | | 1.8 | Muestras (swab) de branquias de peces para análisis de amebas (~150) | Sección 4 del presente informe |
| | | | 1.9 | Muestreo y análisis de muestras de piojos de mar (~150) | Sección 4 del presente informe |
| | | Determinación de la dinámica poblacional genómica de cepas de <i>P. salmonis</i> | 1.10 | Metagenómica de muestras de biopelícula | Sección 3 del presente informe |
| | | | 1.11 | Metagenómica de muestras de agua | Sección 3 del presente informe |
| | | | 1.12 | Metagenómica de muestras de sedimento | Sección 3 del presente informe |
| | | Determinación de la importancia biológica de reservorios y vectores: en ameba, piojo de mar y moluscos. | 1.13 | Experimentos de cultivo de amebas en laboratorio con <i>P. salmonis</i> | Sección 5 del presente informe |
| | | | 1.14 | Tiempo de sobrevivencia de <i>P. salmonis</i> en la ameba | Sección 5 del presente informe |

1.2 Antecedentes

La epidemiología de *P. salmonis* es relativamente desconocida. *P. salmonis* es considerado endémico en áreas de cultivo de salmón del Atlántico en Chile (Rozas and Enríquez, 2014). Una bacteria endémica en un ambiente generalmente solo causa una enfermedad esporádica, pero puede inducir una epizootia en los confines cercanos presentes en las instalaciones de acuicultura (por ejemplo, redes). Se ha sospechado la existencia de reservorios marinos de *P. salmonis*, pero estos siguen siendo relativamente desconocidos. Hay una escasez de información sobre la caracterización (fenotípica y genética) de *P. salmonis*, especificidad del hospedador, distribución geográfica, reservorios naturales, hospedadores alternativos y rutas de transmisión (Otterlei et al., 2016).

Se ha sospechado la existencia de reservorios marinos de *P. salmonis*, pero estos siguen siendo relativamente desconocidos, con la excepción de la lubina blanca, la trucha arco iris y otros peces marinos no salmónidos que actúan como anfitriones. La presencia de *P. salmonis* y organismos similares a *P. salmonis* entre los peces marinos (Chen et al., 2000) y en bacterio-plancton del agua de mar (Mauel and Fryer, 2001) sugieren un potencial reservorio marino para la bacteria.

Actualmente, no hay información sobre la distribución de *P. salmonis* en el medio marino fuera del pez huésped, en particular, su presencia en el agua, sedimentos, biopelículas, plancton, isópodos, parásitos externos y amebas. Aunque existe evidencia anecdótica sobre la participación de parásitos externos e isópodos ameba, no se sabe en qué medida estos organismos desempeñan un papel en la transmisión de la enfermedad. En la última década, gracias a los rápidos avances en biología molecular, se ha logrado un progreso significativo en la comprensión del genoma de *P. salmonis* y otras bacterias similares a *P. salmonis*. Las técnicas moleculares han permitido detectar y diferenciar con precisión las cepas patógenas, genotipo de las bacterias sin cultivarlas e identificar los mecanismos genéticos involucrados en la patogénesis.

1.3 Etiología del síndrome de Rickettsia del salmón (SRS)

P. salmonis, es una bacteria facultativa, intracelular, aerobia, gramnegativa, no móvil y pertenece a la familia Piscirickettsiaceae de la clase γ -proteobacteria (Rozas and Enríquez, 2014). En Chile, al menos dos genogrupos (OF-89 y EM-90) han sido identificados. El análisis de la secuenciación genómica de aislamientos pertenecientes a ambos genogrupos (LF-89 y EM-90) ha mostrado una gran heterogeneidad genética entre los genogrupos (Bohle et al., 2014; Saavedra et al., 2017). En otras partes del mundo, los microorganismos que son *piscirickettsia* o *rickettsia* (incluyendo todos los patógenos de peces intracelulares facultativos) están etiquetados como PLO (*piscirickettsia*-like organism) o RLO (*rickettsia*-like organism) (Mauel and Miller, 2002b). También se informa que los PLO y RLO están asociados con síntomas de tipo SRS en muchas especies de peces. El papel de los PLO y RLO como agente causante de SRS sigue sin estar claro. Más recientemente, Morrison et al., informaron en Australia, la presencia de un organismo similar a *Rickettsia* de Tasmania (TRLO, por sus siglas en inglés) en salmones de áreas de acuicultura sin antecedentes de TRLO asociados con la enfermedad (Morrison et al., 2016). El análisis de las secuencias de ADNr de este aislado indicó que la TRLO mostró similitud con el aislado de *P. salmonis* EM90. Sin embargo, en un estudio anterior se detectó una eliminación de 19 pares de bases en la región espaciadora transcrita interna (ITS) 16S-23S de TRLO, lo que sugiere la existencia de divergencia genética (Corbeil et al., 2005). Por otro lado, se encontró que un organismo similar a *Piscirickettsia* que causa enfermedad en la tilapia hawaiana, no produjo un amplicón con PCR específica de *P. salmonis* (cepa EM-90) (Mauel et al., 2003). La heterogeneidad entre los grupos genéticos conocidos y la diversidad existente de RLO resalta la naturaleza evolutiva de SRS.

1.4 Modo de transmisión de *P. salmonis*

Se sabe que *P. salmonis* sobrevive y se replica en vacuolas citoplásmicas unidas a membrana en células de peces infectados, lo que lleva a una infección sistémica, conocida como SRS. Es menos probable que se transmita de peces adultos infectados a jóvenes y, con mayor frecuencia, de adultos a adultos. La transmisión vertical de la enfermedad también puede ocurrir debido a la presencia de *P. salmonis* en la gónada de peces infectados y posteriormente en los huevos fertilizados. (Smith et al., 1996). Sin embargo, este modo de infección se ha controlado con éxito mediante la selección de poblaciones reproductivas libres de la enfermedad.

La ruta de transmisión de la enfermedad no se comprende completamente, sin embargo, se ha informado que la penetración de la piel y/o las agallas del salmón por *P. salmonis* ocasiona el inicio de la infección en los animales experimentales (Smith et al., 1999; Smith et al., 2004). En estudios realizados por Smith et al. (1999), en la ruta de entrada de *P. salmonis* en la trucha arco iris, se informó que la bacteria penetra en la piel en ausencia de lesión y sin la ayuda de vectores. Además, se demostró que *P. salmonis* alcanza los capilares branquiales y se disemina a través del cuerpo en un tiempo relativamente corto. La exposición oral no se considera una vía importante de transmisión, ya que se ha teorizado que el bajo pH y las enzimas digestivas en el estómago pueden conducir a la inactivación de la bacteria. En estudios similares con salmón del Atlántico, las branquias se han reportado como portales de entrada para la transmisión natural de *P. salmonis* (Almendras et al., 1997).

Se ha demostrado la transmisión horizontal de enfermedades en el agua de mar en poblaciones de salmón en condiciones de laboratorio. Se han reportado altas mortalidades en peces cohabitantes (Rozas-Serri et al., 2017), lo que sugiere transferencia de pez a pez de *P. salmonis*. La transmisión horizontal de *P. salmonis* se ha demostrado en ausencia de vectores en el salmón Coho en agua de mar y agua dulce (Cvitanich et al., 1991). La transferencia horizontal de *P. salmonis* de pez a pez se reconoce como el principal modo de infección (Almendras et al., 1997; Fryer and Hedrick, 2003b) También se ha informado sobre la supervivencia prolongada de bacterias en el agua de mar (Lannan and Fryer, 1994). En cuanto a muchas enfermedades que ocurren naturalmente en la naturaleza, la infección se vuelve más grave en entornos de acuicultura abarrotados.

La transmisión horizontal de SRS se ha demostrado a través de contacto directo entre peces (Almendras and Fuentealba, 1997) y el riesgo de infección aumenta con el aumento de la densidad de los peces. Es posible que los peces infectados liberen *P. salmonis* en la columna de agua (p. ej., se excreta en la bilis, las heces y la orina), lo que a su vez conduce a la infección de peces sanos, especialmente cuando se cultivan en alta densidad. Por lo tanto, es posible que la transmisión horizontal de enfermedades en aguas marinas sea muy probable sin ningún vector.

Dado que *P. salmonis* puede replicarse en líneas celulares derivadas de insectos y ranas (Birkbeck et al., 2004), es posible que otros animales marinos puedan ser huéspedes secundarios. Además, un isópodo parásito asociado con el salmón de cultivo en Chile (*Ceratothoa gaudichaudii*) también se identifica como hospedador de *P. salmonis*. Las especies de peces marinos también son sospechosas como reservorios, pero no están probadas (Rozas and Enríquez, 2014). Además, *P. salmonis* no solo se restringe a los hospedadores de salmónidos, ya que la enfermedad también se ha reportado en no salmónidos (McCarthy et al., 2005). En consecuencia, es posible que exista un vector y varios reservorios.

1.5 Prevalencia de patógenos de peces en ambientes acuáticos

Una serie de bacterias patógenas que se producen naturalmente en el medio marino o que son excretadas por los peces enfermos pueden penetrar en otros peces, sedimentos, plancton y agua marina. Se detectaron bacterias *Vibrio vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en peces, sedimentos, plancton y agua marina (Givens et al., 2014; Martínez-Urtaza et al., 2012). De manera similar, los patógenos de peces *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum* y *Aeromonas salmonicida* se han detectado en peces, agua y sedimentos (Schmidt et al., 2000).

El tiempo de supervivencia de las bacterias patógenas depende entonces de las condiciones ambientales, se podría esperar una supervivencia prolongada a bajas temperaturas del agua. Se han llevado a cabo investigaciones limitadas sobre la prevalencia, la supervivencia y el transporte de *P. salmonis* en el medio acuático. Los mecanismos de patogenicidad en el ambiente marino se entienden de manera imprecisa, con mecanismos probables que involucran la capacidad de la bacteria para unirse y formar biopelículas.

1.6 El agua y los sedimentos como fuente de *P. salmonis*

P. salmonis puede sobrevivir hasta 14 días en agua salada (Lannan and Fryer, 1994), solo un estudio informó bacterias de vida libre después de hasta 40 días en el agua de mar que rodea un centro con brote de enfermedad (Olivares and Marshall, 2010). Se sabe que *P. Salmonis* está inactivo por encima de 20°C y el óptimo para la replicación es entre 15-18°C. No hay información disponible hasta la fecha sobre la prevalencia de *P. salmonis* alrededor de los centros de peces.

Bacterias marinas como *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, y *Aeromonas salmonicida* han sido detectadas en agua y sedimentos alrededor de centros de producción (Givens et al., 2014; Schmidt et al., 2000). Sin embargo, no se dispone de información sobre la presencia o el potencial de supervivencia de *P. salmonis* en el agua y los sedimentos. Es posible que *P. salmonis* sobreviva en sedimentos acuáticos que pueden resuspenderse en la columna de agua con el tiempo.

1.7 Biopelícula marino como reservorio potencial de *P. salmonis*

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). Las bacterias patógenas como el *P. salmonis* pueden incrustarse y prosperar en esas biopelículas. En las biopelículas, las bacterias están protegidas de la desecación, el aumento de la disponibilidad de nutrientes, los depredadores y tienen una mayor resistencia a los antibióticos (Branda et al., 2005). Muchas bacterias ambientales y patógenas, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* producen biopelículas como una estrategia de supervivencia. Marshall et al., (2012) demostraron la producción de biopelículas por células de *P. salmonis* y plantearon la hipótesis de que podría prolongar la supervivencia de las bacterias en el medio ambiente (Marshall et al., 2012). Por lo tanto, es posible que la biopelícula sea la fuente de contagio para los peces cultivados. Hasta la fecha, solo se ha realizado un estudio sobre la presencia de *P. salmonis* en las biopelículas alrededor de las granjas infectadas con resultados no concluyentes (Olivares and Marshall, 2010). Las biopelículas también se han reportado como un reservorio importante para *Neoparamoeba pemaquidensis*, una ameba patógena de salmónidos (Tan et al., 2002). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la presencia y supervivencia de *P. salmonis* en las biopelículas alrededor de los centros de acuicultura.

1.8 Los salmónidos silvestres un reservorio potencial de *P. salmonis*

Los brotes de SRS en el salmón de cultivo pueden contribuir a las infecciones en peces en medio marino, ya que la presencia de *P. salmonis* en la población de peces silvestres está bien establecida. La caracterización genética de *P. salmonis* en la población de peces nativos del sur de Chile ha demostrado que está estrechamente relacionada con la cepa EM-90 (Contreras-Lynch et al., 2015). Esto sugiere que las poblaciones de peces silvestres son un reservorio potencial y que pueden contribuir a la evolución de cepas más virulentas y la transmisión de enfermedades dentro y entre las especies de peces. Sin embargo, la extensión de la prevalencia de la cepa EM-

90 en la población de peces silvestres alrededor de los centros de cultivo de salmón en Chile sigue siendo desconocida.

1.9 Moluscos como reservorio potencial de *P. salmonis*

Muchas bacterias viven en estrecha relación con los protozoos, y algunas especies de amebas y ciliados pueden ingerir bacterias patógenas, empaquetarlas en estructuras membranosas y liberarlas al medio ambiente. Las bacterias que se han empaquetado son más resistentes al estrés y tienen más posibilidades de sobrevivir que las bacterias libres en el medio ambiente (Denoncourt et al., 2014).

Hay muchos crustáceos parásitos en el medio marino que podrían servir como vectores para *P. salmonis* (Fryer et al., 1992). Se planteó la hipótesis de que *P. salmonis* presente en el agua y los sedimentos puede ser concentrado mecánicamente por pequeños organismos que filtran el agua, como los peces micrófagos, los crustáceos pequeños o los moluscos o incluso algunos protozoos como la ameba (Drancourt et al., 2002; Kotlowski et al., 2004). El isópodo parásito *Ceratothoa gaudichaudii*, comúnmente asociado con el salmón de cultivo en Chile, se identificó como hospedador de *P. salmonis* mediante una prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (Fryer and Hedrick, 2003b).

1.10 Bacterioplancton y zooplancton como reservorios de *P. salmonis*

Algunas PLO son genéticamente muy similares a *P. salmonis*, similares a las típicas *P. salmonis* que se han aislado a 10 m de profundidad en bacterioplancton de las aguas costeras de Oregon (Mauel and Fryer, 2001), a la infección por *Piscirickettsia salmonis* en salmón del Atlántico *Salmo salar* en Noruega y al SRS detectado con frecuencia después de la floración de algas y se observó que los peces se alimentaban de zooplancton (Olsen et al., 1997).

2 Identificación y cuantificación de reservorios (bióticos y abióticos) de vectores de *P. salmonis*

2.1 Selección de centros de cultivo y coordinación de muestreos.

La selección de centros se ha realizado sobre la base de la propuesta técnica, que consideró priorizar sitios en brotes de Piscirickettsiosis en sectores de Chiloé Central (Región de Los Lagos), Fiordo Aysén (Región de Aysén) e Isla Capitán Aracena (Región de Magallanes).

Sobre la base de consultas con varias empresas productoras de salmón con concesiones en las zonas previamente definidas y el apoyo, con información actualizada de mortalidades en centros de cultivo asociadas a Piscirickettsiosis, entregada por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, se logró el apoyo y autorización de muestreo de parte de seis centros de cultivo ubicados en las regiones de Los Lagos (4) y Aysén del Gral. Carlos Ibañez del Campo (2). Adicionalmente, se realizaron 3 muestreos en mar abierto, los que fueron utilizados como controles negativos. En el mapa a continuación se muestra el detalle Figura 2-1.

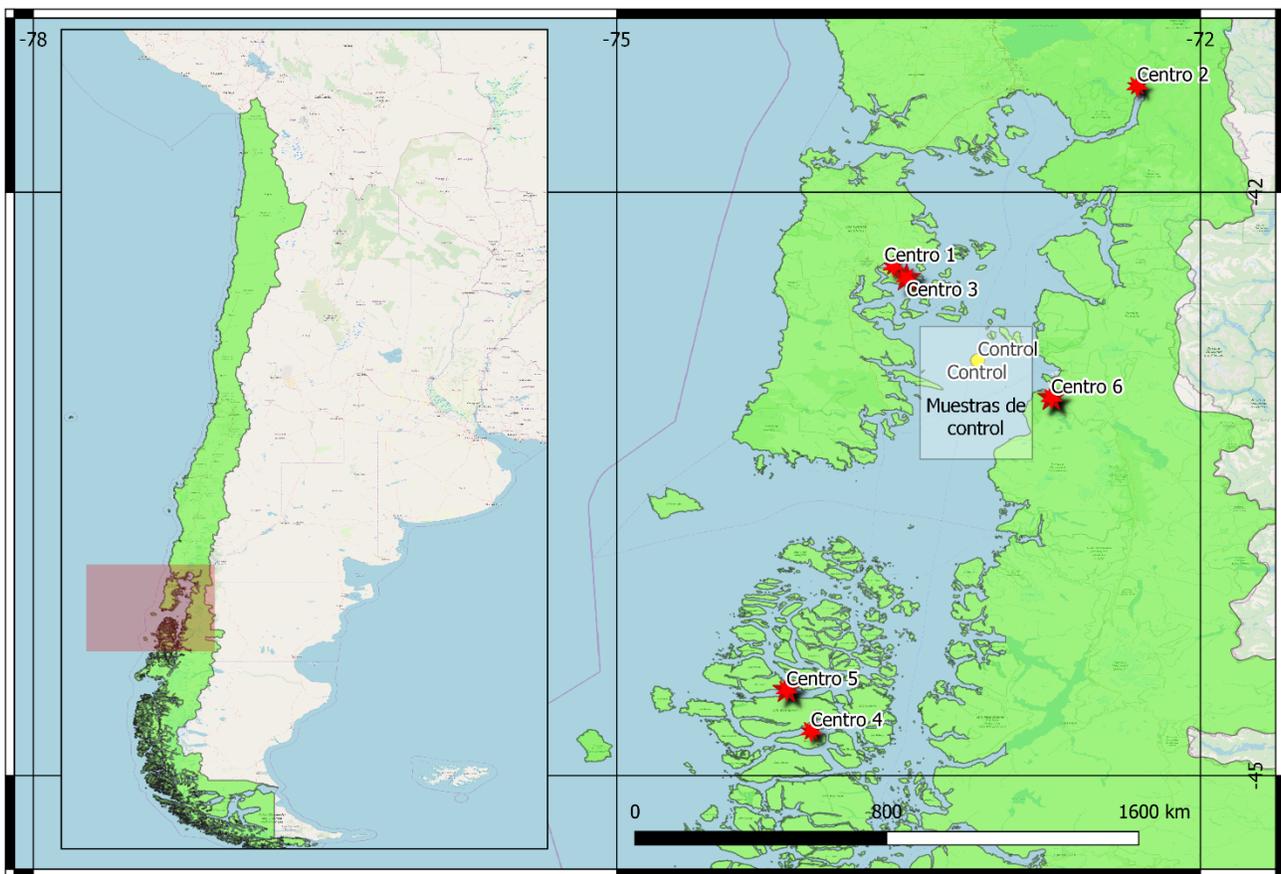


Figura 2-1 Mapa ubicación de los sitios de muestreo y control utilizados en el presente estudio.

En el centro de cultivo 1, muestreado el día 05 de julio del 2018, se obtuvo las siguientes muestras:

- 3 muestras de agua de mar en duplicado
- 3 muestras de sedimento en duplicado
- 3 muestras de biopelículas (raspado de boyas, redes etc. en jaulas con brote) en duplicado
- 3 muestras de zooplancton
- 15 muestras de moluscos adheridos a boyas, redes, cuerdas, etc. en duplicado
- 13 placas sembradas desde mortalidad fresca con signología asociada a Piscirickettsiosis, para aislamiento de la bacteria

Para el centro de cultivo 2, muestreado el día 21 de agosto del 2018, el detalle de las muestras obtenidas fue el siguiente:

- 3 muestras de agua de mar en duplicado
- 3 muestras de sedimento en duplicado
- 3 muestras de biopelículas (raspado de boyas, redes etc. en jaulas con brote) en duplicado
- 3 muestras de zooplancton
- 13 placas sembradas desde mortalidad fresca con signología asociada a SRS, para aislamiento de la bacteria.
- No se obtuvieron muestras de moluscos debido a la baja salinidad del sector donde se emplaza el centro

Para el tercer muestreo, efectuado el día 13 de septiembre del 2018, se obtuvieron las siguientes muestras:

- 3 muestras de agua de mar en duplicado.
- 3 muestras de sedimento en duplicado
- 3 muestras de biopelículas (raspado de boyas, redes etc. en jaulas con brote) en duplicado.
- 3 muestras de zooplancton
- 15 muestras de moluscos adheridos a boyas, redes, cuerdas, etc. en duplicado
- 14 placas sembradas desde mortalidad fresca con signología asociada a SRS, para aislamiento de la bacteria.

El cuarto centro de cultivo fue muestreado el pasado 16 de noviembre del 2018, obteniéndose el siguiente detalle de muestras:

- 3 muestras de agua de mar en duplicado
- 3 muestras de sedimento en duplicado
- 3 muestras de biopelículas (raspado de boyas, redes etc. en jaulas con brote) en duplicado
- 3 muestras de zooplancton
- 15 muestras de moluscos adheridos a boyas, redes, cuerdas, etc. en duplicado
- 14 placas sembradas desde mortalidad fresca con signología asociada a Piscirickettsiosis, para aislamiento de la bacteria

El siguiente muestreo fue realizado el pasado 16 de noviembre del 2018, cuyo detalle se presenta a continuación:

- 3 muestras de agua de mar en duplicado.
- 3 muestras de sedimento en duplicado
- 3 muestras de biopelículas (raspado de boyas, redes etc. en jaulas con brote) en duplicado.
- 3 muestras de zooplancton
- 15 muestras de moluscos adheridos a boyas, redes, cuerdas, etc. en duplicado
- 15 placas sembradas desde mortalidad fresca con signología asociada a Piscirickettsiosis, para aislamiento de la bacteria.

Finalmente, del sexto muestreo se obtuvieron las siguientes muestras:

- 3 muestras de agua de mar en duplicado.
- 3 muestras de sedimento en duplicado

- 3 muestras de biopelículas (raspado de boyas, redes etc. en jaulas con brote) en duplicado.
- 3 muestras de zooplancton
- 15 muestras de moluscos adheridos a boyas, redes, cuerdas, etc. en duplicado
- 15 placas sembradas desde mortalidad fresca con signología asociada a Piscirickettsiosis, para aislamiento de la bacteria

Se utilizaron 3 sitios alejados de los centros de producción y cultivo de salmón para la obtención de controles negativos. Se recolectó una muestra de agua en duplicado en cada uno de los sitios control. Los detalles del muestreo se entregan en la Tabla 2-1. Las muestras fueron analizadas con PCR binario para identificar la presencia de *P. salmonis*. Las 6 muestras resultaron negativas, de acuerdo a lo esperado.

| Detalles del muestreo | | Lat | Long |
|-------------------------|------------------------|----------|----------|
| Comienzo pumping | Término pumping | | |
| 4-1-2018 12:18:00 | 4-1-2018 12:20:00 | -42,8667 | -73,1484 |
| 4-1-2018 12:27:00 | 4-1-2018 12:29:00 | -42,8653 | -73,1459 |
| 4-1-2018 12:34:00 | 4-1-2018 12:36:00 | -42,8642 | -73,1435 |

Tabla 2-1 Detalles del muestreo de sitios control realizados en la X Región de Los Lagos, Chile

2.2 Ejecución de muestreos en centros de cultivo.

Recolección de muestras de agua de mar para la detección de *P. salmonis* y metagenómica.

En cada centro de producción de salmónidos en mar se identificaron tres sitios de muestreo para la recolección de muestras de agua. Los sitios de muestreo definidos correspondieron a una primera muestra lo más cerca posible de las balsas jaula con brote activo, mientras la segunda y la tercera muestras se obtuvieron en la dirección de la corriente predominante a una distancia mínima de 200 m, como se muestra en la Figura 2-2.

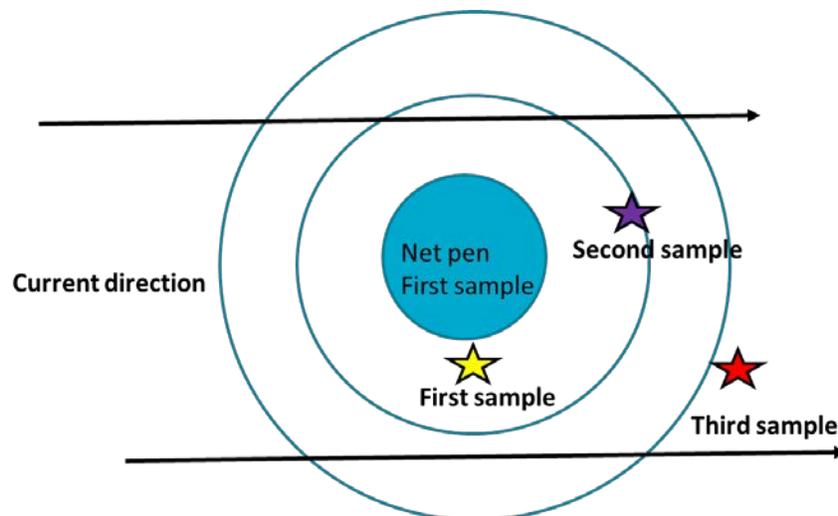


Figura 2-2 Diagrama que muestra la ubicación de los puntos de muestreo para la recolección de muestras de agua en las cercanías a las balsas jaula con brotes activos de SRS.

Las tres muestras de agua fueron obtenidas en duplicado, cada una de un volumen de 10L, se recolectaron a una profundidad de 10m o la mayor profundidad posible, cuando ésta era menor a 10m, utilizando una botella Niskin

de capacidad de 10L. Las muestras obtenidas se dispusieron en tres recipientes estériles de 10L cada uno, para luego ser almacenados lejos de la luz solar y mantenidas a 4°C hasta su procesamiento.

Recolección de muestras de sedimento marino para la detección de *P. salmonis* y metagenómica.

Se muestrearon 6 centros. En cada centro muestreado, se obtuvieron 3 muestras de sedimento por duplicado, las que fueron colectadas en 3 sectores separados alrededor de las jaulas. La primera muestra se obtuvo lo más cerca posible de las jaulas, y las dos muestras restantes a una distancia mínima de 200 metros desde las jaulas. Todas las muestras se obtuvieron con una draga de tipo Van Veen, como la que se muestra en la Figura 2-3. Una vez que la draga fue levantada, ésta se ubicó cuidadosamente en una bandeja para permitir que el agua escurriese antes de ser abierta. Se recolectaron muestras desde los 5 a 10 cm de la capa más superficial del sedimento. La muestra final correspondió a un volumen de aproximadamente 100 a 150 gramos. La muestra fue almacenada en una botella plástica estéril a temperatura ambiente.

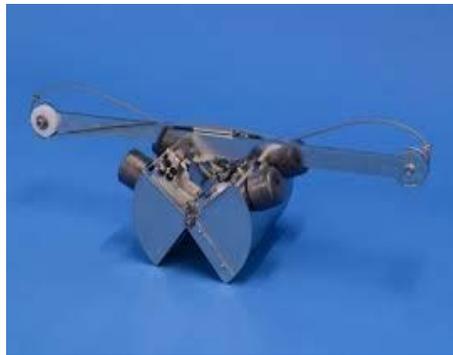


Figura 2-3 Draga tipo Van Veen para la obtención de muestras de sedimento.

Una vez que las muestras llegaron al laboratorio, se depositó una porción de cada muestra en tubos criogénicos de 2 ml a -20°C. Otra porción de 2-5 gramos fue almacenada en tubos tipo Falcon de 15 ml a -20°C, los que fueron despachados a CSIRO-Brisbane para estudios de metagenómica.

Recolección de muestras de biopelícula para la detección de *P. salmonis* y metagenómica.

Se muestrearon 6 centros. En cada centro muestreado, se obtuvieron 3 muestras de biopelícula por duplicado. Las muestras fueron obtenidas de material como cuerdas, mallas, metales y plásticos dentro de las instalaciones del centro, procedentes de cabos de sujeción de las mallas peceras y otras estructuras de la balsa jaula, con un bisturí estéril. Las muestras se dispusieron en un contenedor plástico que contenía 30 ml de agua estéril. Se eliminaron todo tipo de gusanos, moluscos y otros contaminantes visibles. Las muestras etiquetadas fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento.

Recolección de muestras de moluscos para la detección de *P. salmonis*.

Se muestrearon 5 centros muestreados. En cada centro muestreado, se obtuvieron 3 muestras por duplicado de 5 individuos cada una.

Recolección de muestras de zooplancton para la detección de *P. salmonis*.

Se tomaron 3 muestras desde 6 centros de cultivo. La recolección se realizó en movimiento alrededor del centro sobre una embarcación a motor, utilizando una malla de zooplancton de 73 μ . Se realizó un arrastre vertical desde la superficie hasta la máxima profundidad permitida por el terreno (llegando hasta un máximo de 30m). Las muestras colectadas que contenían artrópodos y agua se dispusieron en botellas plásticas de 500 ml mediante lavados con PBS y fueron enviadas al laboratorio a 4°C para su procesamiento.

Obtención de peces silvestres y asilvestrados en inmediaciones del centro.

Durante el proceso de muestreo en el centro de cultivo, se procedió a dejar calada una red de enmalle en las cercanías de dichas instalaciones, obteniéndose peces en seis centros.

En los sectores donde fue posible capturar peces silvestres, se obtuvieron muestras de branquias asociadas a estos ejemplares. En la Tabla 2-2 se puede ver el detalle.

Tabla 2-2 Detalle de especies y número de ejemplares capturados por centro muestreado

| Ejemplares de peces silvestres capturados por Centro | | | |
|--|-----------------|-------------------------------|----------|
| Centro | Especie | | Cantidad |
| | Nombre común | Nombre científico | |
| 1 | Chancharro | <i>Helicolenus langerichi</i> | 7 |
| | Róbalo | <i>Eleginops maclovinus</i> | 1 |
| | Pejerrey de mar | <i>Odontestes regia</i> | 1 |
| 2 | Blanquillo | <i>Prolatilus jugularis</i> | 17 |
| | Róbalo | <i>Eleginops maclovinus</i> | 1 |
| 3 | Chancharro | <i>Helicolenus langerichi</i> | 12 |
| | Rollizo | <i>Pinguipes chilensis</i> | 2 |
| 4 | Róbalo | <i>Eleginops maclovinus</i> | 25 |
| 5 | Cabrilla | <i>Sebastes capensis</i> | 1 |
| | Róbalo | <i>Eleginops maclovinus</i> | 12 |
| | Chancharro | <i>Helicolenus langerichi</i> | 5 |
| 6 | Róbalo | <i>Eleginops maclovinus</i> | 9 |
| | Trucha fario | <i>Salmo trutta</i> | 1 |

Obtención de aislados bacterianos desde centros de cultivo en brote.

El muestreo en terreno fue ejecutado por personal de IFOP, previa coordinación con personal del centro de cultivo de interés. Para el muestreo se consideró la extracción de 94 unidades de peces de la mortalidad fresca, peces moribundos u orillados, como total del centro, y proveniente de las jaulas consideradas, en el momento del muestreo, con brote activo de Piscirickettsiosis.

Los peces fueron procesados y las muestras tomadas desde órganos internos o lesiones, para ser sembradas *in situ* mediante asas estériles desechables, en placas de agar para aislamiento específico de desarrollo propio. Las placas sembradas se llevaron al laboratorio, debidamente rotuladas, en contenedores o cajas manteniendo la temperatura óptima para las muestras, y procesadas dentro de 24 horas desde el momento de la toma de muestra.

2.3 Procesamiento de muestras.

Concentración de muestras de agua en el laboratorio.

Para concentrar las muestras de agua y obtener una muestra final que pueda contener *P. salmonis*, se utilizaron filtros de diálisis Hemoflow modelo FX80, de acuerdo a Hamilton *et al.*, 2016, sistema que ha logrado altas tasas de recuperación de bacterias (cercanas al 83%).

Los filtros de diálisis Hemoflow FX80 son ultrafiltros de fibra hueca, generalmente funcionan con agua en modo tangencial (o flujo cruzado). El producto retenido (agua que fluye sobre la membrana) se recirculó hasta que se alcanzó el factor de concentración deseado. El efecto de fregado de la recirculación de flujo cruzado disminuye la tendencia de los microorganismos a adherirse a las superficies del filtro y reduce la posibilidad de ensuciar el filtro.

Los filtros de diálisis Hemoflow FX80 poseen un peso molecular de corte (MWCO) de los microorganismos concentrados apropiado para que el producto retenido permita que el agua pase a través de los poros.

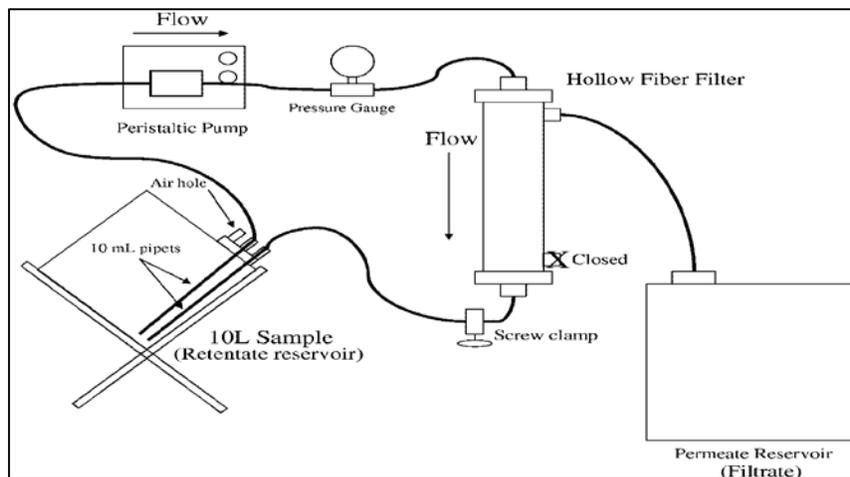


Figura 2-4 Diagrama de circulación del agua en el filtro de membrana. Fuente: Hill *et al.*, 2005

Para el proceso de concentración de la muestra de agua se configuró un sistema, como se observa en la Figura 2-5. El proceso se inició operando la bomba a baja velocidad, para verificar si había fugas. Se continuó el bombeo hasta que el contenedor de 10L estuvo vacío, luego de inclinar el contenedor hacia un lado para permitir la mayor cantidad de succión posible, y finalizando la succión de la bomba una vez que sólo aspiró aire.

La muestra final se obtuvo recogiendo toda el agua restante en el circuito (aprox. 200 ml), que incluyó, el agua devuelta al recipiente, el agua de la manguera que va del recipiente al filtro a través de la bomba, el agua remanente del filtro mismo y el agua de la manguera que llega a la parte superior del recipiente.

Para el almacenamiento a largo plazo, la muestra final concentrada de 200 ml se almacenó a -80°C para su análisis.

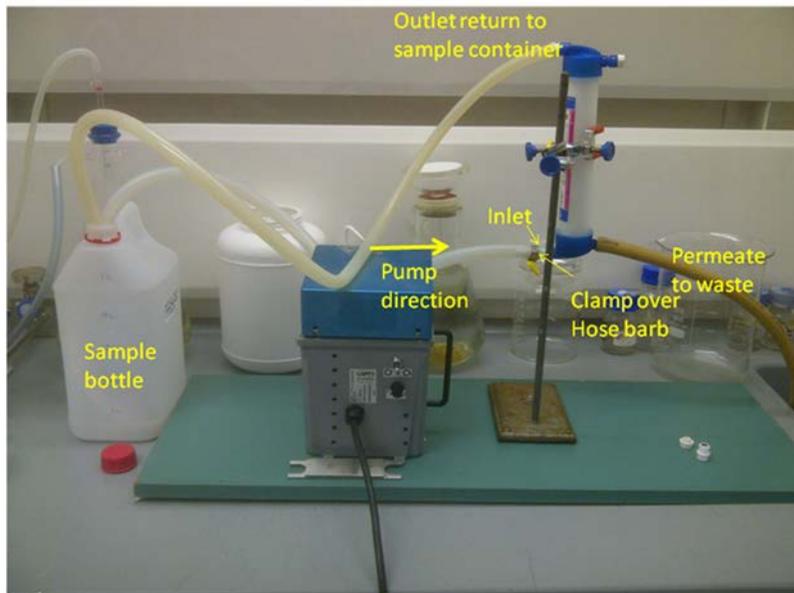


Figura 2-5 Filtros de diálisis Hemoflow FX80 para la concentración de muestras de agua con la configuración correcta de las mangueras.

Procesamiento de muestras de biopelícula en el laboratorio.

Para el procesamiento de muestras de biopelícula, una vez en el laboratorio, se tomó el material con el biopelícula adherido, el cual fue depositado con pinzas estériles en una placa Petri limpia. Cuidadosamente se separó el material y se dividió en 2 o 3 trozos cuando fue posible. Estos trozos se depositaron en un tubo tipo Falcon de 50 ml y se agregó el agua proveniente del contenedor original. Posteriormente, se cerró el frasco y se agitó manualmente por 30 segundos, para posteriormente ser agitado por 1 minuto en un equipo vortex. Luego fue aplicada sonicación por 1 minuto, para luego agitar nuevamente por 1 minuto en vortex. El tubo tipo Falcon fue abierto y cuidadosamente se retiró el resto del material a sin derramar agua. Luego se tomó la segunda mitad del material desde la placa Petri en el mismo tubo Falcon, cerrándolo y agitándolo en un vortex. Se repitió todo el procedimiento en el vortex y sonicador nuevamente. Este procedimiento se efectuó en todas las muestras obtenidas (tres muestras en duplicado) de cada uno de los seis centros muestreados. Finalmente se centrifugaron todos los tubos tipo Falcon que contenían las suspensiones de biopelícula desde un mismo centro (tres muestras en duplicado), a 6000-7000 rpm por 15 minutos para la obtención de un pellet.

Cuidadosamente, se removió todo el sobrenadante desde el tubo con una pipeta estéril tipo pasteur de 10 ml. El tubo Falcon fue pesado para determinar la cantidad de pellet obtenido. A continuación, se resuspendió el pellet en 1,8 ml de agua estéril con la misma pipeta pasteur disgregando el pellet físicamente, asegurando de coleccionar y transferir todo el contenido a un tubo criogénico de 2 ml previamente etiquetado. Se adhirieron 2 a 3 gotas de glicerol estéril para criopreservar las muestras, las que fueron almacenadas a -20°C en un congelador.

Las muestras finales fueron enviadas al laboratorio de CSIRO-Brisbane en hielo seco para estudios de metagenómica.

Procesamiento de muestras de moluscos en el laboratorio.

Una vez en el laboratorio, las conchas de los moluscos fueron separadas de los tejidos blandos. El tejido blando colectado fue homogeneizado y testeado para identificar la potencial presencia de *P. salmonis*. La homogeneización se realizó mediante aplastamiento en mortero.

Las muestras homogeneizadas fueron almacenadas en criotubos a -80°C sin etanol para la extracción de DNA y posterior análisis por PCR.

Procesamiento de muestras de zooplancton en el laboratorio.

Se tomaron 3 muestras en duplicado desde 6 centros de cultivo. Una vez en el laboratorio, las muestras de zooplancton fueron utilizadas para 2 análisis. La primera porción fue utilizada para examinación microscópica para verificar y clasificar su contenido general. La segunda porción (el duplicado) de la muestra se pasó a través de tamiz y el remanente fue transferido cuidadosamente a un criotubo para almacenamiento o posterior extracción de DNA.

Luego se homogenizó cada muestra, para luego extraer el DNA a través del kit EZNA tissue DNA (Omega), siendo procesada de acuerdo a la indicación del proveedor.

Las muestras fueron analizadas por IFOP para determinar la presencia de *P. salmonis* en el zooplancton.

Aislamiento y confirmación de presencia de *P. salmonis*.

El aislamiento de la bacteria se realizó en el laboratorio de microbiología de IFOP, donde las placas provenientes de terreno, fueron incubadas por 7 a 10 días a 18°C, en el medio de cultivo específico de desarrollo propio (Contreras-Lynch et al., 2017), para luego aislar las colonias características de *P. salmonis* y efectuar las pruebas de identificación (qPCR *P. salmonis*) y pureza (tinción Gram) correspondiente.

Una vez efectuada la necropsia de los individuos, de cada ejemplar se procedió a extraer por separado una muestra y contramuestra de aproximadamente 0,5 cm³ de cada uno de los órganos seleccionados (riñón, bazo, corazón y branquia), los que fueron dispuestos en tubos Eppendorf conteniendo etanol para análisis al 70%, con los cuales finalmente se constituyó un pool de órganos, el que fue sometido a análisis en el laboratorio de biología molecular del IFOP.

La extracción del material genético se realizó a través del kit EZNA tissue DNA (Omega), siendo procesada de acuerdo a la indicación del proveedor.

El procedimiento de confirmación por qPCR se realizó de acuerdo al protocolo definido por Corbeil *et al.*, 2003 y considerando la norma LABD/NT3/ del “Programa de laboratorios de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos. Procedimientos para la validación y control de calidad de los Métodos de reacción en cadena de la Polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en animales acuáticos” del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

2.4 Análisis de las muestras.

Extracción de material genético

Muestras branquias, órganos internos de peces silvestres y moluscos.

Para la extracción de ADN genético desde órganos de peces (branquias, riñón, bazo y corazón) y moluscos se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue Kit, siguiendo las instrucciones del proveedor Qiagen.

Cada muestra fue previamente pesada, tomando de cada una un trozo 25 mg, el cual fue macerado para posteriormente seguir con el protocolo de extracción de ADN para este tipo de muestras y kits. Para cada una de las matrices el volumen de elusión correspondió a 100 µl de ADN. Las muestras a las que se realizó este tipo de extracción de ADN corresponden a (Tabla 2-3):

Tabla 2-3 Tipo y número de muestras para extracción de material genético obtenidas desde 6 centros de cultivo y 3 sitios control. Las muestras de moluscos fueron tomadas en duplicado. (*) Indica muestras en duplicado.

| Centro | Branquias | Pool de organos | Moluscos* |
|------------|-----------|-----------------|-----------|
| 1 | 9 | 9 | 15 |
| 2 | 18 | 18 | 0 |
| 3 | 12 | 14 | 15 |
| 4 | 25 | 25 | 15 |
| 5 | 18 | 18 | 15 |
| 6 | 10 | 10 | 15 |
| Cotrol 1 | - | - | - |
| Control 2 | - | - | - |
| Coontrol 3 | - | - | - |

Muestras de Biopelículas y Zooplancton

Para la extracción de ADN genético desde muestras de biopelículas y zooplancton, se utilizó el kit DNeasy PowerSoil Kit siguiendo las instrucciones del proveedor Qiagen.

Las muestras de zooplancton fueron previamente centrifugadas a 4000 rpm por 10 min, desechando el sobrenadante y pesando 25 mg de pellet para continuar con el protocolo de extracción de ADN. Para las muestras de biopelículas se tomó un volumen de 250 µl y se continuó con el protocolo de extracción de ADN.

El volumen de elusión para ambos tipos de matrices correspondió a 100µl de DNA. Las muestras a las cuales se le realizo este tipo de extracción de ADN corresponden a (Tabla 2-4):

Tabla 2-4 Tipo y número de muestras para extracción de material genético obtenidas desde 6 centros de cultivo y 3 sitios control.

| Centro | Agua* | Sedimentos* | Biofilm* | Zooplancton* |
|------------|-------|-------------|----------|--------------|
| 1 | 6 | 6 | 6 | 3 |
| 2 | 6 | 6 | 6 | 3 |
| 3 | 6 | 6 | 6 | 3 |
| 4 | 6 | 6 | 6 | 3 |
| 5 | 6 | 6 | 6 | 3 |
| 6 | 6 | 6 | 6 | 3 |
| Cotrol 1 | 2 | - | - | - |
| Control 2 | 2 | - | - | - |
| Coontrol 3 | 2 | - | - | - |

Análisis por PCR tiempo real sonda Taqman para detección de *P. salmonis*

Cada muestra de ADN se amplificó utilizando un ensayo de PCR en tiempo real de bacterias (16SrRNA) para confirmar el éxito del proceso de extracción de ADN (Nadkarni et al., 2002). Todas las muestras se analizaron para determinar la posible presencia de inhibidores de la PCR. Se realizaron diluciones en serie de diez y cien veces para cada muestra y se analizaron para detectar la presencia de bacterias con un conjunto de cebadores universales (Nadkarni et al., 2002) utilizando iQ Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). Los valores de umbral de ciclo (Ct) obtenidos de muestras sin diluir y diluidas en serie (10 y 100 veces) se compararon para verificar la presencia de inhibidores de la PCR en el ADN extraído de las biopelículas. En el caso de la PCR, se observó inhibición en las muestras, se utilizaron muestras diluidas 10 veces para la qPCR.

Todas las secuencias completas del genoma de *P. salmonis* provenientes de Chile y disponibles en la base de datos de NCBI, además de las cepas convencionales LF-89 y EM90, fueron descargadas desde la NCBI. Luego, las secuencias de sondas y cebadores previamente publicados para la detección de las cepas LF-89 y EM-90 – Canadiense (ATL-4-91) y Noruega (NOR-92) (Corbeil et al., 2005) – fueron contrastadas contra las secuencias provenientes de Chile para evaluar si eran capaces de detectar todos los aislados conocidos de *P. salmonis* provenientes de Chile. Se encontró que el conjunto de cebadores previamente publicados era capaz de detectar el 100% de las cepas de *P. salmonis* conocidas en Chile. Por lo tanto, se estimó que el diseño de un nuevo conjunto de sondas y cebadores frescos no era necesario.

Una vez que los números de *P. salmonis* en las muestras se cuantificaron utilizando secuencias de cebadores y sondas publicadas previamente (Corbeil et al., 2005), las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizaron en Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Los ensayos de qPCR de *P. salmonis* se realizaron en mezclas de reacción de 20 µL utilizando la sonda de mezcla universal SsoAdvanced™ (Bio-Rad Laboratories). Las mezclas de qPCR contenían 10 µL de Supermix, 300 nM de cada cebador y 250 nM de sonda. Se añadió albúmina de suero bovino (BSA) a cada mezcla de reacción hasta una concentración final de 0.2 µg µL⁻¹ para aliviar la inhibición de la PCR (Kreader et al., 2006). Para cada ejecución de PCR, se incluyeron los controles positivos (es decir, ADN diana) y negativos (agua estéril) correspondientes.

Tabla 2-5 Cebadores, sondas y parámetros de ciclo para ensayos de PCR

| Objetivo | Gen | Secuencia de cebador | Parámetros de ciclado | Tamaño d amplicón(bp) | Referencia |
|--|-------------|--|---|--------------------------|--------------------------------------|
| Total bacteria | 16S rRNA | F : TCCTACGGGAGGCAGCAGT R:GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT P: FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC BHQ1 | 10 min at 95°C, 30 cycles of 15 s at 95°C and 15 s at 62°C and 20s at 72°C | 466 | Nadkarni et al., 2002 |
| <i>Piscirickettsia salmonis</i> | 16S rRNA | F-TCTGGGAAGTGTCGCGATAGA R- TCCCGACCTACTCTTGTTCATC P-FAM- TGATAGCCCCGTACACGAAACGGCATA BHQ1 | 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s at 95°C and 10 s at 60°C and 15s at 72°C | 77 | Corbeil et al., 2003 |

Preparación de la curva de qPCR

El amplicón para la detección y cuantificación de *P. salmonis* se sintetizó a la medida mediante la síntesis de genes a la medida de IDT (Coralville, IA, EE. UU.). Los plásmidos recombinantes purificados que contenían un amplicón diana se produjeron mediante tecnologías integradas de ADN (pIDTSmart con ampicilina; IDT) y se clonaron en un vector seguido de extracción con plásmidos (Coralville, IA, EE. UU.). Se preparó una dilución de 10 veces que oscila entre 1×10^6 y 1×10^8 copias por μl de extracto de ADN a partir del ADN plasmídico sintetizado. Se usó una plantilla de 3 μL de cada dilución para preparar una curva estándar. Para cada estándar, las copias genómicas se representaron en función del número de ciclo en el que la señal de fluorescencia aumentó por encima del valor del ciclo de cuantificación (valor Cq). La eficiencia de amplificación (E) se determinó mediante el análisis de los estándares y se estimó a partir de la pendiente de la curva estándar como $E = 10^{-1/\text{slope}}$.

Reproducibilidad PCR y límite de detección de características de rendimiento qPCR

Los estándares de qPCR se analizaron para determinar las eficiencias de amplificación (E) y el coeficiente de correlación (r²). La repetibilidad (acuerdo intra-ensayo) y la reproducibilidad (acuerdo inter-ensayo) de cada ensayo qPCR se evaluaron mediante la determinación del coeficiente de variación (CV). Los valores de CV se calcularon a partir de los valores de Cq de cada estándar que van desde 3×10^6 a 3×10^8 copias genéticas. La repetibilidad intraensayo se calculó en función de los valores del ciclo de cuantificación (Cq) probando cada dilución 10 veces en la misma serie de qPCR. La reproducibilidad entre ensayos se calculó en función de los valores de Cq probando cada estándar en cinco días diferentes. El límite inferior de cuantificación de qPCR (LLOQ) también se determinó a partir de los valores de Cq obtenidos para cada estándar. La cantidad más baja de estándares diluidos detectados en ensayos triplicados al 100% se consideró qPCR LLOQ. Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado. Para cada ensayo de qPCR, se incluyó un control negativo (agua estéril).

Prueba de inhibición de PCR

Antes de la detección y cuantificación de *P. salmonis* en muestras ambientales, todas las muestras se analizaron para determinar la presencia de inhibición de la PCR, ya que esto podría conducir a resultados falsos negativos. Brevemente, se analizaron cuantitativamente muestras de ADN sin diluir y diluidas 1:10 para determinar la presencia de bacterias totales con el conjunto de cebadores bacterianos totales (gen 16S rRNA). Los valores de Ct más altos para el ADN diluido (1:10) en comparación con la muestra no diluida indicaron la presencia de

inhibidores de la PCR, un valor de Ct similar o más bajo no reveló interferencia en el proceso de amplificación. Las muestras que muestran la inhibición de la PCR se probaron más a fondo con diluciones (1:20 y 1: 100) para obtener una dilución sin inhibición para el posterior análisis de qPCR.

DetECCIÓN DE *P. salmonis* VIABLE

Los métodos basados en la PCR no pueden distinguir entre las células bacterianas viables y no viables, lo que puede dar por resultado una sobreestimación del número de células bacterianas en las muestras. La monoazida de propidio (PMA) es un colorante fotosensible, intercalante del ADN, que penetra en las células no viables. El tratamiento de las muestras con PMA antes de la extracción de ADN se ha utilizado con éxito para la detección de células viables a través de métodos qPCR (Alonso et al., 2014; Nocker et al., 2007). Más recientemente, hemos utilizado PMA-qPCR para la detección de nuestras vías de comunicación desde una variedad de matrices (Gyawali et al., 2016). En este estudio, utilizaremos PMA-qPCR para la cuantificación de células viables de *P. salmonis*.

Para la preparación del inóculo, se utilizó una cepa de aislamiento propio de IFOP, obtenido desde un brote de Piscirickettsiosis de campo, desde un ejemplar de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con signología clínica asociada a la enfermedad y resultado de PCR positivo a *P. salmonis*, perteneciente al genogrupo EM90. Una vez aislada la bacteria, se hizo crecer en 100 mL de caldo específico de elaboración propia IFOP, con agitación constante a 16°C, hasta su crecimiento exponencial (densidad óptica a 600 nm, de 1,2 aproximadamente), el que fue alcanzado a los 6 días de incubación. Una vez alcanzado el crecimiento óptimo del inóculo, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos para obtener un pellet, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 10 mL de agua de mar estéril, con la finalidad de dejar las bacterias libres de residuos de caldo, procedimiento que fue realizado dos veces. Finalmente, el pellet obtenido fue resuspendido en 2 ml de agua de mar estéril y se diluyó en 1 L de agua de mar no estéril, obteniendo una concentración de 10^6 UFC / mL, la que fue incorporada dentro de cada una de las cámaras y viales de vidrio.

Para el estudio de viabilidad de la bacteria en agua, se calculó el número de cámaras de difusión a utilizar por cada variable propuesta, teniendo en cuenta los tiempos de muestreo y en triplicado para cada tiempo. En cada uno de los días de muestreo se retiraron 3 cámaras por cada estanque. El número final de cámaras fue de 21 por variable evaluada, considerando que cada cámara tiene una capacidad de 7 mL, se utilizaron 144 mL de agua con inóculo. Para el estanque expuesto a la luz solar se usaron viales de vidrio de 5 mL.

Las cámaras de difusión se utilizaron para el almacenamiento de la bacteria *P. salmonis* disuelta en agua de mar, con el propósito de mantener el líquido inoculado de forma hermética durante todo el ensayo experimental Figura 2-6.

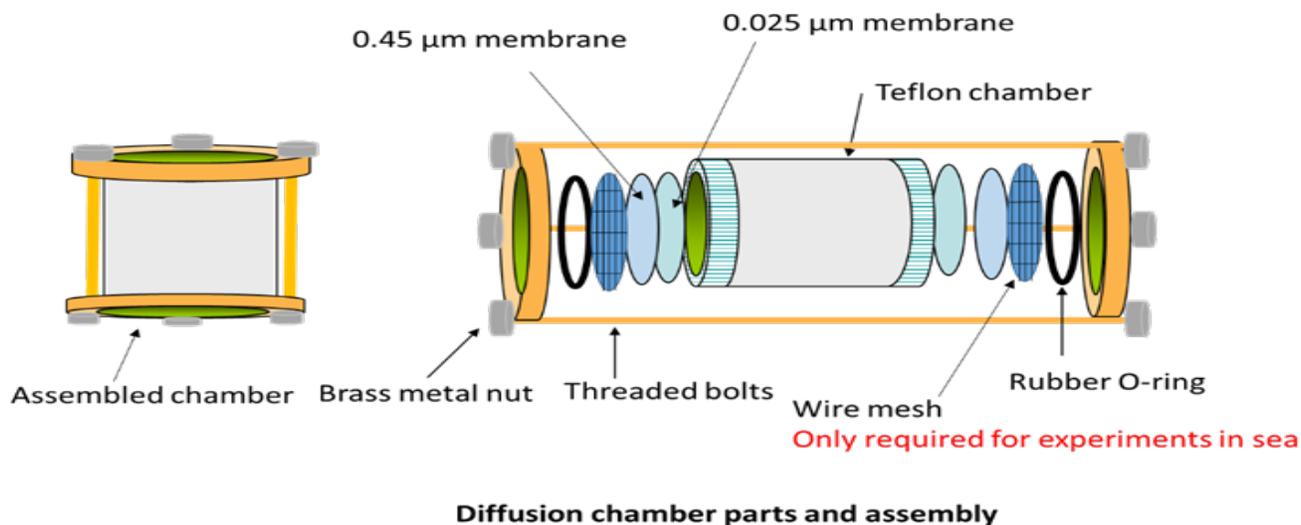


Figura 2-6 Cámaras de difusión con sus piezas y orden de montaje

La cámara principal consiste en una pieza de teflón con membranas que evitan la salida del microorganismo desde el interior de la cámara. Las cámaras tienen un volumen interno de aproximadamente 7 mL. La membrana interna tiene alrededor de 25 mm de diámetro, 250k MWCO (~ 0.025 μm) de ésteres de celulosa (VSWP) (Millipore, Australia). Este tamaño de poro es suficiente para excluir el paso de *P. salmonis* (30 a 50 μm), pero aún permite el paso de agua de mar a través de la membrana de la cámara de difusión.

La membrana externa tiene 25 mm de diámetro y una membrana de soporte 0,45 μm (Pall, Australia). La función principal de la membrana externa es proporcionar soporte a la membrana interna. Las cámaras se unieron a través de un monofilamento plástico de 1,2 mm para mantenerlas sumergidas en el agua dentro de los estanques.

Se utilizaron los resultados de los valores de Ct de las tres replicas en cada tiempo, para realizar un análisis descriptivo de cada variable evaluada, donde se utilizaron los valores de la media y el error estándar de cada variable. Con los resultados de esto, se realizó un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, para verificar las diferencias intra e inter grupos (Sidhu & Toze 2012). Todos los análisis fueron realizados en el software SPSS Statistics 21 (IMB Corp. 2012). La significancia estadística de los tiempos de decaimiento fue determinada con un valor de P de 0,05. Por lo tanto, la hipótesis nula es aceptada si el valor de significancia es <0,05 y los datos comparados se consideraron no significativos.

Extracción de ADN de muestras y 16S rRNA secuenciación de ADN

Las muestras de agua (n = 36), las muestras de sedimento (n = 36), los biopelículas (n = 36) recolectados de 6 granjas de salmón junto con las muestras de agua (n = 3) recolectadas en mar abierto lejos de los centros de producción (control negativo) fueron sometidas a Análisis de metagenómica. Para las muestras de sedimentos y biopelículas (~ 300 mg) de matriz, el ADN se extrajo utilizando el kit de aislamiento de ADN Qiagen PowerSoil (Qiagene, Inc., Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante y se almacenó a -80°C antes de continuar el análisis. El ADN de las muestras de agua se extrajo con el kit Qiagen PowerWater (Qiagene, Inc., Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Además del protocolo de fabricación, siempre colocamos exactamente 12 tubos de cuentas en el vórtice de manera uniforme y el vórtice a la velocidad máxima durante 10 minutos para minimizar la diferencia de eficiencia de lisis entre las muestras. La calidad del ADN para todas las muestras se evaluó con un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, EE. UU.). Las

concentraciones finales de ADN se cuantificaron utilizando PicoGreen con un instrumento FLUO star Optima (BMG Labtech, Jena, Alemania). El ADN purificado se almacenó a -80°C.

Para la secuenciación de 16S rRNA, el ADN se amplificó para la región 16S "V4" por PCR, y se secuenció utilizando el enfoque de secuenciación de amplicón en fase (PAS) utilizando los cebadores F515 (5'-GTGCCAGCGGCCGCGTAA-3') y R806 (5'-GGACTACHVGGGTGTCTCGATA-3') y R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAATAT) 3'). Para mejorar los problemas cuantitativos asociados con la secuenciación de los amplicones, los fragmentos del gen 16S rRNA fueron amplificaciones de ADN de la comunidad (10 ng) con PCR de dos etapas con menor número de ciclos de amplificación (10 y 20 ciclos para la primera y segunda etapa, respectivamente). La amplificación por PCR se realizó en 25 µl de reacciones que contenían 2,5 µl de 10X AccuPrime PCR buffer (incluidos los dNTP) (Invitrogen, Grand Island, NY), 0,4 µM de cebadores directos e inversos, 10 ng de ADN de plantilla y 0,2 µl de AccuPrime High-Fidelity Taq Polimerasa. Las condiciones de los ciclos térmicos fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, seguidos de 30 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 53°C durante 25 segundos y 68°C durante 45 segundos, con extensión final a 68°C durante 10 minutos. Las bibliotecas de muestras para secuenciación se prepararon de acuerdo con la Guía de preparación del kit de reactivos MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.).

Preprocesamiento de secuencias

Después de agregar adaptadores y códigos de barras de índice dual a la secuenciación de los amplicones, se llevó a cabo el instrumento MiSeq en el Instituto de Genómica Ambiental de la Universidad de Oklahoma. En el caso de números variables de lecturas de secuencia de muestras a muestras, las muestras con lecturas de secuencia baja se volvieron a secuenciar para cumplir con el número objetivo de lecturas de secuencia de 30 K por muestra.

Leer recorte y asignación taxonómica

Los datos de secuencia sin procesar se procesaron como se describió anteriormente (Zhou et al., 2016), excepto la generación de OTU por UPARSE (Edgar, 2013) en el umbral de similitud del 97%. Las secuencias representativas se alinearon utilizando Clustal Omega v1.2.2 (Sievers et al., 2011) para construir el árbol filogenético mediante FastTree2 v2.1.10 (Price et al., 2010). Las OTU se anotaron taxonómicamente con el clasificador RDP utilizando el conjunto 16 de entrenamiento del gen 16S rRNA con un límite de confianza del 50% (Wang et al., 2007). El número de secuencia en cada muestra fue rarificado a la misma profundidad (25,600 secuencias por muestra) en análisis comparativos posteriores.

Aislamiento de *P. salmonis* desde peces

Las muestras de peces salmónidos de 2 de los centros muestreados, permitieron el aislamiento de la bacteria luego de que las placas con medio de cultivo de desarrollo propio (Contreras-Lynch *et al.*, 2017) fueron incubadas por 8 días a 18°C. Las colonias fueron sometidas a tinción Gram, como es posible observar en la Figura 2-7. Los 5 aislados obtenidos a partir del muestreo, aislamiento y cultivo de las muestras levantadas en el presente estudio, fueron enviados a Francia para el secuenciamiento completo de su genoma y la realización de análisis metagenómicos.

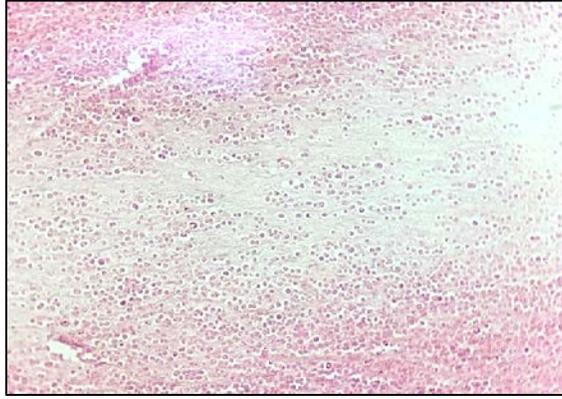


Figura 2-7 Tinción Gram (negativo) (100x) aplicada a las colonias bacterianas puras obtenidas en terreno para el muestreo del centro de cultivo 1.

2.5 Resultados

En la primera etapa del procesamiento simple, el ADN extraído se sometió a un control de calidad (prueba de inhibición de PCR). Después de esto, todas las muestras pasaron por PCR binario para determinar la presencia de *P. salmonis*. Las muestras que se encontraron positivas para la presencia de *P. salmonis* se sometieron a qPCR para determinar el número de bacterias en la matriz.

En este estudio, los sitios de control se escogieron por estar alejados de los centros de producción y cultivo de salmones, como se muestra en la Figura 2-1. Las muestras de agua (10 l) se recogieron con el muestreador de agua Niskin y se procesaron para detectar la presencia de *P. salmonis*. Como nuestros sitios se encontraban en mar abierto, fue difícil recolectar sedimentos, biopelículas y otros tipos de muestras. El objetivo principal de la recolección de muestras de agua fue determinar si *P. salmonis* podría estar presente en el medio marino lejos de los centros de cultivo. Las muestras de agua de los tres sitios resultaron negativas para la presencia de *P. salmonis*. Los resultados por cada uno de los centros muestreados, para cada matriz analizada se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2-6 Resultados de los análisis de PCR binario para *P. salmonis*, e diferentes centros y para las diferentes matrices estudiadas.

| Centro | Resultado | Agua | Sedimentos | Biopelícula | Zooplancton | Branquias | Pool de órganos | Moluscos |
|-----------|--------------|------|------------|-------------|-------------|-----------|-----------------|----------|
| 1 | No. Positivo | 6 | 6 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | No. Negativo | 0 | 0 | 4 | 3 | 7 | 9 | 15 |
| 2 | No. Positivo | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. Negativo | 0 | 0 | 6 | 3 | 18 | 18 | 0 |
| 3 | No. Positivo | 6 | 6 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | No. Negativo | 0 | 0 | 2 | 3 | 12 | 11 | 15 |
| 4 | No. Positivo | 6 | 6 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 |
| | No. Negativo | 0 | 0 | 6 | 3 | 16 | 25 | 15 |
| 5 | No. Positivo | 6 | 6 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| | No. Negativo | 0 | 0 | 6 | 3 | 15 | 18 | 15 |
| 6 | No. Positivo | 6 | 6 | 6 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | No. Negativo | 0 | 0 | 0 | 3 | 8 | 10 | 15 |
| Control 1 | No. Positivo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. Negativo | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control 2 | No. Positivo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. Negativo | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control 3 | No. Positivo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. Negativo | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Como se ve en la Tabla 2-6, se encontró que una cantidad de agua, sedimentos, biopelículas, branquias y órganos internos de los peces eran positivos en varios centros. Varias muestras, especialmente Moluscos, no mostraron amplificación, posiblemente debido a los problemas de inhibición de la PCR que están actualmente bajo investigación. Las branquias de los peces y los órganos internos que dieron positivo por la presencia de *P. salmonis* se sometieron a una amplificación por PCR adicional y se secuenciaron para determinar las cepas de bacterias. Dos muestras de Pool de órganos no fueron posibles de analizar, por lo que el número de muestras se redujo de 94 a 92.

Detección qPCR de *P. salmonis* en agua, sedimentos y las biopelículas

Como se mencionó anteriormente, todas las muestras que dieron positivo por la presencia de PCR binaria de *P. salmonis* se sometieron luego a una prueba de PCR cuantitativa. Los resultados de las cifras de *P. salmonis* en las muestras de agua, sedimentos y biopelículas se presentan en la Figura 2-8, Figura 2-9 y Figura 2-10.

Para las muestras de agua, todos los sitios aparte del primer centro dieron positivo para presencia de *P. salmonis* con numeros variando entre 10 y 10³ células por litro de agua. Mientras que *P. salmonis* fue detectado consistentemente en los sedimentos, variando entre 30 y 300 células por gramo de sedimentos. En comparación, solo una muestra de un sitio (sitio 6, PA) tenia un número cuantificable de *P. salmonis* (200 celulas por gramos).

En el centro del sitio 6 (PA) las tres muestras dieron positivo para la presencia de *P. salmonis*. Vale la pena notar que los mayores numeros en muestras de agua son los más cercanos a las jaulas y los numeros más bajos son los

más alejados. Esto podría explicarse posiblemente por el tiempo de muestreo (pico de brote de la enfermedad), ya que se espera que los números más altos de *P. salmonis* estén más cerca de las jaulas en el pico de SRS y las bacterias eliminadas por el pescado diluido en el agua a medida que se mueven las corrientes oceánicas. El agua se aleja de la jaula enferma. En esta granja, las tres muestras de sedimentos también fueron positivas para el *P. salmonis*, con números que variaron de 100 a 200 bacterias por gramo de sedimentos. Además, la única muestra de biopelícula con cantidad cuantificable de *P. salmonis* provino del sitio alrededor de esta granja con un número de ~ 200 células bacterianas por gramo de peso de biopelícula.

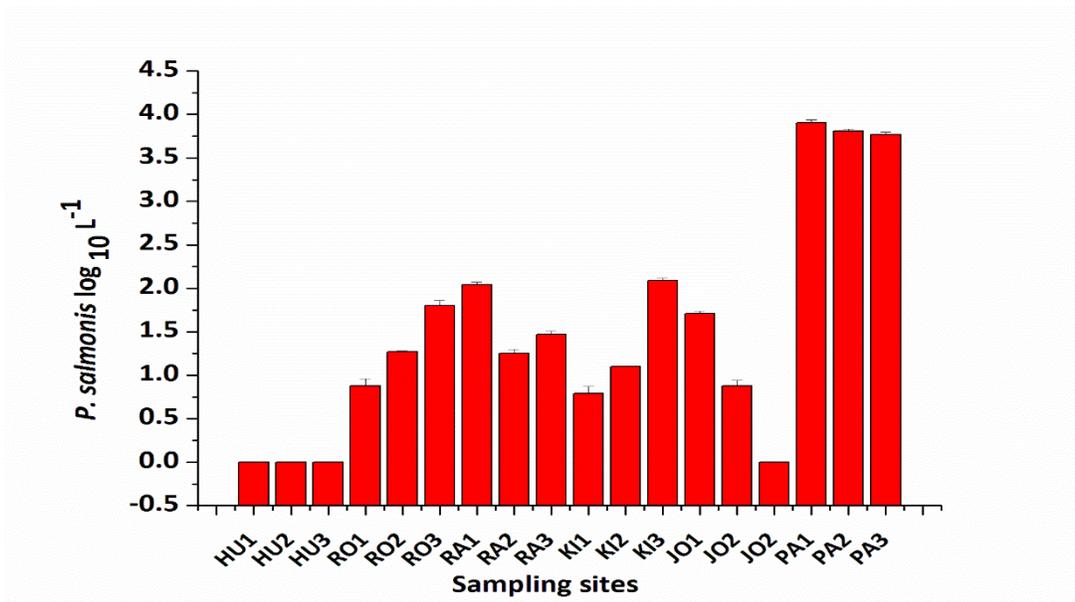


Figura 2-8 Cuantificación de *P. salmonis* utilizando qPCR, basándose en las muestras positivas de agua recolectada en todos los sitios y reportadas en la Tabla 2-6. Las muestras denominadas HU1, HU2 y HU3 corresponden al centro 1, las muestras denominadas RO1, RO2 y RO3 corresponden al centro 2, las muestras denominadas RA1, RA2 y RA3 corresponden al centro 3, las muestras denominadas KI1, KI2 y KI3 corresponden al centro 4, las muestras denominadas JO1, JO2 y JO3 corresponden al centro 5 y las muestras denominadas PA1, PA2 y PA3 corresponden al centro 6.

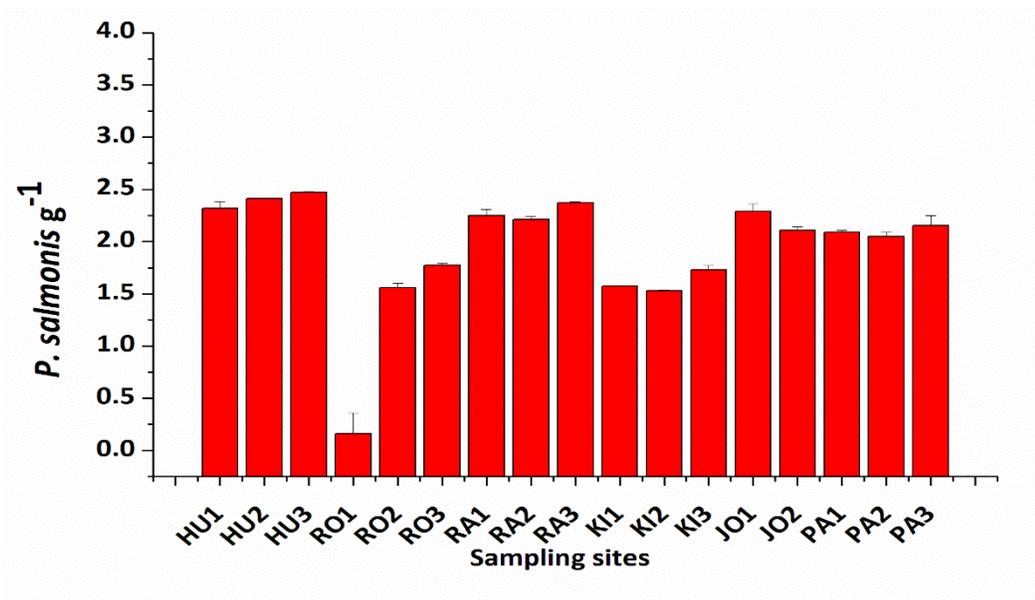


Figura 2-9 Cuantificación de *P. salmonis* utilizando qPCR, basándose en las muestras positivas de sedimento recolectada en todos los sitios y reportadas en la Tabla 2-6. Las muestras denominadas HU1, HU2 y HU3 corresponden al centro 1, las muestras denominadas RO1, RO2 y RO3 corresponden al centro 2, las muestras denominadas RA1, RA2 y RA3 corresponden al centro 3, las muestras denominadas KI1, KI2 y KI3 corresponden al centro 4, las muestras denominadas JO1, JO2 y JO3 corresponden al centro 5 y las muestras denominadas PA1, PA2 y PA3 corresponden al centro 6.

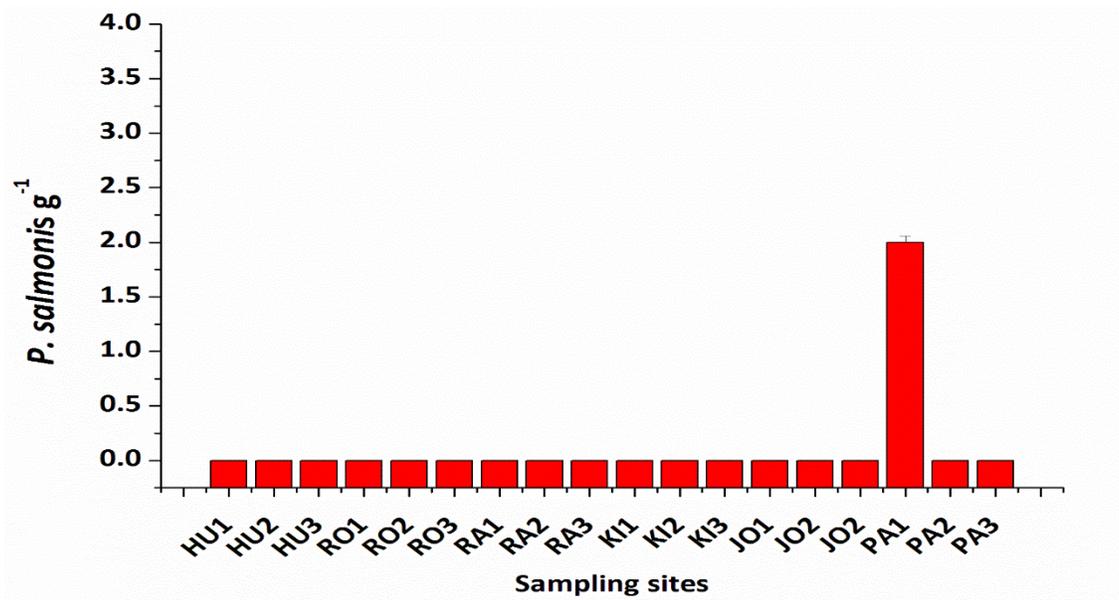


Figura 2-10 Cuantificación de *P. salmonis* utilizando qPCR, basándose en las muestras positivas de biopelícula recolectada en todos los sitios y reportadas en la Tabla 2-6. Las muestras denominadas HU1, HU2 y HU3 corresponden al centro 1, las muestras denominadas RO1, RO2 y RO3 corresponden al centro 2, las muestras denominadas RA1, RA2 y RA3 corresponden al centro 3, las muestras denominadas KI1, KI2 y KI3 corresponden al centro 4, las muestras denominadas JO1, JO2 y JO3 corresponden al centro 5 y las muestras denominadas PA1, PA2 y PA3 corresponden al centro 6.

Detección de *P. salmonis* viable mediante PMA-qPCR

La descripción de los experimentos presentados se presenta a continuación:

| Nomenclatura | Descripción |
|--------------|--|
| A | Agua mar 16°C condiciones controladas |
| B | Agua mar 10°C condiciones controladas |
| C | Agua dulce 10°C condiciones controladas |
| D | Agua de mar en condiciones ambientales realizado in-situ con flujo abierto |

Los resultados de los análisis de PCR con los valores de las medias del triplicado de los Ct para cada variable evaluada en cada tiempo de muestreo, se presentan en la Tabla 2-7

Tabla 2-7 Resultados de Ct por de microcosmos y tiempo de evaluación

| Tiempo | Ambiente controlado A | Ambiente controlado B | Ambiente controlado C | Ambiente controlado D |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| T1 | 16,14 | 16,08 | 17,71 | 16,07 |
| T2 | 17,44 | 16,97 | 16,90 | 18,09 |
| T3 | 18,14 | 16,88 | 16,79 | 22,76 |
| T4 | 19,66 | 17,57 | 16,88 | 23,05 |
| T5 | 21,91 | 18,59 | 16,63 | 26,51 |
| T6 | 21,40 | 17,32 | 16,53 | 24,87 |
| T7 | 21,78 | 21,07 | 24,52 | 26,74 |

Se utilizaron los resultados de los valores de Ct de las tres replicas en cada tiempo, para realizar un análisis descriptivo de cada variable evaluada, donde se utilizaron los valores de la media y el error estándar de cada variable. Con los resultados de esto, se realizó un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas, para verificar las diferencias intra e inter grupos (Sidhu & Toze 2012). Todos los análisis fueron realizados en el software SPSS Statistics 21 (IMB Corp. 2012). La significancia estadística de los tiempos de decaimiento fue determinada con un valor de P de 0,05. Por lo tanto, la hipótesis nula es aceptada si el valor de significancia es <0,05 y los datos comparados se consideraron no significativos.

Los resultados del ANOVA de medidas repetidas, específicamente los contrastes intra-variable y multivariados, los cuales según el valor de significancia propuesto de un 5%, nos indica que si existen diferencias significativas (**p =0,04**). En la Tabla 2-8 se observan las comparaciones múltiples por pares, resultando que existen diferencias significativas entre el microcosmos A y D, también entre la variable B con D y el ambiente controlado D presentó diferencias significativas (**p<0,05**) con respecto al A.

Tabla 2-8 Comparaciones múltiples por pares

| (I)V. ambiental | (J)V. ambiental | Diferencia de medias (I-J) | Error típ. | Sig. ^b | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia ^b | |
|-----------------|-----------------|----------------------------|------------|-------------------|--|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| A | C | 1,501 | 1,151 | 1,000 | -2,944 | 5,947 |
| | B | 1,713 | 0,574 | 0,147 | -0,503 | 3,928 |
| | D | -3,089* | 0,761 | 0,040* | -6,026 | -0,151 |
| C | A | -1,501 | 1,151 | 1,000 | -5,947 | 2,944 |
| | B | ,211 | 0,676 | 1,000 | -2,401 | 2,823 |
| | D | -4,590 | 1,562 | 0,156 | -10,623 | 1,443 |
| B | A | -1,713 | 0,574 | 0,147 | -3,928 | 0,503 |
| | C | -,211 | 0,676 | 1,000 | -2,823 | 2,401 |
| | D | -4,801* | 1,158 | 0,036* | -9,276 | -0,326 |
| D | A | 3,089* | 0,761 | 0,040* | 0,151 | 6,026 |
| | C | 4,590 | 1,562 | 0,156 | -1,443 | 10,623 |
| | B | 4,801* | 1,158 | 0,036* | 0,326 | 9,276 |

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

b. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

2.6 Discusión

A pesar de su papel como un patógeno serio de la salmicultura, los mecanismos de patogenicidad de *P. salmonis* aún no se han dilucidado por completo. Si bien la transmisión horizontal representa una clara amenaza para los centros de cultivo de salmón, se ha prestado menos atención a la comprensión de la amenaza potencial de transmisión de otros componentes ambientales. Las bacterias patógenas excretadas por los peces enfermos pueden penetrar en el agua, sedimento, peces y plancton, por lo que éstos podrían ser importantes reservorios ambientales para la enfermedad SRS.

Agua

En este estudio, todos los sitios- a excepción del primer centro- fueron positivos para la presencia de *P. salmonis* con números que varían de 10 a 9×10^3 células por L^{-1} de agua. Además, las muestras de agua recolectadas en tres de los seis centros tuvieron números de *P. salmonis* > 200 células por L^{-1} . Un número mucho mayor de *P. salmonis* (10^6 células L^{-1}) en el agua de mar que rodea un centro con brote de enfermedad se ha informado anteriormente (Olivares and Marshall 2010). Una vez que las bacterias se excretan de los peces al medio ambiente, los factores abióticos y bióticos influyen en la inactivación de las bacterias. Por lo tanto, los números de bacterias detectados en el agua dependen del estado de la enfermedad del centro en el momento del muestreo y la ubicación del muestreo también influye en los números de patógenos en el agua. En general, los resultados son consistentes con la comprensión actual del *P. salmonis* endémico en áreas de cultivo de salmón del Atlántico en Chile (Rozas and Enríquez 2014).

Vale la pena señalar que cuando se compararon los metadatos de los centros (Tabla 2-9) de cultivo con los datos de *P. salmonis* en el agua, el centro 6 tiene el mayor índice de mortalidad reportado una semana antes y en el momento de la recolección de las muestras de agua. Por lo tanto, el mayor número de bacterias observadas en el agua es probablemente en respuesta a la prevalencia de la enfermedad en el centro y las bacterias eliminadas al agua por peces infectados. De manera similar, el centro 2 tiene una alta mortalidad debido a SRS antes del muestreo y el número observado de *P. salmonis* en las muestras de agua correspondería a la prevalencia de la enfermedad en el centro.

Del presente estudio se concluye que el agua es un medio probable de transmisión de *P. salmonis* dentro de los peces enjaulados, así como una fuente de transmisión desde las instalaciones de acuicultura a la población de peces silvestres a través de la descarga de agua contaminada.

Tabla 2-9 Metadata utilizada para la identificación de reservorios de *P. salmonis* en Chile

| No de centro | Fecha de muestreo | Especies cultivadas | Numero de peces en el centro | Mortalidad total reportada en la semana de muestreo | Mortalidad por SRS reportada en la semana de muestreo | Mortalidad por SRS reportada la semana previa al muestreo | Mortalidad acumulada por SRS reportada durante el ciclo de muestreo | Mortalidad acumulada por SRS reportada durante el ciclo anterior al muestreo | Temperatura | Oxígeno disuelto |
|--------------|-------------------|------------------------|------------------------------|---|---|---|---|--|-------------|------------------|
| 1 | 5/07/2018 | salmon del Atlantico | 97348 | 197 | 74 | 44 | 360 | 10699 | 10,25°C | 8,21 mg/lit |
| 2 | 21/08/2018 | salmon plateado o coho | 53305 | 1958 | 332 | 662 | 1978 | 11 | 11,15°C | 7,94mg/lit |
| 3 | 13/09/2018 | salmon del Atlantico | 22160 | 252 | 124 | 194 | 14768 | 3487 | 10,0°C | 9,32mg/lit |
| 4 | 16/11/2018 | salmon del Atlantico | 46722 | 754 | 9 | 56 | 1046 | 29161 | 10,9°C | 7,87 mg/lit |
| 5 | 16/11/2018 | salmon del Atlantico | 49449 | 316 | 36 | 23 | 603 | 26752 | 10,9°C | 8,11 mg/lit |
| 6 | 30/11/2018 | salmon del Atlantico | 44670 | 1848 | 1309 | 1084 | 5790 | 2953 | 11,2°C | 8,75 mg/lit |

Biopelículas

Se sabe que los patógenos bacterianos, incluso presentes en cantidades bajas en el agua, pueden incrustarse en las biopelículas, lo que puede prolongar su supervivencia al brindar una mayor resistencia a condiciones ambientales adversas (Wingender and Flemming 2011). En el 2003 se describió el complejo de adhesión piscirickettsial (CAP), sobre la superficie de ovas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando estas eran expuestas *in vitro* con *P. salmonis*. Aunque esta estructura no ha sido bien caracterizada, se ha relacionado con la capacidad de unión de la bacteria sobre la superficie de diversos sustratos, tales como, ovas y conchas de moluscos.

En el presente estudio se identificó la presencia de *P. salmonis* en las muestras de biopelículas tomadas en terreno del centro de cultivo número 6. Sin embargo, no está claro si las biopelículas desempeñan un papel importante como reservorio de *P. salmonis*. En el presente estudio, solo las biopelículas de un sitio tenían cantidades cuantificables de bacterias (10^2 por gramo).

Para profundizar en la importancia de los materiales inertes como posibles reservorios de *P. salmonis*, se realizaron experimentos *in vitro* para estudiar la formación del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) sobre materiales plásticos que comúnmente son empleados en balsas jaula y que están en contacto con el agua de mar. Los materiales empleados fueron polietileno de alta densidad (HDPE), policloruro de vinilo (PVC), poliamida (PA) conocido como nylon y politetrafluoretileno (PTFE) conocido como teflón. Y la presencia del CAP fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) se establece tempranamente post infección (45 s) y evoluciona en su formación manteniendo al agente viable hasta por 48 h. Por lo que en este estudio los tiempos de exposición en este estudio fueron de 1 hora, 24 horas y 48 horas.

La bacteria empleada correspondió a un aislado de campo asociado a un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico cultivado en mar, donado por el Laboratorio ETECMA - Puerto Montt. En el laboratorio de la U. de Chile la bacteria fue amplificada y posteriormente, mediante secuenciación del producto de PCR de 1270 pb del gen 16S rRNA, se caracterizó como cepa LF-89, lo cual fue realizado en la Unidad de Secuenciación Automática de la Universidad Católica de Chile procesado en un equipo ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems™). La bacteria fue multiplicada en la línea celular CHSE-214 a 15 °C, temperatura óptima de crecimiento (Fryer *et al.* 1990), hasta alcanzar el 100% de efecto citopático ECP. La bacteria fue titulada de acuerdo con el método de punto final 50% propuesto por Reed y Muench (1938).

Se comprobó la presencia del CAP en PTFE-teflón mediante micrografías electrónicas en todos los tiempos de exposición. Los detalles de la metodología y resultados se pueden observar en el Appendix B

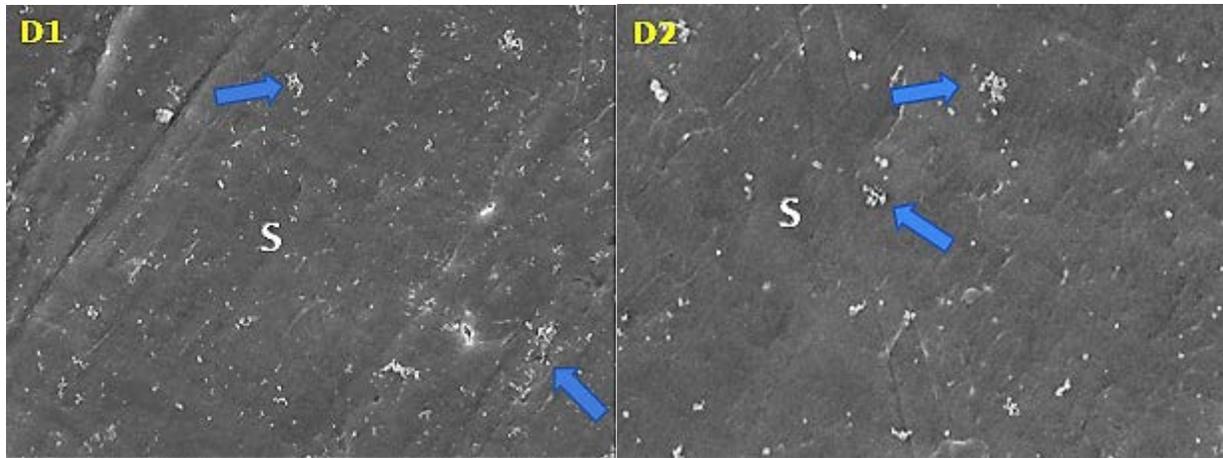


Figura 2-11. Microfotografías electrónicas de PTFE-teflón a 500x (D1) y 3000x (D2). Diversos cúmulos de conglomerados que se corresponde al CAP se muestran con flechas de color azul.

Estos resultados demuestran que la *P. salmonis* es capaz de adherirse a la superficie de ciertos tipos de sustratos que se emplean en la acuicultura. Sin embargo, se estima que se requieren estudios adicionales de campo, con un mayor número de muestras y una mayor duración del estudio para concluir la importancia biológica de los materiales inertes como reservorios de *P. salmonis* en el medio acuático fuera del hospedero. La configuración experimental de dichos estudios adicionales debería estar dedicada a estudiar la prevalencia, viabilidad e infectividad de las bacterias presentes en las biopelículas en material inerte en el medio marino.

Sedimentos

En la acuicultura intensiva, puede producirse un aumento de la sedimentación de desechos de peces orgánicos debajo de las jaulas y en el entorno inmediato. Estos sedimentos consisten principalmente en residuos de forraje y material fecal de peces que puede contener patógenos. Los patógenos bacterianos tienden a adherirse a la materia particulada y, a diferencia de la suspensión bacteriana en la columna de agua, los sedimentos permanecen en su lugar en las inmediaciones del centro de producción. Por lo tanto, es posible que el sedimento sea un reservorio para *P. salmonis* y presente un riesgo de reinfección después de la resuspensión.

En un estudio noruego, en el centro de salmón del Atlántico, la presencia de *Vibrio salmonicida* en números altos (10^6 células por gramo de sedimento) se informó anteriormente (Enger et al. 1989). Cabe señalar que en ese estudio, se detectaron altas cantidades de bacterias en los sedimentos después de más de 100 días de incidencia de la enfermedad, lo que sugiere un alto tiempo de supervivencia de *Vibrio salmonicida* en el medio marino. Harriague et al. (2008) también informó la presencia de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* en muestras de sedimentos y agua (Harriague et al. 2008).

En este estudio, se detectaron niveles bajos de *P. salmonis* en las muestras de sedimentos recolectadas de todas los centros muestreados, con el número más bajo encontrado en los sedimentos del centro 2. Cuando se compararon los metadatos del centro con los números de *P. salmonis* en el sedimento con la mortalidad acumulada de SRS en el ciclo de producción anterior, se aprecia que ésta fue la más baja en comparación con otros centros muestreados. Por otro lado, el centro 1, que tuvo tasas de mortalidad altas en el ciclo anterior también tuvo los números más altos de *P. salmonis* en los sedimentos. Los resultados apuntan hacia la acumulación de *P. salmonis* en los sedimentos en respuesta a la prevalencia de la enfermedad. Por lo tanto, se requiere un trabajo de investigación para determinar la duración del *P. salmonis* en los sedimentos, ya que los sedimentos pueden ser un reservorio importante de *P. salmonis*.

En el presente estudio, la detección de *P. salmonis* en el sedimento alrededor del centro de producción de peces con brotes activos de enfermedad también sugiere que el sedimento podría ser una fuente de *P. salmonis*. En particular, en los eventos con alta influencia de las mareas o mares agitados, que pueden conducir a la resuspensión de bacterias de los sedimentos. Sin embargo, se requiere investigación adicional para confirmar los hallazgos de este estudio, ya que la duración del estudio y el tamaño muestral son relativamente pequeños. Además, se requiere un trabajo de investigación adicional para determinar la viabilidad y la infectividad de las células de *P. salmonis* en los sedimentos.

Peces silvestres y otros animales como reservorios.

El papel de los vectores en la transmisión de *P. salmonis* en el medio marino y el modo de transmisión, sigue siendo desconocido (Rozas and Enríquez 2014). En un estudio anterior (Contreras-Lynch et al. 2015), se informó sobre la presencia de *P. salmonis* en las especies de peces chilenas nativas *Eleginops maclovinus*, *Odontesthes regia*, *Sebastes capensis* y *Salilota australis*.

En este estudio, hemos detectado sistemáticamente *P. salmonis* en las branquias de peces silvestres capturados alrededor de las granjas en el momento del muestreo. Se encontró que *Eleginops maclovinus* y *Sebastes capensis* portaban *P. salmonis*. De todos los órganos internos de los peces, solo se encontró un pez salvaje que muestra la presencia de infección por *P. salmonis* en los órganos internos. En esta etapa, el papel de la población de peces silvestres en la propagación de *P. salmonis* sigue sin estar claro y debe investigarse más.

Moluscos

Se ha informado que *P. salmonis* puede replicarse en líneas celulares derivadas de insectos y ranas, lo que sugiere la posibilidad de persistir en invertebrados y poiquilotermos que no son peces (Birkbeck et al. 2004). En este estudio, hemos recopilado y analizado muestras de bivalvos marinos. Los resultados de la aplicación del PCR binario indican que todas las muestras recopiladas fueron negativas a la presencia de *P. salmonis*.

Para profundizar en la importancia de bivalvos marinos como posibles reservorios de *P. salmonis*, se realizaron experimentos *in vitro* para estudiar la formación del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) sobre conchas de choritos (*Mytilus chilensis*). Las muestras de conchas de choritos- clasificados mediante las claves taxonómicas descritas por Aldea y Valdovinos (2005)- fueron adquiridas en un terminal Pesquero de Santiago. Se seleccionaron choritos juveniles de un tamaño aproximado de 4 cm de largo, de superficie lisa, grosor (similar), color (uniforme) y libre de alteraciones macroscópicas. Las conchas de chorito se seccionaron con una sierra para metal (Redline®) obteniendo trozos de aproximadamente 0,5 cm². Las muestras fueron tratadas con un protocolo de limpieza y desinfección, la limpieza mecánica fue con cepillo de dientes en agua destilada tibia 25°C, en la desinfección se empleó un desinfectante en base a amonio cuaternario a una concentración 200 ppm, durante 2 horas, luego fueron lavados y enjuagados en agua destilada estéril y filtrada, para posteriormente ser mantenidas a -20°C hasta su utilización. La formación del CAP fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Se utilizó un aislado de la cepa LF-89 obtenido de un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cultivado en mar, pasaje dos, aportado por el Dr. Marcos Godoy (el cual fue certificado por el Laboratorio ETECMA de Puerto Montt). En el Laboratorio Nacional de Referencia de la FAVET, la bacteria fue confirmada como *P. salmonis* mediante PCR y secuenciación del gen 16S ribosomal. La bacteria fue reproducida en la línea celular CHSE-214 a temperatura de 15 °C (Fryer et al. 1990) hasta lograr un 100% ECP. El medio de cultivo con la bacteria fue filtrado en poro de 0,5 µm de diámetro (Minisart®) para eliminar restos celulares. El sobrenadante

obtenido fue diluido con agua de mar en una proporción 1:10 y posteriormente titulado en placas de agar con medio de cultivo IFOP-PsM11 (Contreras *et al.* 2017), medio especialmente formulado para el crecimiento de *P. salmonis*. Para el experimento se utilizó un título de 400.000 UFC/ml.

También se utilizó un aislado de la cepa EM-90 obtenido de un brote de piscirickettsiosis en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivado en mar, pasaje tres, aportado por el Dr. Marcos Godoy (el cual fue certificado por el Laboratorio ETECMA de Puerto Montt). En el Laboratorio Nacional de Referencia de la FAVET, la bacteria fue confirmada como *P. salmonis* mediante PCR y secuenciación del gen 16S ribosomal. La bacteria fue reproducida en la línea celular CHSE-214 a temperatura de 15 °C (Fryer *et al.* 1990) hasta lograr un 100% ECP. El medio de cultivo con la bacteria fue filtrado en poro de 0,5 µm de diámetro (Minisart[®]) para eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido fue diluido con agua de mar en una proporción 1:10 y posteriormente titulado en microplacas de 20 pocillos que tenían una monocapa de células de la línea CHSE-214 (Fryer *et al.* 1990). El título obtenido fue de 10^{5,3} TCID₅₀/ml.

El CAP fue observado en la superficie de la concha de chorito mediante MEB a 1000x y 3000x de aumento. Sobre la superficie de la concha se observaron diversos cúmulos de conglomerados correspondientes al CAP. Además en las micrografías de mayor aumento se observó la presencia de la bacteria *P. salmonis* entre el CAP formado. El fenómeno se presentó en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h).

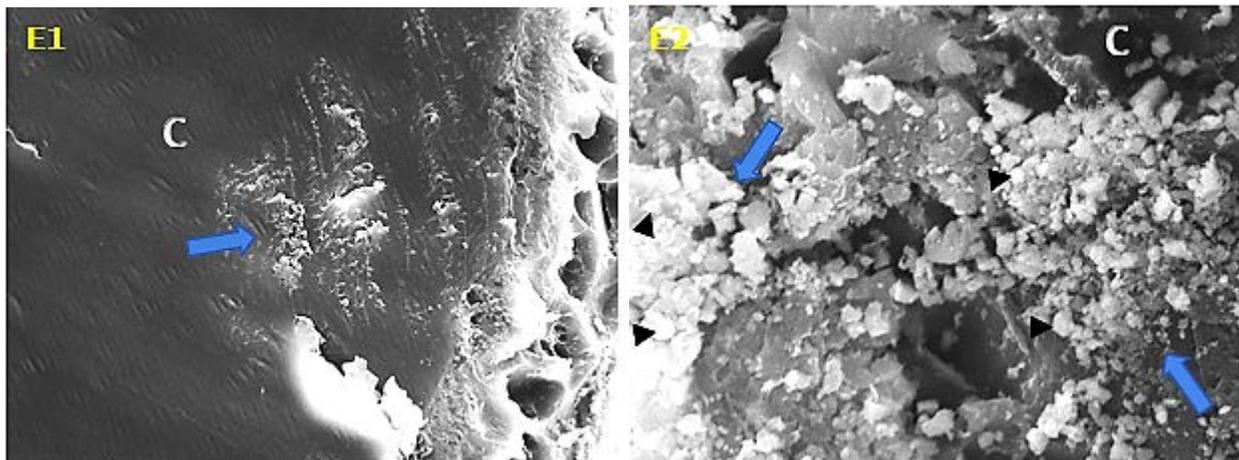


Figura 2-12. Microfotografías electrónicas de concha de chorito a 500x (E1) y concha de chorito a 3000x (E2). Diversos cúmulos de conglomerados que se corresponde al CAP se muestran con flechas de color azul.

La multiplicación de la *Piscirickettsia salmonis* y evaluación de viabilidad post ensayo de adhesión, se realizó en la línea celular CHSE-214 derivada de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). Las células fueron mantenidas en medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle (Biological Industries[®]), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biological Industries[®]) (MEM-10), L-glutamina (Biological Industries[®]) y 1% bicarbonato de sodio, para mantener un pH= 7,4. Fueron cultivadas y subcultivadas hasta una confluencia 100% a una temperatura de 15°C. Los resultados indican que la bacteria mantuvo su efecto citopático hasta 15 días post exposición en la monocapa celular. Los detalles de la metodología y resultados se pueden observar en el Appendix A

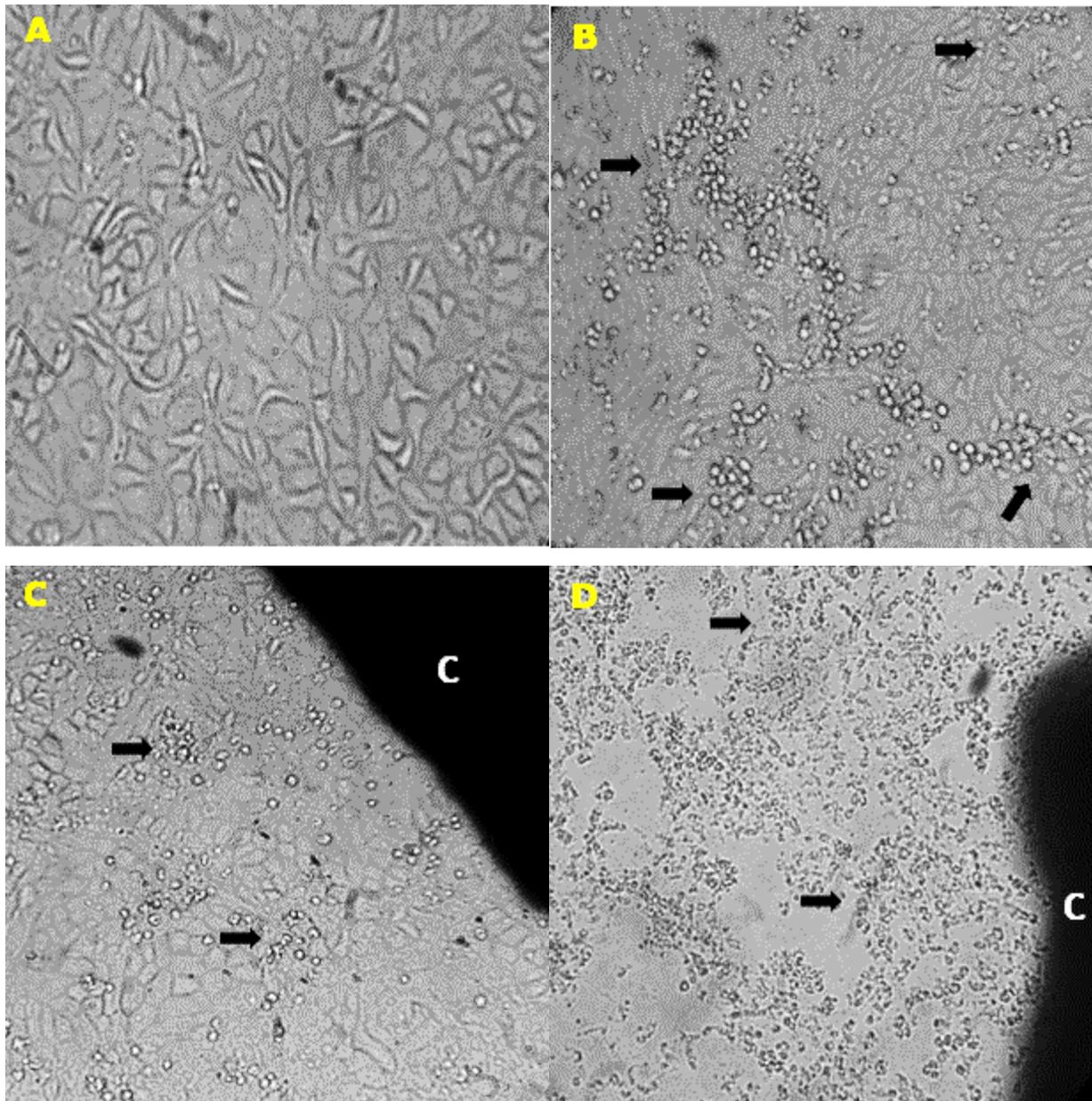


Figura 2-13. Las microfotografías de microscopio invertido con luz polarizada corresponden a: cultivo celular normal de la línea CHSE-214 (A), efecto citopático (ECP) característico del crecimiento y desarrollo de *P. salmonis* en células CHSE-214 (B), ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que presentaba CAP en medio agua de mar (C) y ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que presentaba CAP en medio MEM-4 (D). C= Concha. Los focos de iniciación de ECP se muestran con flechas negras.

Estos resultados demuestran que *P. salmonis* es capaz de adherirse a la superficie de sustratos bióticos, como conchas de choritos. Sin embargo, en el estudio de campo no se logró identificar la presencia de la bacteria en ninguna de las muestras analizadas. Por lo tanto, se estima que se requieren estudios adicionales de campo, con un mayor número de muestras y una mayor duración del estudio para concluir la importancia biológica de *Mytilus chilensis* como reservorios de *P. salmonis* en el medio acuático fuera del hospedero. La configuración experimental de dichos estudios adicionales debería estar dedicada a estudiar la prevalencia, viabilidad e infectividad de las bacterias presentes en superficies biológicas del medio marino.

2.7 Posibles reservorios y rutas de difusión.

Se sabe que *P. salmonis* sobrevive y se replica dentro de vacuolas citoplásmicas unidas a la membrana en células de peces infectados, lo que lleva a una infección sistémica. La ruta de transmisión de la enfermedad no se comprende completamente; sin embargo, se ha informado que la penetración de la piel y/o las branquias del salmón por *P. salmonis* ocasiona el inicio de la infección en los animales sometidos a condiciones experimentales (Smith *et al.* 1999, Smith *et al.* 2004). En estudios realizados por Smith *et al.* (1999), sobre la ruta de entrada de *P. salmonis* en la trucha arco iris, se informó que la bacteria penetra la piel en ausencia de lesión y sin la ayuda de vectores. Además, se demostró que *P. salmonis* alcanza los capilares branquiales y se disemina a través del cuerpo en un tiempo relativamente corto. El contacto directo entre peces y el agua contaminada por *P. salmonis* se considera como el principal mecanismo para la transferencia de enfermedades (Rees *et al.* 2014).

Aunque actualmente no existe información sobre la tasa de desprendimiento de *P. salmonis* por parte de los peces enfermos, los números a nivel de jaula podrían ser bastante altos. Se ha informado que la propagación de virus de salmón atlántico infectado con IHNV tiene un promedio de $3,2 \times 10^7$ pfu de peces por pez por hora (Garver *et al.* 2013). Sin embargo, aunque las infecciones bacterianas tienden a ser menos virulentas en comparación con las infecciones bacterianas con tasas de desprendimiento de bacterias varias magnitudes inferiores, aún así, las bacterias podrían ser eliminadas en cantidades sustanciales desde la jaula enferma hasta el agua. En este estudio, se obtuvieron valores de *P. salmonis* tan altos como 10^3 por L de agua alrededor del centro 6, lo que sugiere que se pueden esperar números muy altos de *P. salmonis* en el pick de la enfermedad.

En este estudio, hemos encontrado una presencia consistente de *P. salmonis* en el agua en números que varían de 10 a 9×10^3 células L^{-1} de agua. La propagación de la enfermedad podría ser más rápida si los factores ambientales fueran favorables para la supervivencia de las bacterias o la ubicación del centro favoreciera que los patógenos no se alejen rápidamente en el agua (debido a una menor circulación de agua).

La resuspensión de bacterias de los sedimentos también es posible, ya que se ha demostrado la resuspensión de *E. coli* y *V. salmonicida* unida a sedimentos en el medio ambiente acuático (Enger *et al.* 1989, Jamieson *et al.* 2005). Nuestros resultados también sugieren que los sedimentos alrededor de los centros de producción de peces infectados podrían ser otro reservorio de bacterias. Los sedimentos debajo de las jaulas podrían constituir un reservorio significativo y una ruta de diseminación del *P. salmonis*, sin embargo, se requiere investigación adicional para confirmar los hallazgos de este estudio.

En general, las bacterias que sobreviven en una etapa viable e infecciosa en el agua y los sedimentos podrían ser un reservorio importante y una ruta de difusión de SRS. La bacteria puede encontrar su camino hacia el cuerpo de los peces a través de las branquias, ya que hemos observado un número de peces silvestres con presencia de *P. salmonis* en las branquias. En un estudio sobre salmón del Atlántico, las branquias se informaron como portales de entrada para la transmisión natural de *P. salmonis* (Almendras *et al.* 1997).

P. salmonis ha sido reportado en especies de peces nativos de Chile *Eleginops maclovinus*, *Odontesthes regia*, *Sebastes capensis* y *Salilota australis* en un estudio previo (Contreras-Lynch *et al.* 2015). Nuestros resultados están de acuerdo con el hallazgo de este estudio, es plausible que los peces silvestres portadores de *P. salmonis* puedan transferir la enfermedad a los peces cultivados, sin embargo, queda por demostrar. Es más probable que los peces salvajes enfermos también contribuyan a la carga de patógenos en el medio ambiente.

Se sabe que los patógenos bacterianos, incluso presentes en cantidades bajas en el agua, pueden incrustarse en las biopelículas, lo que puede prolongar su supervivencia al brindar una mayor resistencia a condiciones ambientales adversas (Wingender and Flemming 2011). Los resultados del presente estudio son concordantes con que *P. salmonis* es capaz de adherirse a la superficie de ciertos tipos de sustratos que se emplean en la acuicultura en Chile.

Se ha informado que *P. salmonis* puede replicarse en líneas celulares derivadas de insectos y ranas, lo que sugiere la posibilidad de persistir en invertebrados y poiquilotermos que no son peces (Birkbeck et al. 2004). Los resultados de este estudio muestran que *P. salmonis* tiene la capacidad potencial de adherirse a la superficie de conchas de choritos (demostrado *en vitro*). Sin embargo, en el estudio de campo no se logró identificar la presencia de la bacteria en ninguna de las muestras analizadas. Por lo que el papel de los bivalvos como reservorio de *P. salmonis* está aún por demostrarse.

Debido a los resultados negativos del PCR en todas las muestras de zooplancton, lo que sugiere que es poco probable que el zooplancton sea un reservorio significativo de *P. salmonis*.

3 Determinación de la dinámica poblacional genómica de cepas de *P. salmonis*

Desde 2005, el desarrollo de nuevos métodos de secuenciación de alto rendimiento (Hall 2007), junto con una fuerte disminución del costo de los secuenciadores y los reactivos, permitió a muchos laboratorios desarrollar sus propios proyectos de secuenciación, lo que llevó a un aumento sorprendente del número de genomas secuenciados, que ha superado los 100.000 hasta la fecha. La enorme fuente de información proporcionada por las secuencias del genoma revolucionó los aspectos básicos de la microbiología. En particular, el tamaño del genoma de las bacterias varía de 139 kb para *Candidatus Tremblaya princeps* a 14.782 kb para *Sorangium cellulosum* (<http://genomesonline.org/>). El análisis del genoma, también conocido como minería genómica o análisis in-silico, constituye actualmente una herramienta de investigación insustituible para diversos aspectos de la microbiología. En particular, la disponibilidad de genomas de prácticamente todos los patógenos bacterianos humanos ha abierto perspectivas en los campos del diagnóstico, la epidemiología, la fisiopatología y el tratamiento. Existen múltiples aplicaciones para la genómica en microbiología clínica:

- La genómica en tiempo real se puede usar para investigar brotes de enfermedades infecciosas.
- Los genomas bacterianos se pueden usar como fuentes objetivo para la detección, identificación o genotipado molecular.
- El contenido del gen, obtenido en comparación con las bases de datos, puede buscar rasgos fenotípicos específicos, como marcadores de resistencia a antibióticos o virulencia, o vías metabólicas deficientes que permitan el diseño de medios de cultivo mejorados.
- Los epítomos antigénicos detectados en el proteoma deducido pueden usarse para aplicaciones serológicas, desarrollo de anticuerpos monoclonales o desarrollo de vacunas.
- Descripción taxonómica de nuevas especies bacterianas.

3.1 Análisis de pangenómica

El pangenoma, formado por un genoma central (genes compartidos por todas las cepas), un genoma prescindible (genes compartidos por algunas cepas, pero no todos) y genes específicos de cepas, representa el conjunto completo de genes de una especie. El tamaño del pangenoma de las bacterias puede diferir mucho entre especies y géneros, en parte debido a la frecuencia de recombinación homóloga y transferencia lateral de genes. Por lo tanto, un genoma por especie a menudo subestima la complejidad genética a nivel de especie. Para *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* se estimó que un promedio de 441, 33 y 27 nuevos genes, respectivamente, se darían a conocer por cada nuevo genoma secuenciado. Tales variaciones dentro de las especies podrían estar vinculadas a la adaptación de nicho. Las bacterias que viven en nichos con acceso limitado al acervo genético microbiano global, como *Bacillus anthracis*, *Chlamydia trachomatis* y *Mycobacterium tuberculosis*, tienen una diversidad genómica intraespecífica mucho más pequeña (Mira et al. 2010). El ejemplo más extremo de homogeneidad del genoma es *Buchnera aphidicola*, que no experimentó reordenamiento del genoma ni duplicación o transferencia de genes.

3.2 Diseño de ensayos moleculares para la detección de patógenos bacterianos

Al dar acceso al repertorio genético completo de una bacteria, la genómica permitió una selección racional de los objetivos de la PCR de acuerdo con el objetivo deseado (género, especie, subespecie o cepa específica) (Li et al. 2009). Las secuencias genómicas también se pueden utilizar para diseñar ensayos de PCR multiplex que permitan la detección y discriminación simultáneas de varios microorganismos, como fue el caso de los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Además, el estudio de secuencias genómicas permitió la optimización de la sensibilidad de detección, ya sea seleccionando un gen o fragmento de ADN no codificante presente como varias copias en el genoma o diseñando ensayos de PCR anidados con un riesgo reducido de contaminación, como el “PCR suicida”.

3.3 Genotipia molecular

Los métodos de tipificación molecular han reemplazado a los métodos fenotípicos. De una manera similar a la descrita anteriormente, las secuencias genómicas pueden ser una fuente de objetivos de genotipado. Varios métodos de genotipificación, clasificados como no basados en secuencias y basados en secuencias, se han diseñado utilizando secuencias genómicas.

Los métodos basados en la no secuencia se basan en el diseño in silico de los perfiles de macro-restricción para enzimas de corte raras que pueden servir para ensayos basados en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, en la selección genómica de polimorfismos de un solo nucleótido o repeticiones en tándem (Fournier et al. 2007). Dichas estrategias se utilizaron para la tipificación de los aislados de *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium* o *Coxiella burnetii*.

Varios métodos de genotipificación basados en secuencias se han diseñado sobre la base de secuencias genómicas, incluida la tipificación de secuencias multilocus (MLST) para el estudio de *Escherichia coli* resistente a múltiples fármacos o *Streptococcus pneumoniae*, y la tipificación multiespaciadora (MST) para la tipificación de *Yersinia pestis*, *Coxiella burnetii*, Aislamientos de *Bartonella* o *Rickettsia* (Drancourt et al. 2004). Sin embargo, la secuenciación bacteriana de genoma completo, al dar acceso a todo el contenido genético de una cepa, es el método de genotipado basado en secuencias más discriminatorio, como lo demostró la tipificación basada en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* o *Staphylococcus aureus* aislamientos clínicos (Köser et al. 2012). Sin embargo, debido a su costo, incluso si ha disminuido profundamente desde 1995, la secuenciación del genoma no es, hasta el momento, una herramienta de rutina en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica.

Las micromatrices de ADN son un intermediario entre los métodos no basados en secuencias y basados en secuencias, ya que permiten la detección de diferencias sutiles o diferencias específicas de especies mediante la comparación simultánea de cepas a nivel del genoma completo. Tal aplicación se usó para discriminar entre las cepas ambientales de *Legionella pneumophila*. Otra ventaja de los microarrays es que su interpretación puede ser automatizada. También se pueden usar microarrays de ADN para detectar e identificar microorganismos en floras complejas (Fournier et al. 2007).

3.4 Predicción del fenotipo

3.4.1 Detección de resistencia a los antimicrobianos

El rápido aumento y la propagación de las bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR) se han convertido en un importante problema de salud pública en todo el mundo. La secuenciación del genoma tiene el potencial de identificar los diversos determinantes de resistencia genética de una cepa bacteriana determinada, como se hizo para un MDR *Acinetobacter baumannii* que causó un brote nacional de infecciones nosocomiales en Francia (Fournier et al. 2006). Alternativamente, la secuenciación del genoma puede ayudar a comprender la dinámica de la propagación de la resistencia en una especie bacteriana, como fue el caso de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, la secuenciación del genoma ha demostrado que los factores determinantes de la resistencia genética, una vez que se cree que surgieron principalmente bajo la presión de los antibióticos, pueden haber surgido de fuentes antiguas o ambientales. Además, los hallazgos genómicos pueden permitir el desarrollo de ensayos de PCR dirigidos específicamente a genes causantes de resistencia o mutaciones que pueden servir como herramientas de detección de rutina.

Otra situación que demuestra el valor de la secuenciación del genoma es durante la identificación de los mecanismos de resistencia en bacterias exigentes, por lo que las pruebas fenotípicas de resistencia a los antibióticos son difíciles o imposibles, como en *Tropheryma whippelii*, donde el genoma reveló la presencia de genes mutados *gyrA* y *parC*, lo que explica la resistencia a las fluoroquinolonas. La secuenciación del genoma también puede permitir la identificación del mecanismo de acción y los genes diana de los nuevos compuestos antimicrobianos.

3.4.1 Identificación de factores de virulencia

Los genes de virulencia son objetivos potenciales para la evaluación de riesgos y estrategias de intervención. La identificación de los genes de virulencia puede llevar al desarrollo de pruebas de detección rápidas para proceder con medidas de aislamiento efectivas en pacientes hospitalizados o retrasar la hospitalización después de la descontaminación. Los análisis de secuencia comparativos proporcionan información sobre los mecanismos patógenos de las bacterias, lo que permite la identificación de proteínas de virulencia conocidas con secuencias o motivos conservados, así como nuevas proteínas de virulencia putativas. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que la reducción del genoma, en lugar de la ganancia de genes, también puede conferir virulencia, posiblemente por pérdida de regulación (Merhej et al. 2013). Además de permitir una mejor comprensión de la patogénesis bacteriana, la identificación de los factores de virulencia en los genomas también puede permitir el diseño de nuevos antimicrobianos potenciales además de permitir la identificación de dianas antimicrobianas.

3.5 Objetivos del presente proyecto

En el presente proyecto, nuestro objetivo es comprender la dinámica poblacional de las cepas de *Piscirickettsia salmonis* que infectan los centros de producción de salmón en Chile, así como descifrar la virulencia y la resistencia a los antibióticos que tienen sus genomas. Para esto, seleccionamos 60 cepas de *P. salmonis* para la secuenciación completa del genoma. Los aislados se recuperaron durante un período de 10 años durante los brotes de *piscirickettsiosis* que ocurrieron en varios centros de producción de salmón, así como en diferentes períodos de tiempo y ubicaciones geográficas a lo largo del sur de Chile. A partir de este análisis genómico, se

desarrollaron herramientas específicas de detección y genotipado para comprender mejor el comportamiento de este agente infeccioso.

Objetivos específicos:

- Comparar el contenido del gen de 40 cepas de *P. salmonis* y determine el tamaño del pangenoma (genes esenciales y prescindibles).
- Identificar los marcadores genéticos que constituyen el mobiloma (genes resultantes de la transferencia lateral de genes, plásmidos, transposones, fagos, secuencias de inserción).
- Detectar pequeños RNAs y secuencia repetida.
- Identificar genes asociados a la virulencia.
- Listar marcadores genéticos asociados con la resistencia a los antimicrobianos.
- Se realizó una lista de genes candidatos de interés para estudios funcionales adicionales en las dos categorías anteriores.
- Evaluar las inferencias filogenéticas entre las cepas estudiadas.
- Identificar secuencias específicas de especies y cepas

3.6 Materiales y métodos

3.6.1 Cultivo de cepas bacterianas

Todos los *P. salmonis* se aislaron y se cultivaron a 18°C hasta 8 días en un medio sólido como se describe anteriormente (Contreras-Lynch et al. 2017).

3.6.2 Confirmación de la identificación de la cepa mediante secuenciación 16S rRNA

La secuencia de nucleótidos del ARNr 16S obtenida por amplificación y secuenciación utilizando los cebadores fD1 y rP2 se secuenció como se describió anteriormente (Drancourt et al. 2000). Se realizó un BLASTN contra GenBank (Benson et al. 2015). Se alinearon las secuencias y se obtuvieron inferencias filogenéticas utilizando el software MEGA (método de máxima verosimilitud) (Tamura et al. 2013).

3.6.3 Preparación de ADN genómico

Las cepas cultivadas como se describió anteriormente se suspendieron individualmente en 400 µL de tampón TE. Luego se diluyeron 200 µL de esta suspensión en 1 mL de tampón TE para el tratamiento de lisis, que incluyó una incubación de 30 minutos con 2,5 µg / µL de lisozima a 37 ° C, seguido de una incubación durante la noche con 20 µg / µL de proteinasa K a 37°C. El ADN extraído se purificó luego utilizando 3 extracciones sucesivas de fenol-cloroformo y precipitaciones de etanol a -20° C durante la noche. Después de la centrifugación, el ADN se resuspendió en 160 µL de tampón TE.

3.6.4 Secuenciación y ensamblaje del genoma

El ADN genómico (ADNg) de cada cepa se secuenció utilizando secuenciadores MiSeq (Illumina Inc, San Diego, CA, EE. UU.) Con la estrategia Paired-End. Cada gDNA se codificó con un código de barras para mezclarse con el ADN de otros aislados utilizando el kit de preparación de muestras Nextera Paired-End (Illumina).

Cada ADNg se cuantificó mediante un ensayo Qubit utilizando el kit de alta sensibilidad (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). La biblioteca Paired-End se preparó con 1,5 µg de ADN genómico utilizando la guía Nextera Paired End (Illumina). Cada muestra de gDNA se fragmentará y etiquetará simultáneamente con un adaptador de unión de extremo emparejado. El patrón de fragmentación se validó en un Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, EE. UU.) Con una etiqueta de laboratorio de 7500 ADN. Los fragmentos marcados se circularizaron y se cortaron mecánicamente en pequeños fragmentos con un tamaño óptimo de 1.550 pb en el dispositivo Covaris S2 en tubos T6 (Covaris, Woburn, MA, EE. UU.). El perfil de la biblioteca se visualizó en un Bioanalyzer LabChip de alta sensibilidad (Agilent Technologies) y se midió la biblioteca de concentración final. Las bibliotecas se normalizaron a 2 nM y se agruparon. Después de un paso de desnaturalización y dilución a 15 pM, el conjunto de bibliotecas se cargó en el cartucho de reactivo y luego en el instrumento junto con la celda de flujo. La generación automatizada de clústeres y la ejecución de la secuenciación se realizaron en una única ejecución de 2x301-bp. Las lecturas pareadas obtenidas se recortaron y luego se ensamblaron utilizando espadas (Bankevich et al. 2012).

3.6.5 Anotación genómica y comparación

Los marcos de lectura abiertos (ORF) se predijeron usando Prodigal con parámetros predeterminados (Hyatt et al. 2010). Sin embargo, los ORF predichos se excluyeron si abarcan una región de brecha de secuenciación. Las secuencias de proteínas bacterianas predichas fueron buscadas contra el GenBank (Benson et al. 2015) y bases de datos de grupos de ortólogos (COG) que utilizan BLASTP. Los ARNt y los ARNr se predijeron utilizando las herramientas tRNAScan-SE y RNAmmer (Lagesen et al. 2007), respectivamente. Los péptidos de señal y el número de hélices transmembrana se predijeron utilizando SignalP (Bendtsen et al. 2004) y TMHMM (Krogh et al. 2001), respectivamente. Los elementos genéticos móviles se predijeron usando PHAST y RAST (Zhou et al. 2011). El algoritmo CRISPRFinder se usó para identificar los loci CRISPR (repetición palindrómica corta interplazada regularmente intercaladas) (Grissa et al. 2007). Se identificó ORFans si su valor BLASTP E es inferior a $1e-03$ para una longitud de alineación superior a 80 aminoácidos. Si las longitudes de alineación son más cortas que 80 aminoácidos, usaremos un valor E de $1e-05$. Tales umbrales de parámetros ya se han utilizado en trabajos anteriores para definir ORFans.

Artemis (Rutherford et al. 2000) y DNA Plotter (Carver et al. 2009) se utilizaron para el manejo de datos y la visualización de características genómicas, respectivamente. Se realizó un análisis filogenómico FastTree (Price et al. 2009) basado en el programa de alineación del genoma de Malva (Darling et al. 2004).

Para evaluar el grado de similitud genómica en el nivel de nucleótidos entre las cepas estudiadas, usaremos tres parámetros: la hibridación digital ADN-ADN (dDDH) que muestra una alta correlación con DDH, utilizando el software GGDC, fórmula 2 (Meier-Kolthoff et al. 2013); el parámetro AGIOS que fue diseñado para ser independiente de DDH (Ramasamy et al. 2014). La última herramienta combina Proteinortho (Lechner et al. 2011) para detectar proteínas ortólogas entre genomas comparados dos por dos, luego recupera los genes correspondientes y luego determina el porcentaje medio de identidad de secuencia de nucleótidos entre ORF ortólogos usando el algoritmo de alineación global Needleman-Wunsch (Ramasamy et al. 2014). Finalmente, la identidad de nucleótido promedio (ANI) a nivel del genoma entre las cepas estudiadas se estimó utilizando BLASTN y el algoritmo descrito anteriormente (Lee et al. 2016).

3.6.6 Detección de marcadores de virulencia y resistencia antimicrobiana

La virulencia y los genes asociados a la resistencia antimicrobiana se detectaron en comparación con las bases de datos VFDB (Chen et al. 2016) y ARG-ANNOT (Gupta et al. 2014), respectivamente, con parámetros predeterminados.

3.7 Resultados y discusión

Secuenciamiento completo

El secuenciamiento completo se realizó en 60 aislados de *P. salmonis*. En la Tabla 3-1 se encuentra el listado de aislados secuenciados y georreferenciados que fue entregado al Cepario Nacional.

Tabla 3-1 Listado de aislados secuenciados y georreferenciados fue entregado al Cepario Nacional

| Correlativo | Código de aislado | ACS | Fecha de muestreo | Órgano | Especie | Longitud | Latitud |
|-------------|-------------------|-----|-------------------|------------------|----------------------|-------------|-------------|
| 1 | I21 | 1 | 06-09-2011 | Riñón | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 2 | I26 | 1 | 01-11-2011 | Riñón | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 3 | I29 | 17b | 07-07-2011 | Músculo | Trucha arcoíris | -78,5760535 | -42,0378036 |
| 4 | I31 | 17a | 20-12-2011 | Riñón | Salmón del atlántico | -78,4918704 | -42,2719941 |
| 5 | I32 | 17a | 30-07-2011 | Hígado | Salmón del atlántico | -78,4918704 | -42,2719941 |
| 6 | I33 | 17a | 06-12-2011 | Cerebro | Trucha arcoíris | -78,4918704 | -42,2719941 |
| 7 | I34 | 17a | 29-07-2011 | Músculo | Salmón del atlántico | -78,4918704 | -42,2719941 |
| 8 | I35 | 1 | 06-09-2011 | Cerebro | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 9 | I36 | 28b | 19-01-2017 | Riñón | Trucha arcoíris | -79,027355 | -45,3723694 |
| 10 | I38 | 9b | 17-01-2012 | Cerebro | Salmón del atlántico | -79,2444862 | -42,4549525 |
| 11 | I39 | 22 | 14-01-2012 | Cerebro | Salmón del atlántico | -78,8709772 | -41,6751476 |
| 12 | I43 | 23 | 20-02-2012 | Abseso | Salmón del atlántico | -78,8709772 | -41,6751476 |
| 13 | I44 | 1 | 08-02-2012 | Músculo | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 14 | I47 | 17b | 26-11-2011 | Riñón-Hígado | Salmón del atlántico | -78,5760535 | -42,0378036 |
| 15 | I15 | 17b | 25-11-2011 | Riñón-Hígado | Trucha arcoíris | -78,5760535 | -42,0378036 |
| 16 | I74 | 9b | 17-01-2012 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,2444862 | -42,4549525 |
| 17 | I71 | 28a | 25-05-2017 | Riñón | Salmón del atlántico | -79,4592265 | -45,3170804 |
| 18 | I69 | 1 | 29-12-2016 | Riñón | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 19 | I68 | 9a | 21-02-2012 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,4773786 | -42,4021266 |
| 20 | I67 | 17b | 25-11-2011 | Caverna muscular | Trucha arcoíris | -78,5760535 | -42,0378036 |
| 21 | I66 | 28c | 01-06-2017 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,3258469 | -45,3774701 |
| 22 | I65 | 2 | 29-03-2018 | Riñón | Salmón del atlántico | -78,8709772 | -41,6751476 |
| 23 | I64 | 9b | 09-01-2017 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,2444862 | -42,4549525 |
| 24 | I63 | 10a | 17-03-2017 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,5831816 | -42,5562172 |
| 25 | I62 | 28b | 29-03-2017 | Hígado | Trucha arcoíris | -79,027355 | -45,3723694 |

| | | | | | | | |
|----|-----|-----|------------|----------------------|----------------------|-------------|-------------|
| 26 | l61 | 28b | 18-01-2017 | Riñón | Trucha arcoíris | -79,027355 | -45,3723694 |
| 27 | l77 | 22 | 13-01-2012 | Hígado | Salmón del atlántico | -78,8709772 | -41,6751476 |
| 28 | l76 | 1 | 27-09-2018 | Cerebro | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 29 | l78 | 14 | 05-01-2012 | Hígado | Salmón del atlántico | -78,798523 | -42,8845417 |
| 30 | l85 | 22d | 03-04-2018 | Hígado | Salmón del atlántico | -80,1903851 | -45,4674567 |
| 31 | l86 | 23 | 14-02-2012 | Hígado | Salmón del atlántico | -78,8709772 | -41,6751476 |
| 32 | l72 | 3b | 21-04-2017 | Hígado | Trucha arcoíris | -79,2432674 | -41,8202022 |
| 33 | l73 | 8 | 04-04-207 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,161152 | -42,2675052 |
| 34 | l87 | 27 | 26-04-2017 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,3304967 | -45,6941438 |
| 35 | l88 | 1 | 28-03-2018 | Hígado | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 36 | l83 | 1 | 19-01-2012 | Cerebro | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 37 | l84 | 1 | 02-02-2012 | Hígado | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 38 | l1 | 19a | 29-10-2009 | Riñón-Cerebro | Trucha arcoíris | -80,2935874 | -44,2171466 |
| 39 | l2 | 1 | 30-07-2010 | Cerebro | Salmón coho | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 40 | l3 | 8 | 02-02-2017 | Bazo | Salmón del atlántico | -79,161152 | -42,2675052 |
| 41 | l4 | 28a | 28-03-2017 | Hígado | Trucha arcoíris | -79,4592265 | -45,3170804 |
| 42 | l5 | 10a | 06-04-2017 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,5831816 | -42,5562172 |
| 43 | l6 | 27 | 27-04-2017 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,3304967 | -45,6941438 |
| 44 | l8 | 10a | 24-07-2008 | Riñón | Salmón coho | -79,5831816 | -42,5562172 |
| 45 | l12 | 19a | 14-07-2009 | Riñón-Hígado-Ulcera | Trucha arcoíris | -80,2935874 | -44,2171466 |
| 46 | l13 | 17b | 28-04-2011 | Riñón-Hígado-Cerebro | Trucha arcoíris | -78,5760535 | -42,0378036 |
| 47 | l14 | 1 | 18-07-2008 | Riñón | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 48 | l15 | 17b | 25-11-2011 | Riñón-Hígado | Trucha arcoíris | -78,5760535 | -42,0378036 |
| 49 | l15 | 17b | 25-11-2011 | Riñón-Hígado | Trucha arcoíris | -78,5760535 | -42,0378036 |
| 50 | l16 | 15 | 23-12-2016 | Riñón | Salmón del atlántico | -78,999865 | -42,6893052 |
| 51 | l18 | 11 | 29-12-2016 | Riñón | Salmón del atlántico | -79,5036222 | -42,9496231 |
| 52 | l20 | 3b | 07-12-2017 | Bazo | Salmón coho | -79,2432674 | -41,8202022 |
| 53 | l75 | 9a | 05-07-2018 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,4773786 | -42,4021266 |
| 54 | l81 | 20 | 16-11-2018 | Riñón | Salmón del atlántico | -80,3655115 | -44,5719875 |
| 55 | l70 | 1 | 03-02-2012 | Cerebro | Trucha arcoíris | -78,3915144 | -41,5994428 |
| 56 | l7 | 22c | 30-05-2017 | Riñón | Salmón del atlántico | -80,3229936 | -45,2923648 |

| | | | | | | | |
|----|-----|-----|------------|-------------------|----------------------|-------------|-------------|
| 57 | I9 | 16 | 23-12-2010 | Riñón | Salmón del atlántico | -78,7205636 | -42,4650153 |
| 58 | I11 | 30a | 24-08-2010 | Riñón-Bazo-Hígado | Trucha arcoíris | -79,3751209 | -45,0632255 |
| 59 | I17 | 12b | 27-06-2017 | Hígado | Salmón del atlántico | -79,7599615 | -43,3463818 |
| 60 | I91 | 14 | 30-11-2018 | Hígado | Salmón del atlántico | -78,798523 | -42,8845417 |

Anotación genómica y comparación

Debido a la contaminación de 5 aislados de *P. salmonis* de los 60 originalmente disponibles, la información de 55 aislados se utilizó para evaluar el grado de similitud genómica en el nivel de nucleótidos entre las cepas estudiadas. En base al análisis de la información disponibles, se estimó que el tamaño del genoma varía de 3.048.700 (PC17) a 3.575.942 (PC11). El pangenoma de *P. salmonis* consistió en 1480 genes centrales, 2122 genes externos y 2434 genes únicos en la nube, específicos para cepas individuales, como se muestra en la Figura 3-1 a continuación. Como se puede ver en la Figura 3-2 los genomas principales se dividen en dos grupos distintos.

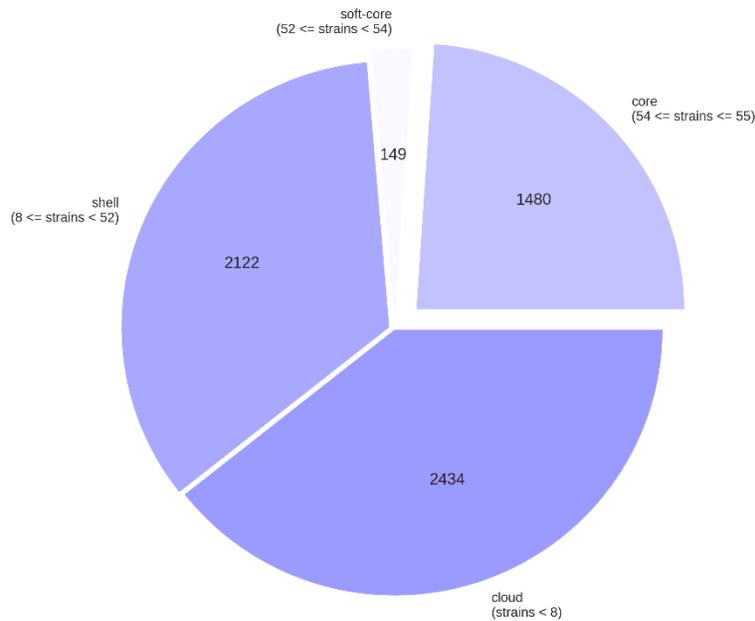


Figura 3-1. Gráfico circular que muestra la desagregación de la frecuencia de genes en 55 aislados de *P. salmonis*

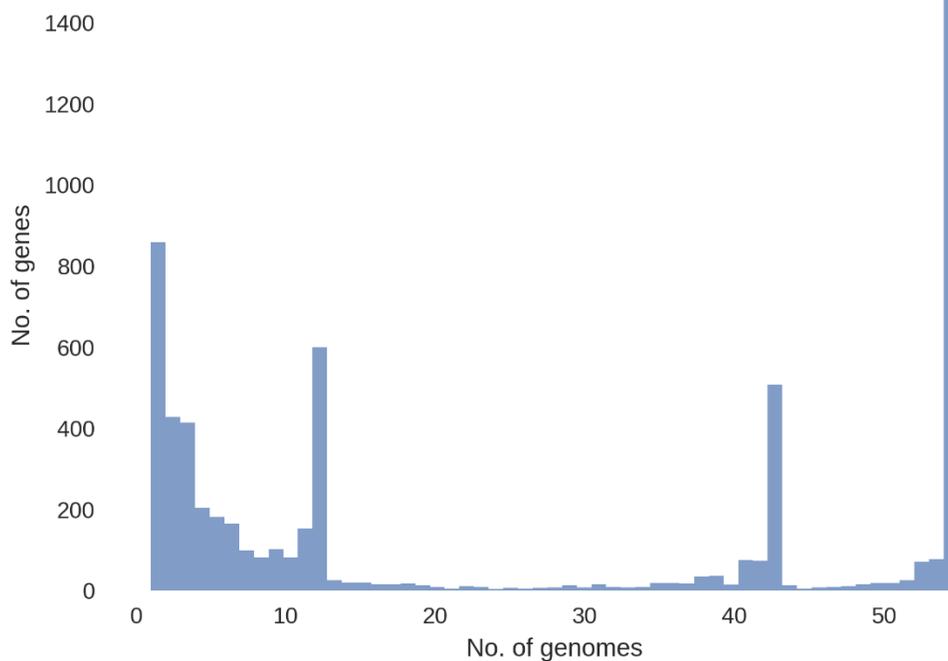


Figura 3-2. Frecuencia de los genes en los 55 aislados analizados de *P. salmonis*

Los valores de identidad de nucleótidos promedio por pares varían de 95.91 a 99.99%. Con base en estos valores, inferimos una distribución filogenética en 2 grupos principales y distantes. Esta observación de acuerdo con la prevalencia informada de dos genotipos LF y EP en áreas de cultivo de salmón en Chile, los que se muestran en la Figura 3-3 a continuación.

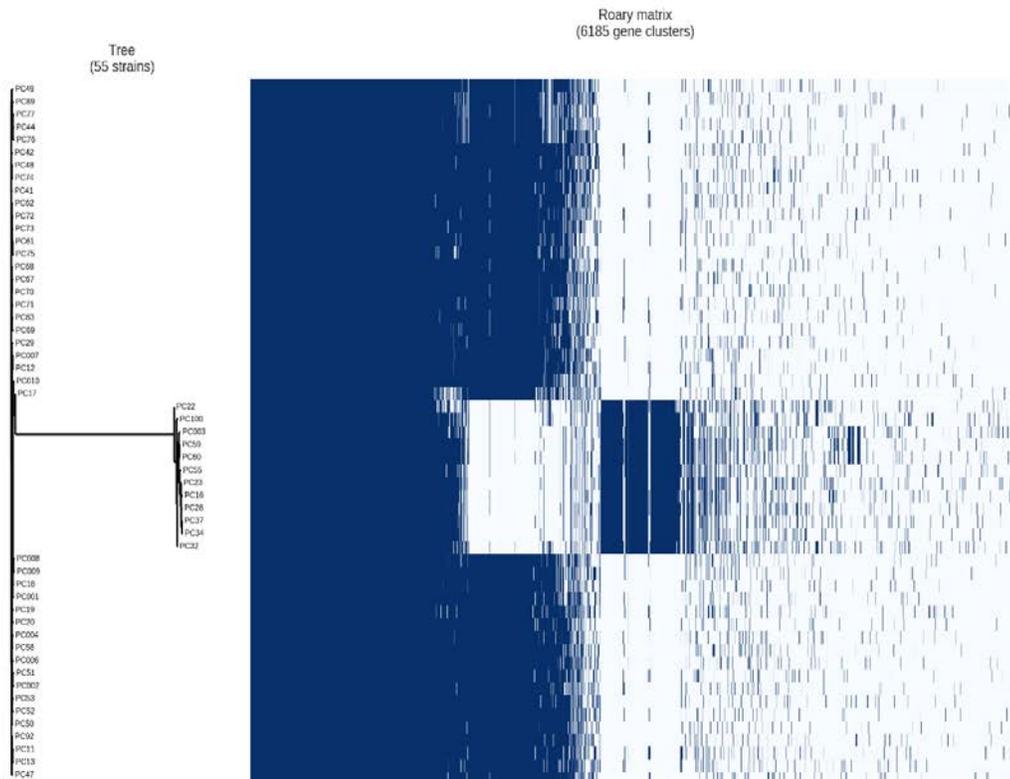


Figura 3-3 Dendrograma que muestra la distribución filogenética de 55 cepas de *P. salmonis* en 2 grupos principales y distantes

Genes de resistencia a antibióticos

Con el fin de superar la acción de los antibióticos, las bacterias han desarrollado una variedad de estrategias diferentes, como la modificación de medicamentos, la mutación del objetivo y las bombas de flujo de salida. Hay cinco genes transportadores (casete de unión a ATP (ABC), extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos (MATE), superfamilia de facilitadores principales (MFS), flujo de salida de múltiples medicamentos (Mex) y bombas de flujo de salida de múltiples fármacos (SMR)) involucradas en proporcionar resistencia intrínseca a los antibióticos en las bacterias.

Realizamos un análisis del genoma de 55 aislados de *P. salmonis* para determinar la presencia de determinantes de resistencia a los antibióticos. Vale la pena mencionar que nos hemos centrado en los genes demostrados para proporcionar resistencia a los antibióticos y las secuencias disponibles en la base de datos de resistencia a los antibióticos del NCBI.

En la Figura 3-4 se muestra la frecuencia de presentación de los genes de resistencia a antibióticos detectados en los 55 aislados de *P. salmonis* analizados.

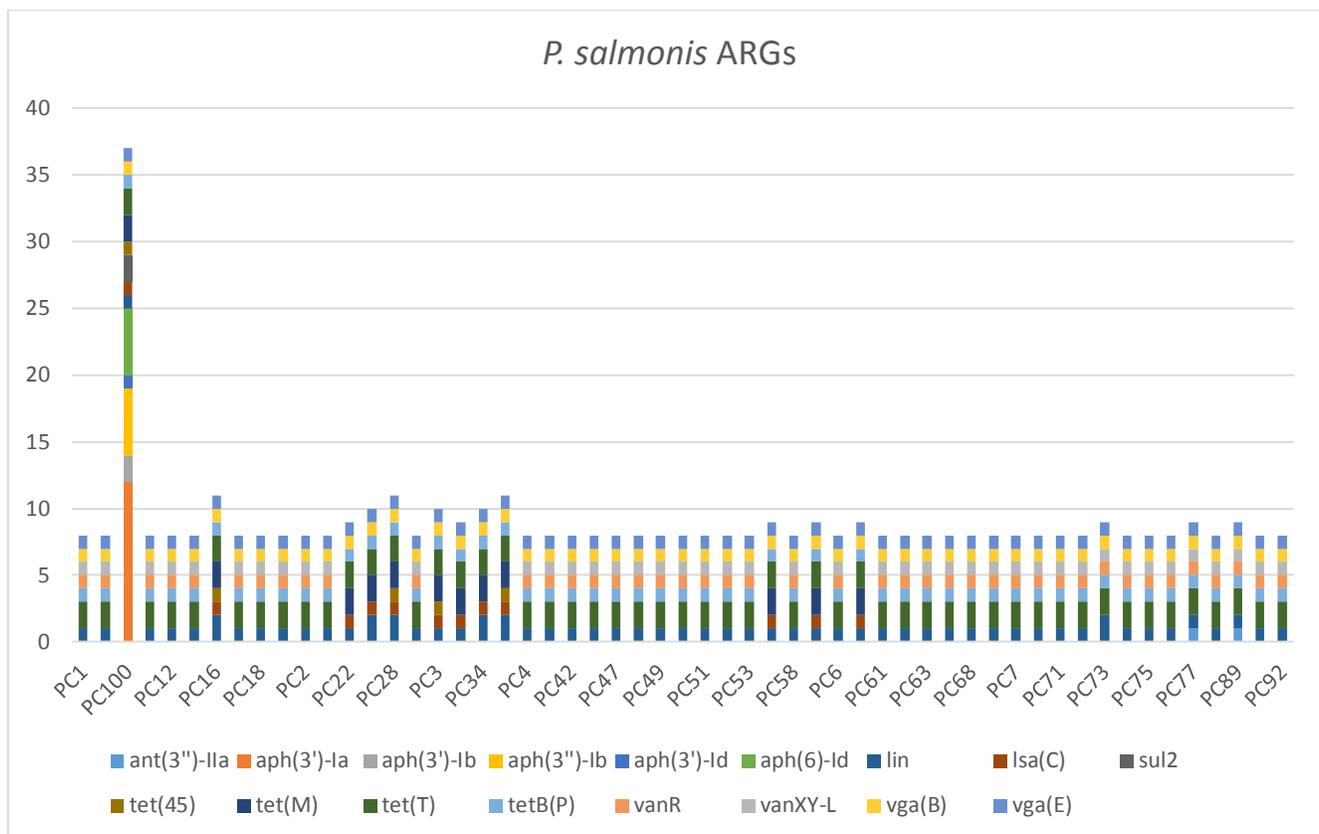


Figura 3-4. Presencia comparativa de genes de resistencia a antibióticos en 55 aislados de *P. salmonis*

La oxitetraciclina y el florfenicol son dos de los principales antibióticos utilizados en el cultivo de salmón en Chile para el control de *P. salmonis*. Los aislados seleccionados para el análisis genómico se seleccionaron después de la selección fenotípica para ambos antibióticos. Por lo tanto, se esperaba que los 60 aislados tuvieran algunos genes de resistencia a los mencionados antibióticos. En general, se encontró que las bacterias tienen entre 8 y 10 detritos de resistencia a los antibióticos. Sin embargo, algunos de ellos tenían un número mayor de ARG.

Los genes implicados en proporcionar resistencia a la tetraciclina, la proteína de protección ribosomal TetB (P), Tet (T) y Tet (M) de resistencia a la tetraciclina, estaban presentes en todos los aislados bacterianos. Además, la bomba de flujo de salida para el grupo ABC (casete de unión a ATP, que controla la eliminación del antibiótico a través de la membrana celular incluida, el gen de proteína de protección ribosómica tipo F Vga (B), Vga (E) y Lsa (C) estaban presentes en todos los aislados.

Además, en casi todos los aislados también se detectó el gen de protección ribosomal de tipo ABC-F tipo lmos0919. El gen transportador de tetraciclina EFS MFS Tet (45) también se detectó en varios aislados. Se sabe que las bombas de eflujo MFS están distribuidas de forma ubicua en bacterias (Roberts, 2005, Reddy et al., 2012) y están involucradas en la MDR, en particular fluoroquinolona, lincosamidas, novobiocina y resistencia a rifampicina (Mokracka et al., 2012).

Además, el gen de resistencia a la vancomicina van XY-L, vanR-C involucrado en la reestructuración de la pared celular de las bacterias también se detectó en varios aislados. La aminoglucósido nucleotidil transferasa ANT(3'')-IIaant(3'')-IIa que proporciona resistencia al grupo de aminoglucósidos (kanamicina, estreptomina y gentamicina) también se detectó en varios aislados.

Se notó que PC108 exhibió 119 proteínas relacionados con la generación de resistencia a los antibióticos y 41 genes de resistencia a los antibióticos, el detalle se puede ver en la tabla Tabla 3-2. En relación con estos aislados, que presentaron una amplia gama de genes de resistencia a los antibióticos para varias categorías de antibióticos, incluidas la tetraciclina, las sulfonamidas y los aminoglucósidos, vale la pena mencionar que este aislado tenía al menos 15 genes implicados en la enzima modificadora de aminoglucósidos (grupo aminoglucósido O-fosfotransferasa). El gen Sul2 de dihidropteroato sintasa resistente a la sulfonamida se detectó en esta bacteria. Los genes resistentes a las sulfonamidas (sulI y sulII) normalmente se ubican en elementos genéticos móviles como los integrones de clase 1 o los plásmidos (Antunes et al., 2005). Por lo tanto, es posible que este sea un gen adquirido en *P. salmonis*.

Los estudios indican que estas bacterias están expuestas a un alto nivel de antibióticos y tienen la oportunidad de intercambiar genes de resistencia con otras bacterias MDR ambientales (*pseudomonaceae* y *enterobacteriaceae* en particular).

Tabla 3-2 Ejemplo de proteínas que codifican para la resistencia a antibióticos en el aislado PC108

| Nombre | GI number | Subject(S) Name |
|------------|--------------|---|
| PC108_1008 | B7MG22 | RecName: Completo = proteína bifuncional de resistencia a la polimixina Arna |
| PC108_1016 | ABG68909 | Portador de eflujo de tipo ABC específico de macrólidos [Escherichia coli 536]. |
| PC108_1017 | ZP_04657259 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Tennessee str. CDC07-0191]. |
| PC108_1179 | YP_001373621 | Proteína relacionada con el transportador ABC [Bacillus cereus subsp. citotoxis NVH 391-98]. |
| PC108_121 | AAG07763 | Resistencia-Nodulación-División celular (RND) transportador de flujo de salida [Pseudomonas aeruginosa PAO1]. |
| PC108_1210 | YP_001437159 | Sistema de expulsión de biciclomicina / multidrogas [Enterobacter sakazakii ATCC BAA-894] |
| PC108_1211 | ABL95934 | Proteína de resistencia al cloranfenicol [Salmonella typhimurium]. |
| PC108_122 | AAG07593 | Resistencia a la nodulación-división celular (RND) efluente precursor de la proteína de fusión de membrana [Pseudomonas aeruginosa PAO1]. |
| PC108_1229 | CAC08220 | TetH tetraciclina resistencia a la salida de la proteína [Pasteurella aerogenes]. |
| PC108_1326 | ZP_04631861 | Proteína de la membrana interna ybaL [Yersinia frederiksenii ATCC 33641]. |
| PC108_1337 | ZP_03033664 | Macrólido específico de ABC tipo portador de la proteína portadora MacB [Escherichia coli F11]. |
| PC108_1381 | YP_001476958 | Dimetiladenosina transferasa [Serratia proteamaculans 568]. |
| PC108_1388 | AAL27445 | VanRE [Enterococcus faecalis]. |
| PC108_1402 | AAZ04782 | QnrA3 determinante de resistencia a quinolona [algas Shewanella]. |
| PC108_1419 | NP_706765 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [Shigella flexneri 2a str. 301]. |
| PC108_1423 | YP_002850060 | Transportador de macrólidos ATP-enlace / permease [Citrobacter sp. 30_2]. |
| PC108_1469 | CAS09877 | Sistema de salida de biciclomicina / multidrogas [Escherichia coli O127: H6 str. E2348 / 69]. |
| PC108_1533 | AAK53981 | Regulador de respuesta VanRc-2 [Enterococcus casseliflavus]. |
| PC108_1534 | AAR37057 | VanSD5 [Enterococcus faecium]. |
| PC108_157 | AAP46587 | Proteína de unión 2 a Penicilina [Neisseria meningitidis]. |
| PC108_1572 | YP_001373621 | Proteína relacionada con el transportador ABC [Bacillus cereus subsp. citotoxis NVH 391-98]. |
| PC108_158 | YP_002850060 | Transportador de macrólidos ATP-enlace / permease [Citrobacter sp. 30_2]. |
| PC108_1645 | AAD22403 | Serina racemase VanT [Enterococcus gallinarum]. |
| PC108_168 | NP_840140 | Proteína de resistencia a la bacitracina BacA [Nitrosomonas europaea ATCC 19718]. |
| PC108_169 | YP_001401994 | Supuesta catión: proteína antiport proton [Yersinia pseudotuberculosis IP 31758] |
| PC108_1768 | YP_001437159 | Sistema de expulsión de biciclomicina / multidrogas [Enterobacter sakazakii ATCC BAA-894] |
| PC108_1800 | AAD22403 | Serina racemase VanT [Enterococcus gallinarum]. |

| | | |
|-------------------|--------------|--|
| PC108_1827 | AAB40740 | MvrC metil viologen resistencia a la proteína C [<i>Escherichia coli</i>]. |
| PC108_1836 | NP_348076 | Proteína de resistencia a la tetraciclina [<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824]. |
| PC108_1861 | AAR37057 | VanSD5 [<i>Enterococcus faecium</i>]. |
| PC108_1862 | AAV58811 | VanRB [<i>Clostridium</i> sp. CCRI-9842]. |
| PC108_1910 | AAG07593 | Probable resistencia a la nodulación-división celular (RND) efluente precursor de la proteína de fusión de membrana [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]. |
| PC108_1911 | AAG07763 | Probable resistencia-Nodulación-División celular (RND) transportador de flujo de salida [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]. |
| PC108_1955 | CAS11303 | Transportador de flujo de salida de múltiples fármacos [<i>Escherichia coli</i> O127: H6 str. E2348 / 69]. |
| PC108_1956 | AAG07763 | Probable resistencia-Nodulación-División celular (RND) transportador de flujo de salida [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]. |
| PC108_196 | ABB53372 | VanHB [<i>Enterococcus faecium</i>]. |
| PC108_2060 | YP_001569731 | Sistema de salida de biciclomicina / multidrogas [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> serovar 62: z4, z23: -]. |
| PC108_212 | ZP_04081918 | Proteína relacionada con el transportador ABC [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>pulsiensis</i> BGSC 4CC1]. |
| PC108_2125 | ZP_03053667 | Transportador de facilitadores principales de la familia MFS [<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061]. |
| PC108_2171 | YP_403947 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197]. |
| PC108_2179 | ABX79411 | VanRc4 [<i>Enterococcus casseliflavus</i>]. |
| PC108_2195 | AAB95639 | Proteína de resistencia a pristinamicina VgaB [<i>Staphylococcus aureus</i>]. |
| PC108_2196 | ABG70222 | Proteína de resistencia a la biciclomicina [<i>Escherichia coli</i> 536]. |
| PC108_2198 | YP_254114 | Proteína de resistencia a quinolonas [<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435]. |
| PC108_2213 | ZP_04630103 | Membrana interna de la proteína ybaL [<i>Yersinia bercovieri</i> ATCC 43970]. |
| PC108_2216 | YP_001437159 | Sistema de expulsión de biciclomicina / multidrogas [<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894] |
| PC108_2305 | YP_002215984 | Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtG [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin str. CT_02021853]. |
| PC108_2308 | YP_002382193 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469]. |
| PC108_2355 | ZP_04060074 | Lincosamida estreptogramina Una proteína de resistencia [<i>Staphylococcus hominis</i> SK119]. |
| PC108_2403 | CAA45050 | SrmB [<i>Streptomyces ambofaciens</i>]. |
| PC108_2475 | YP_001437159 | Sistema de expulsión de biciclomicina / multidrogas [<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894] |
| PC108_2508 | ABX79440 | VanC1 [<i>Enterococcus gallinarum</i>]. |
| PC108_2528 | YP_002244306 | Sistema de salida de biciclomicina / multidrogas [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar enteritidis str. P125109]. |
| PC108_2550 | ABA71728 | VanSG [<i>Enterococcus faecalis</i>]. |
| PC108_2618 | EDK34631 | Transportador previsto, componente permease [<i>Clostridium kluveri</i> DSM 555]. |
| PC108_2636 | YP_042788 | Proteína de resistencia a fluoroquinolona [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MSSA476]. |

| | | |
|-------------------|--------------|---|
| PC108_2682 | CAA45050 | SrmB [<i>Streptomyces ambofaciens</i>]. |
| PC108_275 | AAG07594 | Probable resistencia-Nodulación-División celular (RND) transportador de flujo de salida [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]. |
| PC108_2766 | NP_706765 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301]. |
| PC108_2767 | YP_001588793 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi B str. SPB7]. |
| PC108_277 | AAG07763 | Probable resistencia-Nodulación-División celular (RND) transportador de flujo de salida [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]. |
| PC108_2770 | ABG71110 | Proteína de membrana externa TolC precursor [<i>Escherichia coli</i> 536]. |
| PC108_279 | YP_788913 | RND precursor de la proteína de fusión de membrana de flujo de salida [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14]. |
| PC108_2796 | ACM47285 | D, D-carboxipeptidasa VanYD [<i>Enterococcus faecium</i>]. |
| PC108_2799 | ABG68909 | Portador de eflujo de tipo ABC específico de macrólidos [<i>Escherichia coli</i> 536]. |
| PC108_2800 | YP_002225954 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar gallinarum str. 287/91]. |
| PC108_2816 | YP_001334730 | Sistema de salida de fármacos proteína MdtG [<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578]. |
| PC108_2843 | ZP_03058729 | Proteína de la membrana externa TolC [<i>Escherichia coli</i> B171]. |
| PC108_2844 | YP_001419960 | facilitador principal de la superfamilia transportadora [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42] |
| PC108_2845 | NP_838841 | Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtN [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T]. |
| PC108_2853 | YP_407313 | proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Shigella boydii</i> Sb227] |
| PC108_297 | ZP_01788419 | Proteína de unión a penicilina 1A [<i>Haemophilus influenzae</i> 3655]. |
| PC108_2975 | NP_631702 | Proteína de resistencia al cloranfenicol [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2)]. |
| PC108_308 | YP_002217746 | Proteína D de resistencia a múltiples fármacos [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin str. CT_02021853]. |
| PC108_3109 | ZP_03105209 | Proteína reguladora VanRB [<i>Bacillus cereus</i> NVH0597-99]. |
| PC108_3152 | AAW66497 | TetA(39) [<i>Acinetobacter</i> sp. LUH5605]. |
| PC108_3235 | YP_001691306 | TetL [<i>Lactobacillus sakei</i>]. |
| PC108_3269 | NP_708081 | Sistema de salida de biclomicina / multidrogas [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301]. |
| PC108_3283 | ABS73654 | YkkD [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42]. |
| PC108_3284 | ABS73653 | YkkC [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42]. |
| PC108_3284 | YP_001420884 | YkkC [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42]. |
| PC108_3305 | ZP_02655873 | Transportador ABC, proteína de unión a ATP [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky str. CDC 191]. |
| PC108_3311 | AAY52002 | VanR [<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>]. |
| PC108_3392 | YP_788913 | RND precursor de la proteína de fusión de membrana de flujo de salida [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14]. |
| PC108_3393 | CAW29508 | Probable resistencia-Nodulación-División celular (RND) transportador de salida [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58]. |
| PC108_341 | AAY52004 | VanH [<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>]. |
| PC108_3419 | ABX79417 | VanSc4 [<i>Enterococcus casseliflavus</i>]. |

| | | |
|-------------------|--------------|---|
| PC108_3420 | AAL27445 | VanRE [<i>Enterococcus faecalis</i>]. |
| PC108_346 | CAL48457 | Supuesta resistencia a la trimetoprima dihidrofolato reductasa [<i>Escherichia coli</i>]. |
| PC108_347 | NP_706765 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301]. |
| PC108_3471 | CAR56417 | Sistema de salida de múltiples fármacos, proteína de transporte CeoA [<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315]. |
| PC108_3472 | AAG07763 | Probable resistencia-Nodulación-División celular (RND) transportador de flujo de salida [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]. |
| PC108_355 | Q46306 | RecName: Full = tetrP de la proteína de resistencia a la tetraciclina |
| PC108_357 | ZP_01259020 | Proteína de eflujo multidroga NorM [<i>Vibrio alginolyticus</i> 12G01]. |
| PC108_40 | AAP46618 | Penicilina proteína de unión 2 [<i>Neisseria meningitidis</i>]. |
| PC108_419 | AAR29970 | TetW tetraciclina resistencia a la proteína [<i>Megasphaera elsdenii</i>]. |
| PC108_433 | YP_002467958 | Proteína de unión a penicilina 1b [<i>Buchnera aphidicola</i> str. 5A (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)]. |
| PC108_456 | AAP82508 | Dihidropteroato sintasa [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>]. |
| PC108_472 | YP_001437159 | Sistema de expulsión de biciclomicina / multidrogas [<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894] |
| PC108_48 | ABX79440 | VanC1 [<i>Enterococcus gallinarum</i>]. |
| PC108_496 | Q46306 | RecName: Full = tetrP de la proteína de resistencia a la tetraciclina |
| PC108_497 | ABG21123 | TetM [<i>Escherichia coli</i>]. |
| PC108_525 | P28246 | RecName: Full = Bicyclomycin resistencia protein |
| PC108_559 | YP_002045964 | RecN proteína de unión a penicilina 2 [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>heidelberg</i> str. SL476]. |
| PC108_563 | ABS72056 | D, D carboxipeptidasa [<i>Ruminococcus gauvreauii</i>]. |
| PC108_620 | NP_390536 | Transportador de múltiples fármacos de salida [<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168]. |
| PC108_660 | YP_002181880 | Resistencia a la tetracenomicina C y proteína de exportación [<i>Streptomyces</i> sp. Mg1]. |
| PC108_681 | CAD03195 | Proteína D de resistencia a múltiples fármacos [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhi</i>]. |
| PC108_704 | YP_002044935 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>heidelberg</i> str. SL476]. |
| PC108_743 | ABA71733 | VanTG [<i>Enterococcus faecalis</i>]. |
| PC108_833 | ZP_02632674 | Proteína de resistencia a la tetraciclina TetP (TetB (P)) [<i>Clostridium perfringens</i> E str. JGS1987]. |
| PC108_886 | ACC93631 | VanS [<i>Enterococcus faecium</i>]. |
| PC108_887 | AAL27445 | VanRE [<i>Enterococcus faecalis</i>]. |
| PC108_929 | YP_001486998 | Transportador facilitador principal [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]. |
| PC108_959 | BAC59742 | Proteína de resistencia a múltiples fármacos NorM (Na + / antiportador de drogas) [<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633]. |
| PC108_988 | NP_706765 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301]. |

| | | |
|------------------|--------------|--|
| PC108_989 | NP_286651 | Proteína transportadora de macrólidos ATP / permeasa [Escherichia coli O157: H7 EDL933]. |
| PC108_99 | YP_001744454 | UDP-ácido glucurónico descarboxilasa / UDP-4-amino-4-deoxi-L-arabinosa formiltransferasa [Escherichia coli SMS-3-5]. |

Genes de virulencia

Las bacterias utilizan una amplia gama de determinantes de virulencia para causar una infección en el huésped (Sidhu et al., 2003). Estos determinantes de virulencia incluyen la generación de sideróforos, la formación de biopelículas, la adhesión y la invasión de la célula huésped, protegiendo las bacterias de la respuesta inmune innata del huésped. Se contrastaron todos los aislados con una base de datos completa para los factores de virulencia (Liue et al., 2019). Se detectó una gama más amplia de determinaciones vinculadas a la virulencia en los aislados (archivo adjunto complementario).

Los aislamientos de PC en los que se encontró que tenían un mayor número de determinaciones de resistencia a los antibióticos se analizaron para determinar el rango funcional de virulencia, los genes incluían genes involucrados en la formación de pillers, *pid1B*; hierro quelante, *cheA*; proteínas flagelares, *flip*; *FliR*, *flinN*, sistema de secreción tipo III, *bscN*; proteínas del sistema de secreción tipo IV, *IcmB*; . En total, estos factores de virulencia diferenciados llevados > 60 (hoja de Excel adjunta_ PC9_Vs_vfdb) intervinieron en el inicio de la infección.

Es evidente a partir de la información disponible que un ARG involucrado tanto en genes intrínsecos como adquiridos prevalece en los aislamientos de *P. salmonis*. Se detectaron múltiples genes que proporcionan resistencia tanto a la oxitetraciclina como al florfenicol en todos los aislamientos. El aislado PC108 tuvo una excepcionalmente amplia gama de ARG. La comparación de genes de virulencia a través de diferentes aislados también demuestra que estas bacterias llevan una amplia gama de determinantes de virulencia.

Se analizó el rango funcional de virulencia en los aislados de PC que tenían al menos 20 determinantes de resistencia a los antibióticos probados, los genes incluían genes involucrados en la formación de pillers, *pid1B*; hierro quelante, *cheA*; proteínas flagelares, *flip*; *FliR*, *flinN*, sistema de secreción tipo III, *bscN*; proteínas del sistema de secreción tipo IV, *IcmB*. En total, se identificaron al menos 60 genes diferentes.

Análisis metagenómico de agua, sedimento y biopelículas

Las muestras de agua (n = 36), las muestras de sedimento (n = 36), los biopelículas (n = 36) recolectados de 6 granjas de salmón junto con las muestras de agua (n = 3) recolectadas en mar abierto lejos de los centros de producción (control negativo) fueron sometidas a Análisis de metagenómica.

La primera etapa del análisis metagenómico del análisis del gen 16S rRNA se realizó en las muestras agrupadas (n = 111) de todas las matrices con el objetivo de determinar si los patógenos bacterianos que se sabe que causan enfermedades en el salmón y otros peces estaban presentes en el agua, el sedimento y en muestras de biopelículas. Los datos de metagenómica de todos los sitios se clasificaron a nivel familiar utilizando un clasificador bayesiano en combinación con una base de datos de referencia SILVA. Una breve búsqueda de las secuencias metagenómicas resultantes resaltó la presencia de familias de bacterias que se sabe que albergan bacterias patógenas como *Renibacterium*, *Piscirickettsia*, *Flavobacterium* y *Chryseobacterium*. En la siguiente tabla se presenta una lista de las bacterias identificadas.

Tabla 3-3 Patógenos identificados en las muestras de agua, sedimento y biopelículas

| Hallazgos | |
|--|---------------------|
| Search "Flavobacterium" (2 hits in 1 file) | |
| Line 2594: 410 | Flavobacterium |
| Line 3252: Flavobacterium | |
| Search "Pseudomonas" (4 hits in 1 file) | |
| Line 1371: 132 | Pseudomonas |
| Line 1378: Pseudomonas | |
| Search "Aeromonas" (4 hits in 1 file) | |
| Line 1952: 291 | Aeromonas |
| Line 1988: 370 | Aeromonas |
| Line 2478: Aeromonas | |
| Line 3027: Aeromonas | |
| Search "Renibacterium" (2 hits in 1 file) | |
| Line 3184: 1197 | Renibacterium |
| Line 7106: Renibacterium | |
| Search "Vibrio " (0 hits in 0 files) | |
| Search "Piscirickettsia" (4 hits in 1 file) | |
| Line 2835: 567 | Piscirickettsiaceae |
| Line 4122: Piscirickettsiaceae | |
| Line 4126: 2532 | Piscirickettsia |
| Line 12776: Piscirickettsia | |
| Line 2835: 567 | Piscirickettsiaceae |
| Line 4122: Piscirickettsiaceae | |
| Line 4126: 2532 | Piscirickettsia |
| Line 12776: Piscirickettsia | |
| Line 2580: 611 | Chryseobacterium |
| Line 4342: Chryseobacterium | |

Este resultado corrobora la presencia de *Piscirickettsia* como se detectó con la qPCR previamente en el estudio. Como se puede observar en la Tabla anterior, *Piscirickettsia* se detectó en al menos cuatro muestras. Los resultados anteriores de la qPCR y los resultados de la metagenómica sugieren que la prevalencia de *P. salmonis*, en particular en el agua alrededor de los centros de cultivo de salmónidos bajo brotes activos de enfermedad.

4 Establecimiento de los mecanismos y rutas de diseminación de *P. salmonis*

4.1 Colecta y análisis de muestras de moluscos

Con el objeto de contribuir al conocimiento de la epidemiología de la bacteria *P. salmonis*, se estudió el posible rol que podría tener *Mytilus chilensis* en la difusión de la bacteria, mediante la recolección de individuos desde centros de cultivo que cursaban con Piscirickettsiosis activa.

Se diseñó un muestreo para detectar la presencia de *P. salmonis* en *Mytilus chilensis* provenientes de 5 sitios de muestreo. Los sitios de muestreo correspondieron a centros de cultivo de salmónidos que presentaban brotes activos de SRS. Para esta identificación se contó con el apoyo del equipo de SERNAPESCA. Se tomaron 150 muestras de *Mytilus chilensis*.

Cada muestra fue pesada, tomando de cada una un trozo 25 mg, el cual fue macerado para posteriormente seguir con el protocolo de extracción de ADN. El volumen de elusión correspondió a 100 µl de ADN. Para la extracción de ADN genético se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue Kit, siguiendo las instrucciones del proveedor Qiagen.

Los resultados del PCR tradicional mostraron que todas las muestras fueron negativas a la presencia de *P. salmonis* en *Mytilus chilensis*. Sin embargo, estudios complementarios realizados *in vitro* por la Universidad de Chile, utilizando MEB para la identificación de *P. salmonis*, identificaron tanto la bacteria como el CAP adheridos a conchas de *Mytilus chilensis*, sugiriendo que *P. salmonis* tiene la potencialidad de adherirse y sobrevivir en las conchas de *Mytilus chilensis*. Los detalles de la metodología y resultados pueden encontrarse en el Appendix A y Appendix B

Al realizar un estudio en campo, introduciendo cuerdas con trozos *Mytilus chilensis* al interior de un centro de cultivo que presentaba mortalidades por SRS, el equipo de la Universidad de Chile detectó la presencia de *P. salmonis* mediante PCR tradicional. Los detalles de la metodología y resultados puede encontrarse en el Appendix D

4.2 Colecta y análisis de tejidos coninfectados con *P. salmonis*

Las branquias en los peces son un órgano sensible y fundamental para la ejecución de funciones fisiológicas vitales, tales como ser responsable de la respiración, mantener la presión osmótica óptima y el equilibrio ácido-base de los fluidos corporales entre otros. Sin embargo, es un órgano que es extremadamente sensible a todo tipo de manejo y cambios desfavorables en los ambientes externo e interno, por tanto, presentan alta probabilidad de desarrollar alteraciones patológicas y en consecuencia producir desde una leve disfunción hasta ser una causa directa de mortalidad (Strzyzewska *et al.* 2016).

La amebiasis branquial corresponde a un ecoparasitismo descrito en numerosas especies cultivadas en ambientes marinos tales como salmónidos, turbot, seabass y seabream, entre otras. Las infecciones han sido reportadas en Australia (Tasmania), Irlanda, Francia, Chile, Norteamérica, España, Escocia, Nueva Zelanda, Noruega y Japón (Oldham *et al.* 2016; Crosbie *et al.* 2010; Steinum *et al.* 2009; Nylund *et al.* 2008; Young *et al.* 2008). Las infecciones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) son bastantes severas llegando a representar hasta

un 10 a 20% de los costos de producción en Australia. Aunque en nuestro país la amebiasis branquial había sido reportada esporádicamente, durante el año 2007 se presentó una reemergencia de esta condición siendo actualmente una infección endémica.

Entre los principales factores ambientales relacionados con las infecciones por *N. perurans* en salmón del Atlántico, se encuentran la temperatura (sobre 10°C promedio) y salinidad (sobre 3%) y bajas de oxígeno frecuentes. Los centros afectados se caracterizan por una baja circulación de agua (centros de baja energía). Otros factores de riesgo a considerar son parasitismo por *Caligus sp*, bloom de algas, centros con un alto número de peces y calidad de smolt.

Los peces afectados presentan letargia, diestres respiratorio, incremento de los movimientos operculares, anorexia y muerte. Los centros afectados presentan un alto porcentaje de peces rezagados con baja condición corporal, escasa grasa visceral y sin alimento en el sistema digestivo. Las branquias de los peces afectados se presentan pálidas, con un incremento de secreción de mucus y en algunas ocasiones con hemorragias multifocales. Uno de los signos clásicos es la presencia de "parches", manchas de color blanco en las branquias. En las Figura 4-1 y Figura 4-2 se muestran fotografías de lesiones macroscópicas de un grupo de animales muestreados durante el mes de julio de 2018.



Figura 4-1 Salmón del Atlántico (*S. salar*), afectado por amebiasis branquial (*N. perurans*). Se observa palidez branquial y la presencia de "parches" manchas de color blanco característicos de la infección.



Figura 4-2 Salmón del Atlántico (*S. salar*), afectado por amebiasis branquial (*N. perurans*). En las branquias se observa la presencia de "parches" o manchas de color blanquecino característicos de la infección.

Las coinfecciones ocurren cuando los animales están infectados por dos o más patógenos diferentes, ya sea por infecciones simultáneas o secundarias, de modo que dos o más agentes infecciosos, están activos juntos en el mismo hospedero son muy comunes en la naturaleza y tienen un efecto fundamental en el curso de la patología,

y por lo general agravan las diferentes enfermedades de los peces. Sin embargo, en especies acuáticas este efecto de coinfección no ha sido evaluado detenidamente y los datos disponibles sobre este tema aún son escasos (Kotob *et al.* 2016). De esta manera, se describen relación de co-infección entre patógenos homólogos, como co-infecciones bacterianas, parasitarias y virales, así como también entre patógenos heterólogos entre bacterias y parásitos o virus (Kotob *et al.* 2016; Woo y Buchmann 2012; Young *et al.* 2008). En salmón del Atlántico se han descrito infecciones concomitantes entre *P. salmonis* y *Paramoeba perurans*, *vibrio*, virus IPNV e ISA, *Caligus* entre otros (Downes *et al.* 2018; Kotob *et al.* 2016, Bustos *et al.* 2011).

En Chile la presencia de *P. salmonis* y *N. perurans* no ha sido de forma aislada y podemos ver coinfección, esto puede ser debido a que por lo general algunos brotes de las enfermedades se presentan durante los mismos meses, siendo los de diciembre a julio donde se manifiestan la mayoría de los brotes de amebiasis como se puede evidenciar en las Figura 4-3 y Figura 4-4 (SERNAPESCA, 2017).

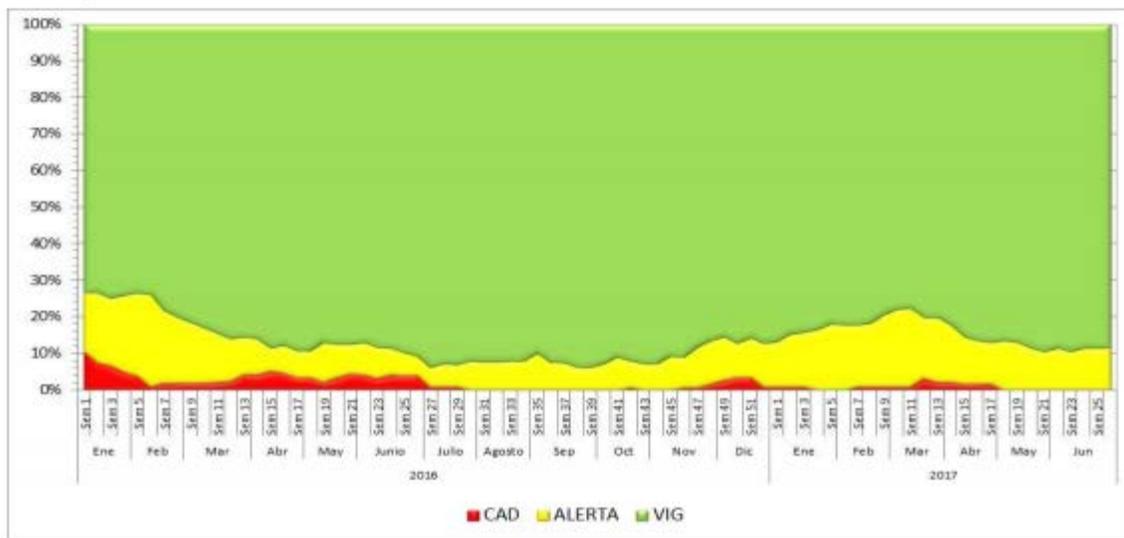


Figura 4-3 Distribución de centros según categoría PSEVC-Piscirickettsiosis Región de Los Lagos, enero 2016 a junio 2017. Fuente SERNAPESCA 2017.



Figura 4-4. Distribución de centros de acuerdo brote de amebiasis Región de Los Lagos. Fuente SERNAPESCA 2017.

4.3 Estudio de *Caligus* coinfectado con *P. salmonis*

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

Para desarrollar un plan eficaz de prevención y control de Piscirickettsiosis, es necesario conocer si existe la presencia de *P. salmonis* en *C. rogercresseyi* y si este parásito actúa como un vector.

Realización del estudio.

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

Material biológico.

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

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

Procesamiento, inclusión y corte

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

Tinción hematoxilina y eosina (HE) y azul toluidina

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

Inmunohistoquímica

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

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

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

1. Control de bloqueo de actividad endógena de peroxidasa. Las muestras fueron comparadas utilizando muestras de tejidos con y sin bloqueo con solución Bloxall™.

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

Evaluación de la presencia de *Piscirickettsia salmonis*

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

Los cortes evaluados por inmunohistoquímica fueron complementados con tinción de hematoxilina y eosina (HE), azul toluidina y un análisis con microscopía electrónica de barrido; esto último cuando los cortes resultaron inmunopositivos a *P. salmonis* en bolsas ovígeras. Se evaluaron por inmunomarcación 150 cortes de tejido de *C. rogercresseyi* (50 machos, 50 hembras y 50 chalimus IV) y por tinción 300 (150 HE, 150 azul toluidina).

Microscopía electrónica de barrido

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

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la presencia y la ausencia de *P. salmonis* en los cortes de tejido de *C. rogercresseyi* en estadios adultos (machos y hembras) y juvenil (chalimus IV). Los resultados fueron

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

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

Resultados

DetECCIÓN DE *Piscirickettsia salmonis* EN *Mytilus chilensis*

Los resultados del PCR tradicional mostraron que todas las muestras fueron negativas a la presencia de *P. salmonis* en *Mytilus chilensis*. Sin embargo, estudios complementarios realizados *in vitro* por la Universidad de Chile, utilizando MEB para la identificación de *P. salmonis*, identificaron tanto la bacteria como el CAP adheridos a conchas de *Mytilus chilensis*, sugiriendo que *P. salmonis* tiene la potencialidad de adherirse y sobrevivir el conchas de *Mytilus chilensis*.

Al relizar un estudio en campo, introduciendo cuerdas con trozos *Mytilus chilensis* al interior de un centro de cultivo que presentaba mortalidades por SRS, el equipo de la Universidad de Chile detectó la presencia de *P. salmonis* mediante PCR tradicional. Los resultados sugieren que *P. salmonis* posee la capacidad de adherirse formando CAP en la superficie de conchas de chorito y que la cercanía a las jaulas que presentan la enfermedad jugaría un rol en la difusión de la enfermedad. Sin embargo, se sugiere realizar investigaciones de campo adicionales, con un mayor número de centros y más moluscos, considerando el análisis de viabilidad de la bacteria.

DetECCIÓN DE *Piscirickettsia salmonis* EN AMEBAS

Las muestras mantenidas en caldo de cultivo en base a malta levadura y agar malta levadura fueron chequeados por medio de qPCR en tiempo real para *Paramoeba perurans*, los cuales resultaron negativos.

Por otro lado, el análisis de PCR del tejido branquial resultaron positivos en los centros Dring 2, Llancaqueo, Chidhuapi, Chope y Calén 2, con Ct promedios superiores a 26. El análisis de PCR para *Piscirickettsia salmonis*, evidencio la presencia de la bacteria en todos los centros analizados en los tejidos internos (pool corazón, riñón). Específicamente el análisis de PCR del tejido branquial resulto positivo entre un 20 a un 30 % de los peces analizados correspondientes a los centros Dring 2, Chope y Calén 2.

Adicionalmente, las muestras histopatológicas de los peces muestreados correspondientes a los centros Dring 2, Chope y Calén 2 evidenciaron escasos hallazgos morfológicos consistentes con Enfermedad amebiana de las branquias, asociado a escasa cantidad de estructuras protozoarias consistentes con *Paramoeba perurans*.

Finalmente los análisis histológicos con tinción hematoxilina & eosina (H&E) y tinción de May Grünwald-Giemsa (MGG), no evidencia la presencia de estructuras consistente con *Piscirickettsia salmonis* en las *Paramoeba perurans*, presente en branquias que cursan con enfermedad amebiana de las branquias.

DetECCIÓN DE *Piscirickettsia salmonis* EN CORTES DE TEJIDO DE CHALIMUS IV Y ADULTOS DE *Caligus rogercresseyi* MEDIANTE HISTOLOGÍA, INMUNOHISTOQUÍMICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

En el presente estudio se analizó un total de 150 parásitos que fueron procesados para cortes histológicos,

inmunohistoquímica y eventualmente microscopía electrónica de barrido (MEB). Del total, 49 ejemplares resultaron positivos a *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica, lo que representa un 32,6 %. La distribución porcentual según las categorías fue de un 42% ($\pm 0,07$) en hembras, 28% ($\pm 0,06$) en machos y de un 28% ($\pm 0,06$) en chalimus IV (Figura 4-7), aunque no se demostró diferencias significativas entre los grupos estudiados (Tabla 4-1).

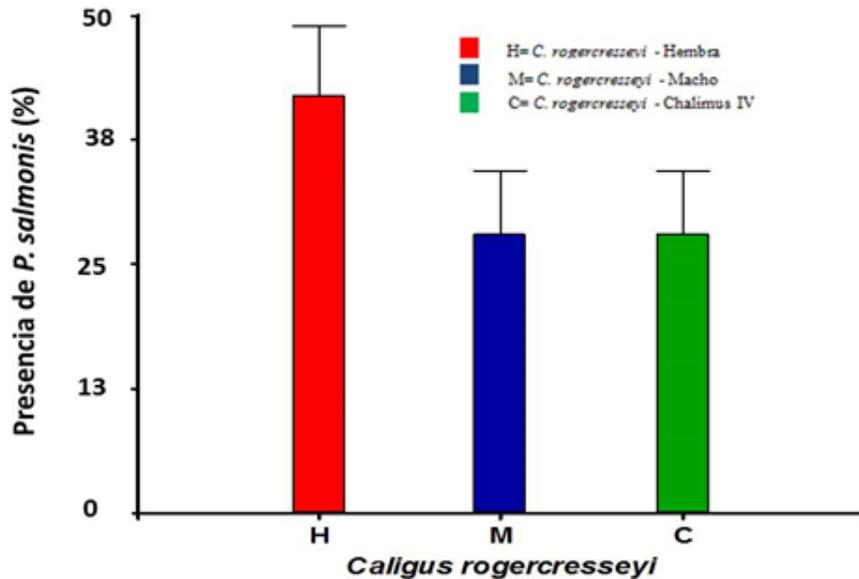


Figura 4-5 Presencia de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi* expresado en porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C). Los individuos fueron detectados mediante técnica de inmunohistoquímica. Se analizó un total 50 individuos por categoría. Las muestras fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis

Tabla 4-1 Presencia de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi* expresado como total y porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C)

| Categoría de <i>Caligus</i> | Presencia | Media | E.E. |
|-----------------------------|-----------|-------|--------------|
| H | 21 (42%) | 0,42 | $\pm 0,07^*$ |
| M | 14 (28%) | 0,28 | $\pm 0,06^*$ |
| C | 14 (28%) | 0,28 | $\pm 0,06^*$ |

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

Del total de cada categoría, 21 hembras, 14 machos y 14 chalimus IV resultaron positivos a *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica, de los cuales en 40 ejemplares se detectó el agente en el interior del parásito, ya sea en forma intra o extracelular. En un caso, la bacteria se detectó sólo en el exterior, adosado a la cutícula. En ocho individuos el microorganismo se observó tanto en el interior como sobre la superficie del *Caligus* (Tabla 4-2).

Tabla 4-2. Presencia de *P. salmonis* mediante inmunohistoquímica en *C. rogercresseyi* adultos y chalimus IV según su ubicación en el interior o exterior del parásito.

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

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

Las bacterias fueron identificadas en distintos sectores del ectoparásito, tanto en estadios adultos (hembra y macho) y juveniles (chalimus IV). Se identificó el agente en una serie de muestras en el interior del ectoparásito como se muestra en las Figura 4-8, Figura 4-9 y Figura 4-10, ya sea en forma intra o extracelular. También fue posible identificar el agente en el exterior del ectoparásito, adosado a la cutícula (Figura 4-8 y Figura 4-9). En un caso se detectó el agente tanto en la superficie como dentro de la pared cuticular.

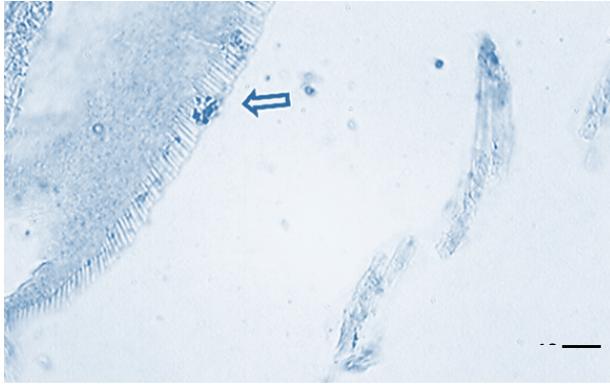


Figura 4-6. Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a un grupo de bacterias ubicadas entre los microfilamentos de un miembro torácico de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™ SG. 1000x.

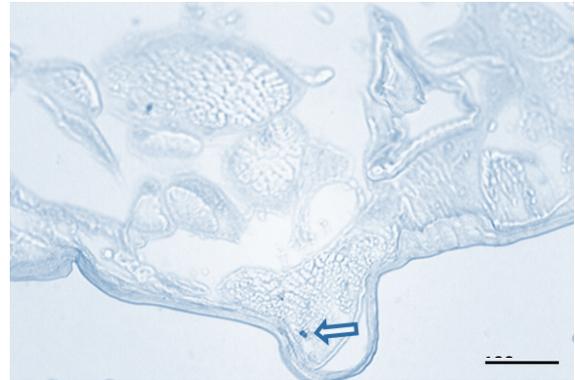


Figura 4-7. Cefalotórax. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en *Caligus rogercresseyi*. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) en una agrupación de bacterias en tejido muscular en Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™ SG. 400x.

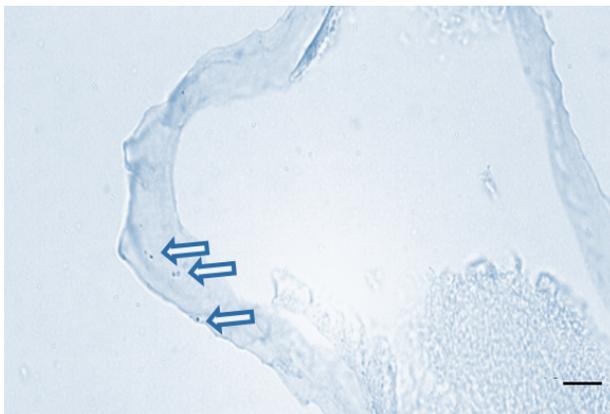


Figura 4-8. Cefalotórax. Se observa inmunorreacción positiva (flechas) a *P. salmonis* en la superficie y dentro de la pared cuticular. Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000x.

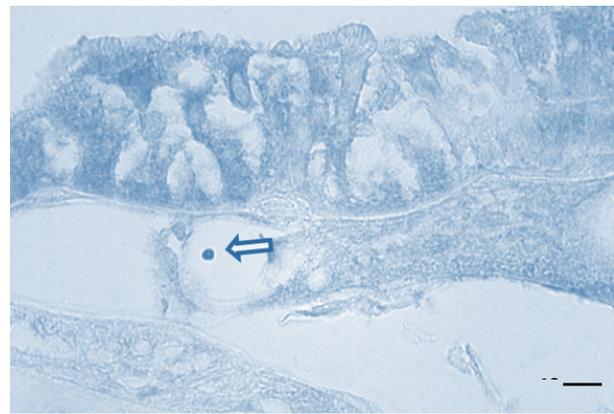


Figura 4-9. Pared del tubo digestivo. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* debajo de las células epiteliales de revestimiento. Chalimus IV. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000X.

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

De los 49 ectoparásitos que presentaron inmunorreacción positiva a *P. salmonis*, 40 individuos presentaron la bacteria en algún tipo de tejido del *Caligus*, ya sea en forma intra o extracelular. De estos, en 20 parásitos la bacteria fue detectada en alguna zona del sistema muscular, en 11 en el sistema digestivo y en 9 en el sistema reproductor. En cuanto a la presencia de *P. salmonis* por estadios, 19 hembras, 12 machos y 9 chalimus IV fueron positivos (Tabla 4-3).

Tabla 4-3. Presencia de *P. salmonis* intra o extracelular en *C. rogercresseyi* mediante inmunohistoquímica.

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

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

Al analizar en porcentaje la positividad de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi*, se observó que en un 22,5% de las hembras el agente se encontró en el sistema reproductor, seguido por un 15% en el sistema muscular y un 10% en sistema digestivo. Con respecto a los machos, la bacteria fue observada en un 22,5% de los individuos en el sistema muscular, un 7,5% en el sistema digestivo y no fue detectada en el sistema reproductor. Por otra parte, en los chalimus IV, el agente se observó en un 12,5% en el sistema muscular, en un 10% en sistema digestivo y no fue encontrado en el sistema reproductor (Figura 4-12).

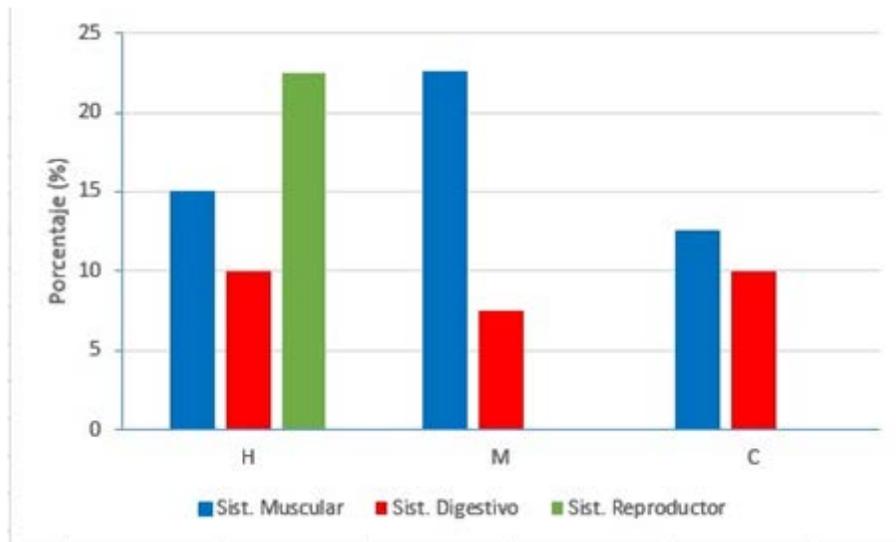


Figura 4-10. Presencia de *P. salmonis* en tejidos de *C. rogercresseyi* expresado en porcentaje según categoría de hembras (H), machos (M) y chalimus IV (C), de acuerdo con el tejido afectado. Los individuos fueron detectados mediante técnica de inmunohistoquímica. Los datos están referidos a 40 *Caligus* infectados con la bacteria mostrados en la tabla 12. Las muestras fueron recolectadas desde un centro de engorda de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) ubicado en la Región de Los Lagos y que fue diagnosticado positivo a piscirickettsiosis.

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

Como se mostró anteriormente, en el presente estudio se detectó la presencia de *P. salmonis* en el sistema reproductivo de hembras adultas, lo que se corresponde anatómicamente a la bolsa ovígera. La bacteria fue observada asociado a los huevos y en la superficie de la cápsula de la bolsa ovígera. En total, se analizaron 50

Caligus hembras de las cuales nueve fueron positivos a *P. salmonis* en la zona de los huevos y en dos casos se ubicaron sobre la superficie (Figura 4-13 y Figura 4-14).

En las imágenes de las Figura 4-11, Figura 4-12 y Figura 4-13 se muestran los resultados de los cortes en serie analizados por inmunohistoquímica y por microscopía electrónica de barrido (Figura 4-14).

En relación con la ubicación externa de la bacteria, está fue detectada mediante azul toluidina, hematoxilina eosina, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido (MEB). La bacteria fue observada ya sea en forma individual (Figura 4-11 y Figura 4-12) o bien formando agrupaciones que se unían a la superficie de la bolsa ovígera (Figura 4-13). En este último caso y mediante MEB, se observó que los grupos de bacterias se encontraban inmersos en una sustancia amorfa y que emitía prolongaciones hacia la superficie (Figura 4-14).

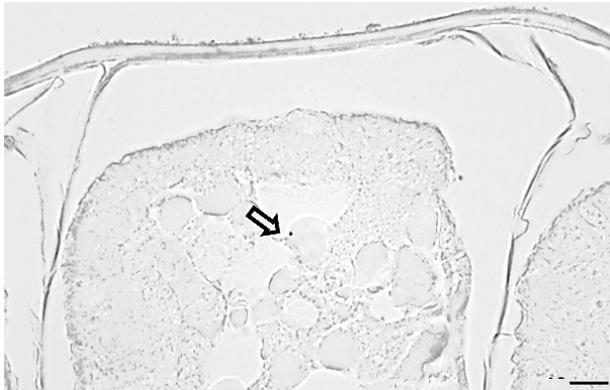


Figura 4-11. Huevo. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* en el huevo dentro de la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000x.

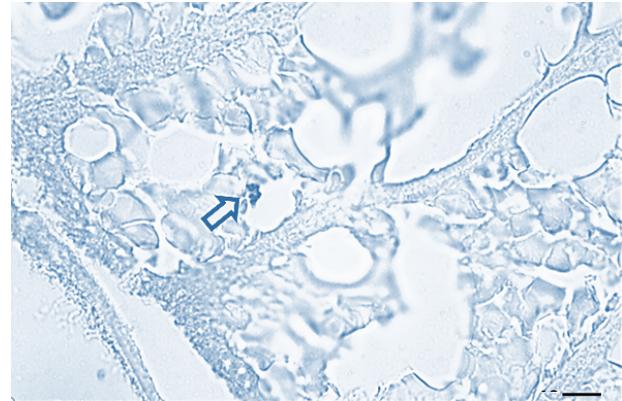


Figura 4-12. Huevos en cistos. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* en el huevo dentro los cistos de la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000x.

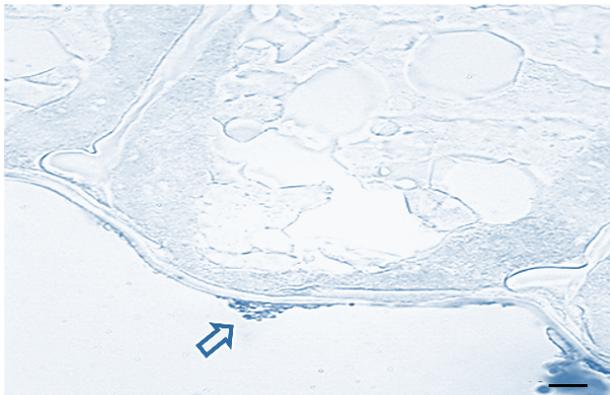


Figura 4-13. Bolsa Ovígera. Capa Externa. Se observa inmunorreacción positiva (flecha) a *P. salmonis* externo a la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* de una hembra adulta. Tinción con peroxidasa ImmPACT™SG. 1000x.

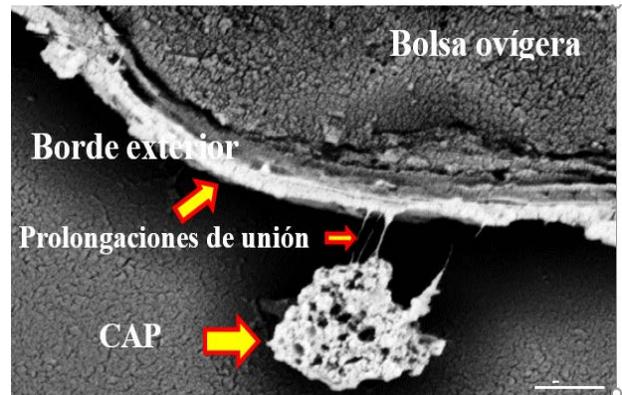


Figura 4-14. Borde Externo. Bolsa Ovígera. MEB. Se observa un conglomerado de bacterias uniéndose a la bolsa ovígera de *C. rogercresseyi* (flecha) de una hembra adulta. La zona es la misma que se aprecia en la Figura 4-13 pero sin anticuerpos.

5 Determinación de la importancia biológica de reservorios y vectores: en ameba, piojo de mar y moluscos

Aislamiento de amebas

Con la finalidad de conseguir el aislamiento de amebas se realizaron 8 visitas a centros de cultivo con historial de Amebiasis branquial en años previos o diagnosticados previamente con Enfermedad Proliferativa Branquial (PGD). La Tabla 5-1 muestra un resumen de los centros de cultivos visitas para aislamiento.

Tabla 5-1 Centro, código SIEP, especie y fecha de las visitas realizadas a los centros de cultivo en la X y XI región para aislamiento de Amebas.

| Centro | Código SIEP | Especie | Fecha de visita |
|------------|-------------|-----------------------------|-----------------|
| Level 2 | 110693 | <i>Salmo salar</i> | 28-10-2018 |
| Dring 2 | 110682 | <i>Salmo salar</i> | 27-10-2018 |
| Llancaqueo | 102136 | <i>Salmo salar</i> | 13-07-2018 |
| Llancaqueo | 102136 | <i>Salmo salar</i> | 11-07-2018 |
| Chidhuapi | 100442 | <i>Salmo salar</i> | 11-05-2018 |
| Chope | 101096 | <i>Oncorhynchus kisutch</i> | 23-04-2018 |
| Calén 2 | 102342 | <i>Oncorhynchus kisutch</i> | 19-04-2018 |
| Llaguepe | 101697 | <i>Oncorhynchus kisutch</i> | 19-04-2018 |

Selección de peces

Con la finalidad de detectar peces vivos con signos de Amebiasis se tomaron muestras dirigidas de peces orillados de distintas jaulas. Posteriormente, los peces fueron anestesiados en un bins con benzocaína al 20%. Los peces que presentaban parches blancos en las branquias fueron separados y sacrificados por sobredosis de anestesia para necropsia y toma de muestras.

Necropsia de peces

Con la finalidad de describir los signos clínicos macroscópicos observados en los grupos de peces dirigidos, se realizó necropsia de los peces muestreados. Los peces fueron dispuestos en una superficie limpia para realización de la necropsia, según lo descrito por Thoesen (1994), Noga (2010) y Woo (2011). Adicionalmente, se realizó fotografía macroscópica de los hallazgos relevantes.

Muestras de branquia para aislamiento

Para el aislamiento de los parásitos se seccionaron arcos branquiales con lesiones macroscópicas de Amebiasis branquial, las cuales fueron almacenadas en bolsas herméticas estériles e identificadas con el número de pez y la jaula de procedencia. Las muestras fueron transportadas refrigeradas a 4 °C hasta el laboratorio para su análisis.

Para confirmar la presencia de amebas en las branquias de los peces muestreados se tomaron filamentos de branquias para análisis de qPCR por tiempo real para *Paramoeba perurans* de acuerdo a lo descrito por Fringuelli et al. (2012), muestras de branquia en formalina al 10% bufferizada, y muestras de trozos de filamentos de 4 mm de espesor en glutaraldehído al 2% para microscopia electrónica (barrido/transmisión).

Extracción de muestras

Los filamentos branquiales fueron separados del arco branquial con un bisturí para ser depositados en tubos Falcon (50 ml) con 40 ml de agua destilada. Cada tubo se agito suavemente durante 5 minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados durante 5 minutos a 500 g a 9 °C, eliminando el sobrenadante una vez terminado el proceso. El contenido fue resuspendido en agua de mar filtrada y traspasado a una placa Petri durante 1 h a 18 °C.

Colección de las amebas

Se eliminaron los residuos branquiales de cada placa y el contenido líquido fue traspasado a tubos falcon (50 ml). Las amebas se colectaron mediante tres lavados consecutivos. El lavado fue realizado centrifugando a 500 g durante 5 minutos a 9 °C, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 15 ml de agua de mar filtrada-estéril. Entre cada lavado fue eliminado el sobrenadante.

Una vez realizado los lavados y eliminado el sobrenadante, se resuspendió el contenido con 750 µL de tripsina/EDTA (tripsina 0,05%, 0,53 Mm NA4EDTA). Posteriormente a cada tubo se agregaron 10 ml de agua de mar filtrada-estéril.

Cultivo de Ameba

Para el cultivo de amebas se utilizó dos medios. Líquido, caldo de cultivo en base a malta levadura (YMB, siglas en inglés) y medio solido agar malta levadura (YMA, siglas en inglés) marca Sigma Life Science.

En ambos medios se inocularon 10 ml de contenido con amebas previamente colectadas. Solo en los medios con medio solido se adicionaron 10 ml de agua de mar filtrada-esterilizada con el fin de mantener hidratado el medio. Los cultivos fueron mantenidos en una estufa de cultivo a 16°C. Adicionalmente, se tomaron muestras de los cultivos para análisis de qPCR en tiempo real para *Paramoeba perurans* de acuerdo a lo descrito por Fringuelli et al. (2012).

Reacción de la polimerasa en cadena para *Piscirickettsia salmonis*

Para determinar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* se procedió a extraer muestras de branquias, riñón y corazón, las cuales fueron preservadas en etanol al 70 % v/v. Las muestras de tejidos preservadas en etanol al 70 % v/v fueron homogenizados utilizando MagNA Lyser instrument® (Roche). El DNA total fue extraído utilizando MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi)® (Roche) de acuerdo a la metodología descrita por el fabricante.

Para asegurar la eficiencia de cada ensayo se procederá a realizar un RT-PCR del gen endógeno constitutivo, factor alpha-1 (ELF1 α), como un control interno (Snow et al., 2005). El análisis para *Piscirickettsia salmonis* se realizó de acuerdo con lo descrito por Corbeil *et al.* (2003).

6 Conclusiones y recomendaciones

Nuestro trabajo de investigación se centró en investigar el papel de los factores bióticos y abióticos previamente identificados por la literatura como reservorio de *P. salmonis* y luego hacer un juicio informado sobre la posibilidad de diseminación de *P. salmonis* desde el reservorio hacia otros centros de cultivo u otras ACS. Los resultados de este estudio sugieren que los peces enfermos son la principal fuente de *P. salmonis* que contamina el agua y los sedimentos en las proximidades de los centros de cultivo.

6.1 Agua

La cantidad de bacterias presentes en el agua alrededor de las jaulas con enfermedad activa depende de la gravedad de la enfermedad, como se demuestra por los resultados del centro de estudio 6. La tasa de mortalidad más alta tuvo el mayor número de bacterias en el agua. Utilizando el modelo hidrodinámico y de conectividad desarrollado para la Región de Los Lagos en el marco del proyeco SIMA Austral, se identificó que la dispersión en las aguas cercanas a la superficie de la región de Los Lagos generalmente sigue un camino en el sentido de las agujas del reloj con una salida significativa en la esquina sureste (Figura 6-1a). Se utilizaron los modelos medioambientales mencionados para hacer un estudio de la dispersión de SRS. Se identificó que las ACS en el lado oeste central de la bahía (ACS 8, 9A, 9B y 9C) Figura 6-1b fueron identificados como con mayores posibilidades de diseminar SRS. Por el contrario, la ACS más baja en el extremo sureste de la bahía (ACS 13) Figura 6-1b fue identificada como la de menor probabilidad de propagación de SRS. El mismo análisis arrojó que las ACS 9C y 13 presentaban más probabilidades de recibir *P. salmonis* y las ACS 1, 3A y 17B tienen el menor riesgo de recibir *P. salmonis* en estado infeccioso Figura 6-1c.

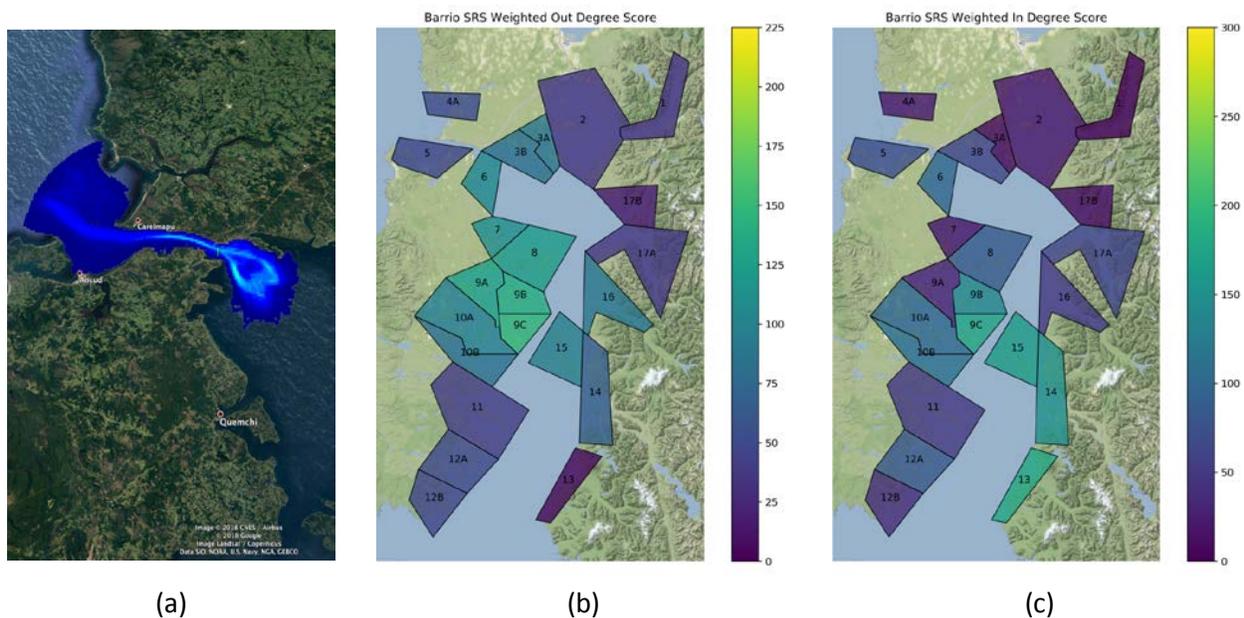


Figura 6-1 (a) Intercambio a través del canal de Chacao desde Barrio 5 a Barrio 6 (lanzamiento del 1 al 5 de enero de 2015, tiempo de dispersión 7 días). (b) Puntaje de riesgo de propagación para SRS (infectar). (c) Puntaje de riesgo de recepción de SRS (ser infectado). Todas las estimaciones se promediaron a lo largo de 2015 y 2016.

Los análisis de conectividad también se pueden aplicar a escala de centros individuales. Los puntajes de propagación y recepción para centros reflejan en gran medida los patrones previamente identificados a nivel de ACS (Figura 6-2).

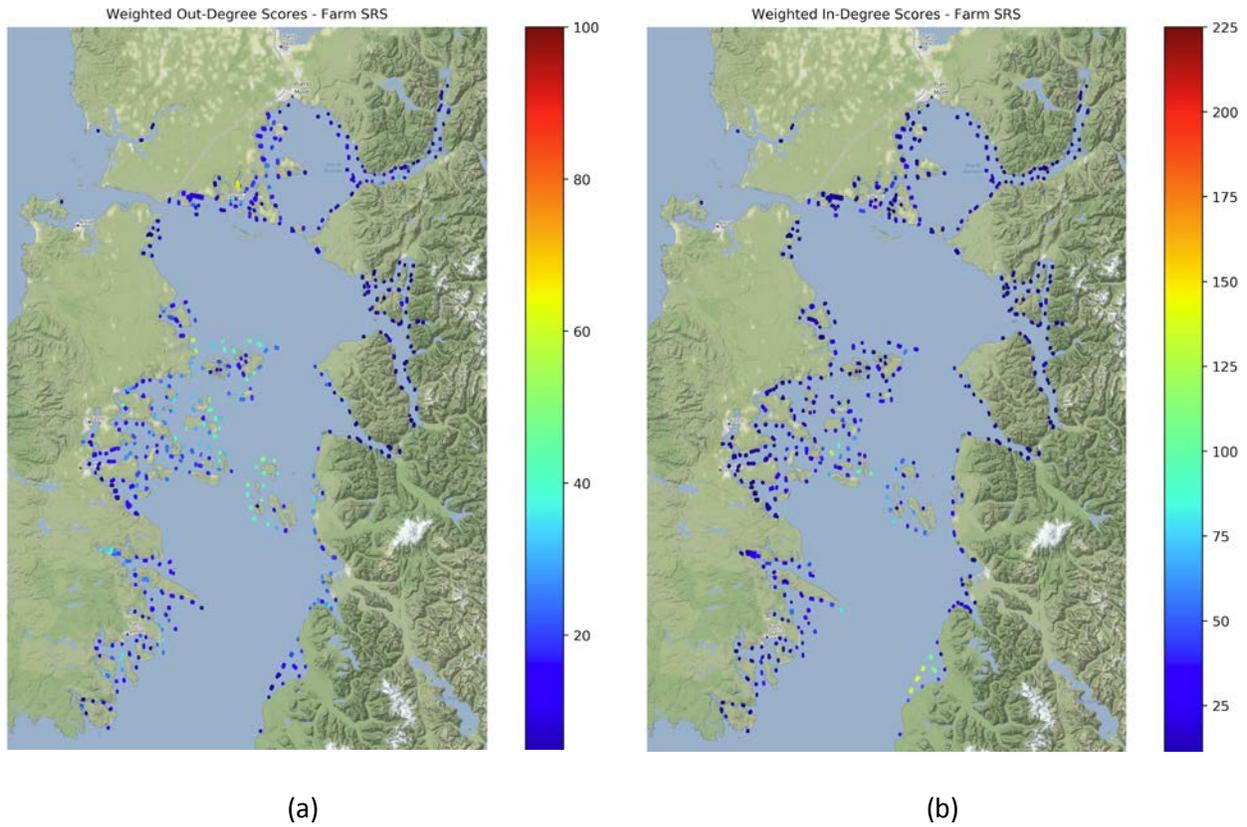


Figura 6-2 Puntajes promedio en la granja para 2015 y 2016 (a) Puntaje de riesgo de propagación para SRS (infectar) (b) Puntaje de riesgo de recepción de SRS (ser infectado).

Como se observa, la gran mayoría de los centros posee un bajo riesgo de infectar o ser infectado. No obstante, un número significativo de centros tiene un alto potencial de infectar, ser infectado, o ambos anteriores. Las estrategias de manejo deben enfocarse sobre estos últimos, por ejemplo removiendo aquellos centros con mayor potencial de transmisión de enfermedades (denominados “stepping stones”). A continuación se presenta un gráfico que ubica los centros en diferentes zonas de riesgo. El área verde presenta bajo riesgo y el área roja presenta un alto riesgo.

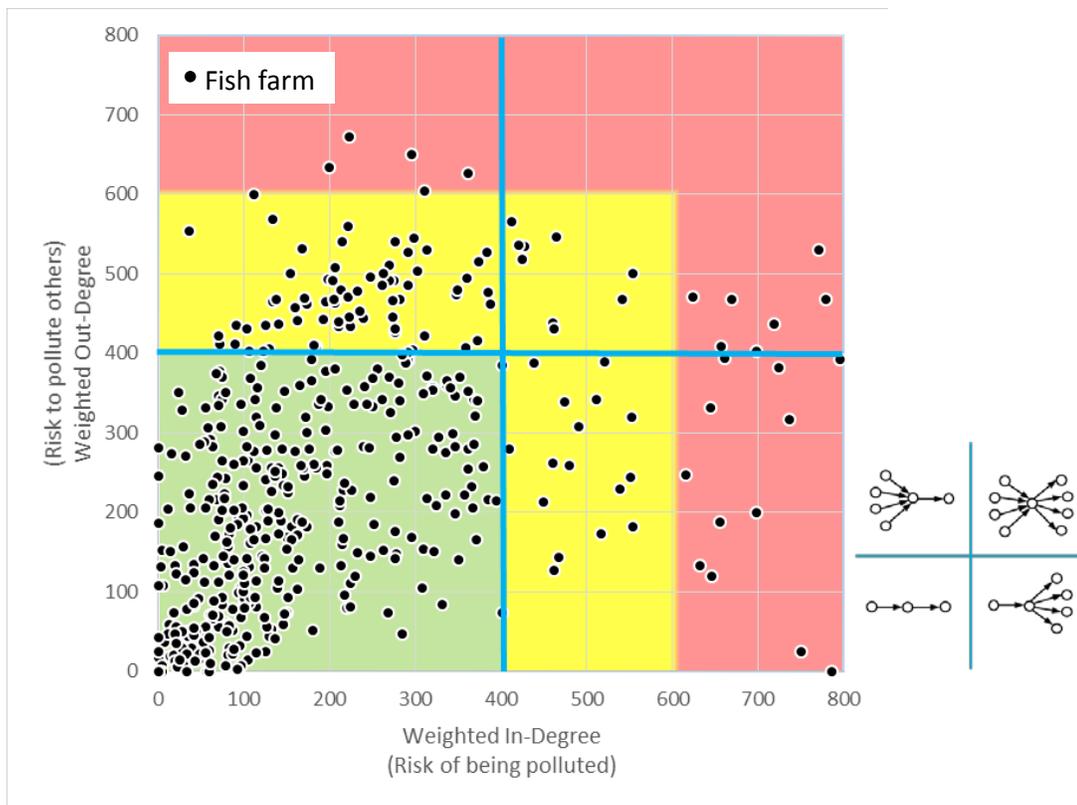


Figura 6-3 Cuatrocientos centros de cultivo de la Region de Los Lagos clasificados a partir de predicciones de conectividad acuática estimadas en Junio de 2016. Área verde representa bajo riesgo de infectar, ser infectado o ambos. Área amarilla representa un riesgo intermedio. Área roja representa un alto riesgo.

6.2 Sedimentos

De acuerdo a los resultados del estudio, los sedimentos marinos también parecen ser un reservorio significativo de *P.salmonis*. Los sedimentos del centro de cultivo 2, que experimentó una alta tasa de mortalidad de peces en el ciclo anterior, mostró el mayor número de *P.salmonis* en los sedimentos. Actualmente no se conoce en forma precisa por cuánto tiempo *P. salmonis* permanece viable en los sedimentos y qué papel desempeñan los sedimentos resuspendidos en el inicio del nuevo ciclo de la enfermedad. Estudios que analicen en forma combinada la conectividad y la erosión de los sedimentos/heces, pueden ayudar a precisar la importancia de este mecanismo potencial.

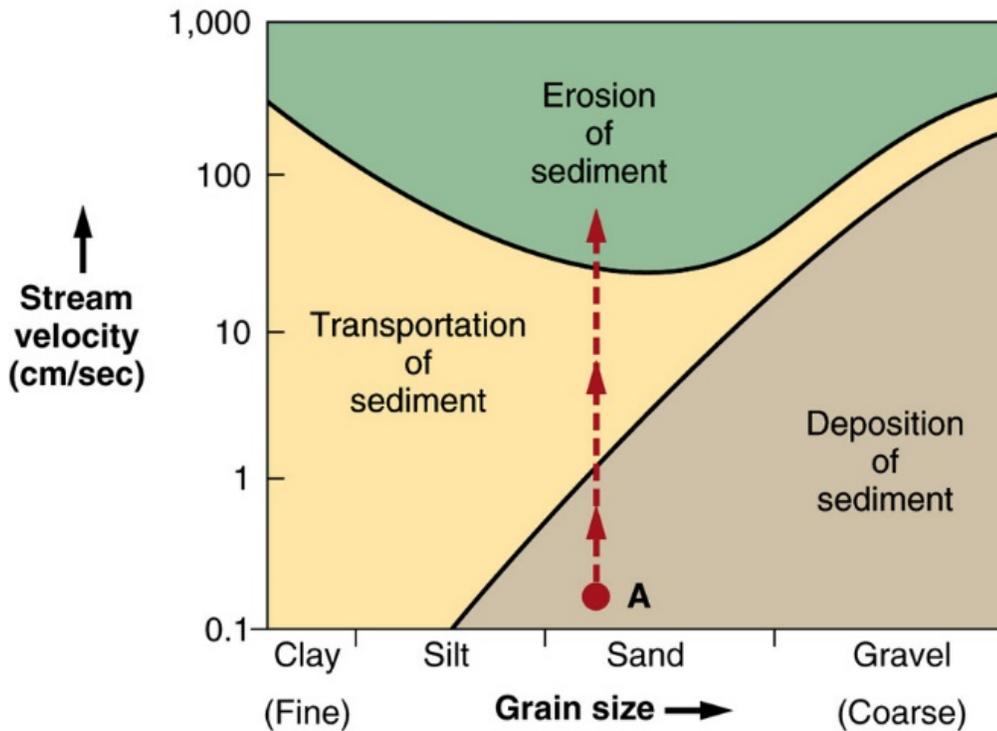


Figura 6-4 Curva de Hjulström. Gráfico utilizado para determinar si un río erosiona, transporta o deposita sedimentos. El gráfico toma en consideración el tamaño de los sedimentos y la velocidad del canal. El eje X muestra el tamaño de las partículas en mm (milímetros).

Las curvas superior e inferior, respectivamente, muestran la velocidad crítica de erosión y deposición (en cm/s), respectivamente, en función del tamaño de partícula (en mm). Los ejes están en escala logarítmica. Las curvas permiten determinar si los sedimentos se erosionarán, serán transportados o se depositarán.

Para tamaños de partícula donde la fricción es la fuerza dominante (en oposición a las fuerzas cohesivas), las curvas de erosión y deposición se siguen de cerca y la velocidad de flujo requerida para movilizar las partículas aumenta con el tamaño de partícula. Por el contrario, en el caso de sedimentos cohesivos (por ejemplo, arcilla y limo), la velocidad de erosión aumenta al disminuir el tamaño del grano. Por otro lado, la velocidad crítica para la deposición depende de la velocidad de sedimentación y disminuye al disminuir el tamaño del grano. Como se observa en la figura, las partículas de arena de un tamaño de alrededor de 0,1 mm requieren la velocidad de corriente más baja para erosionarse.

En la Figura 6-4 los elementos diagonales de la matriz de conectividad, desde la parte inferior izquierda a la superior derecha, representan los porcentajes de partículas que permanecen en cada centro, y por tanto el potencial de auto-infección. Los elementos sobre y bajo la diagonal representan el potencial de propagación y recepción de la infección entre centros. Combinado con estimaciones de resuspensión de sedimentos o heces,

este cálculo puede permitir estimar el riesgo de transmisión local de enfermedades desde los sedimentos a la población de peces de cultivo.

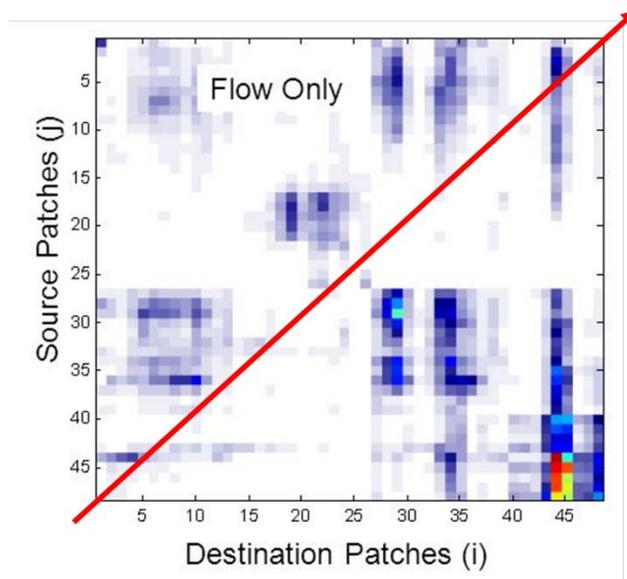


Figura 6-5 Matriz para estimar el riesgo de re-suspensión y re-infección

Se recomienda la utilización de este enfoque metodológico para ayudar a dilucidar el rol de la re-suspension y re-infección de los centros de cultivo.

6.3 Peces silvestres

Es posible que los peces silvestres desempeñen un papel importante en la propagación de *P. salmonis*, ya que hemos detectado *P. salmonis* en branquias de peces silvestres alrededor de 4 de los 6 centros analizados. Esto también justifica una investigación adicional con un estudio que involucre un número mayor de centros con un grado variable de brotes de enfermedad.

6.4 Materiales plásticos

La adhesión de la bacteria a superficies de ovas sugiere que la bacteria también es capaz de adherirse a otro tipo de superficies con los que entra en contacto. En consecuencia, el presente proyecto buscó estudiar si *P. salmonis* era 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.

Los resultados sugieren que tanto el teflón como el nylon tienen la potencialidad de alojar la bacteria y formar el CAP.

Appendix A Estudios de CAP con microscopía electrónica de barrido cepa LF-89

La piscirickettsiosis es la enfermedad bacteriana más importante en la salmonicultura nacional, debido a los altos costos económicos que produce (estimados en \$450 USD anuales). Su agente etiológico es la *Piscirickettsia salmonis*, bacteria Gram negativa, cocoide, intracelular facultativa, aislada por primera vez en Chile en el año 1989, sin embargo, sus formas de transmisión, supervivencia y estrategias de mantención fuera del huésped no son absolutamente conocidas.

En el 2003 se describió el complejo de adhesión piscirickettsial (CAP), sobre la superficie de ovas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando estas eran expuestas *in vitro* con *P. salmonis*. Aunque esta estructura no ha sido bien caracterizada, se ha relacionado con la capacidad de unión de la bacteria sobre la superficie de diversos sustratos, tales como, ovas y conchas de moluscos. Este complejo se establece tempranamente post infección (45 s) y evoluciona en su formación manteniendo al agente viable hasta por 48 h. Al respecto, se ha sugerido que los componentes proteicos del sustrato son de importancia en la unión inicial de la bacteria. Estudios recientes demuestran que *P. salmonis* forma CAP en superficie de conchas de chorito (*Mytilus chilensis*), molusco de amplia distribución a lo largo de las costas de Chile.

Estudios sobre el comportamiento del agente en medios de baja disponibilidad nutricional (agua salada), indican que forma agregados bacterianos unidos por celulosa. Estos hallazgos sugieren que la bacteria puede formar biopelículas. En contraste con estudios publicados sobre el CAP es de interés establecer si este complejo, que se forma en unión a superficie, posee celulosa en su estructura.

El presente objetivo se relaciona al estudio de la formación del CAP en concha de chorito (*Mytilus chilensis*) en medio agua de mar y determinar si los componentes proteicos del sustrato influyen en su formación. Por otra parte, se pretendió demostrar que la estructura de este complejo está constituida principalmente por celulosa.

Los resultados de este estudio entregarán antecedentes sobre la importancia epidemiológica de la formación del CAP como estrategia de sobrevivencia y permanencia de la bacteria en el medio fuera del huésped.

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas dependiente de la Unidad de Anatomía Patológica del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile y en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Pontificia Universidad Católica de Chile de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

A.1 Línea Celular CHSE 214.

Con la finalidad de reproducir la bacteria *Piscirickettsia salmonis* y evaluar su viabilidad post ensayo de formación de CAP y tratamiento con celulosa, se utilizó la línea celular CHSE-214 (ATCC® CRL 1681), derivada de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), cultivada con medio Leivovitz (L-15) (Biological Industries®), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biological Industries®), con un pH= 7,4 a temperatura de 15 °C hasta lograr 100% efecto citopático (ECP), de acuerdo a lo establecido por Fryer *et al.* (1990).

A.2 Cepa LF-89 *Piscirickettsia salmonis*.

Se utilizó un aislado obtenido de un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cultivado en mar, pasaje dos, aportado por el Dr. Marcos Godoy (el cual fue certificado por el Laboratorio ETECMA de Puerto Montt). En el Laboratorio Nacional de Referencia de la FAVET, la bacteria fue confirmada como *P. salmonis* mediante PCR y secuenciación del gen 16S ribosomal. La bacteria fue reproducida en la línea celular CHSE-214 a temperatura de 15 °C (Fryer *et al.* 1990) hasta lograr un 100% ECP. El medio de cultivo con la bacteria fue filtrado en poro de 0,5 µm de diámetro (Minisart[®]) para eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido fue diluido con agua de mar en una proporción 1:10 y posteriormente titulado en placas de agar con medio de cultivo IFOP-PsM11 (Contreras *et al.* 2017), medio especialmente formulado para el crecimiento de *P. salmonis*. Para el experimento se utilizó un título de 400.000 UFC/ml.

A.3 Cepa EM-90 de *Piscirickettsia salmonis*.

Se utilizó un aislado obtenido de un brote de piscirickettsiosis en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivado en mar, pasaje tres, aportado por el Dr. Marcos Godoy (el cual fue certificado por el Laboratorio ETECMA de Puerto Montt). En el Laboratorio Nacional de Referencia de la FAVET, la bacteria fue confirmada como *P. salmonis* mediante PCR y secuenciación del gen 16S ribosomal. La bacteria fue reproducida en la línea celular CHSE-214 a temperatura de 15 °C (Fryer *et al.* 1990) hasta lograr un 100% ECP. El medio de cultivo con la bacteria fue filtrado en poro de 0,5 µm de diámetro (Minisart[®]) para eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido fue diluido con agua de mar en una proporción 1:10 y posteriormente titulado en microplacas de 20 pocillos que tenían una monocapa de células de la línea CHSE-214 (Fryer *et al.* 1990). El título obtenido fue de 10^{5,3} TCID₅₀/ml.

A.4 Conchas de *Mytilus chilensis*.

Se obtuvieron cuatro ejemplares de chorito desde un mercado de Santiago. El criterio de selección comprendió: tamaño (aproximadamente 4 cm de largo), juveniles, superficie (lisa), grosor (similar), color (uniforme) y libre de alteraciones macroscópicas. Fueron clasificados como *Mytilus chilensis* mediante las claves taxonómicas descritas por Aldea y Valdovinos (2005).

Para obtener un sustrato adecuado se realizó un protocolo de limpieza y desinfección, modificado de acuerdo con el estudio de Pérez (2017), que consiste en limpieza mecánica en agua tibia (25 °C), con cepillo suave, desinfección con cloruro de benzalconio (Billow[®]) a una concentración final de 0,02% (200 ppm), por 24 h. Las conchas de chorito fueron seccionadas con una sierra fina de joyería para obtener trozos de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm y luego fueron dispuestas a una nueva desinfección en cloruro de benzalconio (Billow[®]) a concentración final de 0,02% (200 ppm), por 24 h. Las muestras fueron lavadas y enjuagadas en agua destilada estéril para ser posteriormente mantenidas a -20 °C en bolsa hermética estéril hasta su utilización.

A.5 Agua de mar.

El agua de mar fue suministrada por el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) la cual se extrajo desde la bahía de Hueihue, Chiloé, Región de los Lagos (41°54'55" S y 73°29'24" W), donde existen numerosos centros de salmonicultura y mitilicultura. En esta muestra se determinaron los parámetros de salinidad (29 ppm) y pH (7,6).

Fue filtrada bajo condiciones de esterilidad (campana de bioseguridad tipo 2) con poro de 2 μm y posteriormente esterilizada mediante autoclave a 120 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min.

A.6 Proteinasas y celulasa.

A.6.1 Tripsina:

Se utilizó la enzima trypsin (Sigma-Aldrich¹). Esta enzima es una peptidasa producida en el páncreas humano como tripsinógeno (forma inactivada), que mediante hidrólisis rompe los enlaces peptídicos después de lisina (Lys) y arginina (Arg), ambos aminoácidos con grupos radicales cargados positivamente.

Forma péptidos o aminoácidos de menor tamaño. Su pH óptimo de acción es 7 a 9 y la temperatura a la que presenta mayor actividad 37 $^{\circ}\text{C}$ (Sigma-Aldrich¹, 2016).

A.6.2 Proteinasa K:

Se utilizó la enzima proteinasa K (Sigma-Aldrich²). Enzima peptidasa aislada desde el hongo *Engyodontium album*, utilizada por su amplia especificidad ya que degrada muchas proteínas nativas a péptidos. Su sitio predominante de ruptura es el enlace peptídico después de aminoácidos alifáticos y aromáticos con grupos alfa-amino bloqueados.

Su pH óptimo de acción es de 7,5 a 9 (con un rango de 7 a 12) y la temperatura a la que presenta mayor actividad es 37 $^{\circ}\text{C}$ (Sigma-Aldrich², 2016).

A.6.3 Celulasa:

Se utilizó la enzima celulasa obtenida de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich²). Enzima glicosil hidrolasa que degrada cadenas de celulosa a monómeros de glucosa. Producida por *Aspergillus niger*, cataliza la hidrólisis de enlaces endo-1,4- β -D-glucosídicos en celulosa, liquenina, glucano de cebada y celo-oligosacáridos celotriosa a celo-hexosa. No escinde celobiosa o p-nitrofenil- β -D-glucósido. Esta enzima también escinde glicosaminoglucano intacto a partir de un péptido central por hidrolización del enlace xilosil-serina.

Su pH óptimo de acción es 5 y la temperatura a la que presenta mayor actividad 37 $^{\circ}\text{C}$ (Sigma-Aldrich³, 2016).

A.7 Formación de CAP en concha de chorito (*Mytilus chilensis*) en agua de mar.

El procedimiento fue realizado según lo descrito en el estudio de Pérez (2017) para la formación de CAP, modificado para la utilización de medio agua de mar. Se utilizaron seis trozos de concha de chorito (con sus respectivos duplicados), de tamaño aproximado 0,5 x 0,5 cm, que fueron dispuestos de forma individual en tubos Eppendorf de 2 ml. Se mantuvo una temperatura constante de 15 $^{\circ}\text{C}$ desde el inicio al fin del ensayo.

Las muestras una vez sometidas a alguno de los tratamientos enzimáticos, fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato de sodio y enviadas al Laboratorio de Microscopía Electrónica de barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile para ser observadas mediante un microscopio de barrido (JEOL modelo JSM-IT300LV).

Se utilizaron dos controles negativos: Uno que correspondió a una muestra de concha sumergida en agua de mar estéril (C (-) AGUA MAR) y otro de concha adicionado de L-15 (C (-) L15) que fueron mantenidos en esas condiciones por 24 h. Adicionalmente se contó con un control positivo (C (+) PS-L15) que corresponde a conchas sumergidas en una suspensión de medio L-15 que contenía *P. salmonis*, modificado de los estudios de Pérez (2017)(Tabla 6-1). Estas últimas muestras fueron desafiadas con la bacteria por 10 min, 1 h y 24 h. La formación de CAP en agua de mar, fue evaluada utilizando *P. salmonis* diluida en agua de mar, de acuerdo a lo explicado anteriormente, sometiendo a los grupos según corresponda, a una exposición con la bacteria durante, 10 min, 1 h o 24 h (PS-AM, Tabla 6-1). Todas las conchas fueron fijadas y procesadas para ser observadas mediante MEB. Adicionalmente, una muestra de 24 h de exposición a *P. salmonis* en agua de mar, fue introducida en una botella de cultivo con línea celular CHSE-214 para evaluar viabilidad bacteriana de acuerdo a lo descrito por Pérez (2017).

Tabla 6-1 Diseño experimental de formación de complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) en superficie de concha de chorito (*Mytilus chilensis*) en medio agua de mar.

| | Grupo | Tiempo de incubación | Tiempo de exposición | | | Viabilidad |
|---|---|----------------------|----------------------|-----|------|--------------------------------------|
| | | 24 horas | 10 min | 1 h | 24 h | ECP |
| C O N T R O L E S | C (-) AGUA MAR agua de mar + concha | MEB | - | - | - | - |
| | C (-) L15 L15 + concha | MEB | - | - | - | - |
| | C (+) PS-L15 <i>P. salmonis</i> + L15 + concha | - | - | MEB | MEB | - |
| | PS-AM <i>P. salmonis</i> ¹ + agua de mar + concha | - | MEB | MEB | MEB | Cultivo CHSE- 214 ² |

¹ El título bacteriano fue de 400.000 UFC/ml. ² Un duplicado de concha desafiada durante 24 h fue colocada en la línea celular CHSE-214. C (-) = Control negativo, C (+) = Control positivo, L15 = Medio Leibovitz, PS-AM = Grupo desafío con *P. salmonis* diluida en agua de mar, *P. salmonis* = *Piscirickettsia salmonis*, Concha = Concha de *Mytilus chilensis*, MEB = Microscopía Electrónica de Barrido, ECP = Efecto Citopático.

A.8 Evaluación de la formación de CAP sobre la superficie de conchas de chorito tratadas con proteasas.

El procedimiento fue realizado según los estudios de Toledo (2008), modificándose la temperatura y tiempo de exposición de las conchas de chorito. Para el tratamiento se utilizaron dos enzimas: tripsina y proteinasa K (Sigma-Aldrich¹; Sigma-Aldrich²).

Las muestras y sus respectivos duplicados fueron fijados en glutaraldehído 3% en tampón de cacodilato de sodio y procesadas para ser observadas mediante microscopio MEB/EDX (JEOL modelo JSM-IT300LV).

Para la evaluación del tratamiento sobre las conchas se utilizaron tres trozos de concha de chorito, de tamaño aproximado 0,5 x 0,5 cm, colocándose cada uno en tubos Eppendorf de 2 ml. Cada muestra tuvo un duplicado (total seis muestras). Se mantuvo una temperatura constante de 37 °C durante el ensayo, temperatura de mayor actividad enzimática de ambas proteasas (Sigma-Aldrich¹; Sigma-Aldrich²). Como control negativo se utilizaron conchas (n=2) sin tratar (C (-)), las que fueron fijadas en glutaraldehído 3% al tiempo 0. El resto de las conchas fueron tratadas con 2 µg/µl de tripsina (C (-) Trip) o con 5 µg/µl de proteinasa K (C (-) PK). Luego fueron lavadas dos veces con solución tamponada de PBS 1X (pH 7,2) y fueron fijadas al tiempo de 1 h (Tabla 6-2).

Para evaluar la formación de CAP, se utilizaron nueve trozos de concha de chorito de tamaño aproximado 0,5 x 0,5 cm, las cuales se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 2 ml. Cada muestra tuvo un duplicado (total 18 muestras). Se mantuvo una temperatura constante de 15 °C durante el ensayo de acuerdo con lo descrito por Pérez (2017).

Como control negativo (C (-)) y control positivo (C (+) PS-AM) se utilizaron los descritos en la Tabla 6-2. La formación de CAP fue evaluada (en duplicado) en muestra de concha tratada con tripsina (PS-Trip) o proteinasa K (PS-PK), que fueron expuestas con *P. salmonis* al tiempo 10 min, 1 h y 24 h (Tabla 2). Todas las muestras después del tratamiento fueron fijadas y procesadas para su observación en MEB.

Tabla 6-2. Diseño experimental de formación de CAP en concha de chorito (*Mytilus chilensis*) tratadas con proteinasas.

| | Grupo | Tiempo de tratamiento | | Tiempo de exposición | | |
|---|---|-----------------------|-----|----------------------|-----|------|
| | | 0 | 1 h | 10 min | 1 h | 24 h |
| C O N T R O L E S | C (-) concha sin tratamiento | MEB | - | - | - | - |
| | C (-) Trip ¹ concha tratada con tripsina | - | MEB | - | - | - |
| | C (-) PK ² concha tratada con proteínasa K | - | MEB | - | - | - |
| | C (+) PS-AM <i>P. salmonis</i> ³ + agua de mar + concha sin tratamiento | - | - | MEB | MEB | MEB |
| | PS-Trip <i>P. salmonis</i> ³ + agua de mar + C (-) Trip | - | - | MEB | MEB | MEB |
| | PS-PK <i>P. salmonis</i> ³ + agua de mar + C (-) PK | - | - | MEB | MEB | MEB |

¹Tratamiento con 2 µg/µl de tripsina. ²Tratamiento con 5 µg/µl de proteinasa K. ³El título bacteriano fue de 400.000 UFC/ml. MEB= Microscopía Electrónica de Barrido. Concha= Concha de *Mytilus chilensis*.

A.9 Evaluación de CAP formado sobre la superficie de conchas de chorito post tratamiento con celulasa.

Se utilizaron tres trozos de concha de chorito de tamaño aproximado 0,5 x 0,5 cm con un CAP preformado de 24 h (PS-AM, Tabla 6-1). Se utilizaron tubos Eppendorf de 2 ml, cada uno con un trozo de concha y cada muestra con un duplicado (total seis muestras). Se mantuvo una temperatura constante de 15 °C desde inicio a fin del ensayo, temperatura óptima para el crecimiento de *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1990). Luego del tiempo de tratamiento y exposición respectivos las muestras fueron fijadas y procesada para su observación mediante MEB.

Se utilizó un control positivo de concha con CAP (C (+) PS-AM)[10] formado de 24 h correspondiente al grupo expuesto mostrado en la Tabla 6-1. El efecto de la celulasa en el CAP fue evaluado en muestra de concha con CAP 24 h adicionada de una solución de celulasa 5 mg/ml en “buffer” PBS 1x (pH 7,2) por 4 h (PS-AM-CEL), tiempo después del cual fue fijada y procesada para MEB. Un duplicado fue lavado dos veces con “buffer” PBS 1X (pH 7,2) e introducido en una botella de cultivo con línea celular CHSE-214 para evaluar viabilidad bacteriana (Tabla 6-3).

Tabla 6-3. Tratamiento del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) de 24 h con celulasa.

| | Grupo | Tiempo de tratamiento | | Viabilidad |
|---------------------------------|--|-----------------------|-----|--------------------------------------|
| | | 0 h | 4 h | ECP |
| C O N T R O L | C (+) PS-AM concha CAP 24 h | MEB | - | - |
| | PS-AM-CEL concha CAP 24 h + celulasa | - | MEB | Cultivo CHSE- 214 ¹ |

¹ Un duplicado de concha desafiada durante 4 h fue colocado en la línea CHSE-214.

MEB= Microscopía Electrónica de Barrido. ECP= Presencia de efecto citopático.

A.10 Ensayo de actividad enzimática.

Con la finalidad de determinar la correcta funcionalidad de las enzimas utilizadas en el estudio, se realizó un ensayo de efectividad enzimática para proteasas y para celulasa.

A.10.1 Ensayo proteinasas:

Se realizó una cinética de degradación utilizando como sustrato albúmina de suero bovino (BSA), y fue evaluada posteriormente mediante método Bradford de cuantificación de proteínas y espectrometría de absorción.

A.10.2 Ensayo celulasa:

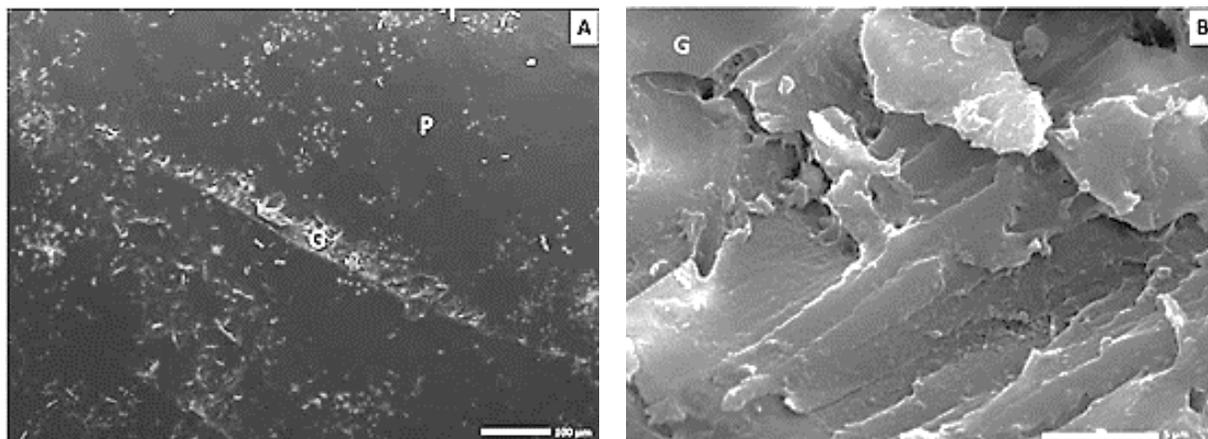
Se realizó una cinética de degradación utilizando como sustrato DEAE-Cellulose, y fue evaluada posteriormente mediante espectrometría de absorción de unidades de glucosa, según lo descrito por el fabricante (Enzymatic Assay Cellulase Sigma-Aldrich, 2017).

A.11 Resultados

A.11.1 Formación de CAP en concha de chorito (*Mytilus chilensis*) en agua de mar.

Controles negativos.

Se utilizaron dos controles negativos, uno cultivado en medio L-15 y otro en agua de mar, cultivados a 15 °C por 24 h. En ambos controles se observó la superficie del periostraco de la concha de chorito (P blanca) sin microorganismos contaminantes y con una distribución homogénea, interrumpida por abrasiones en la continuidad que fueron denominadas grietas (G blanca) y fueron observadas con frecuencia de una a dos grietas por muestra de 0,5 x 0,5 cm. Al interior de las grietas no se observaron microorganismos y fue posible distinguir placas de carbonato de calcio (calcita o aragonita) descritas por (Spencer, 2017) como componentes de la zona prismática del ostraco de la concha de moluscos (Figura 6-6).



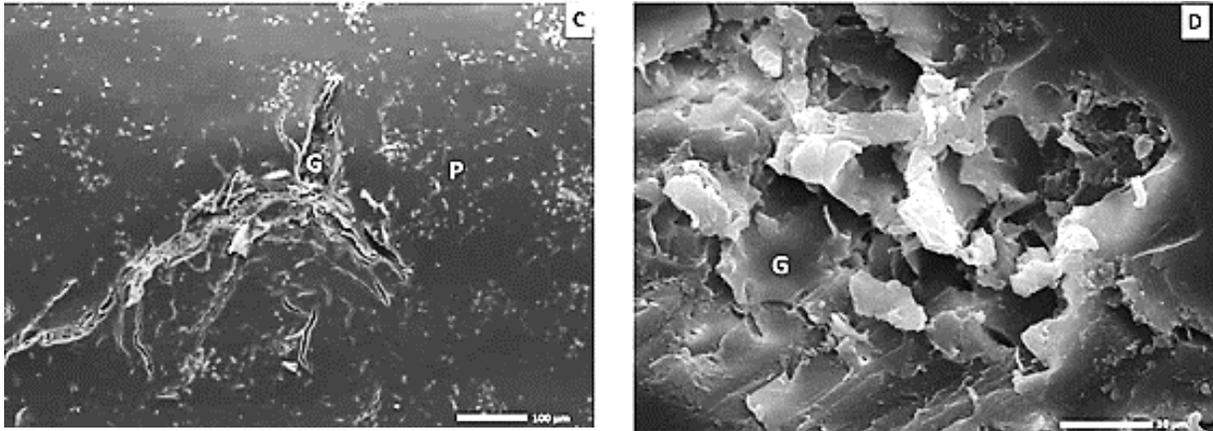
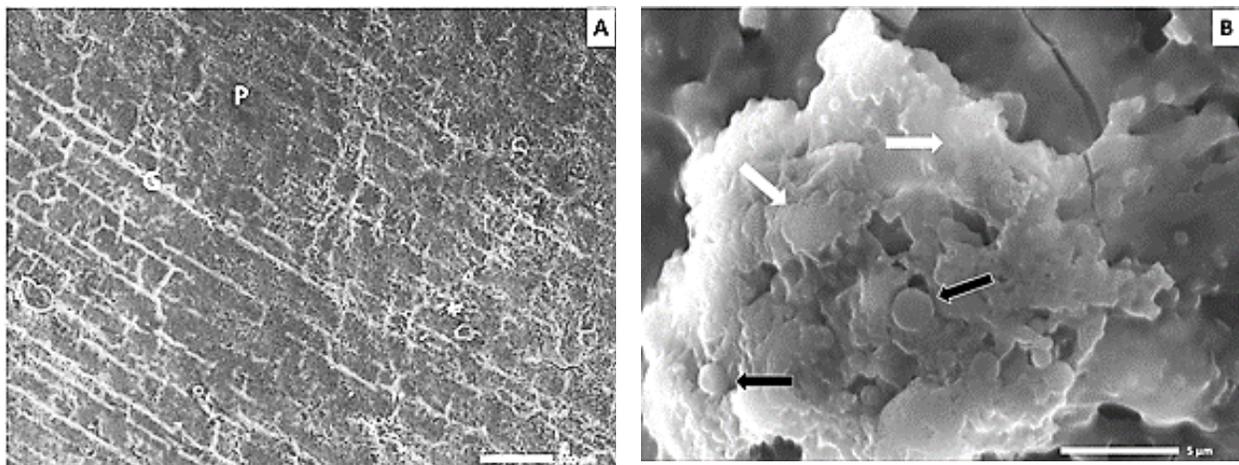


Figura 6-6. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de concha de chorito post limpieza. Se observan diferentes zonas de la superficie de una concha control negativo. No se observan microorganismos. A. Concha incubada en medio L-15 por 24 h (150x). B. Grieta de concha incubada en medio L-15 por 24 h (5000x). C. Concha incubada en agua de mar por 24 h (150x). D. Grieta de concha incubada en agua de mar por 24 h (2000x). P= Periostraco. G= Grieta.

Controles positivos.

En el control positivo, correspondiente a concha de chorito cultivada en sobrenadante de L-15 con *Piscirickettsia salmonis* por 1 h (cuadros a la izquierda) y 24 h (cuadros a la derecha), fue posible observar estructuras blanquecinas, difusas y de distribución focal, unidas a la superficie del periostraco (Figura 6-7, letra P) como a la superficie de las grietas (Figura 6-7, letra G). Dentro de la grieta se observaron diversas estructuras cocoides de 0,5 a 2 µm de diámetro, correspondientes a la bacteria *P. salmonis* (flecha negra), rodeada de material de forma irregular y distribución focal correspondiente al complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) (flecha blanca) (Figura 6-7).



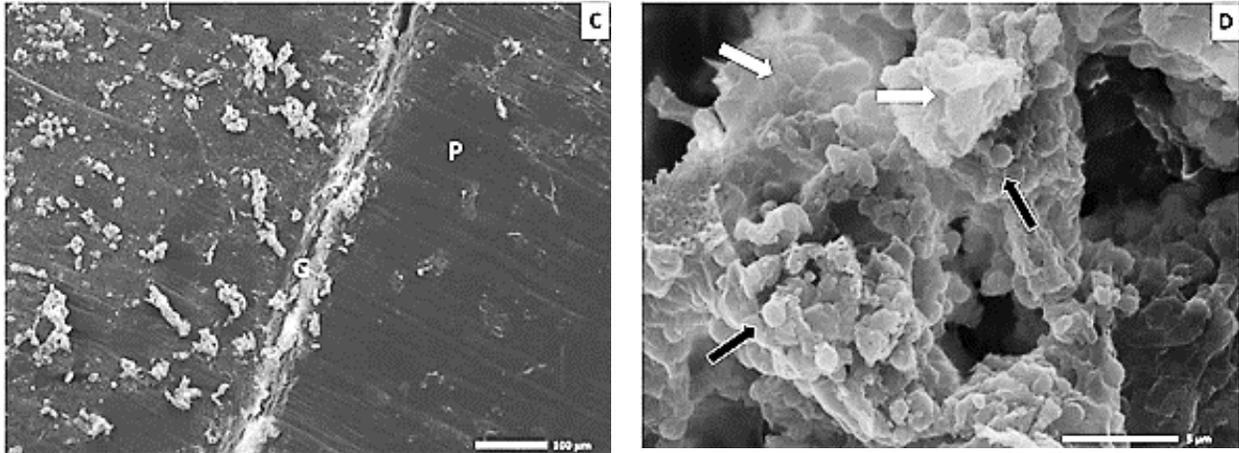
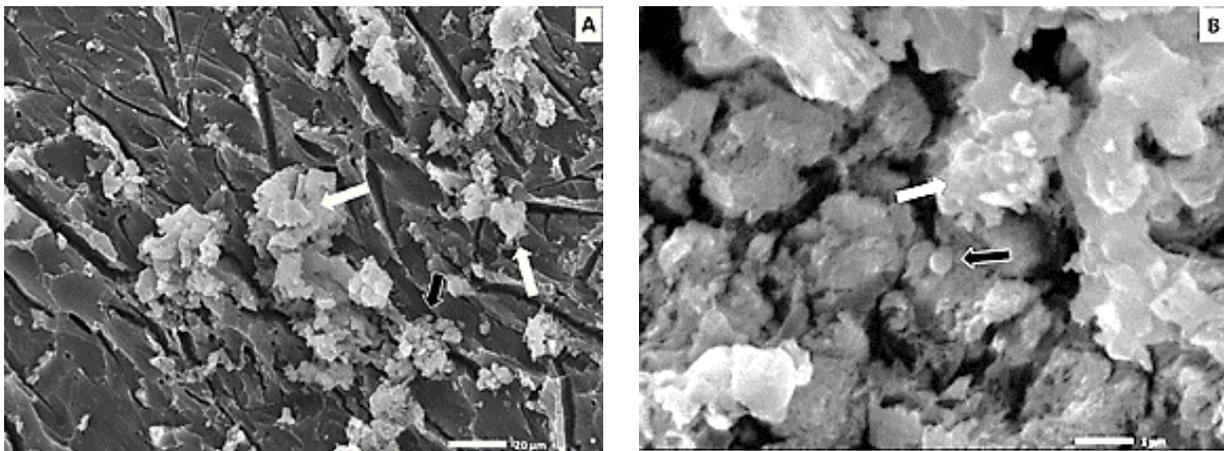


Figura 6-7. Control positivo. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de conchas de chorito desafiadas con *P. salmonis* en medio de cultivo L-15. Se observan diferentes zonas con la presencia de la bacteria unida a la superficie formando el complejo de adhesión piscirickettsial (CAP). Las flechas negras indican la presencia de la bacteria. Las flechas blancas indican la presencia del CAP. A y B. Concha incubada en medio L-15 con *P. salmonis* por 1 h (150x y 5000x). C y D. Concha incubada en medio L-15 con *P. salmonis* por 24 h (150x y 5000x). La. P= Periostraco. G= Grieta.

A.12 Ensayo formación de complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) en medio agua de mar.

La bacteria y la formación del CAP estuvieron presentes en todos los tiempos de exposición (10 min, 1 h y 24 h) con medio agua de mar y con *P. salmonis*. Se observaron diversos conglomerados de organismos adheridos a la superficie y que midieron entre 0,5 a 2 µm de diámetro (Figura 6-8, flecha negra) o rodeados por una estructura irregular y difusa del CAP con tamaños variables entre 10 y 60 µm de longitud (Figura 6-8, flecha blanca). A medida que avanzó el tiempo de exposición, se observó en menor frecuencia los conglomerados bacterianos, así como las bacterias solitarias unidas a la superficie, habiendo un predominio de la estructura irregular y difusa del CAP.



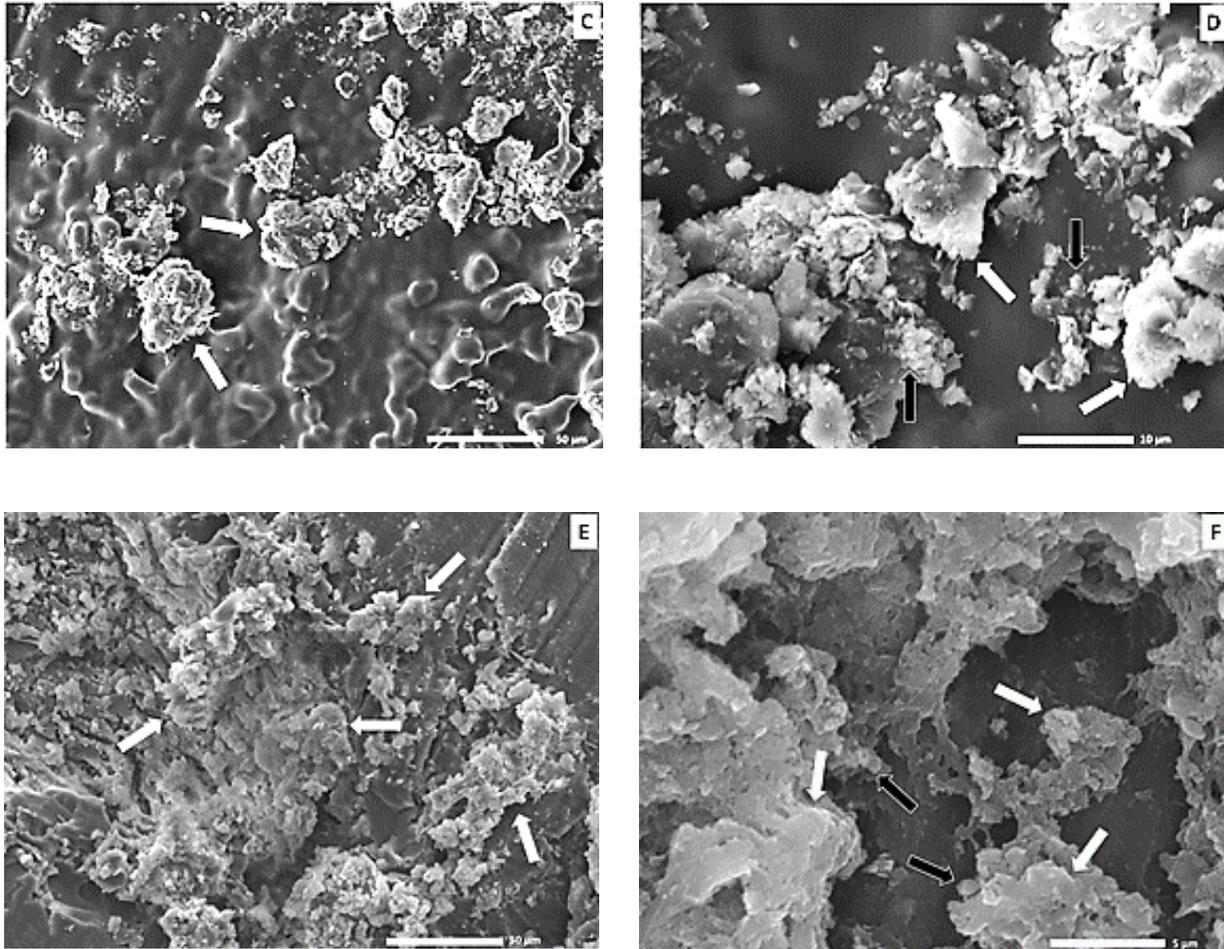


Figura 6-8. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de conchas de chorito desafiadas con *P. salmonis* en agua de mar. Se observan diferentes zonas con la presencia de la bacteria unida a la superficie formando el complejo de adhesión piscirickettsial (CAP). Las flechas negras indican la presencia de la bacteria. Las flechas blancas indican la presencia del CAP. A y B. Concha incubada en agua de mar con *P. salmonis* por 10 min (150x y 5000x). C y D. Concha incubada en agua de mar con *P. salmonis* por 1 h (150x y 5000x). E y F. Concha incubada en agua de mar con *P. salmonis* por 24 h (150x y 5000x).

A.13 Viabilidad de *P. salmonis* en formación de CAP de 24 horas en agua de mar.

El control negativo no mostró ningún efecto en las líneas celulares estudiadas al día 23 de colocado un trozo de concha en la botella de cultivo. En las células con trozos de conchas, expuestas con *P. salmonis* por 24 h, se observó efecto citopático desde el día 3 post-exposición. Las células afectadas se observaron con vacuolas, inmediatamente alrededor del borde de la concha (Figura 6-9). Al día 6 post-exposición el efecto citopático se hizo más evidente en las zonas más cercanas al borde de la concha y al día 10 ya había un 80% de células afectadas.

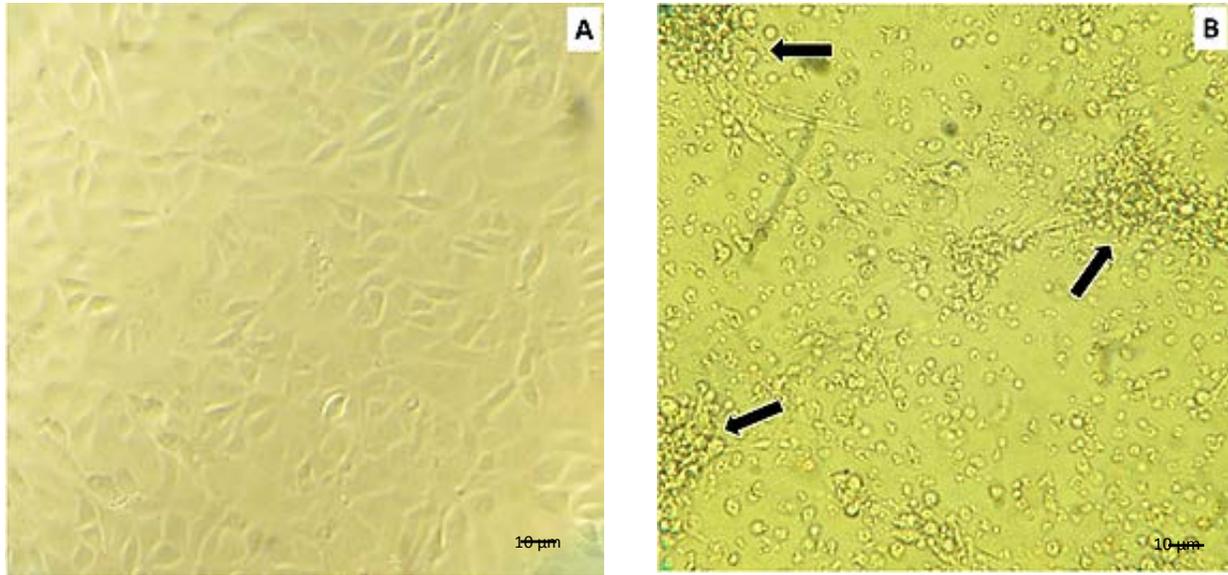


Figura 6-9. Cultivo celular línea CHSE-214. Microscopio invertido con luz polarizada. La figura A muestra un cultivo normal. La figura B presenta efecto citopático característico del crecimiento y desarrollo de *P. salmonis*. La línea celular en B fue expuesta con una concha cuyo duplicado presentaba la formación de CAP de 24 h. Las barras indican 10 µm.

A.13.1 Ensayo de actividad enzimática

Los tratamientos con proteasas (tripsina y proteinasa K) antes del desafío con *P. salmonis* y con celulasa posterior la formación del CAP no produjo un efecto en la unión de la bacteria.

Appendix B Adhesión in vitro de *Piscirickettsia salmonis* en superficies de materiales de cultivo de balsas jaulas

La acuicultura es una de las principales actividades productivas de Chile, segundo mayor productor de salmón en el mundo, una de las principales enfermedades que afectan la salmonicultura chilena es la “Piscirickettsiosis o SRS”, causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, la que amenaza la sustentabilidad de la industria debido al sistema de producción intensivo inserto en el medio acuático que actúa como vehículo diseminador de este patógeno.

Los significativos avances en la prevención y el control de esta enfermedad no han sido suficientes debido al limitado conocimiento en muchos aspectos del ciclo de vida, la ecología y la dinámica de la población de este patógeno. La dificultad en el control de esta enfermedad se asocia principalmente al escaso y fragmentario conocimiento disponible sobre la transmisión, supervivencia y estrategias de mantención fuera del huésped, las que no están del todo definidos.

Al respecto, en un estudio realizado por Larenas *et al.* (2003) describieron que la bacteria era capaz de adherirse a la superficie de ovas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante unas estructuras laminares a la que llamaron “Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP). Aunque esta estructura no ha sido del todo caracterizada, Quinteros (2005) sugiere que corresponde a una biopelícula, relacionada a la capacidad de unión de la bacteria a la superficie de la ova. En trabajos recientes se pudo observar que la bacteria es capaz de adherirse a la superficie de otros sustratos, donde se formó el CAP como lo visto en conchas de choritos (*Mytilus chilensis*) reportado por Pérez (2017).

La adhesión de la bacteria a superficies de ovas sugiere que la bacteria también es capaz de adherirse a otro tipo de superficies con los que entra en contacto. En consecuencia, el presente 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.

Los resultados obtenidos a partir de este trabajo permiten comprender aspectos epidemiológicos de la piscirickettsiosis, se relacionan con la mantención y persistencia del agente etiológico fuera del huésped, lo que implica replantear las estrategias de control y prevención de la enfermedad.

B.1 Lugar de procesamiento de muestras

El trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas del SERNAPESCA, Departamento de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

B.2 Línea Celular CHSE 214

La multiplicación de la *Piscirickettsia salmonis* y evaluación de viabilidad post ensayo de adhesión, se realizó en la línea celular CHSE-214 derivada de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). Las células fueron mantenidas en medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle (Biological Industries®), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biological Industries®) (MEM-10), L-glutamina (Biological Industries®) y 1% bicarbonato de sodio, para mantener un pH= 7,4. Fueron cultivadas y subcultivadas hasta una confluencia 100% a una temperatura de 15 °C.

B.3 Piscirickettsia salmonis

La bacteria empleada correspondió a un aislado de campo asociado a un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico cultivado en mar, donado por el Laboratorio ETECMA - Puerto Montt. En el laboratorio de la U. de Chile la bacteria fue amplificada y posteriormente, mediante secuenciación del producto de PCR de 1270 pb del gen 16S rRNA, se caracterizó como cepa LF-89, lo cual fue realizado en la Unidad de Secuenciación Automática de la Universidad Católica de Chile procesado en un equipo ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems™).

La bacteria fue multiplicada en la línea celular CHSE-214 a 15 °C, temperatura óptima de crecimiento (Fryer *et al.* 1990), hasta alcanzar el 100% de efecto citopático ECP. La bacteria fue titulada de acuerdo con el método de punto final 50% propuesto por Reed y Muench (1938).

B.4 Agua de mar

El agua fue suministrada por el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), extraída de la bahía de Hueihue, Chiloé, Región de los Lagos (41°54'55" S y 73°29'24" W). Se esterilizó en autoclave a 120 °C por 15 min y luego filtrada a 0,22 µm (CA Syringe Filter EDLAB®) bajo campana de bioseguridad tipo 2. Se midieron los parámetros de pH y salinidad.

B.5 Materiales plásticos empleados

Los materiales correspondieron a láminas de 3 mm de espesor de: polietileno de alta densidad (HDPE), policloruro de vinilo (PVC), poliamida (PA), politetrafluoretileno (PTFE), adquiridos en una productora de la ciudad de Santiago. Los materiales se cortaron en fragmentos aproximados de 0,5 cm² con una sierra para metal. Posteriormente se limpiaron con un cepillo suave empleando agua destilada tibia (25 °C), luego se desinfectó con amonio cuaternario a una concentración de 200 ppm, durante 2 horas (DESAMON®). Finalmente los materiales fueron lavados y/o enjuagados en agua destilada estéril y filtrada, para luego ser mantenidas a -20 °C hasta su utilización.

Tabla 6-4 Descripción de materiales de cultivo de balsas jaula empleados en el experimento.

| Materiales | Descripción |
|-------------------------------------|---|
| Polietileno de alta densidad (HDPE) | El polietileno (PE) es químicamente el polímero más simple. Se representa con su unidad repetitiva $(CH_2-CH_2)_n$. El PE se produce a partir del etileno derivado del petróleo o gas natural. Dependiendo de las condiciones del proceso de fabricación existen variedades de PE. Las más conocidas son: el polietileno de alta densidad HDPE y el polietileno de baja densidad LDPE. |
| Policloruro de vinilo (PVC) | El PVC $(C_2H_3Cl)_n$ es el producto de la polimerización del monómero de cloruro de vinilo . Es el derivado del plástico más versátil. Se puede producir mediante cuatro procesos diferentes: suspensión, emulsión, masa y solución. Se presenta como un material blanco que comienza a reblandecer alrededor de los 80 °C y se descompone sobre 140 °C. Es un polímero por adición y además una resina que resulta de la polimerización del cloruro de vinilo o cloroeteno. Tiene una muy buena resistencia eléctrica y a la llama . |
| Poliamida (PA) nylon | Se trata de un plástico de nitrógeno que presenta interrupciones regulares de grupos amida en su cadena principal. El nylon se obtiene a partir de la policondensación entre hexametildiamina y ácido adípico, la composición química es $(NH(CH_2)_5CO)_n$. El nombre de nylon (poliamida 66) proviene de las siglas New York-London (ny - lon) |
| Politetrafluoretileno (PTFE) teflón | El PTFE está formado en su totalidad por cadenas de macromoléculas sin ramificar, con un grado de polimerización bastante elevado. La composición química: $(CF_2-CF_2)_n$ Los enlaces FC son tan fuertes que es muy difícil romperlos. Por otra parte, la estructura molecular es completamente simétrica. Se trata de un plástico especial que sólo se destina a elevadas temperaturas. El polímero que contiene hasta un 40% de materiales aditivos se denomina compuesto de PTFE. |

B.6 Conchas de *Mytilus chilensis*

Las muestras de conchas de choritos correspondieron a *Mytilus chilensis* clasificados mediante las claves taxonómicas descritas por Aldea y Valdovinos (2005). Fueron adquiridos en un terminal Pesquero de Santiago. Se seleccionaron choritos juveniles de un tamaño aproximado de 4 cm de largo, de superficie lisa, grosor (similar), color (uniforme) y libre de alteraciones macroscópicas. Las conchas de chorito se seccionaron con una sierra para metal (Redline®) obteniendo trozos de aproximadamente 0,5 cm². Las muestras fueron tratadas con un protocolo de limpieza y desinfección, la limpieza mecánica fue con cepillo de dientes en agua destilada tibia 25 °C, en la desinfección se empleó un desinfectante en base a amonio cuaternario a una concentración 200 ppm,

durante 2 horas, luego fueron lavados y enjuagados en agua destilada estéril y filtrada, para posteriormente ser mantenidas a -20 °C hasta su utilización.

B.7 Adhesión de *P. salmonis* en superficies de materiales plásticos empleados en la construcción de balsas jaula y posterior liberación al medio.

B.7.1 Controles negativos.

Las muestras de controles negativos corresponden a los fragmentos de los materiales empleados en balsas jaula. Estas fueron incubadas individualmente en tubos eppendorf de 2 ml en agua de mar y MEM-4 durante 48 h. Posteriormente fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% tamponado en cacodilato de sodio (0,2 M), para luego ser procesadas y observadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, empleándose un microscopio SEM/EDS marca JEOL® modelo JSM-IT300LV.

Tabla 6-5. Controles negativos de muestras de materiales de balsas jaulas y concha de chorito

| Material de cultivo* | agua de mar | MEM-4 |
|-------------------------------------|-------------|-------|
| polietileno de alta densidad (HDPE) | SI | SI |
| policloruro de vinilo (PVC) | SI | SI |
| Poliamida (PA) nylon | SI | SI |
| Politetrafluoretileno (PTFE) teflón | SI | SI |
| Concha de chorito | SI | SI |

B.7.2 Desafío de muestras a *P. salmonis* en medio MEM-4.

El procedimiento se realizó en base al estudio de Pérez (2017), para la formación de CAP en conchas de chorito en un medio enriquecido (MEM-10 + *P. salmonis*), 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 y PTFE y concha de *M. chilensis*, como control, que fueron expuestos a *P. salmonis* en medio enriquecido MEM-4 (Tabla 6-6).

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 procesados

y/o observados 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.

Tabla 6-6. Materiales de cultivo de balsas jaula y concha de chorito expuestos a MEM-10 con *Piscirickettsia salmonis*.

| Grupo | Tiempo de tratamiento | | |
|--------------------------------------|-----------------------|------|------|
| | 1 h | 24 h | 48 h |
| MEM-4 + <i>P. salmonis</i> + PVC | SI | SI | SI |
| MEM-4 + <i>P. salmonis</i> + HDPE | SI | SI | SI |
| MEM-4 + <i>P. salmonis</i> + PA | SI | SI | SI |
| MEM-4 + <i>P. salmonis</i> + PTFE | SI | SI | SI |
| MEM-4 + <i>P. salmonis</i> + conchas | SI | SI | SI |

B.7.3 Desafío de muestras a *P. salmonis* en agua salada

Se empleó el medio de desafío de *P. salmonis* en agua de mar, que contenía 9 partes de agua de mar y 1 parte del sobrenadante de ECP de *P. salmonis* en MEM-10. Para el ensayo de 35 materiales (HDPE, PVC, red y concha) se requirió 14 ml de medio *P. salmonis* en agua de mar, de ellos 1,4 ml correspondieron al sobrenadante del efecto citopático al 100% de *P. salmonis* en cultivo celular de la línea CHSE-14 completado con 12,4 ml de agua de mar estéril. La cantidad aproximada de bacteria fue de $10^{5,2}$ TCID₅₀/ml. El desafío fue similar a lo descrito en el punto anterior (Tabla 6-7).

Tabla 6-7. Materiales de cultivo de balsas jaula y concha de chorito expuestos a MEM-10 con *P. salmonis*.

| Grupo | Tiempo de exposición | | |
|--|----------------------|------|------|
| | 1 h | 24 h | 48 h |
| Agua de mar + <i>P. salmonis</i> + PVC | SI | SI | SI |
| Agua de mar + <i>P. salmonis</i> + HDPE | SI | SI | SI |
| Agua de mar + <i>P. salmonis</i> + PA | SI | SI | SI |
| Agua de mar + <i>P. salmonis</i> + PTFE | SI | SI | SI |
| Agua de mar + <i>P. salmonis</i> + conchas | SI | SI | SI |

B.7.4 Prueba de infectividad (Desafío + línea celular CHSE-214).

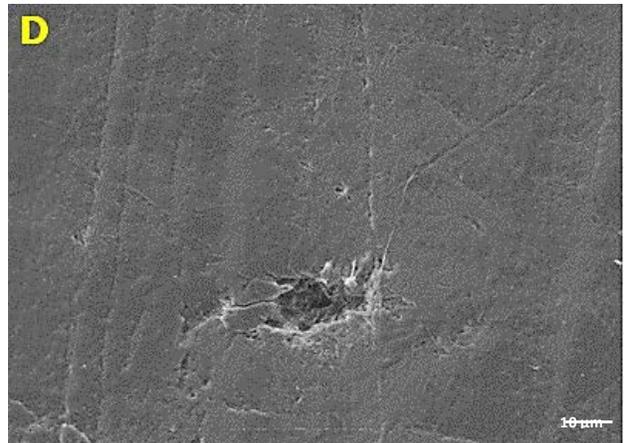
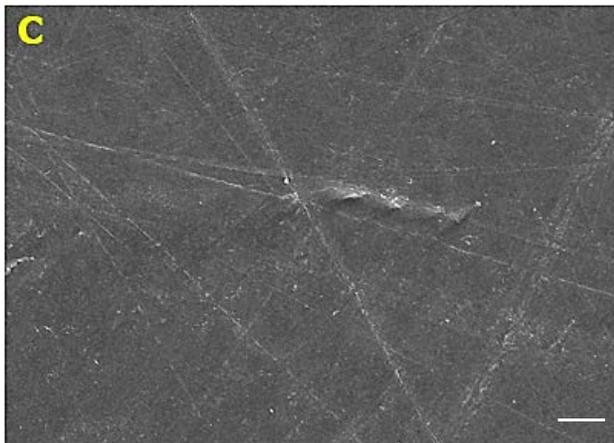
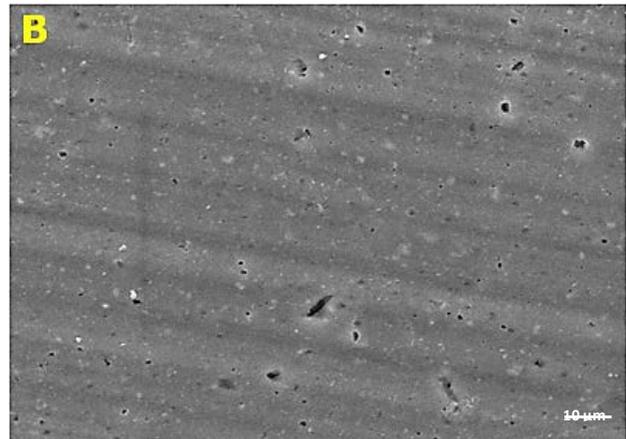
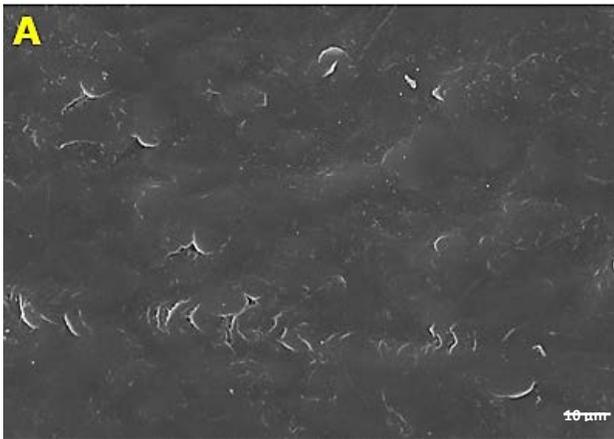
La liberación de la bacteria se corroboró según el estudio de Pérez (2017), empleando para ello los fragmentos de los materiales de cultivo de balsas jaula y concha de chorito que fueron expuestos a *P. salmonis* en medio agua de mar y MEM-4, las cuales fueron incubados a 15 °C por 48 h. Luego de este tiempo los materiales y concha de chorito fueron extraídos de los tubos Eppendorf, para luego ser lavados con un tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS). En seguida las muestras fueron colocados en una botella de cultivo celular de la línea CHSE-214 y mantenidos a 15 °C para hacer el seguimiento de la viabilidad de la bacteria. La viabilidad se evaluó a través de la observación en un microscopio invertido, evaluándose la producción de efecto citopático de la *P. salmonis* en las células CHSE-214.

B.8 Resultados

B.8.1 Controles negativos

Los controles negativos de las muestras ocupadas en el experimento corresponden a HDPE, PVC, PA-nylon, PTFE-teflón y concha de chorito que fueron incubados con los medios agua de mar y MEM-4 por 48 h a 15°C. La figura 5 (A, B, C, D, E) corresponde a la micrografía electrónica de los controles negativos a 1000x de HDPE, PVC, PA-nylon, PTFE-teflón y concha de chorito, respectivamente. La figura 5F corresponde al control negativo a 3000x de concha de chorito, muestras incubadas con agua de mar.

Las micrografías muestran las características particulares de la superficie de cada muestra, todas presentan una distribución semi-homogénea con la presencia de algunas abrasiones propias del material y otros ocasionados durante su manejo. Así mismo no se observa la presencia de contaminantes ambientales o de microorganismos sobre la superficie.



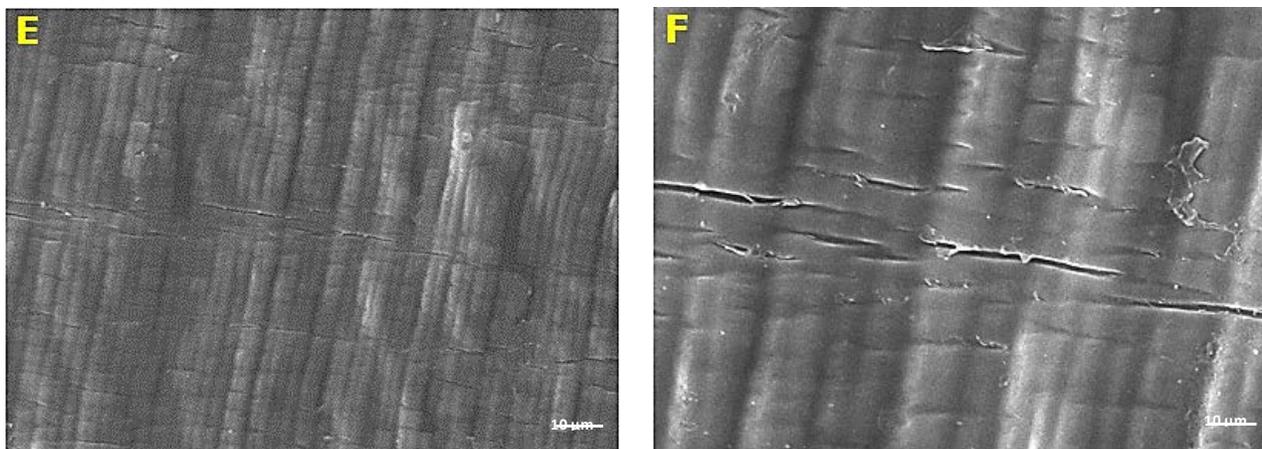


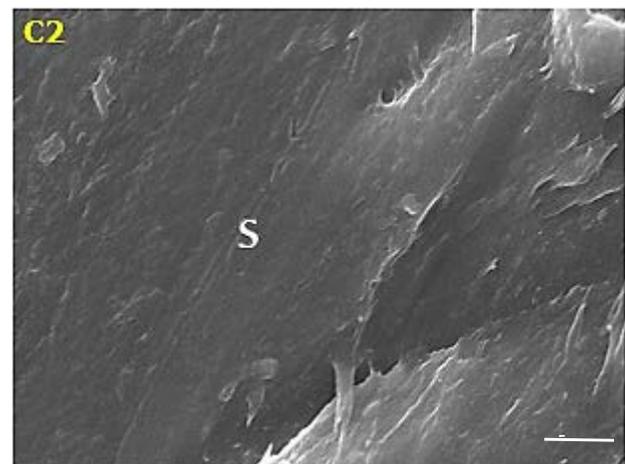
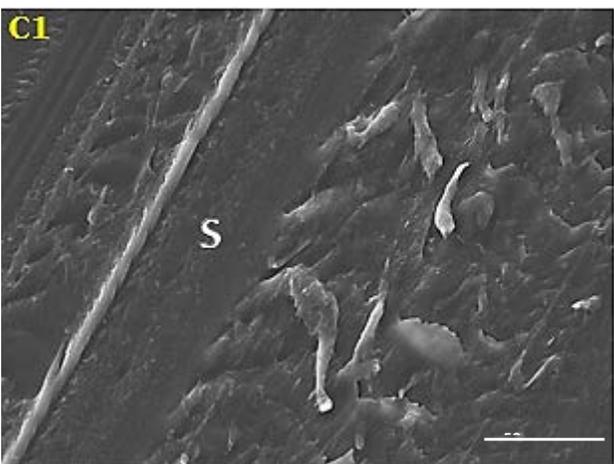
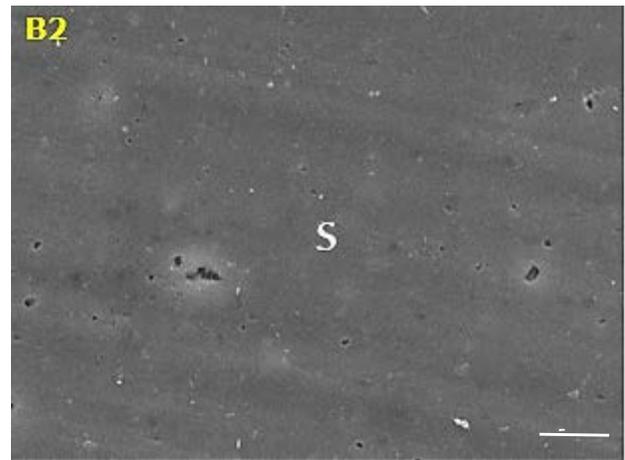
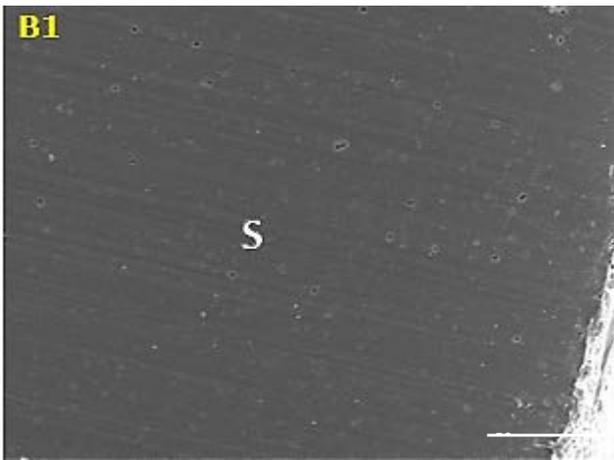
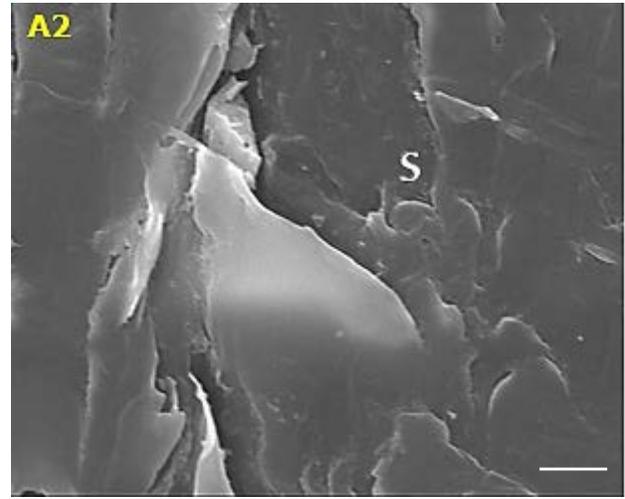
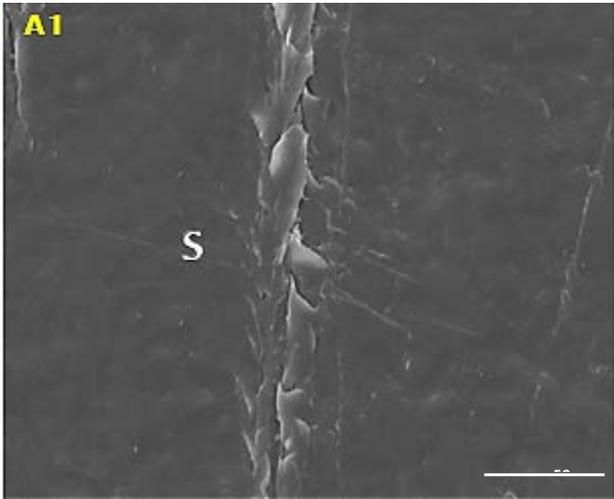
Figura 6-10 Micrografías electrónicas de control negativo de los materiales de balsas jaulas y concha de chorito incubadas en agua salada por 48 h. Control negativo de HDPE MEB 1000x (5A), control negativo de PVC MEB 1000x (5B), control negativo de PA-Nylon MEB 1000x (5C), control negativo de PTFE-teflón MEB 1000x (5D), control negativo de concha de chorito MEB 1000x (5E) y control negativo de concha de chorito MEB 3000x (5F). Las barras indican 10 µm.

B.9 Desafío de muestras a *P. salmonis* en agua salada

Las micrografías electrónicas (Figura 6-11) de los desafíos de las muestras a *P. salmonis* en agua de mar, demuestra que el CAP no estuvo presente en todos los materiales estudiados. Las Figura 6-11A1 y Figura 6-11A2 corresponde a HDPE a 1000x y 3000x de aumento respectivamente, en ella no se observa la presencia de CAP en su superficie en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h). Las micrografías corresponden a la exposición de 48 h.

La figura Figura 6-11B1 y Figura 6-11B2 corresponden a PVC a 1000x y 3000x de aumento respectivamente, en ella no se observa la presencia de CAP en su superficie en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h). Las micrografías corresponden a la exposición de 48 h. La Figura 6-11C1 y Figura 6-11C2 corresponden a PA-nylon a 1000x y 3000x de aumento respectivamente en ellas no se muestra la presencia de CAP en su superficie, en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h), las micrografías corresponde a la exposición de 48 h.

La presencia del CAP se muestra en el PTFE-teflón mostrado en las micrografías electrónicas de las Figura 6-11D1 y Figura 6-11D2 a 1000x y 3000x de aumento respectivamente. Sobre la superficie (letra S) se observa diversos cúmulos de conglomerados las que corresponde al CAP (flechas de color azul). El fenómeno fue observado en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h). Las micrografías corresponden a la exposición de 48 h. El CAP también fue observado en la superficie de la concha de chorito mostrado en las micrografías electrónicas de las figuras 6E (E1 y E2) a 1000x y 3000x de aumento respectivamente. Sobre la superficie de la concha (letra C) se observa diversos cúmulos de conglomerados las que corresponde al CAP (flechas de color azul), además en las micrografías de mayor aumento (Figura 6-11E2) se puede observar la presencia de la bacteria *P. salmonis* entre el CAP formado. El fenómeno se presentó en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h), las microfotografías mostradas corresponden a la exposición de 48 h.



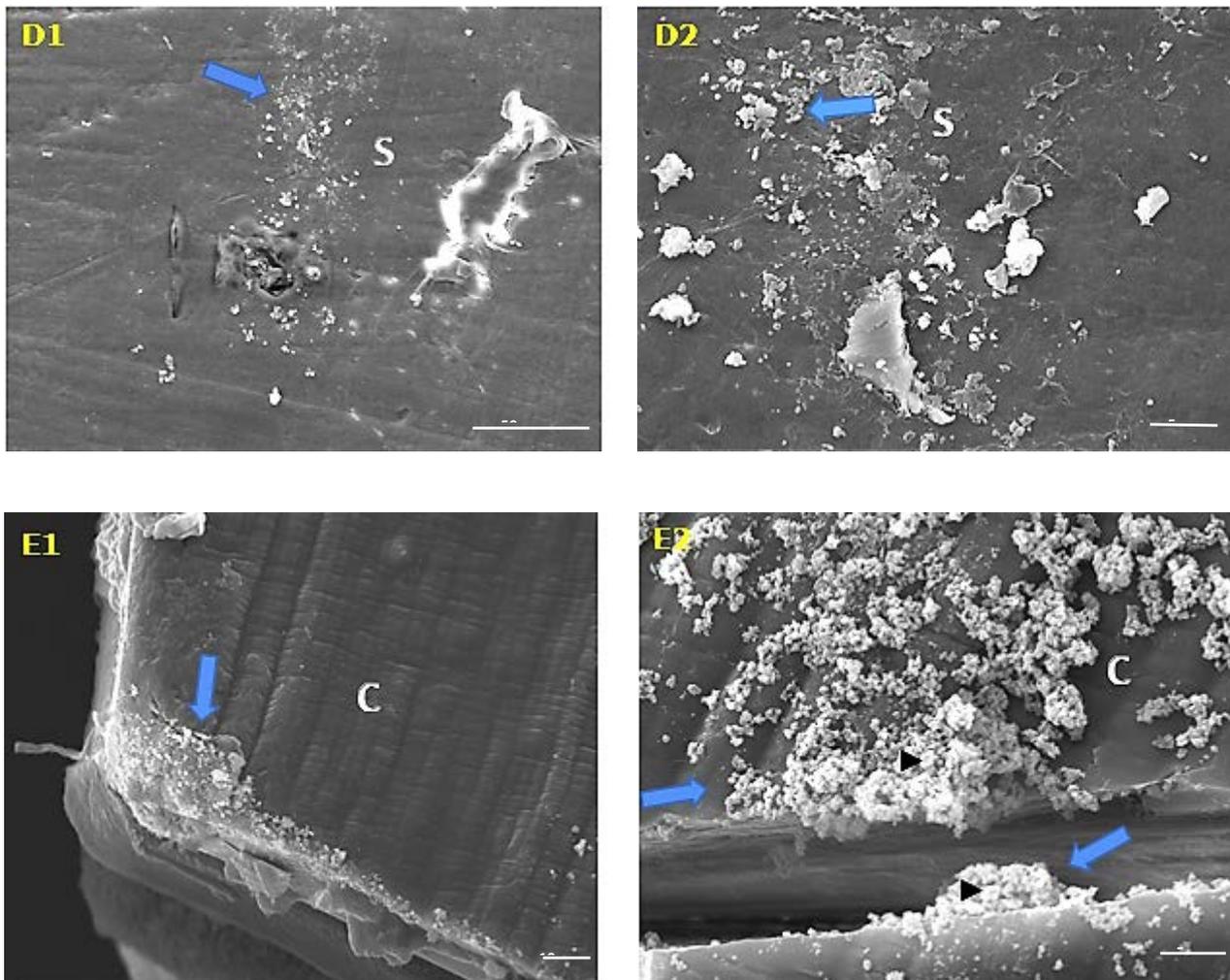


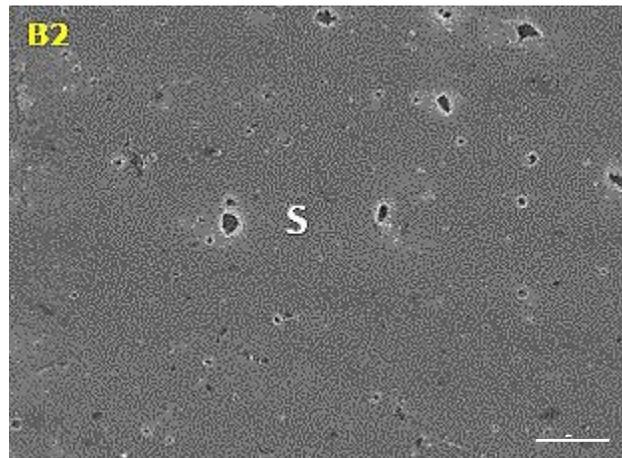
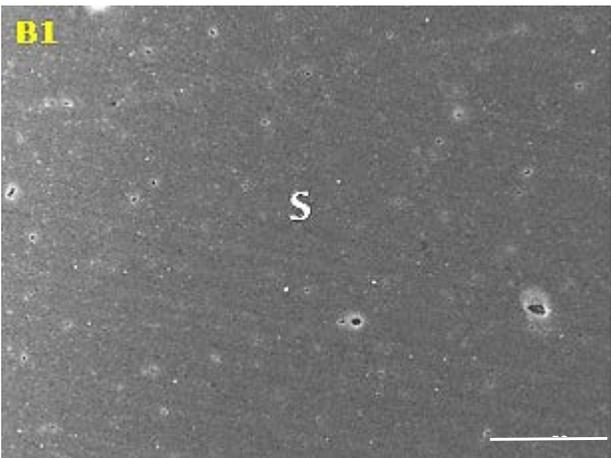
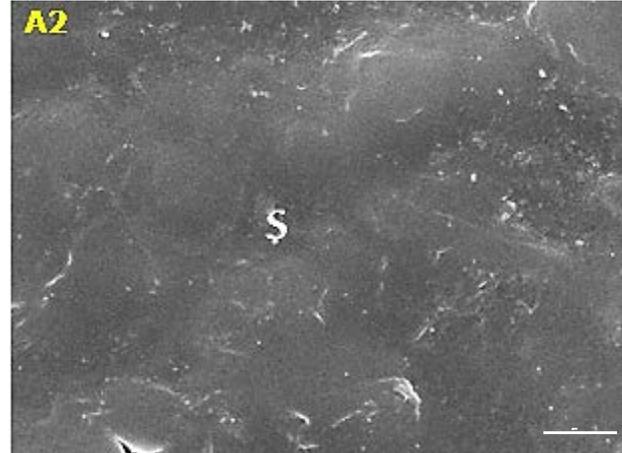
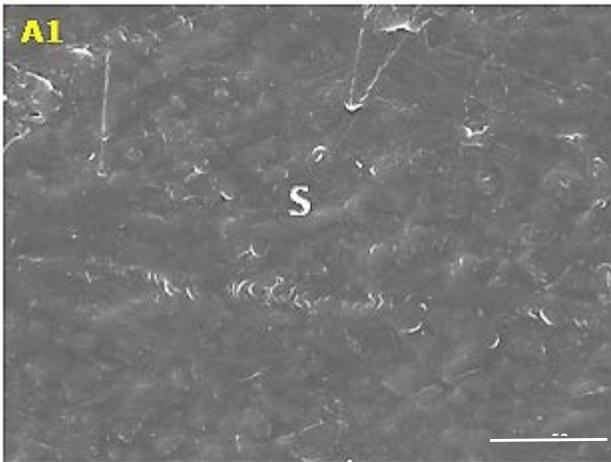
Figura 6-11. Micrografías electrónicas de HDPE, PVC, PA-nylon, PTFE-teflón y concha de chorito desafiados a *P. salmonis* en medio agua de mar incubados por 48 h a 15 °C. Las micrografías electrónicas corresponden a HDPE a 500x (A1), HDPE a 3000x (A2), PVC a 500x (B1), PVC a 3000x (B2), PA-nylon a 500x (C1), PA-nylon a 3000x (C2), PTFE-teflón a 500x (D1), PTFE-teflón a 3000x (D2), concha de chorito a 500x (E1) y concha de chorito a 3000x (E2).

B.9.1 Desafío de muestras a *P. salmonis* en MEM-4

Los desafíos de las muestras a *P. salmonis* en agua de mar, son mostradas en las microfotografías electrónicas de la Figura 6-12. En ellas se demuestra que el CAP no se presentó en ninguno de los materiales estudiados. Las Figura 6-12A1 y Figura 6-12A2 corresponden a HDPE a 1000x y 3000x de aumento respectivamente. No se demostró la presencia del CAP en su superficie (letra S), en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h). Las figuras corresponden a la exposición de 48 h. La Figura 6-12B1 y Figura 6-12B2 corresponden a PVC a 1000x y 3000x de aumento respectivamente; en ellas no se observa la presencia de CAP en su superficie (letra S), en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h). Las figuras corresponden a la exposición de 48 h. La Figura 6-12C1 y Figura 6-12C2 corresponde a PA-nylon a 1000x y 3000x de aumento respectivamente; en ella no se observa la presencia de CAP en su superficie (letra S), en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h). Las figuras corresponden a la exposición de 48 h.

La presencia del CAP se muestra en el PTFE-teflón mostrado en las micrografías electrónicas de la Figura 6-12D1 y Figura 6-12D2 a 1000x y 3000x de aumento respectivamente. Sobre la superficie (letra S) se observa diversos cúmulos de conglomerados las que corresponde al CAP (flechas de color azul). El fenómeno fue observado en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h). Las figuras corresponden a la exposición de 48 h.

El CAP también fue observado en la superficie de la concha de chorito mostrado en la Figura 6-12E1 y Figura 6-12E2 a 1000x y 3000x de aumento respectivamente. Sobre la superficie de la concha de chorito (letra C) se observó diversos cúmulos de conglomerados las que se corresponde al CAP (flechas de color azul). Además, en la figura 7 E2 se puede observar la presencia de la bacteria *P. salmonis* (triángulos negros) entremedio del CAP. El fenómeno fue observado en todos los tiempos de exposición (1 h, 24 h y 48 h). Las figuras mostradas corresponden a la exposición de 48 h.



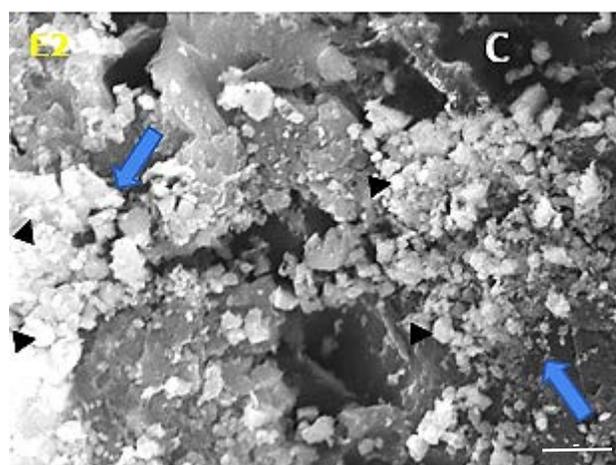
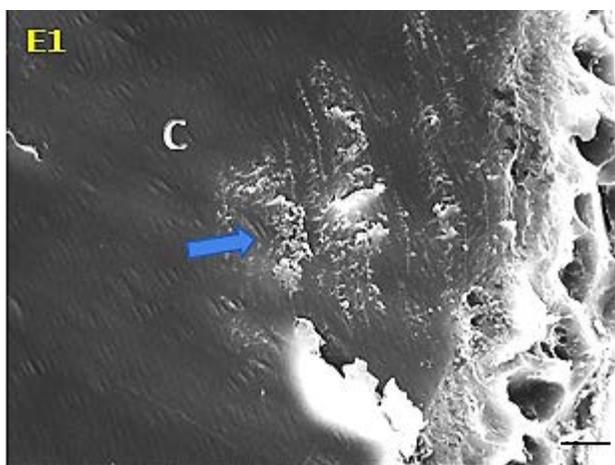
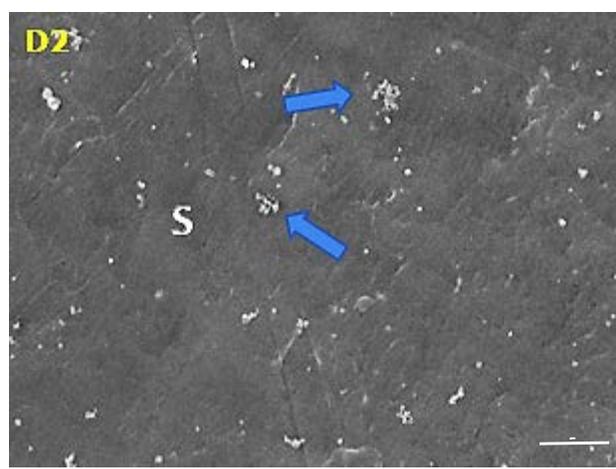
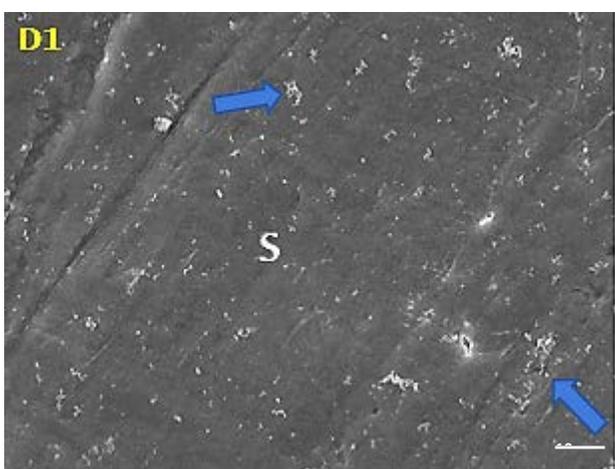
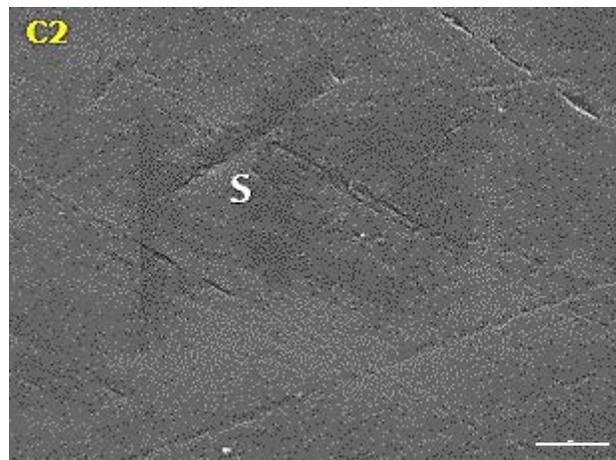
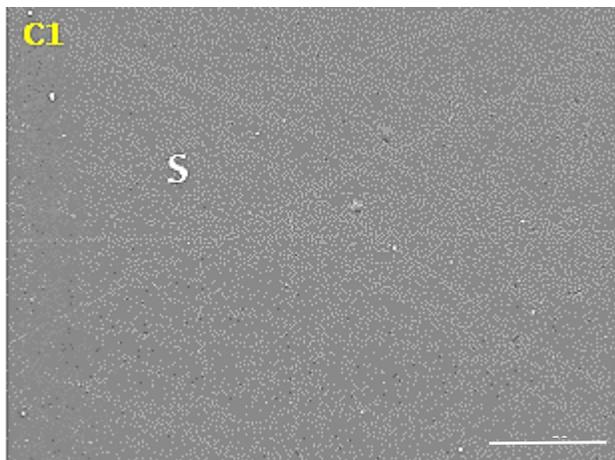


Figura 6-12. Microfotografías electrónicas de HDPE, PVC, PA-nylon, PTFE-teflón y concha de chorito desafiados a *P. salmonis* en medio MEM-4 incubados por 48 h a 15 °C. Las figuras corresponden a HDPE a 500x (A1), HDPE a 3000x (A2),

PVC a 500x (B1), PVC a 3000x (B2), PA-nylon a 500x (C1), PA-nylon a 3000x (C2), PTFE-teflón a 500x (D1), PTFE-teflón a 3000x (D2), concha de chorito a 500x (E1) y concha de chorito a 3000x (E2).

B.9.2 Ensayos de Viabilidad

La microfotografía de la Figura 6-13A fue obtenida de un microscopio invertido de luz polarizada a partir de un cultivo celular normal de la línea CHSE-214 (control negativo). La figura 8B corresponde a un efecto citopático (ECP) característico de *P. salmonis* en células CHSE-214 (control positivo). La 8C muestra el ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que fue expuesta a *P. salmonis* en medio de agua de mar por 48 h a 15°C. La imagen corresponde al día 15 post exposición donde se observan los focos de iniciación de ECP (flechas negras) sobre la monocapa celular, mientras que la figura 8D muestra el ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que fue expuesto a *P. salmonis* en medio MEM-4. Esta última imagen corresponde a los 15 días post exposición donde se observan los focos de iniciación de ECP (flechas negras) sobre la monocapa celular.

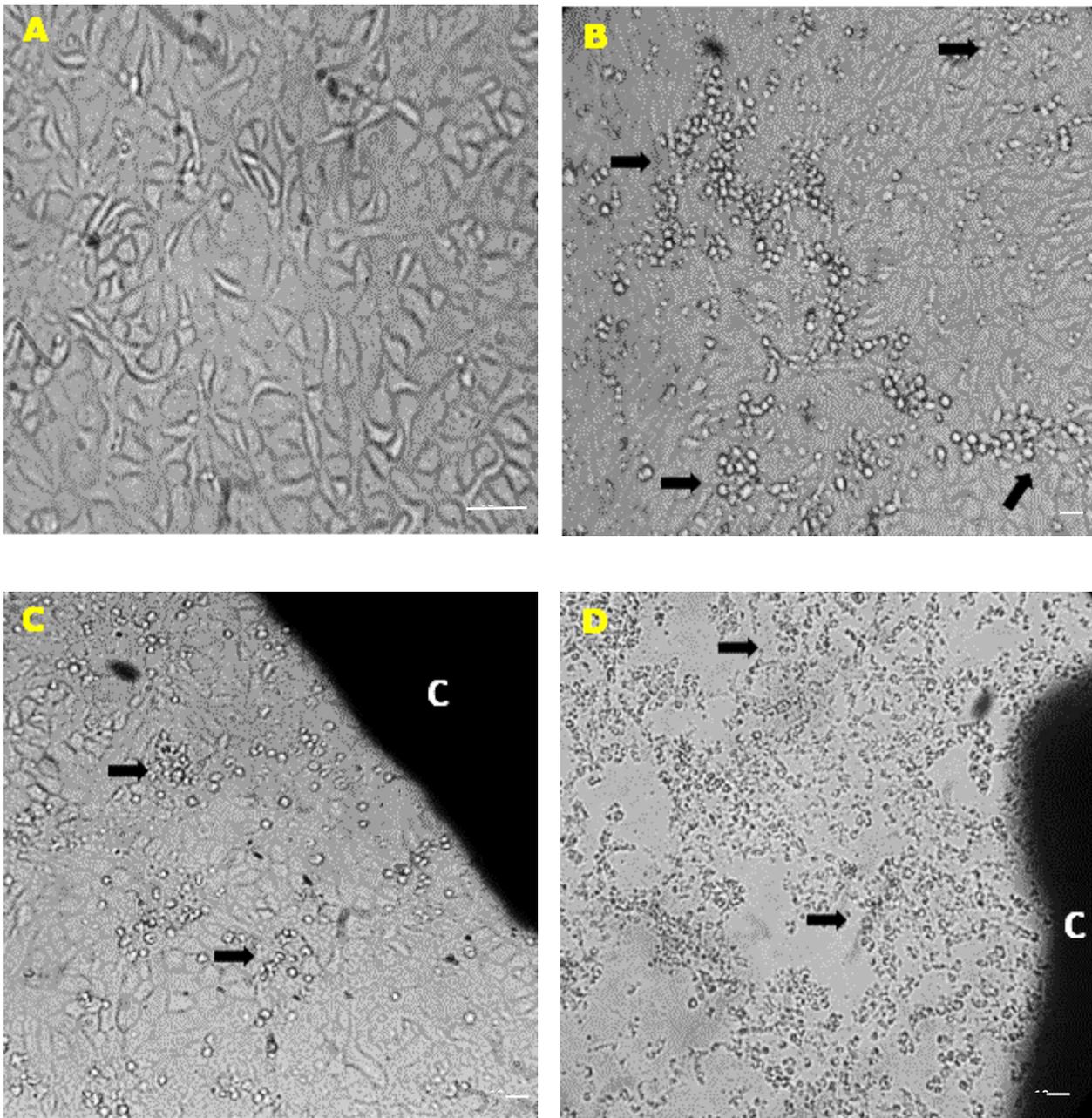


Figura 6-13. Las microfotografías de microscopio invertido con luz polarizada corresponden a: cultivo celular normal de la línea CHSE-214 (8A), efecto citopático (ECP) característico del crecimiento y desarrollo de *P. salmonis* en células CHSE-214 (8B), ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que presentaba CAP en medio agua de mar (8C) y ECP en células CHSE-214 producido por la concha de chorito que presentaba CAP en medio MEM-4 (8D). C= Concha.

Appendix C Caracterización del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP) utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplado a espectroscopía dispersiva de energía de rayos-X (EDS).

El Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP) fue descrito por vez primera por Larenas *et al.* (2003), donde describe que el CAP corresponde a unas prolongaciones similares a pseudópodos de la bacteria *Piscirickettsia salmonis* que le permiten adherirse a la superficie de ovas de trucha arcoíris y entre las mismas bacterias. Posteriormente, Quinteros (2005) definió que el CAP podría corresponder a una biopelícula, por la presencia de material amorfo que rodean a las bacterias durante el proceso de formación de este complejo, el material observado fue definido como: material granular, fibrilar y de tipo manto.

La formación del CAP se evidenció también sobre la superficie de la piel y branquias de truchas arcoíris que fueron desafiadas a la bacteria (Bravo, 2007). Estudios más recientes demostraron que la bacteria tiene la capacidad de adherirse a otros tipos de sustratos diferente a la ova, piel o branquias de peces, en el trabajo *in vitro* realizado por Pérez (2017), el autor, pudo observar mediante SEM, la formación de CAP sobre la superficie de la concha de chorito (*Mytilus chilensis*). En el presente proyecto, además, mediante SEM, se observó la adhesión de *P. salmonis* a la capa externa de la bolsa ovígera de *Caligus rogercresseyi*, lo que sugiere que la estructura de unión corresponde al CAP.

La adhesión de la bacteria, con la formación de CAP, sobre la superficie de sustratos vivos como: ovas, piel y branquias de peces además de concha de chorito, sugiere que este mismo fenómeno podría presentarse sobre la superficie de sustratos abióticos con los que la bacteria tiene contacto en el medio ambiente marino. Los sustratos abióticos, generalmente son los que corresponden a las instalaciones de balsas jaula de los centros de cultivo de peces, los que constan de una compleja variedad de componentes sumergidos como redes, flotadores, boyas, alimentadores, aireadores, silos, cabos de fondeo, etc., los mismos que proporcionan una enorme superficie en donde puede producirse la colonización de innumerables bacterias marinas a través de biopelículas, las cuales pueden actuar como potenciales reservorios de este patógenos.

Si bien no está definida la naturaleza del CAP, Quinteros (2005) sugiere que el CAP podría corresponder a una biopelícula, por la presencia de material granular, filamentosa y de tipo manto, la que entregaría a la bacteria protección frente a ambientes adversos, resistencia a antibióticos y persistencia en el medio ambiente marino. Así mismo, Marshall *et al.* (2012) describió que *P. salmonis* sometida a condiciones de estrés, produce grandes agregados celulares que se parecen mucho a las estructuras de biopelículas. Las bacterias parecían estar incrustadas dentro de una matriz que desapareció cuando se expuso a celulasa, lo que sugiere que la composición de esta matriz corresponde a un polisacárido, típico de las biopelículas.

En este contexto la microscopía SEM-EDS proporciona información morfológica de alta resolución tridimensional (3D) y cuantitativa al estar acoplado a un detector de energía dispersiva de rayos-X (EDS) permitiendo conocer la formación y detalles de la composición elemental de diferentes muestras (Gauvin *et al.*, 2006).

El objetivo de nuestro estudio fue caracterizar la composición elemental del CAP formado en la superficie sobre la concha de chorito y PTFE-teflón mediante microscopía SEM-EDS.

C.1 *P. salmonis*

La bacteria empleada correspondió a un aislado de campo asociado a un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico cultivado en mar, donado por el Laboratorio ETECMA - Puerto Montt, caracterizada como cepa LF-89, por secuenciación del gen 16S rRNA, realizado en la Unidad de Secuenciación Automática de la Universidad Católica de Chile procesado en un equipo ABI PRISM 3500xl Applied Biosystems. La bacteria fue multiplicada en la línea celular CHSE-214 a 15 °C, temperatura óptima de crecimiento (Fryer *et al.* 1990), hasta alcanzar el 100% de efecto citopático ECP. La bacteria fue titulada de acuerdo con el método de punto final 50% propuesto por Reed y Muench (1938), dando un título de $10^{6.2}$ TCID₅₀/mL. Así, también la bacteria fue cultivada en medio sólido específico, el medio sólido fue el IFOP-PsM11 desarrollado por Contreras *et al.* (2015).

C.2 Materiales plásticos desafiados

Los materiales empleados en el estudio fueron aquellos que se emplean en las instalaciones de balsas jaula de cultivo de peces, de la gran variedad de materiales, se seleccionaron las que se utilizan en mayor cantidad en este rubro, siendo estos: Polietileno de alta densidad (HDPE), Policloruro de vinilo (PVC) y Poliamida (PA). Adicionándole, se utilizó politetrafluoretileno (PTFE) o teflón, como un material antiadherente, y la concha de chorito de *Mytilus chilenses* en donde existe la evidencia de la formación de CAP.

C.3 Formación de Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP)

La metodología se basó en el estudio realizado por Pérez (2017), para la formación de CAP en conchas de *Mytilus Chilensis*. El desafío se realizó con fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² de los materiales descritos anteriormente, sometidos a un protocolo de limpieza y desinfección. Los materiales fueron expuestos a *P. salmonis* en dos medios 1) *P. salmonis* en agua de mar, este medio estaba compuesto por 9 partes de agua de mar y 1 parte del sobrenadante de ECP de *P. salmonis* cultivado en células CHSE-214 y 2) *P. salmonis* en medio MEM, este medio estaba compuesto por 9 partes de MEM y 1 parte del sobrenadante de ECP de *P. salmonis* cultivado en células CHSE-214. La cantidad de bacteria con la que se trabajó después de la dilución fue $10^{5.2}$ TCID₅₀/mL. El experimento se realizó en tubos Eppendorf de 2 mL, el volumen empleado fue de 0,5 mL, cantidad suficiente que cubre la muestra, incubándolos a 15 °C, temperatura óptima de crecimiento de la bacteria por 1, 24 y 48 horas. Luego de los tiempos de exposición las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5%, luego mantenidas en refrigeración hasta su procesamiento.

C.4 Microscopía electrónica de barrido y microanálisis mediante energía dispersiva de rayos X (SEM-EDS)

La determinación de la presencia de CAP y el análisis de la composición elemental de la misma fue realizada en aquellos materiales en donde hubo la formación del CAP. Las zonas analizadas de estas muestras seleccionadas correspondieron a una zona donde morfológicamente hubo presencia de CAP y ausencia de CAP, respectivamente. Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, empleándose un microscopio SEM/EDS marca JEOL® modelo JSM-IT300LV.

C.5 Resultados y Discusión

C.5.1 Formación de complejo de adhesión Piscirickettsial (CAP) en los materiales

Los resultados preliminares obtenidos, mediante la SEM, demostraron que el CAP se forma sobre la superficie de la concha de chorito, en los dos medios donde estaba suspendido la bacteria y en todos los tiempos de exposición; similar resultado se observó en el material antiadherente PTFE o teflón, lo que no sucedió en el resto de los materiales que se estudió (HDPE, PVC y PA o nylon). En vista que el objetivo del estudio es caracterizar la composición elemental del CAP, las micrografías electrónicas que se muestran más adelante corresponderán enteramente a los materiales en donde se produce la formación CAP y se realiza el microanálisis elemental de la misma.

C.5.2 Microanálisis elemental del CAP, mediante SEM-EDS

Conforme a lo anterior, el CAP no se formó en todos los materiales poliméricos analizados, por ello el microanálisis elemental del CAP, mediante el SEM-EDS, se realizó en las muestras donde hubo la presencia de CAP de forma manifiesta. Las muestras analizadas correspondieron a: a) Microanálisis elemental de un cúmulo de bacterias de *P. salmonis*, cultivado en medio sólido específico. b) CAP de *P. salmonis* formado sobre la superficie de concha de *Mytilus chilensis* en medio agua de mar. c) CAP de *P. salmonis* formado sobre la superficie de PTFE-teflón expuesto en el sobrenadante de ECP de la bacteria.

Microanálisis SEM- EDS de bacterias de *P. salmonis*, cultivado en medio sólido

La Figura 6-14, muestra el análisis morfológico de un conglomerado de bacterias de *P. salmonis*, cultivado en medio sólido especial para el crecimiento de la bacteria (IFOP-PsM11). La Figura 6-14A, corresponde a una micrografía SEM a un aumento (1000x), en ella se aprecian zonas de conglomerados bacterianos (flechas azules) y entre medio de ellos se aprecian las bacterias (flechas negras). La Figura 6-14B, es el aumento a 3000X, la micrografía SEM muestra el conglomerado bacteriano (flecha azul) donde es posible apreciar estructuras cocoide que corresponden a las bacterias (flechas negras). En la última imagen, se observa que las bacterias están unidas entre sí mismas, esta unión podría producirse por el CAP, en vista que se puede observar material de tipo filamentosos entre bacteria similar a lo observado por Quinteros (2005) quien observó un material granular y filamentosos en cúmulos de bacterias adheridos a la superficie de la ova.

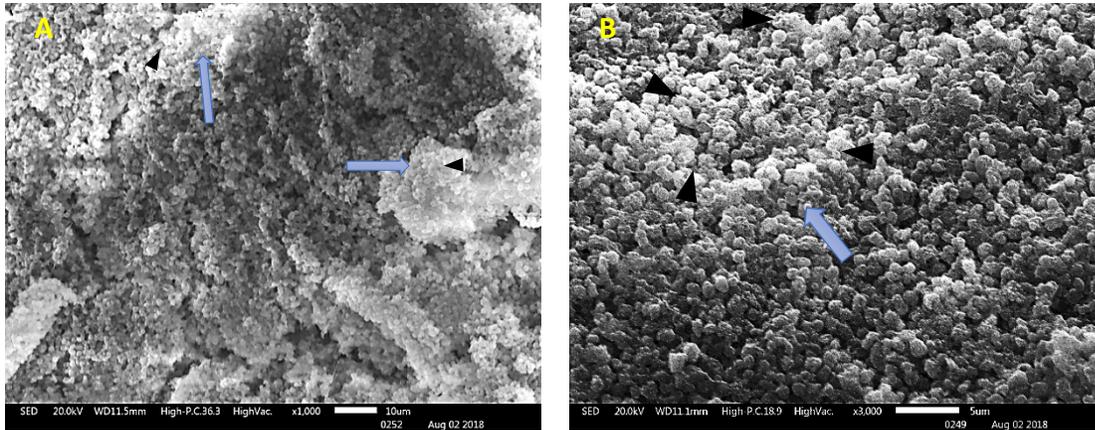


Figura 6-14 Micrografías SEM de *P. salmonis* cultivados en medio sólido (IFOP-PsM11). 1A a un aumento de 1000x. 1B aumento a 3000x. Flechas azules zonas de aglomeración bacterias y flechas negra bacteria *P. salmonis*.

Adicionalmente, mediante el análisis de SEM-EDS se caracterizó la composición química de *P. salmonis* cultivado en medio sólido, se consideró como un control, que pueda ser comparado, con la composición elemental del CAP formado en otros materiales.

En la Figura 6-15, la Figura 6-15A corresponde a la micrografía SEM de la *P. salmonis*, a un aumento de 1000X, en la imagen se aprecia los conglomerados bacterianos rodeados de abundante material (flechas azules), el material que rodea las bacterias correspondería al CAP. La Figura 6-15B corresponde al análisis micro-elemental SEM-EDS del conglomerado de *P. salmonis* de la imagen anterior, la zona analizada corresponde al cuadrado de líneas blancas. La Figura 6-15C, corresponde a un espectro de energía dispersiva EDS del conglomerado de *P. salmonis* cultivado en medio sólido.

El análisis SEM-EDS permitió conocer la composición elemental del conglomerado de *P. salmonis* cultivado en medio sólido. Los átomos presentes fueron: C, O, Na, P, Cl, Ca. El microanálisis de EDS de la tabla 8, muestra el % de composición elemental de los componentes de la colonia de *P. salmonis* desarrollado en medio sólido, dando los siguientes valores: 69,7% de C, 29% de O, 0,5% de Na, 0,5% de P, 0,2% de Cl y 0,1% de Ca.

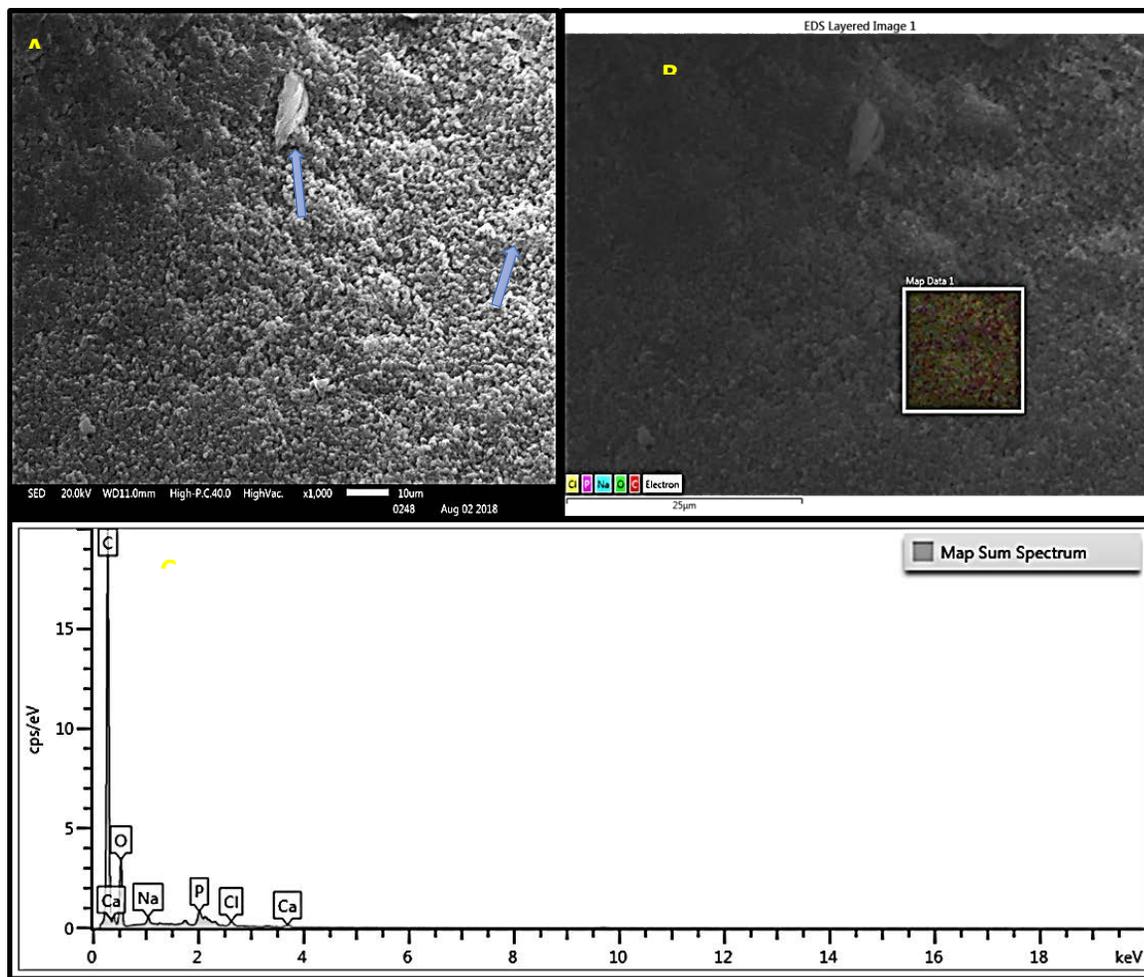


Figura 6-15. Micrografía SEM de la colonia de *P. salmonis* (A), SEM-EDS de la colonia de *P. salmonis* (B), microanálisis de EDS de la colonia de *P. salmonis* (C).

Tabla 6-8 Microanálisis elemental del conglomerado de *P. salmonis* cultivado en medio sólido correspondiente a la Fig. 6-10C.

| Element | Line Type | Apparent Concentration | k Ratio | Wt% | Wt% Sigma | Standard Label | Factory Standard |
|---------|-----------|------------------------|---------|-------|-----------|----------------|------------------|
| C | K series | 115,07 | 1,15068 | 69,66 | 0,3 | C Vit | Yes |
| O | K series | 39,76 | 0,13381 | 29,03 | 0,3 | SiO2 | Yes |
| Na | K series | 1,64 | 0,00692 | 0,45 | 0,03 | Albite | Yes |
| P | K series | 3,19 | 0,01783 | 0,5 | 0,02 | GaP | Yes |
| Cl | K series | 0,97 | 0,00846 | 0,23 | 0,01 | NaCl | Yes |
| Ca | K series | 0,56 | 0,00503 | 0,13 | 0,01 | Wollastonite | Yes |

Total: 100

Microanálisis SEM- EDS de bacterias de *P. salmonis*, cultivado en medio solido

Mediante el análisis de SEM-EDS se caracterizó la composición química del CAP presente en la superficie de la concha de chorito. En la la Figura 6-16A corresponde a la micrografía SEM de una muestra de concha de chorito desafiado a *P. salmonis* en medio agua de mar donde se aprecia la formación de un material granular que contiene en medio la bacteria *P. salmonis* imagen 3000X. La Figura 6-16B corresponde al análisis SEM-EDS de material granular y/o CAP presente en la superficie de la concha de chorito. La Figura 6-16C corresponde al SEM-EDS de una zona sin la formación del CAP en la superficie de la concha de chorito. En general, el análisis SEM-EDS permitió determinar la presencia del CAP sobre la superficie de la concha de chorito y conocer la composición elemental de ambas zonas que se muestran en las micrografías B y C. En la Figura 6-16B, donde hubo formación de CAP, los átomos presentes fueron: C, N, O, Cl, K, Ca, Fe y Ni, mientras que en la Figura 6-16C donde no se formó el CAP (zona lisa de la concha de chorito) los presente son: C, N, O y Ca.

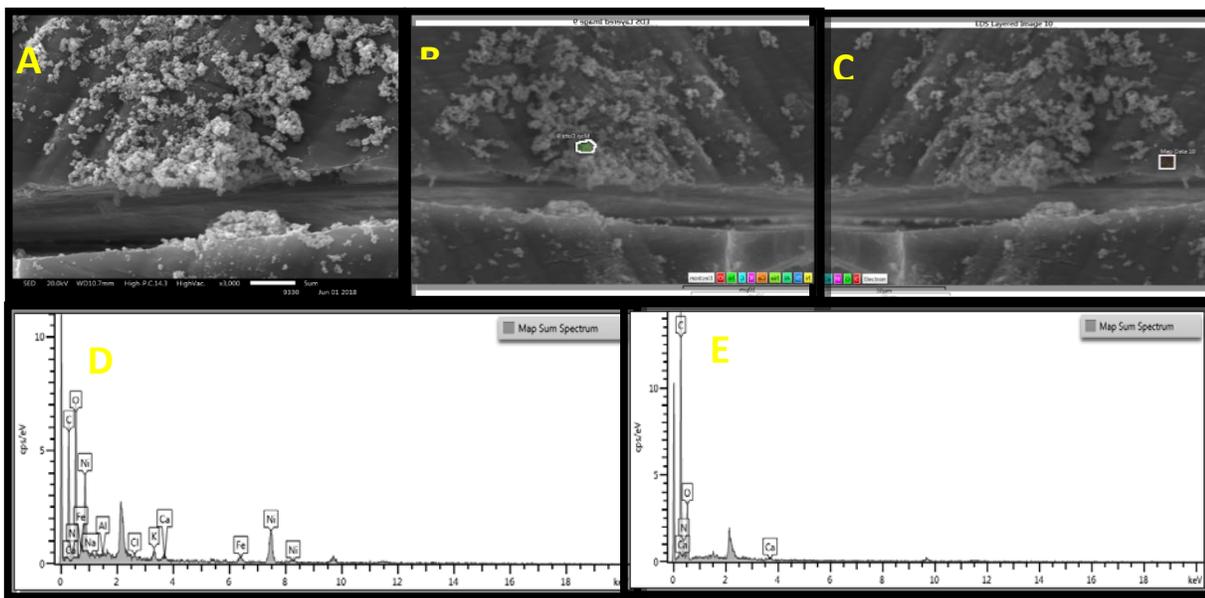


Figura 6-16 Micrografía SEM de CAP en la superficie de concha de chorito (11A), SEM-EDS del CAP (11B), SEM-EDS de la superficie de la concha de chorito (11C), microanálisis de EDS del CAP (11D) y microanálisis de EDS de la superficie de la concha de chorito (11E).

Tabla 6-9. Microanálisis elemental del CAP presente en superficie de la concha de chorito correspondiente a la Fig. 6-11B.

| Element | Line Type | Apparent Concentration | k Ratio | Wt% | Wt% Sigma | Standard Label | Factory Standard |
|--------------|-----------|------------------------|---------|------------|-----------|----------------|------------------|
| C | K series | 30,04 | 0,30036 | 44,74 | 2,5 | C Vit | Yes |
| N | K series | 1,57 | 0,0028 | 1,45 | 4,55 | BN | Yes |
| O | K series | 52,23 | 0,17575 | 42,89 | 2,38 | SiO2 | Yes |
| Cl | K series | 0,68 | 0,00597 | 0,28 | 0,07 | NaCl | Yes |
| K | K series | 1,57 | 0,0133 | 0,58 | 0,09 | KBr | Yes |
| Ca | K series | 0,6 | 0,00537 | 0,22 | 0,08 | Wollastonite | Yes |
| Fe | K series | 2,2 | 0,02195 | 0,9 | 0,16 | Fe | Yes |
| Ni | K series | 19,99 | 0,1999 | 8,88 | 0,61 | Ni | Yes |
| Total | | | | 100 | | | |

Tabla 6-10. Microanálisis elemental del CAP presente en superficie de la concha de chorito correspondiente a la Fig. 6-11C.

| Element | Line Type | Apparent Concentration | k Ratio | Wt% | Wt% Sigma | Standard Label | Factory Standard |
|---------|-----------|------------------------|---------|-------|-----------|----------------|------------------|
| C | K series | 83,03 | 0,83026 | 40,78 | 1,36 | C Vit | Yes |
| N | K series | 87,75 | 0,15622 | 34,23 | 1,83 | BN | Yes |
| O | K series | 31,88 | 0,10727 | 24,89 | 1,25 | SiO2 | Yes |
| Ca | K series | 0,53 | 0,00472 | 0,1 | 0,04 | Wollastonite | Yes |
| Total: | | | | 100 | | | |

Microanálisis SEM- EDS del CAP formado sobre la superficie de PTFE-teflón expuesto en el sobrenadante de ECP de la bacteria.

La Figura 6-17 muestra la micrografía SEM y microanálisis EDS del CAP presente en la superficie de la PTFE-teflón. La Figura 6-17A corresponde a la micrografía SEM de la superficie del PTFE-teflón desafiado al sobrenadante 100% ECP de *P. salmonis* donde se observó la presencia de un material granular que correspondió al CAP que contiene en medio la bacteria *P. salmonis*. La Figura 6-17B corresponde al análisis SEM-EDS de material granular del CAP. La Figura 6-17C corresponde al espectro de microanálisis SEM-EDS de una zona libre de CAP sobre la superficie del material PTFE-teflón.

En general, SEM-EDS demostró la presencia del CAP sobre la superficie de PTFE-teflón y permitió conocer la composición química de ambas zonas mostradas en las micrografías B y C. En la Figura 6-17B, zona donde está presente el CAP, los átomos encontrados fueron: C, O, F, K, Ca, Fe y Ni, mientras que en la Figura 6-17C, zona libre de CAP, los átomos C, F.

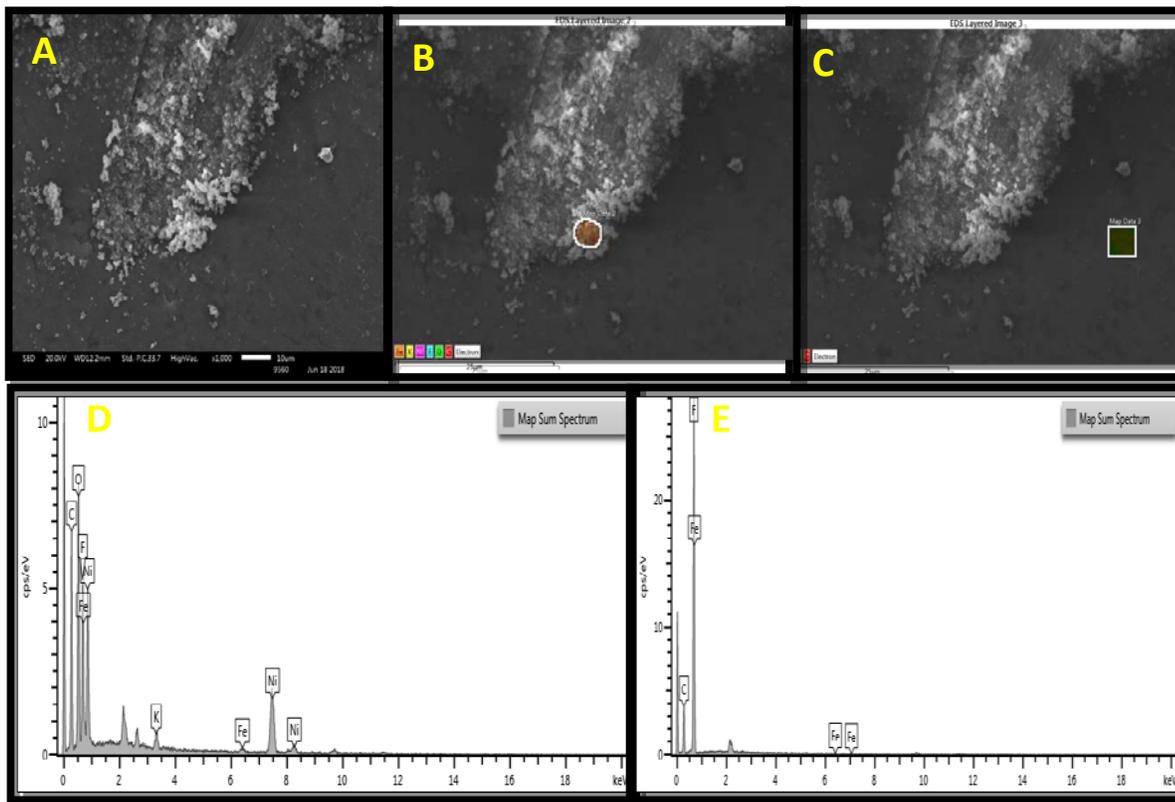


Figura 6-17 Micrografía SEM de CAP en la superficie de PTFE-teflón (12A), SEM-EDS del CAP (12B), SEM-EDS de la superficie libre de CAP del PTFE-teflón (12C), microanálisis de EDS del CAP (12D) y microanálisis de EDS de la superficie del PTFE-teflón (12E).

Tabla 6-11 Microanálisis elemental del CAP presente en superficie del PTFE-teflón correspondiente a la Fig. 6-12B.

| Element | Line Type | Apparent Concentration | k Ratio | Wt% | Wt% Sigma | Standard Label | Factory Standard |
|---------|-----------|------------------------|---------|-------|-----------|----------------|------------------|
| C | K series | 27 | 0,27001 | 37,04 | 0,39 | C Vit | Yes |
| O | K series | 20,55 | 0,06914 | 10,81 | 0,23 | SiO2 | Yes |
| F | K series | 195,42 | 0,38372 | 48,38 | 0,35 | CaF2 | Yes |
| K | K series | 0,56 | 0,00477 | 0,16 | 0,02 | KBr | Yes |
| Fe | K series | 1,73 | 0,01731 | 0,58 | 0,04 | Fe | Yes |
| Ni | K series | 8,83 | 0,0883 | 3,04 | 0,08 | Ni | Yes |
| Total: | | | | 100 | | | |

Tabla 6-12 Microanálisis elemental de la superficie del PTFE-teflón correspondiente a la Fig. 6-12C.

| Element | Line Type | Apparent Concentration | k Ratio | Wt% | Wt% Sigma | Standard Label | Factory Standard |
|---------|-----------|------------------------|---------|-------|-----------|----------------|------------------|
| C | K series | 16,51 | 0,16511 | 31,3 | 1,09 | C Vit | Yes |
| F | K series | 345,21 | 0,67783 | 68,66 | 1,09 | CaF2 | Yes |
| Fe | K series | 0,1 | 0,00102 | 0,05 | 0,09 | Fe | Yes |
| Total: | | | | 100 | | | |

Los datos obtenidos del microanálisis del SEM-EDS permitieron comparar la variación en la composición química del CAP presente en la superficie del PTFE-teflón frente a otra zona donde no se formó CAP. La Tabla 6-11 muestra el % de la composición elemental CAP presente en superficie del PTFE- teflón, donde los átomos presentes fueron: 37,0% de C, 10,9% de O, 48,4% F, 0,2% de K, 0,6% de Fe y 3,0% de Ni. Por otro lado, en la tabla 12 muestran el microanálisis de EDS de la superficie del PTFE-teflón, donde no hubo formación del CAP, la composición química fue de: 31,3 % de C y 68,7 % de F.

El microanálisis de EDS permitió comparar la variación en la composición química de las dos zonas de la superficie del PTFE-teflón evaluada mediante SEM-EDS. Estos resultados mostraron nuevamente que la composición elemental que el CAP presente en la superficie del PTFE-teflón y una variación respecto de la zona libre de CAP, en este caso los elementos presentes junto a la presencia del CAP fueron O, K, Fe y Ni.

Finalmente, de acuerdo al presente estudio, se demuestra mediante microscopía electrónica y micro-análisis SEM-EDS que de todos los materiales analizados solo en la superficie de concha de chorito y PTFE-teflón se formó CAP y se determinó la coexistencia de ciertos elementos como Fe, Ni, K junto a la formación del CAP. Este resultado demuestra que la formación es un proceso selectivo de acuerdo con las necesidades intrínsecas del metabolismo bacteriano.

Appendix D Instalación de cuelgas en centros de cultivo.

Atados a una cuerda se dispusieron los sustratos en un centro (41°28'01.0"S 72°19'34.3"W) productor de salmónes coho ubicado en el Seno del Reloncaví. El lugar fue diagnosticado con piscirickettsiosis por un laboratorio privado y al momento de colocar las cuelgas se encontraba en un brote activo con individuos con signos clínicos concordantes con la enfermedad (<https://youtu.be/m00DsnBgK1Y>). Las mortalidades no han sido proporcionadas por el centro. Cada cuelga contaba con conchas de chorito, polietileno de alta densidad (HDPE), policloruro de vinilo (PVC), poliamida (PA, nylon) y politetrafluoretileno (PTFE, teflón) y que fueron previamente lavados y desinfectados. Los materiales fueron expuestos en duplicado. Los sustratos fueron colgados (una cuelga por cada esquina de la jaula) a una profundidad de 5 metros (<https://youtu.be/jsKrTffckFk>) y se retiraron de ahí a los 7, 15 y 30 días post exposición. Una vez retirados los distintos sustratos fueron mantenidos en etanol al 70% y refrigerados hasta ser procesados.

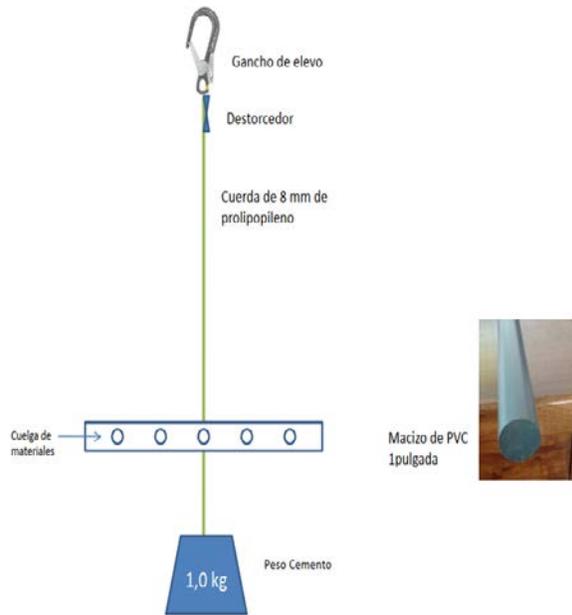


Figura 6-18. Esquema de cuelga que fue utilizada para disponer diversos polímeros y conchas de chorito en el centro de cultivo.



Figura 6-19. Cuelga que fue utilizada para disponer diversos polímeros y conchas de chorito en el centro de cultivo. Cada material fue previamente limpiado, desinfectado y esterilizado mediante UV y luego protegido mediante un embalaje utilizado para autoclave.



Figura 6-20. Cuelga. Se observa la cuerda, el material envuelto y la pesa que lo sostiene.



Figura 6-21. Cuelga. Se observa el material que fue sumergido. Se han retirado las envolturas. T= Teflón, P=Polietileno, C=Conchas, HDPE, Ny=Nylon.

D.1 Procesamiento de las muestras

Se dispuso de controles a distintos niveles:

- Control negativo de contaminación durante la extracción de ADN: hígado de pollo
- Controles de PCRa: agua libre de DNAsas (Promega®) y extracto de ADN de perro como control negativo de la técnica de PCRa y una muestra de tejido con *P. salmonis* como control positivo.

Para los materiales plásticos, se realizó un raspado con portaobjeto y bisturí, sobre la cara anverso y reversa, depositando el contenido del raspado en tubos Falcon de 50 ml de manera independiente. La muestra de cada cara se consideró como un duplicado de la contracara. En el caso de las conchas de chorito (n=3/cuelga), fueron raspadas con bisturí por su cara interna y luego externa. Para cada cara se utilizó material nuevo estéril.

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 (PCRa) descrita por Mauel *et al.* (1996) con las modificaciones hechas por Peirano (2015) y finalmente se evidenciaron los resultados del PCRa en electroforesis en gel TBE de agarosa al 2%.

D.2 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 siguiendo la estandarización del protocolo hecha por el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas.

D.3 Cuantificación de ADN.

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

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

D.4 PCRa.

Durante la etapa de PCRa las muestras fueron procesadas al interior de una campana de bioseguridad (BIOBASE, modelo 11231 BCC 86). 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, controles negativos y positivos de la técnica) se dispusieron en dicho tubo 6,5 µl de agua libre de nucleasas, 12,5 µl de enzima (GoTaq Colorless Mastermix) 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 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* (Fermelo). La primera amplificación se configuró desnaturalización previa a los 35 ciclos a 94°C durante 2 minutos y luego cada ciclo de PCR tuvo 1 min de desnaturalización a 94°C por 2 min, 2 min de hibridación a 60 °C y 3 min 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 DNA 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') diseñados a partir de la secuencia del 16S ADNr de 5 cepas de *P. salmonis* (LF-89, EM-90, ATL-4-91, NOR-92, SGLO-94). De la primera amplificación resultan amplicones de 1491 pb y de la segunda se obtienen fragmentos de ADN de 467 pb. 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 al 2%. Para la detección de material genético en el gel de agar se utilizó la tinción GelRed®.

D.5 Electroforesis.

Las muestras amplificadas fueron retiradas del termociclador y almacenadas a -20 °C de temperatura hasta la realización de la electroforesis.

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 agar 1,5 Lafken (Fermelo). 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 alcanzar 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 hasta que se formara el gel a temperatura ambiente.

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

Se hizo la migración de electroforesis durante 90 min a 70 V de potencia 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 más 2 µl de Orange/Blue por bolsillo en el gel.

D.6 Resultados

Se observó la presencia de *P. salmonis* en conchas de chorito y nylon. Estos resultados se muestran en la Tabla 6-13 y Figura 6-22. A partir de los resultados obtenidos, se demuestran que la *P. salmonis* posee la capacidad de adherirse formando CAP en la superficie de algunos polímeros y conchas de chorito. Además, considerando los resultados del presente proyecto es posible que la bacteria posteriormente pueda liberarse al medio conservando su capacidad infectiva. Los resultados entregan antecedentes para analizar aspectos

epidemiológicos de la piscirickettsiosis relacionados con la mantención y persistencia del agente etiológico en el medio acuático y que deben seguir siendo estudiados.

Tabla 6-13 Presencia de *Piscirickettsia salmonis* en conchas de chorito (*Mytilus chilensis*) y en materiales plásticos utilizados en la salmonicultura y que fueron expuestos en un centro de cultivo de engorda afectado por piscirickettsiosis.

| Tipo de material | Presencia de <i>P. salmonis</i> ¹ |
|---|--|
| polietileno de alta densidad (HDPE) | Ausencia |
| policloruro de vinilo (PVC) | Ausencia |
| poliamida (PA, nylon) | Presencia |
| politetrafluoretileno (PTFE) | Ausencia |
| Conchas de chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) | Presencia |

¹ La presencia del agente fue detectada mediante PCR convencional de acuerdo a lo descrito por Mauel et al. (1996).

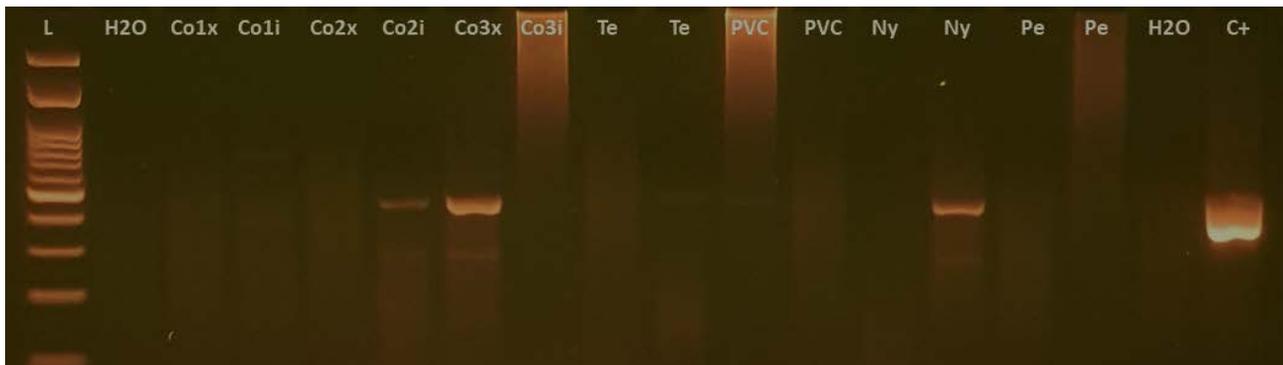


Figura 6-22 Detección de *P. salmonis* mediante PCR en conchas de chorito (*Mytilus chilensis*) y algunos polímeros. L: Ladder, H2O: Control interno negativo, C+: Control positivo, Co(N°)i: Concha número cara interna, Co(N°)x: Concha número cara externa, Te: Teflón, PVC, Ny: Nylon, Pe: Polietileno. Se observa positividad en Co2i, Co3x y Ny.

7 Referencias

- Aldea C., Valdovinos C. (2005). Rockysore mollusks of the south-central Chile (36° - 38°S): Taxonomy and key of identification. *Gayana* 69: 364-396.
- 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. *Journal of Fish Diseases*, 20: 409-418.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A. and Pevzner, P.A. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19(5), 455-477.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340(4), 783-795.
- Benson, D.A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Sayers, E.W. (2015) GenBank. *Nucleic Acids Res* 43(Database issue), D30-35.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. *R package version*, 1,7.
- Birkbeck, T. H., Griffen, A. A., Reid, H. I., Laidler, L. A., & Wadsworth, S. (2004). Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 72: 3693-3694.
- 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.
- Bustos, P. A., Young, N. D., Rozas, M. A., Bohle, H. M., Ildefonso, R. S., Morrison, R. N., & Nowak, B. F. (2011, 01). Amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) farmed in Chile. *Aquaculture*, 310(3-4), 281-288. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.001
- Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M. and Parkhill, J. (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* 25(1), 119-120.
- Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M., Poggi, S., Bifulco, C., Key, G., D'Amato, L., Sabattini, E., Feudale, E., Reynolds, F., Gerdes, J., Rilke, F. (1993). Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *The Journal of Pathology* 171: 83-98.
- Chen, S., Wang, P., Tung, M., Thompson, K. D., & Adams, A. (2000, 11). A *Piscirickettsia salmonis*-like organism in grouper, *Epinephelus melanostigma*, in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 23(6), 415-418. doi:10.1046/j.1365-2761.2000.00250.x
- Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J. and Jin, Q. (2016) VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on. *Nucleic Acids Res* 44(D1), D694-697.
- Contreras-Lynch, S., Smith, P., Olmos, P., Loy, M. E., Finnegan, W., & Miranda, C. D. 2017. A novel and validated protocol for performing MIC tests to determine the susceptibility of *Piscirickettsia salmonis* isolates to florfenicol and oxytetracycline. *Frontiers in microbiology*, 8, 1255.

- Contreras-Lynch, S., Olmos, P., Vargas, A., Figueroa, J., Gonzalez-Stegmaier, R., Enriquez, R. and Romero, A. (2015) Identification and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* in native fish from southern Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* 115(3), 233-244.
- Corbeil, S., McColl, K. A., & Crane, M. S. J. 2003. Development of a TaqMan quantitative PCR assay for the identification of *Piscirickettsia salmonis*. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 23(3), 95-101.
- Crosbie, P. B., Ogawa, K., Nakano, D., & Nowak, B. F. (2010, 05). Amoebic gill disease in hatchery-reared ayu, *Plecoglossus altivelis* (Temminck & Schlegel), in Japan is caused by *Neoparamoeba perurans*. *Journal of Fish Diseases*, 33(5): 455-458. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01137.x
- Darling, A.C., Mau, B., Blattner, F.R. and Perna, N.T. (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14(7), 1394-1403.
- Downes, J. K., Yatabe, T., Marcos-Lopez, M., Rodger, H. D., Maccarthy, E., O'connor, I., Ruane, N. M. (2018, 05). Investigation of co-infections with pathogens associated with gill disease in Atlantic salmon during an amoebic gill disease outbreak. *Journal of Fish Diseases*, 41: 1217-1227. doi:10.1111/jfd.12814
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J.P. and Raoult, D. (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38(10), 3623-3630.
- Drancourt, M., Roux, V., La Vu Dang, L.T.-H., Castex, D., Chenal-Francisque, V., Ogata, H., Fournier, P.-E., Crubézy, E. and Raoult, D.J.E.i.d. (2004) Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. 10(9), 1585.
- Edgar, R.C. (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10(10), 996-998.
- Enger, O., Husevag, B. and Goksoyr, J. (1989) Presence of the Fish Pathogen *Vibrio-Salmonicida* in Fish Farm Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 55(11), 2815-2818.
- Fish parasites: Pathobiology and protection. (2012). doi:10.1079/9781845938062.0000
- Fournier, P.-E., Drancourt, M. and Raoult, D.J.T.L.i.d. (2007) Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. 7(11), 711-723.
- Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S. and Abergel, C.J.P.g. (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. 2(1), e7.
- Fringuelli, E., Gordon, A.W., Rodger H., Welsh, M.D. & Graham, D.A. (2012). Detection of *Neoparamoeba perurans* by duplex quantitative Taqman real-time PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded Atlantic salmonid gill tissues. *Journal of Fish Diseases*, 35: 711-724.
- Fryer, J., Lannan, C., Garces, L., Larenas, J., & Smith, P. (1990). Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathology*, 25(2), 107-114. doi:10.3147/jsfp.25.107
- Fryer, J. L., & Lannan, C. N. (2015, 09). *Piscirickettsia*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-8. doi:10.1002/9781118960608.gbm01219
- Fryer, J.L. and Hedrick, R.P. (2003) *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases* 26(5), 251-262.
- Garver, K.A., Mahony, A.A.M., Stucchi, D., Richard, J., Van Woensel, C. and Foreman, M. (2013) Estimation of Parameters Influencing Waterborne Transmission of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLoS One* 8(12).
- Gauvin, R., Robertson, K., Horny, P., Elwazri, A. M., & Yue, S. (2006, 03). Materials characterization using high-resolution scanning-electron microscopy and x-ray microanalysis. *Jom*, 58(3), 20-26. doi:10.1007/s11837-006-0155-0

- Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C. (2007) CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue), W52-57.
- Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L. and Rolain, J.M. (2014) ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 58(1), 212-220.
- Hall, N.J.J.o.e.b. (2007) Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. 210(9), 1518-1525.
- Hamilton, K. A., Ahmed, W., Palmer, A., Sidhu, J. P. S., Hodggers, L., Toze, S., & Haas, C. N. 2016. Public health implications of *Acanthamoeba* and multiple potential opportunistic pathogens in roof-harvested rainwater tanks. *Environmental research*, 150, 320-327.
- Harriague, A.C., Di Brino, M., Zampini, M., Albertelli, G., Pruzzo, C. and Misic, C. (2008) Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy). *Mar Pollut Bull* 56(3), 574-579.
- Hyatt, D., Chen, G.L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W. and Hauser, L.J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11, 119.
- Jamieson, R.C., Joy, D.M., Lee, H., Kostaschuk, R. and Gordon, R.J. (2005) Resuspension of sediment-associated *Escherichia coli* in a natural stream. *J Environ Qual* 34(2), 581-589.
- Karatas, S., Mikalsen, J., Steinum, T. M., Taksdal, T., Bordevik, M., & Colquhoun, D. J. (2008, 10). Real time PCR detection of *Piscirickettsia salmonis* from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Journal of Fish Diseases*, 31(10), 747-753. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00948.x
- Köser, C.U., Holden, M.T., Ellington, M.J., Cartwright, E.J., Brown, N.M., Ogilvy-Stuart, A.L., Hsu, L.Y., Chewapreecha, C., Croucher, N.J. and Harris, S.R.J.N.E.J.o.M. (2012) Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. 366(24), 2267-2275.
- Kotob, M. H., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., & El-Matbouli, M. (2016, 10). The impact of co-infections on fish: A review. *Veterinary Research*, 47(1). doi:10.1186/s13567-016-0383-4
- King, R.K., Flick Jr, G.J., Pierson, D., Smith, S.A., Boardman, G.D. and Coale Jr, C.W.J.J.o.A.F.P.T. (2004) Identification of bacterial pathogens in biofilms of recirculating aquaculture systems. 13(1), 125-133
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305(3), 567-580.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rodland, E.A., Staerfeldt, H.H., Rognes, T. and Ussery, D.W. (2007) RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 35(9), 3100-3108.
- Lannan, C. and Fryer, J.J.J.o.F.D. (1994) Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis* 1. 17(5), 545-548.
- Larenas, J., Astorga, C., Contreras, J., Garcés, H., Fryer, J., & Smith, P. (1996). Rapid Detection of *Piscirickettsia salmonis* Using Microwave Irradiation. *Fish Pathology*, 31(4), 231-232. doi:10.3147/jfsp.31.231
- Larenas J., Bartholomew J., Troncoso O., Fernandez S., Ledezma H., Sandoval N., Vera P., Contreras J. and Smith P. (2003). Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56, 25-30. doi:10.3354/dao056025
- Lechner, M., Findeiss, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P.F. and Prohaska, S.J. (2011) Proteinortho: detection of (co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics* 12, 124.
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S.C. and Chun, J. (2016) OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(2), 1100-1103.

- Levicoy, C.G. (2013). Estudio histológico de las estructuras reproductivas de dos géneros de ectoparásitos caligidos de *Eleginops maclovinus* en el sur de Chile. Memoria de título, Escuela de Biología Marina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Li, W., Raoult, D. and Fournier, P.-E.J.F.m.r. (2009) Bacterial strain typing in the genomic era. 33(5), 892-916.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P. and Goker, M. (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 14, 60.
- Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., & Inwood, J. H. (1972). Tinción de los cortes. Métodos de Laboratorio. DF México, México. Nueva editorial interamericana SA de CV. 1145-1154.
- Marshall, S., Gómez, F., Ramirez, R., Nilo, L. and Henriquez, V. (2012). Biopelícula generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth 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, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26, 189-195.
- Melo, R. C., Rosa, P. G., Noyma, N. P., Pereira, W. F., Tavares, L. E., Parreira, G. G., . . . Roland, F. (2007, 10). Histological approaches for high-quality imaging of zooplanktonic organisms. *Micron*, 38(7), 714-721. doi:10.1016/j.micron.2007.05.002
- Merhej, V., Georgiades, K. and Raoult, D.J.B.i.f.g. (2013) Postgenomic analysis of bacterial pathogens repertoire reveals genome reduction rather than virulence factors. 12(4), 291-304.
- Mira, A., Martín-Cuadrado, A.B., D'Auria, G. and Rodríguez-Valera, F.J.I.M. (2010) The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. 13(2), 45-57.
- Morley, N. (2013, 05). FISH PARASITES: PATHOBIOLOGY AND PROTECTION - Edited by P. T. K. Woo and K. Buchmann. *Journal of Fish Biology*, 82(5), 1767-1768. doi:10.1111/jfb.12119
- Morrison, R. N., Crosbie, P. B., & Nowak, B. F. (2004, 08). The induction of laboratory-based amoebic gill disease revisited. *Journal of Fish Diseases*, 27(8), 445-449. doi:10.1111/j.1365-2761.2004.00561.x
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology-Sgm*, 148: 257-266.
- Nylund, A., Watanabe, K., Nylund, S., Karlsen, M., Sæther, P. A., Arnesen, C. E., & Karlsbakk, E. (2008, 06). Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Archives of Virology*, 153(7), 1299-1309. doi:10.1007/s00705-008-0117-7
- Olafsen, J.A., Mikkelsen, H.V., Glaever, H.M. and Hansen, G.H. (1993) Indigenous Bacteria in Hemolymph and Tissues of Marine Bivalves at Low-Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 59(6), 1848-1854.
- Olivares, J. and Marshall, S.J.J.o.f.d. (2010) Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. 33(3), 261-266.
- Oldham, T., Rodger, H., & Nowak, B. F. (2016, 04). Incidence and distribution of amoebic gill disease (AGD) — An epidemiological review. *Aquaculture*, 457, 35-42. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.02.013
- Otterlei, A., Brevik, Ø. J., Jensen, D., Duesund, H., Sommerset, I., Frost, P., ... & Apablaza, P. 2016. Phenotypic and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* from Chilean and Canadian salmonids. *BMC veterinary research*, 12(1), 55.
- Pérez M. (2017). Evaluación *in vitro* de la formación del Complejo de Adhesión *Piscirickettsial* (CAP) de *Piscirickettsia salmonis* en conchas de chorito (*Mytilus chilensis*) y su capacidad infectiva. Tesis, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile 28pp.

- Price, M.N., Dehal, P.S. and Arkin, A.P. (2009) FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol* 26(7), 1641-1650.
- Price, M.N., Dehal, P.S. and Arkin, A.P.J.P.o. (2010) FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. 5(3), e9490.
- Rees, E.E., Ibarra, R., Medina, M., Sanchez, J., Jakob, E., Vanderstichel, R. and St-Hilaire, S.J.A. (2014) Transmission of *Piscirickettsia salmonis* among salt water salmonid farms in Chile. 428, 189-194.
- Rozas, M. and Enríquez, R.J.J.o.f.d. (2014) *Piscirickettsiosis* and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. 37(3), 163-188.
- Quinteros, J. (2005). Comparación en la presentación de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Tesis para optar al título de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile, 54pp.
- Ramasamy, D., Mishra, A.K., Lagier, J.C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., Raoult, D. and Fournier, P.E. (2014) A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(Pt 2), 384-391.
- Reed, L., & Muench, H. (1938, 05). A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints¹². *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- Rozas, M., y Enríquez, R. 2014. *Piscirickettsiosis* and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of fish diseases*, 37(3), 163-188.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. and Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16(10), 944-945.
- SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca). 2011. LABD/NT3/Programa de laboratorios de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos. Procedimientos para la validación y control de calidad de los Métodos de reacción en cadena de la Polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en animales acuáticos. Valparaíso, Chile. 13 p.
- SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca). 2018. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos. Año 2017. Valparaíso, Chile. 38 p.
- SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca). 2018b. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional. Año 2017. Valparaíso, Chile. 9 p.
- SERNAPESCA, Informe Sanitarios primer semestre de 2017. pag 20- 27. http://www.SERNAPESCA.cl/sites/default/files/informe_sanitario_1er_semestre_2017.pdf
- Shi, S., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (1997, 03). Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(3), 327-343. doi:10.1177/002215549704500301
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M. and Söding, J.J.M.s.b. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. 7(1), 539.
- Smith, P.A., Pizarro, P., Ojeda, P., Contreras, J., Oyanedel, S. and Larenas, J. (1999) Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 37(3), 165-172.
- Smith, P.A., Rojas, M.E., Guajardo, A., Contreras, J., Morales, M.A. and Larenas, J. (2004) Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 61(1-2), 53-57.

- Spencer P. (2007). Efecto de las macromoléculas orgánicas de la valva de *Diplodon chilensis* (Bivalvia:Hyriidae) en la cristalización de carbonato de calcio *in vitro*. Tesis, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile. 50pp.
- Steinum, T., Kvellestad, A., Rønneberg, L. B., Nilsen, H., Asheim, A., Fjell, K., Dale, O. B. (2008, 03). First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. *Journal of Fish Diseases*, 31(3), 205-214. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00893.x
- Steinum, T., Sjøstad, K., Falk, K., Kvellestad, A., & Colquhoun, D. (2009, 08). An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation. *Aquaculture*, 293(3-4), 172-179. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.05.006
- Strzyzewska, E., Szarek, J., & Babinska, I. (2016, 07). Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: A review. *Veterinárni Medicina*, 61(No. 3), 123-132. doi:10.17221/8763-vetmed
- Suurmeijer, A. J. H., & Boon, M. E. (1993). Optimizing keratin and vimentin retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue with the use of heat and metal salts. *Applied Immunohistochemistry*, 1, 143-148.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12), 2725-2729.
- Taylor, R. S., Crosbie, P. B., & Cook, M. T. (2010, 01). Amoebic gill disease resistance is not related to the systemic antibody response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 33(1), 1-14. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01108.x
- Toledo N. 2008. Caracterización de la interacción de *Piscirickettsia salmonis* con ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sometidas a tratamientos con proteasas. Tesis, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 70pp.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R.J.A. and microbiology, e. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *73(16)*, 5261-5267.
- Wingender, J. and Flemming, H.C. (2011) Biopelículas in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health* 214(6), 417-423.
- Young, N. D., Dyková, I., Nowak, B. F., & Morrison, R. N. (2008, 04). Development of a diagnostic PCR to detect *Neoparamoeba perurans*, agent of amoebic gill disease. *Journal of Fish Diseases*, 31(4), 285-295. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00903.x
- Young, N., Dyková, I., Snekvik, K., Nowak, B., & Morrison, R. (2008, 01). *Neoparamoeba perurans* is a cosmopolitan aetiological agent of amoebic gill disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 78, 217-223. doi:10.3354/dao01869
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J. and Wishart, D.S. (2011) PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 39(Web Server issue), W347-352.
- Zhou, J., Deng, Y., Shen, L., Wen, C., Yan, Q., Ning, D., Qin, Y., Xue, K., Wu, L., He, Z., Voordeckers, J.W., Nostrand, J.D., Buzzard, V., Michaletz, S.T., Enquist, B.J., Weiser, M.D., Kaspari, M., Waide, R., Yang, Y. and Brown, J.H. (2016) Temperature mediates continental-scale diversity of microbes in forest soils. *Nat Commun* 7, 12083.

CONTACT US

t 1300 363 400
+61 3 9545 2176
e csiroenquiries@csiro.au
w www.csiro.au

AT CSIRO, WE DO THE EXTRAORDINARY EVERY DAY

We innovate for tomorrow and help improve today – for our customers, all Australians and the world.

Our innovations contribute billions of dollars to the Australian economy every year. As the largest patent holder in the nation, our vast wealth of intellectual property has led to more than 150 spin-off companies.

With more than 5,000 experts and a burning desire to get things done, we are Australia's catalyst for innovation.

CSIRO. WE IMAGINE. WE COLLABORATE.
WE INNOVATE.

FOR FURTHER INFORMATION

OCEANS & ATMOSPHERE

Andy Steven
t +61 7 3833 5570
e Andy.Steven@csiro.au
w www.csiro.au/OandA

CSIRO CHILE

Patricio Bernal
t +56 2 2797 6303
e Patricio.Bernal@csiro.au
w www.csiro.au