

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR**

Evaluación de *Mytilus chilensis* como reservorio de *Piscirickettsia salmonis* mediante diagnóstico molecular de PCR

**Proyecto para optar al título
de Ingeniero Acuicultor**

Por

Cecilia Leal Cerda

Valparaíso

2014

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR

Evaluación de *Mytilus chilensis* como reservorio de *Piscirickettsia salmonis* mediante diagnóstico molecular de PCR

Proyecto para optar al título de Ingeniero Acuicultor

Por

Cecilia Leal Cerda

Valparaíso

2014

Comisión del Proyecto de Título:

Profesor Guía: Dra. Mariel Campalans Barnier

Profesor: Dra. Jacqueline Campalans Barnier

Profesor: Dr. José Gallardo Matus

Profesor: Dr. Gabriel Yany González

INFORME PROYECTO DE TITULACIÓN

AUTORIZACIÓN DE USO

Al presentar este Proyecto como último requisito para la obtención del título de Ingeniero Acuicultor, autorizo a la biblioteca de la Escuela Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, para que disponga libremente de ella para inspección y consulta.

Autorizo además reproducciones parciales o totales de este Proyecto sólo con fines académicos.

Cecilia Leal Cerda

**Dedicada a mi madre Carmen Cerda
Saavedra.**

AGRADECIMIENTOS

Con este proyecto finalizo una etapa que me deja mucho aprendizaje tanto en lo profesional como en lo personal, recuerdos de momentos buenos y malos, y personas que han enriquecido mi vida.

Primero quiero agradecer a las profesoras Mariel, Jacqueline y Sra Edith, por la confianza y paciencia esperando que terminara este proyecto, por su ayuda en todo lo que significo la realización de este proyecto, desde el conocimiento hasta los equipos e insumos, también agradezco la experiencia de trabajar en su laboratorio por todo lo que aprendí no solo respecto a lo técnico para mi proyecto, sino como investigadoras y personas. A los profesores de mi comición Don Gabriel Yany y Don José Gallardo por su disposición, compromiso y ayuda para mejorar este proyecto.

Con cariño agradezco a mis compañeros que se transformaron en amigos entrañables con quienes compartí momentos de angustia y de alegría, y que de una u otra manera me han apoyado y dado ánimo Alejandra Hernandez, Alejandra Zegarra, en especial a Mauricio Rojas y Patricia Aceituno por su ayuda durante toda la carrera y en el desarrollo de este proyecto, por la motivación y cariño sin ustedes todo habría sido más difícil. A Renzo, Andres, Toto, Pablo, Alain, Natalie, Mafe en general todo el grupo de compañeros con los que compartí estos años significaron apoyo y animo. A Yerkho por su compañía, apoyo, paciencia y tolerancia soportado variados estados de ánimo y su amor.

Por supuesto a mi familia, a mis hermanos por su alegría y cariño que siempre me anima. Al tío Luis por su esfuerzo, apoyo y consejos. A mi abuelo, tíos y primos por su preocupación y apoyo en momentos difíciles. A mis amigos que me han acompañado y me animaron a seguir.

En especial agradezco a mi madre, la primera en preocuparse por mi educación y quien a sido incondicional en cada momento sin criticas solo confianza, esfuerzo, apoyo y fortaleza, todo lo que soy te lo debo y espero no decepcionarte.

Gracias a Dios por todas estas bendiciones.

CONTENIDO

Comisión del Proyecto de Título	i
INFORME PROYECTO DE TITULACIÓN	ii
AUTORIZACIÓN DE USO.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
CONTENIDO.....	vi
CONTENIDO DE FIGURAS	vii
CONTENIDO DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
ANTECEDENTES GENERALES.....	4
Moluscos bivalvos como reservorio de patógenos.....	4
Depuración de moluscos.....	7
Técnicas de diagnóstico de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Obtención y tamaño de la muestra.	12
Mantención de las muestra.	12
Extracción de glandula digestiva de <i>Mytilus chilensis</i>	13
Extracción de sedimento desde los estanques de mantención.....	14
Detección de <i>P. salmonis</i> en glándula digestiva de <i>M. chilensis</i> y Fecas.	14
Extracción de ADN y amplificación por PCR.....	14
Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	16
Determinación del tiempo de permanencia de <i>P. salmonis</i> en la glandula digestiva de <i>M. chilensis</i> en un ambiente controlado.....	17
RESULTADOS	18
Detección de <i>P. salmonis</i> en la glándula digestiva de <i>M. chilensis</i> y fecas sedimentadas de <i>M. chilensis</i> , en ambiente controlado.....	18
Verificación de la presencia de <i>P. salmonis</i>	18
Detección y prevalencia de <i>P. salmonis</i> en <i>M. chilensis</i>	19
Detección de <i>P. salmonis</i> en fecas sedimentadas.	20
Determinación del tiempo de permanencia de <i>P. salmonis</i> en la glandula digestiva de <i>M. chilensis</i> en un ambiente controlado.....	21
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIÓN	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXOS	32

CONTENIDO DE FIGURAS

FIGURA 1: SISTEMA DE MANTENCIÓN DE <i>M. CHILENSIS</i>	13
FIGURA 2: PROCESAMIENTO DE TEJIDO PARA EXTRACCIÓN DE ADN Y PROCEDIMIENTO DE PCR.....	15
FIGURA 3: DETECCIÓN DEL FRAGMENTO MOLECULAR AMPLIFICADO DE <i>PISCIRICKETTSSIA SALMONIS</i>	20
FIGURA 4: PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS OBTENIDAS DEL ANÁLISIS PARA LA DETECCIÓN DE <i>P. SALMONIS</i> EN LAS FECAS DE <i>M. CHILENSIS</i>	21
FIGURA 5: PROBABILIDAD DE QUE <i>P. SALMONIS</i> PERMANEZCA EN <i>M. CHILENSIS</i> UN DETERMINADO PERIODO DE TIEMPO.....	22
FIGURA 6: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL DÍA CERO.....	37
FIGURA 7: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL DÍA UNO.	37
FIGURA 8: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA MUESTRAS, CORRESPONDIENTES A LOS DÍAS DOS Y TRES.....	38
FIGURA 9: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL DÍA CUATRO.	39
FIGURA 10: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL DÍA CINCO, NUEVE, 24, 35, 49.....	40
FIGURA 11: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA MUESTRAS CORRESPONDIENTES AL DIA 49, 57 Y 67.41	

CONTENIDO DE TABLAS

TABLA 1: MICRORGANISMOS TRANSMITIDOS POR VIA HÍDRICA.....	5
TABLA 2: CICLOS DE AMPLIFICACIÓN TERMAL PARA DETECCIÓN DE <i>P. SALMONIS</i>	16
TABLA 3: TOTAL DE MUESTRAS EXTRAÍDAS Y ANALIZADAS DURANTE EL ESTUDIO.....	18
TABLA 4: NÚMERO DE POOLES POSITIVOS Y PREVALENCIA DE <i>P. SALMONIS</i> EN <i>M. CHILENSIS</i>	18
TABLA 5: PREVALENCIA RESPECTO DEL N° TOTAL DE POOLES EVALUADOS SEGÚN EL DÍA DE EVALUACIÓN.	19
TABLA 6: RESUMEN DEL PROCESAMIENTO DE LOS CASOS	32
TABLA 7: CODIFICACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE.....	32
TABLA 8: TABLA DE CLASIFICACIÓN DE POOLES EVALUADOS ^{A,B}	33
TABLA 9: VARIABLES EN LA ECUACIÓN DE REGRESION.	33
TABLA 10: VARIABLES QUE NO ESTÁN EN LA ECUACIÓN DE REGRESION.	33
TABLA 11: PRUEBAS OMNIBUS SOBRE LOS COEFICIENTES DEL MODELO.	34
TABLA 12: COEFICIENTES DE DETERMINACION.	34
TABLA 13: TABLA DE CLASIFICACIÓN DE LOS POOLES EVALUADOS ^A	34
TABLA 14: VARIABLES EN LA ECUACIÓN DE REGRESIÓN	35
TABLA 15: PROBABILIDAD DE QUE <i>P. SALMONIS</i> PREVALEZCA EN <i>M. CHILENSIS</i> UN DETERMINADO PERIODO DE TIEMPO.	35
TABLA 16: REGISTRO DE TEMPERATURA (°C) DEL AGUA EN LOS ESTANQUES DE MANTENCIÓN DE <i>M. CHILENSIS</i>	41

RESUMEN

Se realizó un ensayo experimental con el fin de evaluar el rol de *Mytilus chilensis* (Chorito) como reservorio de *Piscirickettsia salmonis*. Para lograr este objetivo, se obtuvieron choritos desde las estructuras flotantes utilizadas en centros de cultivo de engorda de salmónidos declarados positivos para *P. salmonis* ubicados en la XI Región de Chile. La presencia del patógeno en tejidos de *M. chilensis* se detectó analizando la glándula digestiva de los moluscos mediante técnicas moleculares (PCR), siguiendo la metodología recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2006).

La detección de *P. salmonis* se realizó desde el tiempo cero, estipulado como el momento en que los choritos se extrajeron de las estructuras de cultivo de salmónes, hasta dos meses luego del inicio del ensayo. Durante este tiempo los individuos fueron mantenidos en un ambiente controlado a una temperatura entre 15 y 16 °C y una densidad de 50 individuos por cada 15 litros de agua, realizando análisis en intervalos regulares de tiempo. Los resultados indican que el agente permanece detectable durante el periodo de la investigación con una prevalencia del 52% de un total de 96 pooles analizados. Además, se evaluó el tiempo como factor en la disminución de la probabilidad de detectar a *P. salmonis* en los tejidos de *M. chilensis* obteniendo una significancia de $p < 0,05$. Se logra estimar que éste molusco, puede actuar como reservorio de *P. salmonis*.

ABSTRACT

An experimental trial was made with the purpose of evaluating the role of *Mytilus Chilensis* (mussel) as a reservoir of *Piscirickettsia salmonis*. To achieve this objective, mussels were extracted from the floating structures used in the fatten farm centers of salmonidae declared positive for *P. salmonis* located in the IX Region of Chile. The presence of the pathogen in the tissues of *M. chilensis* were detected analyzing the digestive gland of the mollusks throughout molecular techniques (PCR), following the methodology recommended by the World Organization of Animal Health (OIE, 2006).

The detection of *P. salmonis* was done since time zero, stipulating as the moment in which the mussels were extracted from the structures of salmon's farm, until two months after the beginning of the trial. During this period the individuals were maintained in a control environment in a temperature between 15 and 16 °C and a density of 50 individuals per each 15 liters of water, analyzing in regulars periods of time. The results show the agent remains detectable during the period of the investigation with a prevalence of 52% of a total of 96 pooles analyzed. Furthermore, the time was evaluated as a factor in the depletion of the probability detecting *P. salmonis* in the tissues of *M. chilensis* obtaining a significance of $p < 0,05$. Estimating this mollusk, can act as a reservoir of *P. salmonis*

INTRODUCCIÓN

La industria salmonera nacional cumple un importante rol en el progreso económico del país, principalmente para la región de Los Lagos. Según el indicador de actividad económica regional (Inacer) publicado por el Instituto Nacional de Estadísticas (INE, 2012), el crecimiento positivo de algunas regiones se explica por el aumento sustancial de los centros de cultivo, principalmente por la mayor extracción de salmón del Atlántico, ya que, tanto de forma directa (productores) e indirecta (proveedores de insumos y servicios asociados), se emplazan y desarrollan en esta zona.

Una de las principales problemáticas que enfrenta la industria acuícola nacional, es la constante exposición a enfermedades de alto riesgo sanitario, como es el caso de la Piscirickettsiosis, causada por el agente infeccioso *Piscirickettsia salmonis* clasificada en la “Lista 2” de enfermedades de alto riesgo (Sernapesca 2012), siendo una de las principales causas de mortalidad en salmónidos cultivados en Chile, lo que ha repercutido en grandes pérdidas económicas para esta industria (Bohle *et al.*, 2009).

En el año 1989, se presentaron los primeros brotes de Piscirickettsiosis, enfermedad causada por una bacteria intracelular de los salmónidos, describiéndose por primera vez en salmón Coho, sin embargo, pronto se vieron afectadas todas las especies salmónidas cultivadas en Chile, llegando a ocasionar hasta un 90% de mortalidad en algunos centros de cultivo (Bravo & Campos, 1989). Según resultados del Programa de Vigilancia Pasivo del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, esta enfermedad constituyó el 33% de los diagnósticos realizados por los laboratorios acreditados por Sernapesca, entre un 20 a 30% de mortalidad, llegando en algunos casos al 90%. (Sernapesca, 2012). Debido a esta problemática, en diciembre del 2012 fue aprobado el Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis, cuyo objetivo principal es disminuir el impacto que tiene esta enfermedad en la Salmonicultura de Chile, a partir de la detección temprana y seguimiento de los casos de Piscirickettsiosis, y la oportuna aplicación de medidas de control para esta enfermedad (Sernapesca, 2013).

En la presentación del Programa de Vigilancia Específico de Piscirickettsiosis aprobado recientemente, se menciona la falta de conocimiento e información disponible, referente al patógeno y al posible rol de reservorio de especies silvestres y otros organismos acompañantes (Sernapesca, 2013) lo que podría estar provocando que las medidas sanitarias estratégicas utilizadas para controlar a *P. salmonis*, no sean lo suficientemente efectivas. Los avances y perspectivas para el control de esta enfermedad, han significado mejoras en la cantidad y calidad de la información que la industria maneja sobre esta patología por lo que las investigaciones sobre Piscirickettsiosis se enfocan principalmente en inmunología, transmisión vertical y rutas de entrada del agente infeccioso (Leal, 2007).

Los organismos que se adhieren a las redes y estructuras flotantes utilizadas en los centros de cultivo de salmónidos, pueden actuar como potenciales reservorios de patógenos. En este sentido, los moluscos bivalvos pueden retener agentes patógenos del agua, por lo que pueden actuar como reservorios (Skår & Mortensen, 2007) ya que su mecanismo de alimentación mediante filtración hace posible absorber y acumular patógenos en sus tejidos (Pina, 2001). A pesar de que hay bastante información relacionada a la capacidad de los moluscos filtradores de acumular y retener microorganismos patógenos, en la actualidad no está claro el posible rol que puedan tener los moluscos como reservorio de patógenos de peces de cultivo. En centros de cultivo de salmónidos este hecho puede representar un riesgo de transmisión de la enfermedad considerando que *M. chilensis* es uno de los organismos más abundantes y expuesto al agente infeccioso. Bajo esta interrogante, el presente estudio evalúa la presencia del agente infeccioso *Piscirickettsia salmonis* en *M. chilensis* provenientes de un centro diagnosticado con brote de Piscirickettsiosis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si *Mytilus chilensis* perteneciente al fouling de estructuras flotantes de centros de cultivo de salmones, actúa como reservorio de la bacteria *Piscirickettsia salmonis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en *Mytilus chilensis* procedente del fouling de un centro de cultivo de salmones declarado positivo a Piscirickettsiosis.
2. Determinar el tiempo de permanencia de *Piscirickettsia salmonis* en *Mytilus chilensis* mantenidos en un ambiente controlado.

ANTECEDENTES GENERALES

Moluscos bivalvos como reservorio de patógenos

En el Reglamento sobre las medidas de protección, control y erradicación de las enfermedades de alto riesgo para las especies hidrobiológicas, (DS 319) se define un reservorio o portador a un individuo que hospeda un agente patógeno sin manifestar síntomas ni signos clínicos y es capaz de transmitir la infección (Subpesca, 2001).

Debido a que los moluscos son organismos filtradores, concentran contaminantes a un nivel muy superior al de su entorno acuático (Lee *et al.*, 2010). Los bivalvos filtradores se alimentan removiendo el material particulado que se encuentra suspendido en el agua, el que además de fitoplancton incluye partículas inertes que componen el detritus, pudiendo ser este último de origen orgánico o inorgánico (Navarro, 2001). Una vez que el alimento es filtrado por las branquias, se dirige hacia los palpos labiales donde se clasifica antes de llegar a la boca. El bolo alimenticio, combinado con el moco, pasa a la boca, esófago, y luego al estómago, el que se halla rodeado por el divertículo digestivo (glándula). Dentro del estómago hay una abertura que llega hasta un intestino muy curvo que se extiende hasta terminar en el recto y finalmente en el ano (Helm, 2006).

El alimento de los moluscos bivalvos está constituido por microalgas, materia orgánica, ciertos protistas planctónicos y sales minerales. Los microorganismos filtrados son retenidos en el tracto digestivo, los que generalmente no suelen ser nocivos para el molusco, sin embargo, en algunas ocasiones pueden representar un riesgo para la salud del hombre en el caso de que se hayan acumulado bacterias patógenas, virus animales o biotoxinas producidas por dinoflagelados (Pina, 2001). Debido a que agentes patógenos tales como los virus, se acumulan en el tracto digestivo y otras partes del cuerpo como branquias, manto y pie (Power & Collins, 1990) los moluscos bivalvos pueden actuar como reservorios de estos agentes. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estos mecanismos de difusión mediante filtración pueden considerarse pasivos, ya que los agentes patógenos que son atrapados, ingeridos y a veces acumulados siguen el normal proceso de absorción de alimento y eliminación (Skår & Mortensen, 2007).

Los moluscos bivalvos concentran los contaminantes que se hallan en la columna de agua donde crecen (Lee *et al.*, 2010). En un desafío realizado al mejillone cebra se demostró que son capaces de acumular casi la totalidad de bacterias de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp* a los que fueron expuestos en 24 horas (Abadias, 2013). Además, se observó que la capacidad de acumulación de *E.coli* fue mayor que la de *Enterococcus sp*. lo que se podría explicar por el mayor tamaño de las bacterias de *E.coli*, permitiendo una mayor retención de las mismas respecto a los enterococos (Abadias, 2013). Anteriormente, en una investigación

realizada por Mitchell en 1966 sobre la acumulación y eliminación de poliovirus en ostras (*C. virginica*), se observó que la concentración de poliovirus podía ser 27 veces superior a la del agua de mar tras un tiempo de exposición de 1 hora, también se demuestra la capacidad de concentración de partículas de poliovirus por ostras a un bajo título del virus y su capacidad de reducir rápidamente su carga de partículas virales en condiciones adecuadas. Además, en estudios anteriores se ha demostrado que algunos virus pueden persistir en los tejidos de los moluscos por mucho tiempo, como el virus de la poliomielitis y Coxsackie B-3 en *C. virginica* mantenidos a 5 °C durante 28 días, se demostró que el virus Coxsackie se mantuvo en los niveles iniciales en el intestino, lo que sugiere que el intestino no pudo desactivar el virus (Metcalf & Stiles, 1965). Por otro lado, se expuso a la ostra del pacífico (*Crassostrea gigas*) a la bacteria *V. salmonicida* que afecta a peces salmónidos, obteniendo un incremento de la bacteria en la hemolinfa y tejido blando del molusco, concluyendo que los bivalvos que habitan en los centros de cultivos pueden servir como reservorio para patógenos de peces (Olafsen *et al.*, 1993). En otro estudio sobre la transmisión del virus IPN, se concluyó que el virus se excreta por las heces de los moluscos bivalvos contaminados (*Pecten maximus*) y que éste puede ser transmitido a los crustáceos *Palaemons elegans* y *Pandalus borealis* al alimentarse de moluscos muertos y heces, sin embargo, bajo condiciones experimentales, no se logró una transmisión desde las gambas a la trucha (Mortensen, 1993).

La tabla 1 muestra algunos microorganismos patógenos tales como bacterias, protozoos, parásitos, y toxinas producidas por cianobacterias, que se transmiten por vía hídrica o están asociados al consumo de moluscos bivalvos.

Tabla 1: Microorganismos transmitidos por vía hídrica.

Tipo	Especie	Patología
Bacterias	<i>Salmonella</i> spp.	Gastroenteritis
	<i>Shigella</i> spp.	Disentería
	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	Disentería
	<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Diarrea con sangre
	<i>E. coli</i> enteroroxigenica	Diarrea
	<i>Campylobacteria</i> spp.	Gastroenteritis
	<i>Vibrio cholerae</i> 01	Cólera
	<i>V. cholerae</i> no 01	Diarrea
	<i>V. vulnificus</i> , <i>v. parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Diarrea con sangre
Patógenos oportunistas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecciones oculares y del oído, dermatitis.
	<i>Mycobacterium</i> spp.	Lesiones en la piel.
	<i>Aeromonas</i> spp.	Infecciones de heridas, diarrea
	<i>Flavobacterium</i> spp.	Meningitis
	<i>Acinetobacter</i> spp.	Meningitis, infecciones de heridas.
	<i>Klebsiella</i> spp.	Neumonía
	<i>Legionella</i> spp.	Enfermedad del legionario
Protozoos	<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería
	<i>Giardia intestinalis</i> , <i>G lamblia</i>	Giardiasis

	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Diarrea
	<i>Naegleria fowleri</i>	Meningoencefalitis
	<i>Gonyaulax spp. Pyrodinium spp.</i>	Intoxicación paralítica
	<i>Procentrum spp. Dinophysis spp.</i>	Intoxicación diarreica
Parásitos	<i>Shistosoma spp.</i>	Esquistosomiasis dermatitis
	<i>Dracunculus medinensis</i>	Dracunculiasis
	<i>Ancylostoma</i>	Trastornos gastrointestinales
	<i>Taenia</i>	Trastornos gastrointestinales
Toxinas de cianobacterias	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Envenenamiento

Fuente: Pina, 2001.

Skår & Mortensen (2007), investigaron el posible papel de *Mytilus edulis* como vector del virus de la Anemia Infecciosa del salmón (ISAV) de forma experimental. Los moluscos acumularon el virus mediante la filtración normal, y éste fue detectado en los moluscos sólo hasta 72 horas después del desafío, por lo que en este estudio se concluye que *M. edulis* probablemente no actúa como un hospedador reservorio de ISAV (Skår & Mortensen, 2007). Por otro lado, en condiciones experimentales se ha demostrado que *Caligus rogercresseyi* que infecta a salmones de cultivo en Chile puede actuar como vector en la transmisión horizontal del virus ISA (Oelckers *et al.*, 2013). También, en una investigación realizada con varios organismos obtenidos desde el estuario de Reloncavi, se evaluó la posibilidad de que en la fauna nativa, lo que incluyó peces, moluscos, crustáceos, lobos marinos, fecas y microplancton existan vectores o reservorios del virus ISA. Los resultados fueron negativos, excepto en un espécimen de salmón del Atlántico en estado libre y sin signología clínica donde se encontró la cepa más frecuente del virus (González *et al.*, 2011). Esta situación coincide con lo ocurrido en países productores del hemisferio norte donde es recurrente encontrar salmones en estado salvaje infectados con ISAV en baja prevalencia (Plarre, 2011). En Noruega hay estudios que demuestran que *Caligus elongatus* y *Lepeophtheirus salmonis* pueden actuar como vectores de ISAV (Nylund *et al.*, 1994). En el Centro para la Salud y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Iowa se plantea que el reservorio de ISAV es aún desconocido, considerando que algunos experimentos han demostrado que varias especies de salmónidos pueden portar el virus asintóticamente.

En el caso de las bacterias tipo rickettsial, usualmente pueden ser transmitidas a un hospedador vía vector invertebrado desde un reservorio, sin embargo, se ha planteado que para que los vertebrados sean reservorios eficaces de rickettsias, tienen que ser un hospedador normal del vector y ser susceptibles a las rickettsias (Nylund *et al.*, 1994). Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2006) la vía de transmisión de *P. salmonis* por vectores no pasa de ser una hipótesis y el papel de la transmisión vertical no está muy claro. Sin embargo, hay estudios que han demostrado que *P. salmonis* se puede transmitir de forma vertical mediante las ovas de alevines de peces salmónidos (Larenas *et al.*, 2005) Así mismo, se ha comprobado la transmisión horizontal de la enfermedad sin presencia de vectores (Cvitanich *et al.*, 1991; Almendras *et al.*, 1997). En un estudio realizado por Fryer y Lannan (1994) demostraron una supervivencia *in vitro* relativamente prolongada del agente en

agua salada, lo cual sugiere que la bacteria presente en el contenido fecal, en condiciones marinas, podría producir la infección horizontal. En otro estudio fue posible replicar *P. salmonis* en líneas celulares de insectos lo que sugiere que el agente infeccioso tiene el potencial de persistir en organismos invertebrados (Birkbeck *et al.*, 2004). A la fecha, no es claro si un huésped intermedio este implicado en la transmisión natural de Piscirickettsiosis (AQUAVETPLAN, 2013), por lo que la fuente, reservorio y medio de transmisión de *P. salmonis* es aún una interrogante.

Depuración de moluscos

Debido a la capacidad de acumulación de los bivalvos filtradores que en algunos casos puede llegar a representar un riesgo para la salud humana, se realizan procesos de descontaminación de los moluscos antes de ser comercializados, basados en la inmersión de éstos en agua de mar microbiológicamente limpia, desinfectada con ozono o radiación ultravioleta, durante un periodo de 24 a 72 horas. (Pina, 2001)

El objetivo de la depuración es la eliminación de los contaminantes ya sean microbianos o de otro tipo, la cual se consigue cuando se proveen las condiciones adecuadas de temperatura, oxígeno y salinidad, para que los moluscos realicen su actividad de filtración de agua (Lee *et al.*, 2010). Se deben manejar distintos factores como la temperatura que afecta la actividad metabólica de los organismos. Además, se debe prevenir la recontaminación de los moluscos, aplicando un sistema “All in / All out”, para evitar que los moluscos que están parcialmente depurados se recontaminen con el material excretado por otros moluscos. El agua utilizada, debe ser agua limpia que incluya el tratamiento de desinfección pertinente, cuando fuera necesario.

Según los estudios de Lee *et al* (2010) la eliminación microbiana, puede no ser óptima a pesar de que los moluscos realicen filtración. Se ha observado que los patógenos bacterianos pueden sobrevivir en las heces y ser expulsados posteriormente al agua superficial, por lo que es de esperar que la supervivencia de los virus y por tanto el potencial de recontaminación sea mayor debido a su mayor supervivencia en el agua de mar. En general, los indicadores bacterianos como *E. coli* y patógenos como *Salmonella* de origen fecal se eliminan con facilidad desde los moluscos cuando se encuentran en un sistema de depuración. Sin embargo, se ha observado que la depuración no es efectiva para reducir la carga bacteriana desde moluscos que presentan bacterias del genero Vibrionaceae, patógeno para el hombre, por lo que es necesario revisar factores como salinidad y temperatura, con tal de asegurar que no pudiera darse un aumento de la concentración del patógeno durante el ciclo de depuración del molusco. La eliminación de bacterias durante la depuración usando bivalvos inoculados experimentalmente con cultivos bacterianos suelen mostrar un mayor grado de eliminación que los estudios que usan moluscos contaminados de forma natural por lo que esta técnica es cuestionable. Otras investigaciones con ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) han mostrado que,

durante la depuración, los virus se eliminan más lentamente que la bacteria *E. coli*. Incluso en sistemas correctamente diseñados y gestionados, cerca de un tercio de la concentración inicial de virus se mantiene después de 2 días a 8°C. A temperaturas más elevadas, por ejemplo, de 18 a 21°C, los virus se eliminan del molusco más rápidamente pero mientras la mayoría de los virus presentes se eliminan al cabo de 5 o 7 días a estas temperaturas, puede que quede algo de contaminación viral residual incluso cuando se están depurando moluscos moderadamente contaminados. Los datos sobre la depuración de choritos (*Mytilus spp.*) inoculados experimentalmente con Hepatitis A indican que el período de depuración necesario para su eliminación es también prolongado (Lee *et al.*, 2010). Otro caso en que se estudio la tasa a las que dos especies de ostras, *C. ariakensis* y *C. virginica*, acumularon, retuvieron y depuraron cinco diferentes patógenos virales revelo que las ostras pueden albergar y retener hasta tres tipos de virus durante 4 semanas después de la exposición inicial a agua contaminada y que *C. ariakensis* demostraba mayor capacidad de bioacumulación y retención que *C. virginica* respecto de los mismos virus. Además, destaca que el tiempo es uno de los factores mas significativos para lograr la depuración de los moluscos (Nappier *et al.*, 2008).

Piscirickettsia salmonis

P. salmonis, es un patógeno bacteriano Gram negativo, no móvil, no encapsulado, pleomórfica pero en general cocoides con un tamaño variable entre 0,5 y 1,5 micras de diámetro (Bravo *et al.*, 1989). Por su carácter intracelular el mantenimiento *in Vitro* de estas bacterias se realiza en líneas celulares de peces y la temperatura óptima para su cultivo oscila entre 15 y 18 °C (OIE, 2006). Sin embargo, nuevos antecedentes entregados por estudios recientes señalan a *P. salmonis* como una bacteria facultativa que es capaz de crecer en medios artificiales libres de células (Mikalsen *et al.*, 2008, Mauel *et al.*, 2008, Gómez, 2009). Estos autores han descrito medios artificiales de cultivo sobre la base de infusión de corazón-cerebro, hemoglobina y un medio de agar rico en sangre de carnero. Esta información es relevante en la investigación para la prevención y control de esta bacteria, tanto para fines terapéuticos como en la en la producción de vacunas en investigación por los laboratorios.

La transmisión del agente patógeno, es de tipo horizontal con o sin contacto físico, (Larenas *et al.*, 1997). Los sitios de entrada más probables del agente infeccioso son la piel y branquias de los peces, incluso sin lesiones y en ausencia de vectores (Smith *et al.*, 1999), resultados experimentales sustentan una transmisión vertical del agente al lograr la infección de alevines provenientes de ovas de reproductores machos y/o hembras positivos a Piscirickettsiosis (Larenas *et al.*, 2005). Por otro lado, las bacterias rickettsiales han sido asociadas con artrópodos los cuales pueden actuar como vectores, reservorios y/o amplificadores del ciclo de vida de la bacteria (Raoult & Roux, 1997).

P. salmonis agente causal de Piscirickettsiosis ha sido una de las principales causas de mortalidad en salmónidos cultivados en las costas marinas del sur de Chile y ha significado grandes pérdidas económicas (Bohle *et al.*, 2009). La enfermedad también ha sido descrita en

Irlanda, Escocia, Noruega y Canadá pero la patogenia parece ser más grave en centros de cultivo en Chile (Marschall *et al.*, 1998).

El agente infeccioso se presenta luego del traspaso de los peces al mar, por lo que se asume que la bacteria es de origen marino, presumiblemente desde un pez hospedador marino (Pina, 2001). Esta enfermedad esta descrita en la “Lista 2” de enfermedades de alto riesgo para peces en Chile. Los signos clínicos se caracterizan por un nado errático y lento en la superficie del agua y, al examinar los peces, se identifican úlceras puntiformes y nódulos blancos en la piel, hígado jaspeado (con nodulaciones blancas) y hemorragias petequiales, principalmente en los ciegos pilóricos. Se ha detectado en el salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*), en el salmón real (*O. tshawytscha*), en el salmón japonés (*O. masou*), en la trucha arco iris (*O. mykiss*), en el salmón rosado (*O. gorbuscha*) y en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Además, se ha aislado en peces no salmónidos como Lubina blanca (*Atractoscion nobilis*) en la costa sur de California (Arkush *et al.*, 2005), Lubina (*Dicentrarchus labrax*) en Grecia, donde se han visto afectadas por un patógeno similar de *P. salmonis* (Athanasopoulou *et al.*, 2004), también en Hawai, en las poblaciones de tilapia (*Oreochromis mossambicus* y *Melanotheron sardotherodon*), tanto los peces de vida libre, como criados en cultivo han sufrido una enfermedad de tipo Piscirickettsiosis (Mauel *et al.*, 2003), lo que sugiere una expansión de este agente hacia otras especies de peces de importancia comercial (Marshall *et al.*, 2007).

En Chile la enfermedad fue considerada de importancia económica desde un brote masivo reportado en 1989, cuando causó la muerte de aproximadamente 1,5 millones de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) de tamaño comercial, cultivado en el área de Calbuco, al sur de Chile (Bravo & Campos, 1989). Esta enfermedad constituyó el 33% de los diagnósticos realizados por los laboratorios acreditados por Sernapesca y el 21% solo en el primer semestre del año 2011 (Sernapesca, 2007-2011) alcanzando mortalidades acumuladas hasta cosecha de un 60 a 80% en *S. coho* (Bravo & Campos, 1989; Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1990).

Existen en el mercado vacunas autorizadas para el control de *P. salmonis*, sin embargo su efectividad es cuestionada, ya que si bien han mostrado un efecto positivo en la disminución de mortalidad en el tiempo, se ha demostrado que el efecto de las vacunas se pierden con el inicio de la primavera, donde se producen los eventos más importantes de mortalidad por esta causa (Leal & Woywood, 2007). En los casos activos de la enfermedad el uso de antibióticos sigue siendo la principal medida de control, estos productos se describen en el Registro de Medicamentos Veterinarios, y los cuales son: ácido oxolínico, flumequina, oxitetraciclina y florfenicol. (Sernapesca, 2010). Otras medidas de control son la implementación de estrategias operacionales como All in-All out, trasladar los smolt directamente desde agua dulce a centros de mar, sin pasar por estuario o reduciendo la permanencia de los smolt en los estuarios, reducir los manejos en los periodos de engorda etc., medidas que generalmente son difíciles de aplicar en la práctica (Leal & Woywood, 2007). Además, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) recomienda la aplicación de medidas higiénicas y la adopción de una política de gestión adecuada, entre éstas, una

disminución de las densidades de cultivo por jaula, realizar la repoblación con peces de crías sanos, además de sanear todos los equipos e instalaciones del centro de cultivo (OIE, 2012).

Debido a la importancia que ha tenido *P.salmonis* en la acuicultura del país y a que las medidas estratégicas que se han aplicado no han sido lo suficientemente efectivas para controlar la Piscirickettsiosis, recientemente el Servicio Nacional de Pesca presentó un nuevo Programa Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis, cuyo objetivo principal es disminuir el impacto que tiene esta enfermedad en la Salmonicultura de Chile, a partir de la detección temprana y seguimiento de los casos de Piscirickettsiosis, y la oportuna aplicación de medidas de control para esta enfermedad. Sin embargo, las propias autoridades comentan que para que este programa tenga una real efectividad es necesario conocer el comportamiento integral de la enfermedad, para lo cual se requiere de estudios específicos que ayuden a incrementar la información disponible de esta patología en sus hospedadores como también en sus posibles vectores (Sernapesca, 2013).

Técnicas de diagnóstico de *Piscirickettsia salmonis*

En los moluscos las técnicas de diagnóstico se basan en la detección directa del agente causal mediante histología y citología, también pueden utilizarse inmunoanálisis con anticuerpos monoclonales o sondas de ácido nucleico, además de distintos métodos de diagnóstico provisional, como improntas de tejidos, cultivo en medio de tioglicolato líquido de Ray (RFTM) o la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (OIE, 2012). La técnica PCR es sensible a las condiciones en las que se ejecuta, y puede dar falsos positivos y falsos negativos por lo que hace necesario el uso de muestras de control. Este tipo de técnicas solo detectan ácido nucleico patógeno y no indican la viabilidad del patógeno (OIE, 2012).

Se han desarrollado técnicas moleculares, como sondas de ácido nucleico y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar agentes patógenos de los animales acuáticos. La confirmación de *Piscirickettsia salmonis* en cultivo celular se hace mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo (IFI) o por la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Estos procedimientos están detallados en el *Manual de pruebas de diagnóstico para animales acuáticos* (OIE, 2006). De manera alternativa, *P. salmonis* puede ser detectada mediante frotis o impresiones de tejidos teñidos con Gram, Giemsa o azul de metileno, seguido de inmunofluorescencia indirecta (IFAT). En la actualidad existen medios de cultivo enriquecidos en los cuales se puede aislar *P. salmonis* sin la necesidad de cultivos celulares (San Martín, 2010). Los tejidos de peces adecuados para ser examinados en cultivos celulares, PCR, impresiones/frotis de tejido e histología, son el riñón, hígado y sangre recolectados durante infecciones clínicas y subclínicas (San Martín, 2010).

Se ha desarrollado la PCR anidada para detectar el ADN genómico de *P. salmonis* utilizando partidores generales de rADN 16S bacteriano en la primera amplificación y partidores específicos para *P. salmonis* en la segunda reacción (OIE, 2006). Las dos secuencias de partidores generales para eubacterias son EubA (1518R) 5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAN-CCR-CA-3' y EubB (27F) 5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3' (OIE 2006). Los dos partidores específicos para *P. salmonis* PS2S (223F) y PS2AS (690R) tienen las siguientes secuencias: 5'-CTA-GGA-GAT-GAG-CCC-GCGTTG-3' y 5'-GCT-ACA-CCT-GAA-ATT-CCA-CTT-3', respectivamente. Estos partidores aportan un producto específico de 467 pares de bases (OIE, 2006).

Las sustancias básicas utilizadas en este método son Tampón 10x (2,5µm), dNTP (2,5 µl), primer 1 (EubA) (0,6 µl) primer 2 (EubB) (0,6 µl), MaCl₂ (1,0 µl) Taq DNA polimerasa (0,4 µl), ADN (1,0 µl). Agua desnaturalizada sin nucleasa hasta completar 25 µl de volumen final. La mezcla se debe desnaturalizar a 94 °C durante 2 minutos y luego amplificar por 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 2 minutos, y 72 °C durante 3 minutos. El proceso dura alrededor de dos horas luego del cual se realiza un segundo mix con la misma cantidad de sustancias más el ADN del primer ciclo y cambiando solamente los primer utilizando ahora PS2S y PS2AS realizando un segundo PCR (OIE, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y tamaño de la muestra.

Se recolectaron 400 ejemplares de *M. chilensis* desde las especies que conformaban el fouling de las estructuras (flotadores y cabos de fondeo) de un centro de cultivo de *Salmo salar* ubicado en la XI región positivo para *P. salmonis*, según información entregada por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura respecto a las zonas declaradas en brote de piscirickettsiosis el año 2010. Con estos ejemplares, se conformaron 200 pools de dos choritos cada uno.

El tamaño de la muestra se estableció según la tabla propuesta en el *Manual de pruebas del diagnóstico para animales acuáticos* que establece el tamaño mínimo de la muestra con un 95% de confianza para detectar un individuo enfermo suponiendo un 5% de prevalencia del patógeno en una población (OIE, 2006).

Una vez obtenidos los moluscos, fueron embalados y trasladados en condiciones de humedad y a baja temperatura hasta el Laboratorio de Patologías Marinas de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV).

Mantenimiento de la muestra.

En el Laboratorio de Patologías Marinas los choritos fueron separados y dispuestos homogéneamente en 4 acuarios de 15 litros cada uno. Cada acuario se mantuvo con agua de mar microfiltrada, tratada con luz ultravioleta (UV), más aireación constante (Fig. 1). Los moluscos fueron alimentados diariamente con 50 ml de microalgas *Tetraselmis suecica* y se registró la temperatura del agua en cada estanque durante los días del estudio. Además, se realizaron dos recambios de agua diarios evitando la resuspensión del material decantado utilizando un sifón desde la superficie. El agua de desecho de cada acuario fue desinfectada con Virkon® al 1:200 (0,5%), solución desinfectante de amplio espectro.

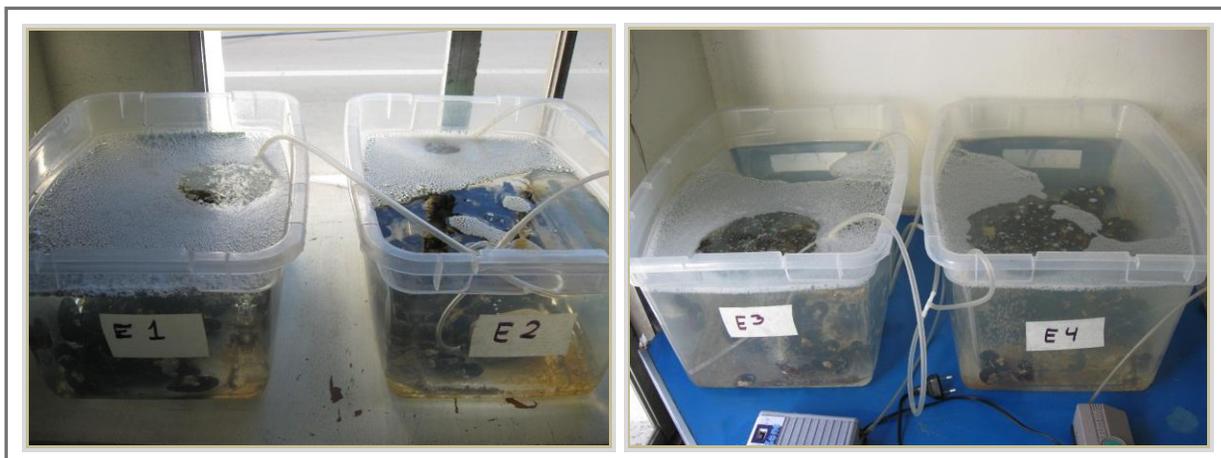


Figura 1: Sistema de mantención de *M. chilensis*. Acuarios con agua de mar microfiltrada, tratada con luz ultravioleta (UV) más aireación constante.

Extracción de glándula digestiva de *Mytilus chilensis*.

Antes de comenzar la experiencia y exponer a los especímenes a un ambiente controlado, se procesaron 15 pooles de *M. chilensis* con el objetivo de verificar la presencia de *P. salmonis* en el tejido de los individuos.

Desde cada individuo fue extraído un trozo de glándula digestiva y depositada en un tubo eppendorf de 2 ml con alcohol puro debidamente rotulado. Los utensilios y mesa de trabajo fueron reemplazados, lavados y desinfectados entre cada muestra procesada. El número de pooles y frecuencia de extracción de tejido fue realizada tres veces al día por cinco días, posteriormente se realizó una vez al día, a los nueve, 24, 35, 49, 57 y 67 días contados desde el inicio de la experiencia, como se detalla en la Figura 2. La frecuencia de extracción de tejido se determinó en base a los estudios realizados por Mitchell *et al.*, 1966; Skår & Mortensen, 2007.

Extracción de sedimento desde los estanques de mantención.

En paralelo con los objetivos propuestos por el presente estudio, con el fin de verificar si *P. salmonis* persiste en las fecas sedimentadas en los estanques de mantención, fue recolectado el sedimento acumulado en el fondo de los recipientes, por un período de dos semanas. El agua con el sedimento fue filtrada utilizando una malla de 50 μm para eliminar sedimentos de mayor tamaño, y el sedimento resultante, fue resuspendido en 1 ml de alcohol.

Detección de *P. salmonis* en glándula digestiva de *M. chilensis* y Fecas.

Para la detección de *P. salmonis* las muestras obtenidas desde moluscos y fecas sedimentadas fueron procesadas y analizadas por medio de la técnica de diagnóstico molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siguiendo las indicaciones del *Manual de pruebas de diagnóstico para animales acuáticos* (OIE, 2012).

Extracción de ADN y amplificación por PCR.

Una vez obtenida la muestra de glándula digestiva, se agregó solución de digestión en base a proteinasa K, incubando la muestra durante dos horas a 60 °C. A continuación, se adicionó tampón de extracción (Na Cl 5M), luego esta mezcla fue agitada en vórtex por 15 segundos y posteriormente centrifugada. Con este proceso se logró una separación del tejido obteniendo un líquido sobrenadante que contiene el material genético y una fase sólida que contiene restos de las membranas y otros componentes. Para extraer el ADN desde el sobrenadante, se agregó etanol absoluto helado que permitió la decantación del material genético. El sobrenadante fue descartado, y el sedimento que consta del ADN, lavado, rehidratándolo con etanol. Luego, nuevamente se descartó el sobrenadante, se adicionó agua sin nucleasas, y por último fue refrigerado hasta su procesamiento por PCR.

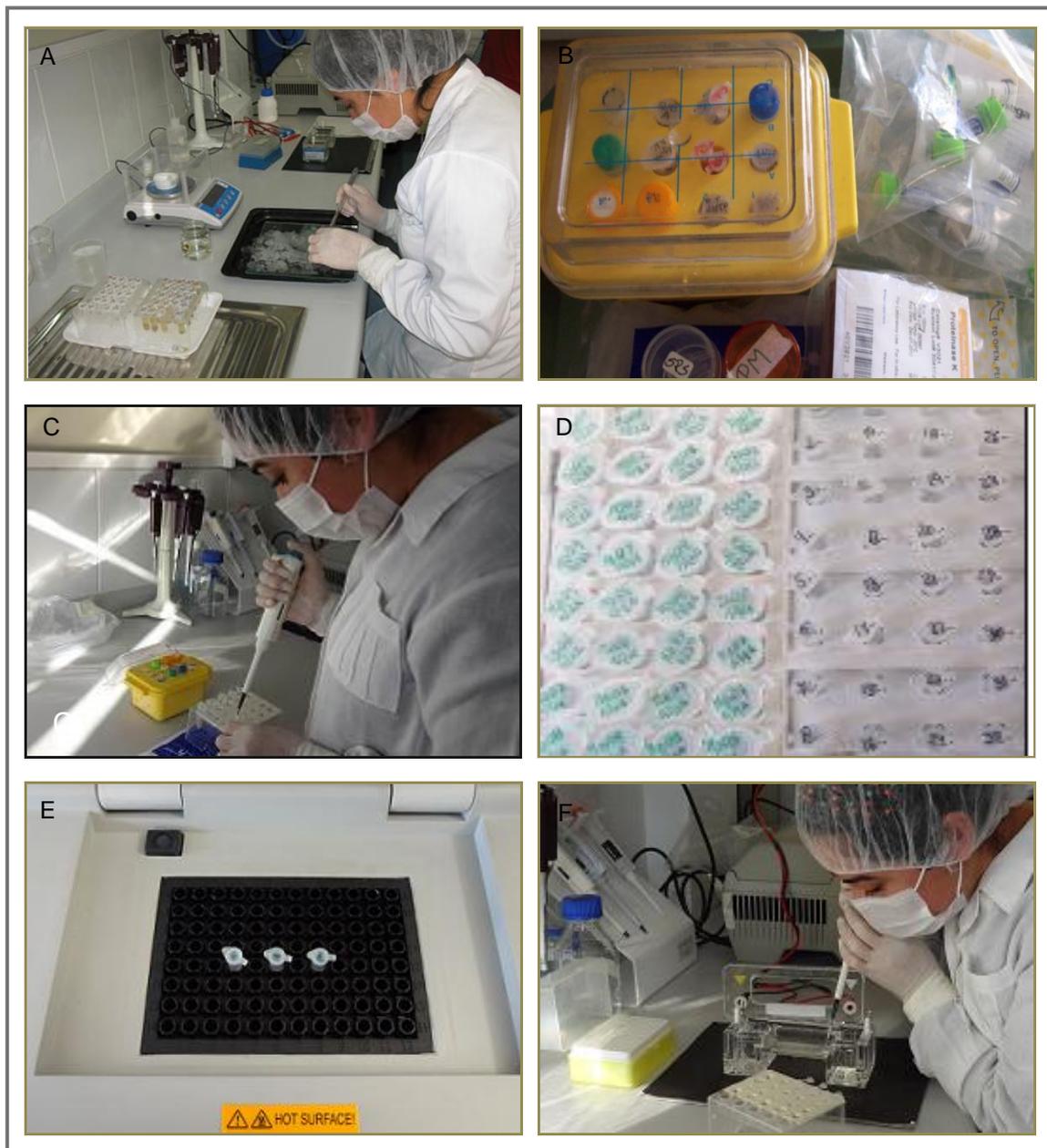


Figura 2: Procesamiento de tejido para extracción de ADN y procedimiento de PCR. Figura: 2A) Preparación de la muestra para extracción de ADN; 2B) Insumos para procesamiento por PCR; 2C) Adición de insumos para procesamiento por PCR; 2D) Tubos eppendorff conteniendo muestras; 2E) Controles positivo y negativo junto a muestra para procesamiento en termociclador; 2F) Preparación de electroforesis.

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μL con los siguientes reactivos: 2,5 μL tampón PCR 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl]; 2,5 μL dNTP 10 mM; 0,6 μL de cada partidador (10 μM); 0,4 μL de la enzima Taq DNA polimerasa [5 U/ μL (Promega, Francia)]; 1 μL ADN (10 ng) y agua destilada estéril hasta alcanzar el volumen final, utilizando como partidores en la primera reacción EubA y EubB (Tabla 3).

El ciclo termal consistió en desnaturación a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, anillamiento o hibridación a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos y elongación a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos. Fueron realizados 35 ciclos de amplificación.

La segunda PCR fue realizada utilizando 1 μL del producto de la primera PCR, substituyendo los partidores por PS2S y PS2AS (Tabla 2). El ciclo termal consistió desnaturación a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, anillamiento o hibridación a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos y elongación a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos. También fueron realizados 35 ciclos de amplificación.

Tabla 2: Ciclos de amplificación termal para detección de *P. salmonis*.

	Primers	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1^{er} ciclo	EubA- EubB	94 $^{\circ}\text{C}$	2 min	1
		94 $^{\circ}\text{C}$	1 min	35
		50 $^{\circ}\text{C}$	2 min	
		72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	
2^o ciclo	PS2S-PS2AS	94 $^{\circ}\text{C}$	2 min	1
		94 $^{\circ}\text{C}$	1 min	35
		65 $^{\circ}\text{C}$	2 min	
		72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	

La detección del fragmento amplificado se efectuó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% durante 50 min, procedimiento recomendado por la OIE y utilizado en el proyecto FIP 2008/66.

Los resultados de PCR se evaluarán según el grado de prevalencia del patógeno en los pools analizados. La prevalencia del patógeno corresponde a la razón entre el número de resultados positivos del diagnóstico dividido por el número de pools analizados expresado en porcentaje.

Determinación del tiempo de permanencia de *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M. chilensis* en un ambiente controlado.

Para determinar el tiempo de permanencia de *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M. chilensis* en un ambiente libre controlado, se realizó una regresión logística, mediante la cual se modeló cómo influye en la probabilidad de aparición de un suceso, habitualmente dicotómico, la presencia o no de diversos factores (Calderon, 2009). Para estos efectos se utilizó el Software estadístico SPSS aplicando el método de Wald hacia atrás, que incluye a todas las variables, y posteriormente, selecciona aquellas que se ajustaron mejor al modelo generado.

El objetivo de este modelo es predecir la probabilidad de detectar *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M. chilensis*, y en cuanto tiempo esa probabilidad resulta en un valor mínimo, definiendo:

“Presencia de *P. salmonis*” = 1 y “Ausencia de *P. salmonis*” = 0;

Determinando si la variable tiempo influye aumentando o disminuyendo esta probabilidad, considerando como variable dependiente la presencia de *P. salmonis*, y como variable independiente el día de análisis a la que pertenece la muestra de *M. chilensis*.

Esta función corresponde al puntaje que se obtiene para estimar la probabilidad de encontrar a *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M. chilensis*.

P: probabilidad de que *P. salmonis* permanezca en *M. chilensis* un determinado periodo de tiempo.

$$P = \exp(S) / (1 + \exp(S)).$$

RESULTADOS

A continuación, en la Tabla 3 se presenta el número de pooles de tejido de glándula digestiva de *M. chilensis* extraídos y analizados mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Los estanques de mantención registraron una temperatura promedio de 15,6 °C durante todo el ensayo (Anexo III, Tabla 17).

Tabla 3: Total de muestras extraídas y analizadas durante el estudio.

Día	Pooles Extraídos	Pooles Analizados
0	15	15
1	12	12
2	12	12
3	12	12
4	12	12
5	12	11
9	4	2
24	4	4
35	4	4
49	4	4
57	4	4
67	4	4
Total	99	96

Detección de *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M. chilensis* y fecas sedimentadas de *M. chilensis*, en ambiente controlado.

Verificación de la presencia de *P. salmonis*.

A continuación se presenta el número de pooles positivos a la detección y prevalencia del agente *P. salmonis* en los tejidos de glándula digestiva de *M. chilensis* con el objeto de verificar la presencia del agente infeccioso mediante PCR, antes de ser expuestos a un ambiente controlado.

Tabla 4: Número de pooles positivos y prevalencia de *P. salmonis* en *M. chilensis*.

Nº Pooles Procesados PCR	Nº Pooles Positivos	Prevalencia (%)
15	9	60

Detección y prevalencia de *P. salmonis* en *M. chilensis*.

En la siguiente tabla se observan los resultados de la detección mediante PCR de *P. salmonis* expresados como prevalencia en un ambiente controlado. *P. salmonis* fue detectado durante todo el transcurso del ensayo a excepción del noveno día, donde sin embargo, sólo fue posible evaluar dos pools.

En relación a la prevalencia de *P. salmonis* en tejido de *M. chilensis*, esta fue mayor en los primeros días de evaluación observándose el máximo de prevalencia los días dos y cinco. A partir del día 24, se observa una disminución de la prevalencia constante en el tiempo, apreciando resultados positivos a *P. salmonis* incluso a los 67 días de experiencia.

Tabla 5: Prevalencia respecto del N° total de pools evaluados según el día de evaluación.

Día	Positivos	Negativos	Total	Prevalencia
0	9	6	15	60
1	4	8	12	33
2	10	2	12	83
3	8	4	12	67
4	5	7	12	42
5	9	2	11	82
9	0	2	2	0
24	1	3	4	25
35	1	3	4	25
49	1	3	4	25
57	1	3	4	25
67	1	3	4	25
Total	50	46	96	52

En la figura 3 se observa un ejemplo de los resultados de la electroforesis. Los carriles positivos observados en la figura, corresponden al segundo y tercer día de procesamiento. Los resultados de PCR en gel de agarosa para cada pool analizado, se detallan en el Anexo II.

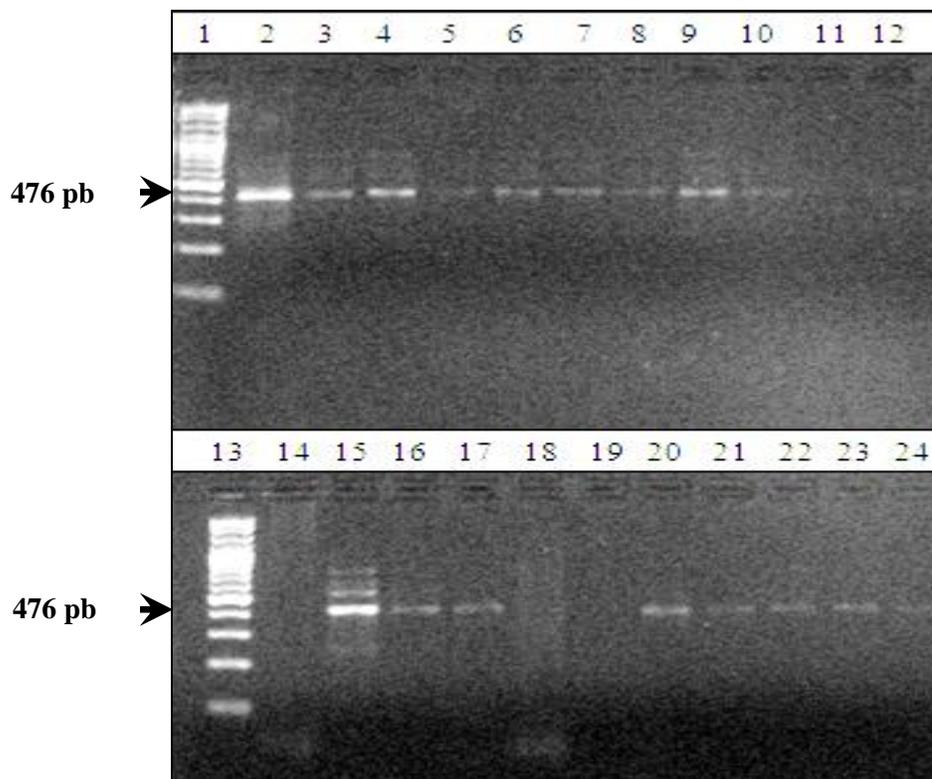


Figura 3: Detección del fragmento molecular amplificado de *Piscirickettsia salmonis*. Carril 1 y 13 corresponden al marcador de peso molecular, el que varía entre 100 y mil, el carril 2 contiene el control positivo obtenido del suero de riñón de un pez infectado con *P. salmonis*, el carril 14, que corresponde al control negativo, el carril 3 al 12 y de 15 a 24 corresponden a las muestras analizadas.

Detección de *P. salmonis* en fecas sedimentadas.

En cuanto a la detección de *P. salmonis* mediante PCR de las fecas recolectadas desde los cuatro estanques de mantención de *M. chilensis*, se obtuvieron seis muestras de sedimento de los cuatro estanques en todo el ensayo, en total se analizaron 24 muestras. A partir del análisis molecular desarrollado, se detectó la presencia del patógeno en un 42% del total de muestras evaluadas (Fig. 5).

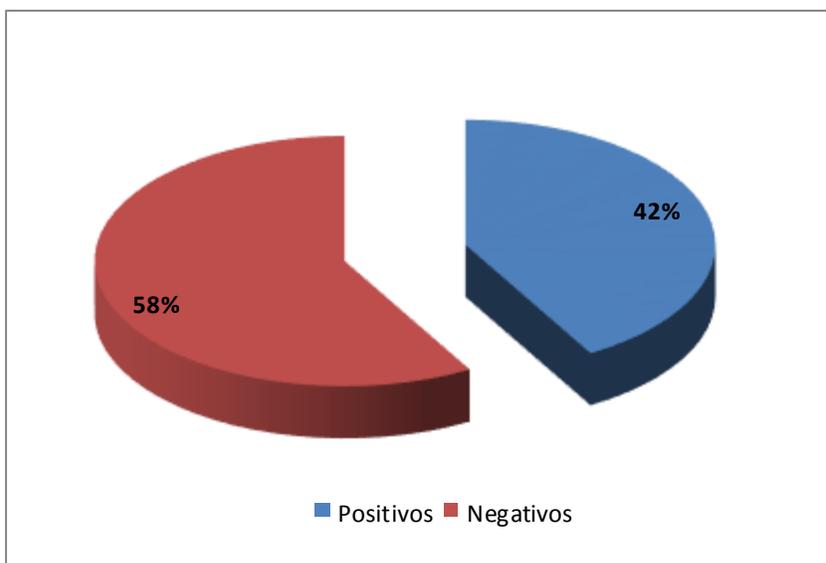


Figura 4: Porcentaje de muestras positivas obtenidas del análisis para la detección de *P. salmonis* en las fecas de *M. chilensis*.

Determinación del tiempo de permanencia de *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M. chilensis* en un ambiente controlado.

Utilizando el software estadístico SPSS, se realizó un modelo de regresión logística, utilizando el método Wald hacia atrás. Se considera como variable dependiente la presencia de *P. salmonis*. El día de evaluación fue incluido como co variable. El desarrollo del modelo se detalla en el Anexo I.

A partir del análisis se obtuvo la siguiente función.

Donde,

$$S = 0,413 - 0,03 * D$$

S: Puntuacion

D: Día

Esta función corresponde al puntaje que se obtiene para estimar la probabilidad de encontrar a *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M. chilensis*. Esta función de probabilidad corresponde a:

$$P = \exp(S) / (1 + \exp(S))$$

P: Probabilidad de que *P. salmonis* permanezca en *M. chilensis* un determinado periodo de tiempo.

Con un nivel de confianza de un 95% los resultados del análisis indican que la probabilidad de encontrar *P. salmonis* en los tejidos de *M. chilensis* disminuye de acuerdo el tiempo transcurre. Entre el día 0 y 5 se observa una probabilidad de entre un 57 y 60% de detectar *P. salmonis* en el tejido de *M. chilensis*. Desde el día 24 se observa la disminución de la probabilidad de detectar *P. salmonis* en los pools de glándula digestiva de *M. chilensis* analizados, hasta alcanzar un 21% y 17% de probabilidad los días 57 y 67 respectivamente (Fig. 6).

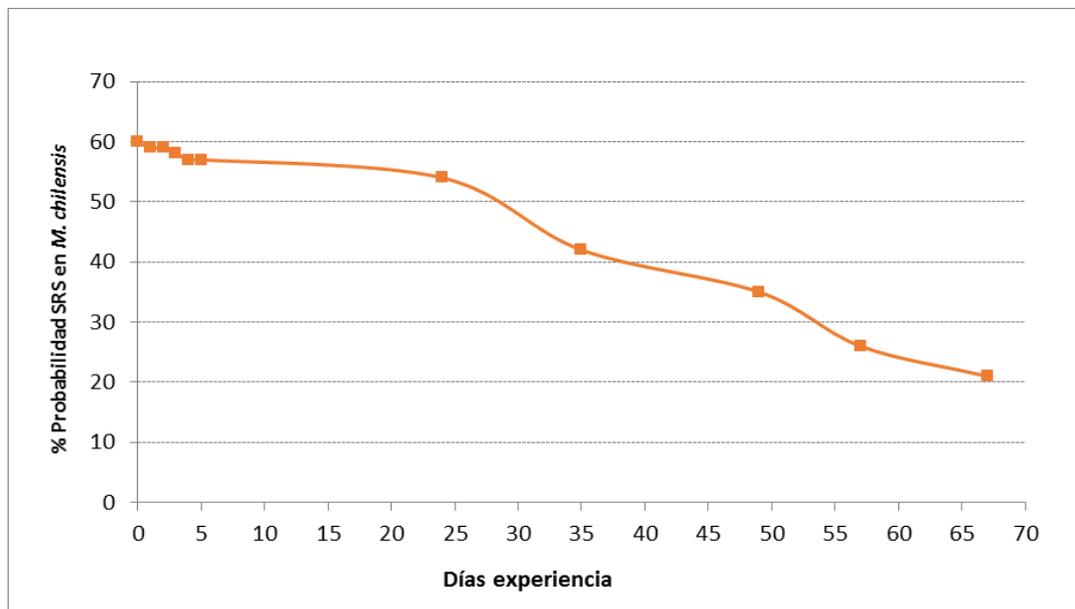


Figura 5: Probabilidad de que *P. salmonis* permanezca en *M. chilensis* un determinado periodo de tiempo.

DISCUSIÓN

El molusco bivalvo *Mytilus chilensis* constituye parte importante de la macrofauna que se acumula en el fouling de las estructuras flotantes de los centros de cultivo de salmónidos, formando parte del medio ambiente de los salmones en cultivo, y por lo tanto, están expuestos a factores propios de la actividad acuícola tales como productos metabólicos de los peces, trazas de alimento, productos farmacológicos, agentes patógenos, etc., los cuales son absorbidos por los moluscos al ser filtrados debido a su mecanismo de alimentación y respiración.

Diversos estudios han demostrado que los moluscos pueden acumular y retener en su organismo por un tiempo prolongado múltiples microorganismos, siendo algunos de estos patógenos, tales como virus y bacterias, como es el caso de *P. salmonis* los que quedan retenidos en el tracto digestivo de los moluscos al ser filtrados junto con el alimento. (Lee *et al.*, 2010, Abadías, 2013, Olafsen *et al.*, 1993, Mortensen, 1993). Existen diferentes factores que pueden influir en acumulación, retención y eliminación de microorganismos de los moluscos. La temperatura, la salinidad y la turbidez del agua, pueden influir en la tasa de filtración de los moluscos, lo que afectaría la tasa de eliminación del microorganismo. La temperatura promedio del agua de mantención de los moluscos en este ensayo fue de 15,6 °C, si consideramos que en cultivo celular la temperatura ideal para el desarrollo de la bacteria varía en rango entre 15 y 18 °C (OIE, 2000), podríamos esperar que una temperatura similar a la de este estudio favoreciera en alguna medida la mantención del patógeno en los tejidos de los moluscos. Sin embargo, ya que la temperatura fue practicamente constante con un promedio de 15,6 °C en todos los estanques de matención durante el periodo que duro el estudio y con una desviación estándar de 0,54 no se espera una significancia entre este factor y la detección de *P. salmonis* durante el tiempo de estudio, por lo que este factor no se incluyó en el modelo.

El tipo de microorganismo también es un factor a considerar. Skår & Mortensen, (2007), en su estudio desarrollaron un sistema en el que se agregaba una concentración conocida del virus ISA para comprobar si los moluscos acumulan el virus por filtración, mientras que en otro experimento los moluscos convivían con salmones infectados con ISA. En ambos casos los resultados indican que este virus no es acumulable por los moluscos estudiados, descartando de esta forma a los moluscos como reservorio de este virus. Mitchell *et al.*, (1966), por su parte utilizando un sistema de flujo constante de agua al cual se agregaba una cepa de poliovirus en una dosis conocida para su acumulación y se detenía el suministro de esta para su eliminación, demostró la capacidad de las ostras de concentrar partículas de poliovirus. Por otro lado, con bacterias se ha demostrado que el mejillón cebra tiene la capacidad de acumular en mayor cantidad bacterias *Escherichia coli* que *Enterococcus* sp justificando este hecho en la diferencia de tamaño de estas dos bacterias, siendo retenidas las de mayor tamaño (Abadías, 2013).

Respecto al tiempo de retención del agente patógeno en los tejidos de los moluscos, es preciso referirse a la depuración efectiva de los moluscos, si bien, Pina (2001), manifiesta que los procesos de descontaminación que eliminan patógenos como bacterias, protozoos, parásitos, y toxinas producidas por cianobacterias, se basan en la inmersión de los moluscos en agua de mar purificada por un periodo de 24 a 72 h, algunos estudios sobre Poliovirus e ISA virus en otras especies de moluscos bivalvos, reportan tasas de eliminación entre 12, 72 y 96 horas (Pina 2001; Skår & Mortensen, 2007). También, Nappier (2008) en su investigación indica que algunos virus entericos puede ser retenidos durante 29 días en *C. ariakensis* y durante 22 días en *C. virginica*. En el presente estudio al analizar los ejemplares de *M. chilensis*, mantenidos en un medio controlado, donde es posible detectar a *P. salmonis* a los 67 días, cabe considerar al tiempo de depuración como factor significativo respecto a la disminución de probabilidad de detectar a *P. salmonis* en un periodo de tiempo.

Respecto a la vía de evacuación de los patógenos desde los tejidos de moluscos Mortensen (1993) pudo aislar al virus IPN desde heces de *Pecten maximus*, previamente desafiados con el virus. Abadias (2013), por su parte observó que el mejillón cebra es capaz de acumular y depurar *E.coli* y *Enterococcus* sp transmitiendo las bacterias al agua esteril al cabo de 24 horas, pero que al someter al mejillón cebra a depuración su capacidad de infección es menor, probablemente por retener estas partículas para su alimentación. En el presente estudio fue posible detectar ADN bacteriano en las fecas sedimentadas en los estanques de mantención de los moluscos, aunque no fue medida la posibilidad de reinfección, se podría esperar un rol en la infección de otros moluscos o especies en un sistema de cohabitación por ayudar en la mantención del patógeno en el ambiente.

La Piscirickettsiosis está descrita en la “Lista 2” de enfermedades de alto riesgo para salmones en Chile. Si bien, en la actualidad existe un programa específico de vigilancia y control para Piscirickettsiosis (Sernapesca, 2013), éste establece medidas de control directas sobre las jaulas afectadas con esta enfermedad, como el retiro de mortalidad con mayor frecuencia, tratamientos farmacológicos, desdobles sanitarios, cosecha anticipada, entre otros, sin embargo no se hace mención al entorno de los centros, ni la frecuencia del cambio de mallas, donde se encuentra el fouling adherido. Cabe considerar en este punto el desconocimiento respecto del tiempo en que este agente patógeno puede permanecer viable en el ambiente. Así, zonas de concesiones que presenten un historial de brote de esta enfermedad podrían representar un factor de riesgo para la práctica de la Salmonicultura, reduciendo la eficiencia de las medidas de control de la enfermedad. También se desconoce del radio de diseminación del patógeno, dato importante de considerar, tal como en el caso de virus ISA, donde se ha estimado un radio de acción de 5 km de proximidad geográfica entre centros de cultivo, plantas faenadoras, etc., desde donde se presenten brotes de la enfermedad (OIE, 2006) el cual podría verse aumentado por el efecto de las corrientes marinas que al mismo tiempo de generar una renovación de la columna de agua favoreciendo las condiciones de cultivo, aporta en la diseminación de los microorganismos.

En este estudio no se consideraron los efectos de los tratamientos aplicados para el control de esta enfermedad en los centros de cultivo, como la aplicación de antibióticos a los peces enfermos y el posible efecto de los residuos que podrían ser igualmente filtrados por los moluscos presentes en el biofouling de las estructuras. Estos antecedentes podrían generar información valiosa para ser considerado como medida de control, referente a los moluscos que se encuentran adheridos en las estructuras flotantes de centros de salmones y/o a cultivos de mitílidos próximos a éstos.

La información respecto a los reservorios y vectores probables de los patógenos causantes de enfermedades de alto riesgo, da cuenta de la relación entre el ambiente producido por las condiciones de cultivo de peces y los patógenos, contribuye en generar medidas de control y erradicación de estas enfermedades que abarquen todos los frentes, no solo al agente y al huésped. Este estudio aporta datos sobre la detección, tiempo de retención y evacuación del patógeno, en el propósito de establecer el rol de *M. chilensis* en la transmisión del patógeno y su posible papel de reservorio en el ambiente.

Considerando que aunque *P. salmonis* genera patologías solo a peces, el ser descrita como una bacteria facultativa, entendiéndose esto como la capacidad reproducirse o sobrevivir en un medio que se lo permita, además de los antecedentes sobre su supervivencia in vitro en agua salada (Fryer y Lannan., 1994), replicación en líneas celulares de insectos (Birkbeck et al., 2004) y en el caso de este estudio, en que fue posible detectar su ADN en la glándula digestiva de *Mytilus chilensis* (Chorito), luego de 67 días de exposición a un medio libre de algún foco de infección, se podría describir a este molusco como un reservorio para *Piscirickettsia salmonis*.

CONCLUSIÓN

Se identifica la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en la glándula digestiva de *Mytilus chilensis*, proveniente del fouling de las estructuras flotantes de los centros de cultivo de salmónes que presentaron brote de la enfermedad Síndrome Rickettsial Salmonideo, siendo posible la detección durante al menos 67 días después de ser expuestos a un ambiente controlado.

Se detectó la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en las fecas generadas en los estanques de mantención, lo que indicaría que una de las posibles vías de evacuación de la bacteria son las heces desechadas por *Mytilus chilensis*.

Los resultados de este estudio, prueban que *Mytilus chilensis* podría actuar como un reservorio de *Piscirickettsia salmonis* agente de Piscirickettsiosis en centros de cultivo de salmónidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadias, J. 2013. Presencia y acumulación de microorganismos potencialmente patógenos en el mejillón cebrado de aguas superficiales de Aragón. Universidad de Zaragoza, Escuela de Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente, Área de Tecnologías del Medio Ambiente (Trabajo fin de Máster)

Almendras, F.E., Fuentealba, I.C., Jones, S.R.M., Markham, F. and 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

Alvarado, V., Schäfer, J.W., Enríquez, R., Monras, M., Cubillos, V., Farias, C y Alberdi, A. 1990. Síndrome del Salmón Coho (S.S.C.), nueva enfermedad de salmonídeos cultivados en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. Patología Animal 4: 10-13.

Aquaveplan, 2013. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Disease strategy: Piscirickettsiosis (Version 1). In: Australian Aquatic Veterinary Emergency Plan (AQUAVETPLAN), Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, ACT. Disponible en: <http://www.daff.gov.au/animal-plant-health/aquatic/aquavetplan/piscirickettsiosis>

Arkush, K.D., McBride, A.M., Mendonca, H.L., Okihiro, M., Andree, K.B., Marshall, S., Henríquez, V., Hedrick, R.P. 2005. Genetic characterization and experimental pathogenesis of *Piscirickettsia salmonis* isolated from white seabass *Atractoscion nobilis*. Diseases of Aquatic Organism. Vol. 63: 139–149, 2005S

Athanassopoulou, F., Groman, D., Prapas, Th., Sabatakou, O. 2004. Pathological and epidemiological observations on rickettsiosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from Greece. Journal of Applied Ichthyology. Vol: 20, Issue 6, pages 525–529.

Birkbeck, TH., Griffen, A., Reid, HI., Laidler, LA and Wadsworth, S. 2004. Growth of *Piscirickettsia salmonis* to High Titers in Insect Tissue Culture Cells. American Society for Microbiology. Infection and Immunity, p. 3693–3694 Vol. 72, No. 6.

Bravo S. & Campos M. 1989. Coho salmon syndrome in Chile. Fish Health Section Newsletter, American Fisheries Society 17, 3.

Bohle H, Tapia E, Martínez A, Rozas M, Figueroa A, Bustos P. 2009. *Francisella philomiragia*, bacteria asociada con altas mortalidades en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) cultivados en balsas-jaulas en el lago Llanquihue. Laboratorio de Diagnóstico y Biotecnología, ADL Diagnostic Chile Ltda., Puerto Montt, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria Vol: 41, 237-244.

Calderón Jully, de los Godos L. 2009. Regresión logística aplicada a la epidemiología, Revista Salud, Sexualidad y Sociedad Vol: 1(4).

Cubillos, V., Farías C., Alberdi A., Alvarado V., Schäfer W. y M. Monrás. 1990. Características anatomopatológicas del síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de los salmonídeos. Patología Animal 4: 14-17.

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

Fryer, JL & Lannan, CL. 1994. Rickettsial and Chlamydial Infections of Freshwater and Marine Fishes, Bivalves, and Crustaceans. Zoological Studies 33(2): 95-107.

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

González, R.R., Ruiza, P., Llanos-Riveraa, A., Cruzata, F., Silva, J., Astuyaa, A., Grandóna, M., Jara, D., Aburto, C. 2011. ISA virus outside the cage: ichthyofauna and other possible reservoirs to be considered for marine biosafety management in the far-southern ecosystems of Chile. Aquaculture, 318(1), 37-42.

Helm, M., Bourne, N., y Lovatelli, A. 2006. Cultivo de Bivalvos en Criadero. Manual Práctico. FAO Documento Técnico de Pesca, Número 471. FAO, Roma, Italia.

Instituto Nacional de Estadística. 2012. Indicador de Actividad Económica Regional (Inacer), Boletines trimestrales Octubre- Diciembre 2012. Disponible en: http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/territorio/inacer/inacer.php

Larenas, J., Contreras, J., Oyanedel, S., Morales, M.A. 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en Truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. Archivos de Medicina Veterinaria 29:113-119.

Larenas, J., Zamorano, E., Smith, P. 2005. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. Mon. Electr. Patol. Vet. 2005; 2(1):59-67

Leal, J., Woywood, D. 2007. Piscirickettsiosis en Chile: Avances y perspectivas para su control. SalmoCiencia 2, 34-42.

Lee R, Lovatelli A, Ababouch L. 2010. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. FAO Documento Técnico de Pesca y Acuicultura. No. 511.

Mauel MJ., Miller DL., Frazier K., Liggett AD., Styer L., Montgomery- Brock D., Brock J. 2003. Characterization of a piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. *Diseases of Aquatic Organism* 53, 249-255.

Mauel MJ., Ware C., Smith P. 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *J Vet Diagn Invest* 20, 213-214.

Marshall SH, P Conejeros, M Zahr, J Olivares, F Gómez, P Cataldo, V Henríquez. 2007. Immunological characterization of a bacterial protein isolated from salmonid fish naturally infected with *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine* Vol: 25, 2095-2102.

Madigan, MT., Matinko JM., Parker, J. 2004. Brock. *Biología de los microorganismos*. Vol:184 pp. 303, 312 pp.

Metcalf, T. G. & Stiles, W. C. 1965. The accumulation of enteric viruses by the oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Infectious Diseases*, 115: 68-76.

Meyers TR 1984. Marine bivalve mollusks as reservoirs of viral finfish pathogens: significance to marine and anadromous finfish aquaculture. *Mar Fish Rev* 46:14–17

Mitchell J.R., Presnell M.W., Akin E., Cummins J.M., Liu O.C. 1966. Accumulation and elimination of poliovirus by eastern oyster. *American Journal of Epidemiology* Vol: 84, Issue 1Pp. 40-50.

Mikalsen J, O Skjaervik, J Wiik-Nielsen, MA Wasmuth, DJ Colquhoun. 2008. Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiology Letters* Vol: 278, 43-47.

Mortensen, S .1993. Passage of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) through invertebrates in an aquatic foodchain. *Dis Aquat Org* 16:41–45.

Muncoacuicola. 2009. Conferencia: Primer Estudio Epidemiológico de ISAv en Chile. Primer Congreso Internacional de virus ISA y Bioseguridad. Ver en: <http://www.mundoacuicola.cl/comun/index.php?modulo=3&view=1&cat=5&idnews=184>

Nappier, S., Graczyk, T and Schwab, K. 2008. Bioaccumulation, Retention, and Depuration of Enteric Viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6825–6831. Vol. 74, No. 22

Nylund A., Hovland T., Hodneland K., Nilsen F., Levik P. 1994. Mechanisms for transmission of infectious salmon anaemia (ISA). *Diseases of aquatic organisms*. Vol: 19, 95-100.

Office International des Epizooties (OIE), 2000. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Sección 2.2. Enfermedades de los moluscos capítulo i.2 . p 297-299.

Office International des Epizooties (OIE) 2006. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. CAPÍTULO 2.1.13 PISCIRICKETTSIOSIS (Piscirickettsiasalmonis). p 250-254.

Office International des Epizooties (OIE) 2012. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. Capítulo 2.3. p 9-10.

Olafsen JA., Mikkelsen HV., Giæver HM and Hansen GH.1993. Indigenous Bacteria in Hemolymph and Tissues of Marine Bivalves at Low Temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 59(6):1848.

Oelckers K., Vike S., Duesund H., Gonzalez J., Nylund A, Yany G. 2013. *Caligus rogercresseyi*: Posible vector en la Transmisión horizontal del virus de la Anemia infecciosa del salmón (ISAV). Ciencia y Tecnología para una Acuicultura Sostenible. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Acuicultura. Universidad Austral de Chile 282-283.

Perea, JA. 2009. Enfermedades Infecciosas. Curso académico 2009-2010. Introducción a las enfermedades infecciosas. Disponible en: <http://www.uco.es/dptos/sanidad-animal/img/infecciosas/tema1.pdf>

Pina, S. 2001. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Universidad de Barcelona, Departamento de Microbiología Facultad de Biología. (Tesis Doctoral).

Plarre H., 2011. Infectious salmon anaemia virus (ISAV): Evolution, genotyping, reservoirs and transmission. Heidrun Plarre. Dissertation for the degree philosophiae doctor (PhD) at the University of Bergen.

Power U.F., Collins J.K. 1990. Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. Appl Environ Microbiol, Vol : 56:803-807.

Raoult, D and Roux, V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. Vol: 10(4):694.

San Martín, B., Yatabe, T., Gallardo, A., Medina, P. 2010. Manual de buenas prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena. Laboratorio de Farmacología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, 35pp.

Servicio nacional de pesca (Sernapesca).2007. Medidas de Bioseguridad con el fin de evitar la diseminación del Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAV). Ver en: http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=642&func=fileinfo&id=1960

Servicio nacional de pesca (sernapesca).2008. Balance de la Situación Sanitaria de la Anemia Infecciosa del Salmón en Chile de Julio del 2007 a Julio del 2008. 28 pp. Ver en: http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=2659.

Servicio nacional de pesca (Sernapesca). 2010. Manual de buenas prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena. Ver en: http://www.aqua.cl/files/cab28a_Manual.pdf

Servicio nacional de pesca (Sernapesca). 2013. Programa sanitario específico de vigilancia y control de Piscirickettsiosis (PSEVC-PISCIRICKETTSIOSIS). Ver en: http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=6726

Schäfer, J.W., V. Alvarado; R. Enríquez y M. Monras. 1990. The "Coho Salmon Syndrome" (C.S.S.): a new disease in Chilean salmon reared in sea water. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 10: 130.

Skår, C.K. and Mortensen, S., 2007. Fate of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in experimentally challenged blue mussels *Mytilus edulis*. Diseases of aquatic organisms. Vol: 74,1-6.

Smith, P.A., Pizarro, P., Ojeda, P., Contreras, J., Oyanedel, S., Larenas, J. 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms 37: 165-172.

Subsecretaria de pesca (subpesca), 2001. Reglamento de medidas de protección, control y erradicación de enfermedades de alto riesgo para las especies hidrobiológicas. Ver en: <http://www.subpesca.cl/mostrarchivo.asp?id=3445>.

Tierney J.T., Sullivan R., Peeler J.T., Larkin E.P. 1982. Persistence of poliovirus in shellstock and shucked oysters stored at refrigeration temperature. J Food Prot, 45:1135-1137.

Vaneechoutte, M. y Eldere, J.V. 1997. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. Journal of Medicine Microbiology. Vol: 46: 188-194.

Wigodski T. S., Herdener P M. 2009. La Industria del Salmón, el Virus ISA y la Transparencia en la Información al Mercado: Caso Multiexport.

ANEXOS

Anexo I

Resultados entregados por el software SPSS:

Modelo de regresión logística que considera como variable dependiente la presencia de *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M chilensis*, el día de análisis fue incluido como covariable. Se usará el método Wald hacia atrás, que descarta a la variable que presente un ajuste menor con el modelo generado.

El software entrega el siguiente informe de resultados:

Regresión logística

Tabla 6: Resumen del procesamiento de los casos

Casos no ponderados	N	Porcentaje
Incluidos en el análisis	96	100,0
Casos seleccionados	0	,0
Casos perdidos		
Total	96	100,0
Casos no seleccionados	0	,0
Total	96	100,0

- Si está activada la ponderación, consulte la tabla de clasificación para ver el número total de casos.
- La variable Region_11 es constante para los casos seleccionados. Como se ha especificado un término constante, la variable se eliminará del análisis.

Tabla 7: Codificación de la variable dependiente

Valor original	Valor interno
0	0
1	1

Bloque 0: Bloque inicial

Tabla 8: Tabla de clasificación de Pooles evaluados^{a,b}

	Observado	Pronosticado		
		Presencia		Porcentaje correcto
		0	1	
Paso 0	Presencia 0	0	46	,0
	Presencia 1	0	50	100,0
	Porcentaje global			52,1

a. En el modelo se incluye una constante.

b. El valor de corte es ,500

Tabla 9: Variables en la ecuación de regresión.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 0 Constante	,083	,204	,167	1	,683	1,087

En el bloque inicial 0, la ecuación de regresión sólo incluye el parámetro estimado $\beta_0 = 0,083$, el error estándar E.T = 0,204 y la significación estadística con la prueba de Wald, que sigue una ley Chi-cuadrado con 1 grado de libertad, y la estimación de la OR = 1,087.

Tabla 10: Variables que no están en la ecuación de regresión.

	Puntuación	gl	Sig.
Paso 0 Variables Día	6,445	1	,011
Estadísticos globales	6,445	1	,011

Variables que no están asociadas en la ecuación de regresión según la significación estadística asociada al índice de Wald.

Bloque 1: Método = Por pasos hacia atrás (Wald)

Tabla 11: Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo.

		Chi cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Paso	6,747	1	,009
	Bloque	6,747	1	,009
	Modelo	6,747	1	,009

Se muestra una tabla chi-cuadrado que evalúa la hipótesis nula de que los coeficientes β_i de todos los términos (excepto la constante) incluidos en el modelo son cero.

Tabla 12: Coeficientes de determinación.

Paso	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	126,171 ^a	,068	,091

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 3 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

Los coeficientes de determinación indican que el 6,8% o el 9,1% de la variación de la variable dependiente es explicada por las variable incluida en el modelo.

Tabla 13: Tabla de clasificación de los pooles evaluados ^a

		Observado	Pronosticado		
			Presencia		Porcentaje correcto
			0	1	
Paso 1	Presencia	0	15	31	32,6
		1	5	45	90,0
	Porcentaje global				62,5

a. El valor de corte es ,500

Clasificación de las muestras según la concordancia de los valores observados con los estimados por el modelo. El modelo tiene una especificidad del 62% y una sensibilidad del 32,6. Con la constante y una única variable predictora (Dia), el modelo a clasificado correctamente a un 62,5 % de los casos, cuando el punto de corte de la probabilidad de Y calculada se establece en 50% (0,5).

Tabla 14: Variables en la ecuación de regresión

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1 ^a Día	-,030	,013	5,667	1	,017	,971
Constante	,413	,244	2,865	1	,091	1,511

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Día.

La tabla entrega las variables incluidas en la ecuación de regresión, los coeficientes de regresión con sus errores estándar (ET), el valor del estadístico de Wald para evaluar la hipótesis nula ($\pi = 0$), la significación estadística asociada, y el valor de la OR= $\exp(\beta_i)$.

El método asigna un puntaje a cada variable, y aquellas que tienen mayor puntaje son las que entran en la ecuación, en este caso la variable día.
Sólo itero una vez por lo que el modelo entregado es:

$$S = 0,413 - 0,03 * D$$

S: Score

D: Día

Esta función corresponde al puntaje que se obtiene para estimar la probabilidad encontrar a *P salmonis* en tejidos de *M chilensis*.

P: probabilidad de que *P salmonis* prevalezca en *M chilensis* un determinado periodo de tiempo.

$$P = \exp(S) / (1 + \exp(S))$$

Tabla 15: Probabilidad de que *P. Salmonis* prevalezca en *M. chilensis* un determinado periodo de tiempo.

Día	Puntaje (S)	Probabilidad
0	0,413	0,60
1	0,383	0,59
2	0,353	0,59
3	0,323	0,58
4	0,293	0,57
9	0,143	0,54
24	-0,307	0,42
35	-0,637	0,35
49	-1,057	0,26
57	-1,297	0,21
67	-1,597	0,17

La probabilidad de encontrar *P. salmonis* en la glándula digestiva de *M. chilensis* disminuye de acuerdo el tiempo transcurre. Entre el día 0 y 5 se observa una probabilidad de entre un 57 y 60% de detectar *P. salmonis* en la glandula digestiva de *M. chilensis*. Desde el día 24 se comienza a observar la disminución de la probabilidad de detectar *P. salmonis* en los pooles de glándula digestiva de *M. chilensis* analizados, hasta alcanzar un 21% y 17% de probabilidad los días 57 y 67 respectivamente.

Anexo II

Detalle de resultados de PCR observados en electroforesis en gel de agarosa al 2%.

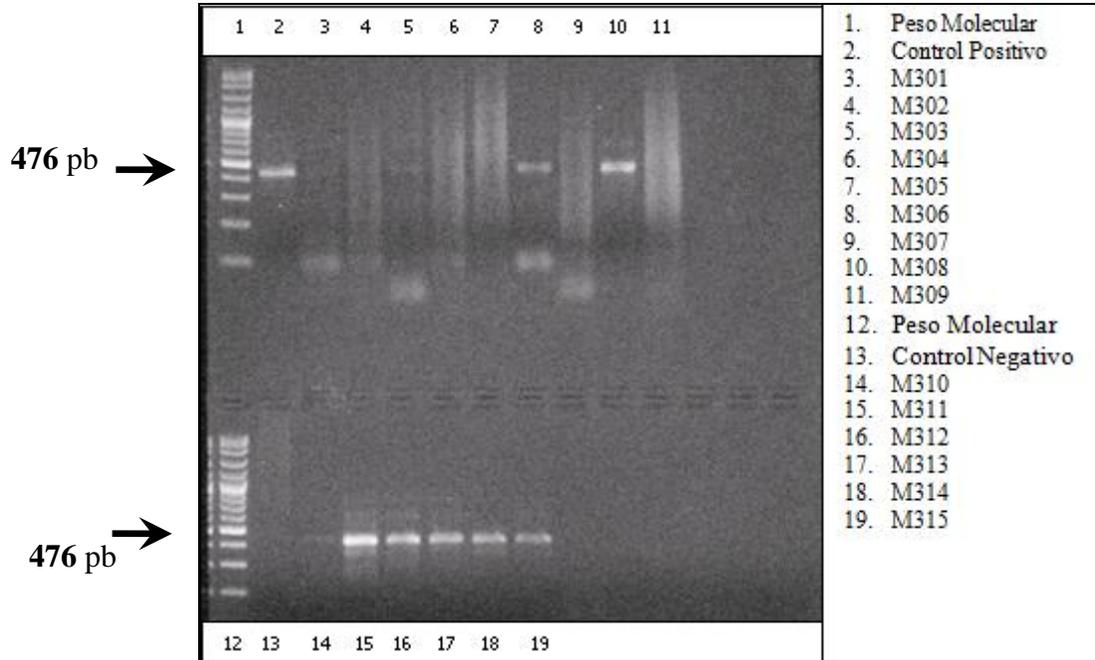


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa para muestras correspondientes al día cero, antes de exponer a los moluscos a un ambiente controlado. Carril 1 y 12, Peso Molecular, Carril 2 y 13 Controles Positivo y negativo respectivamente.

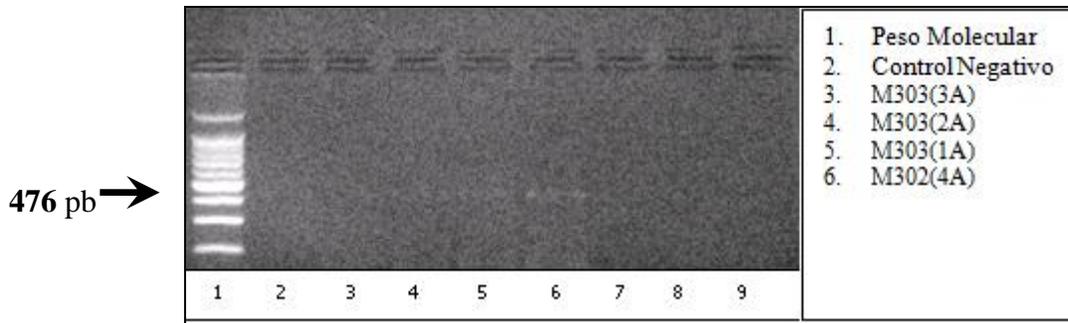


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa para muestras correspondientes al día uno. Moluscos expuestos a un ambiente controlado. Carril 1: Peso Molecular, Carril 2 control negativo.

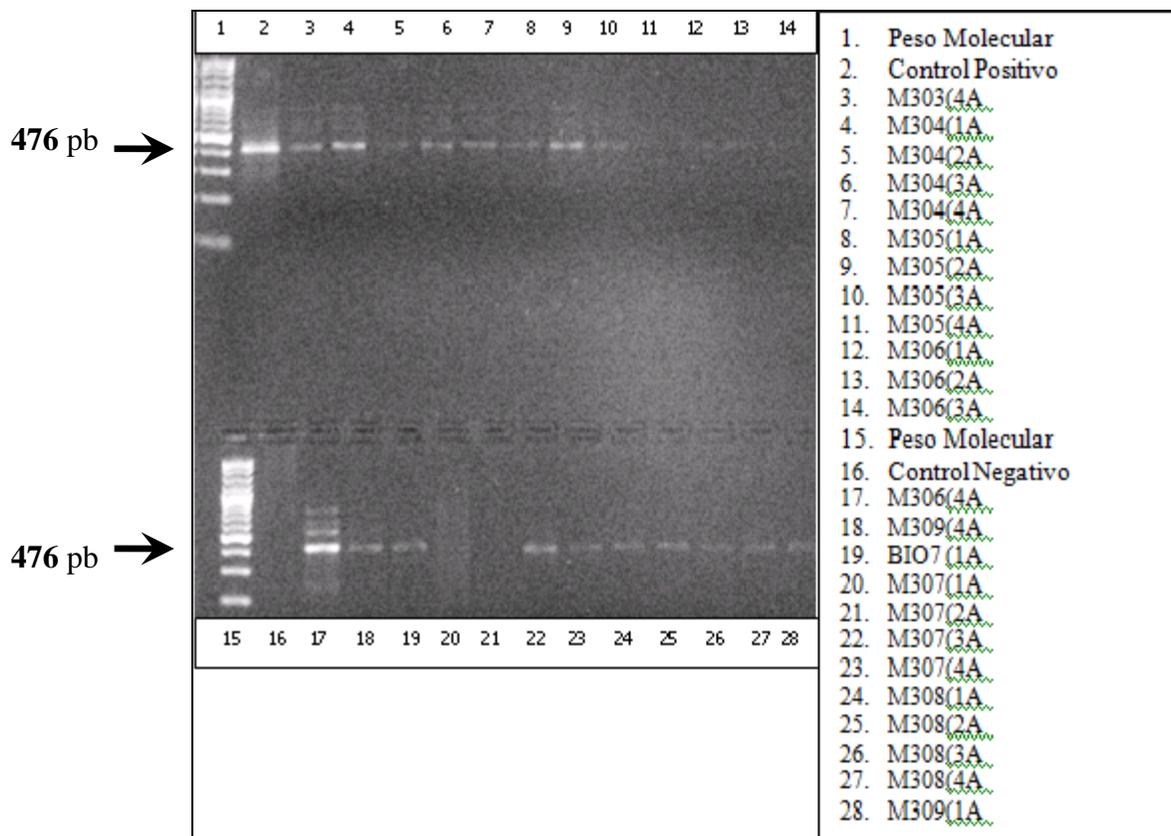


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa para muestras, correspondientes a los días dos y tres. Moluscos expuestos a un ambiente controlado. Carril 1 y 15: Peso Molecular, Carril 2 y 16 control positivo y negativo, respectivamente.

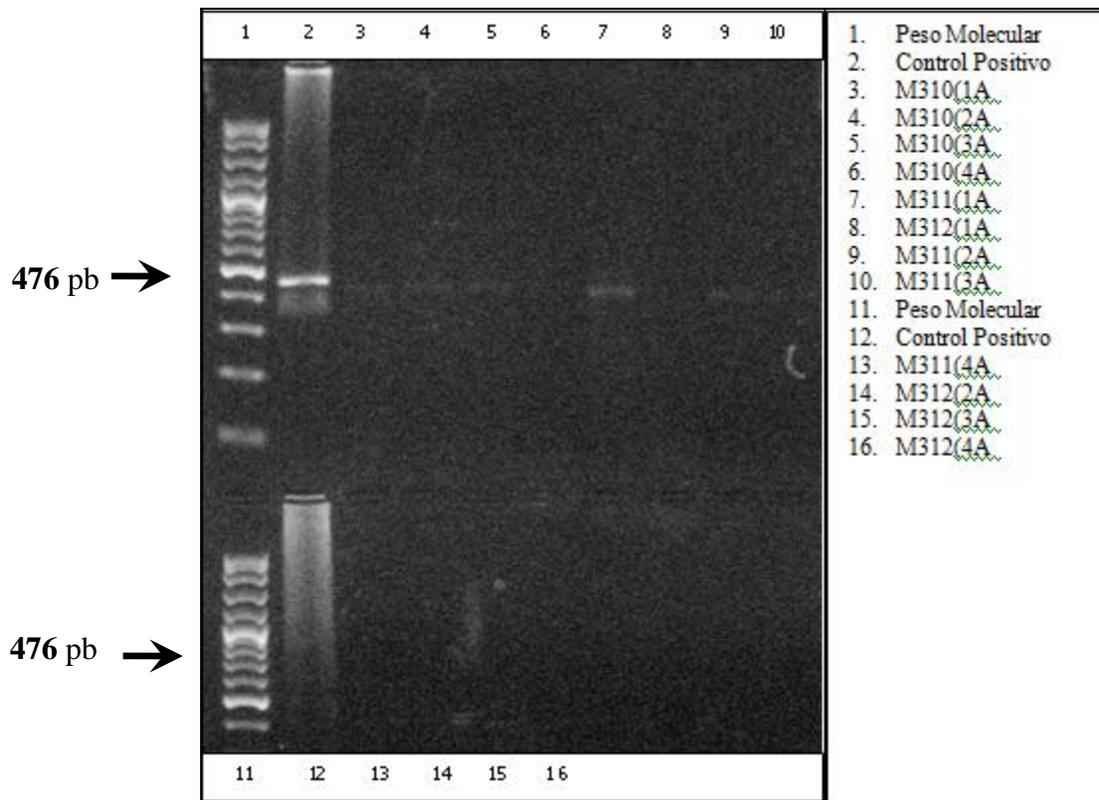


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa para muestras correspondientes al día cuatro. Moluscos expuestos a un ambiente controlado. Carril 1y 11: Peso Molecular, Carril 2 y 12 control positivo y negativo, respectivamente

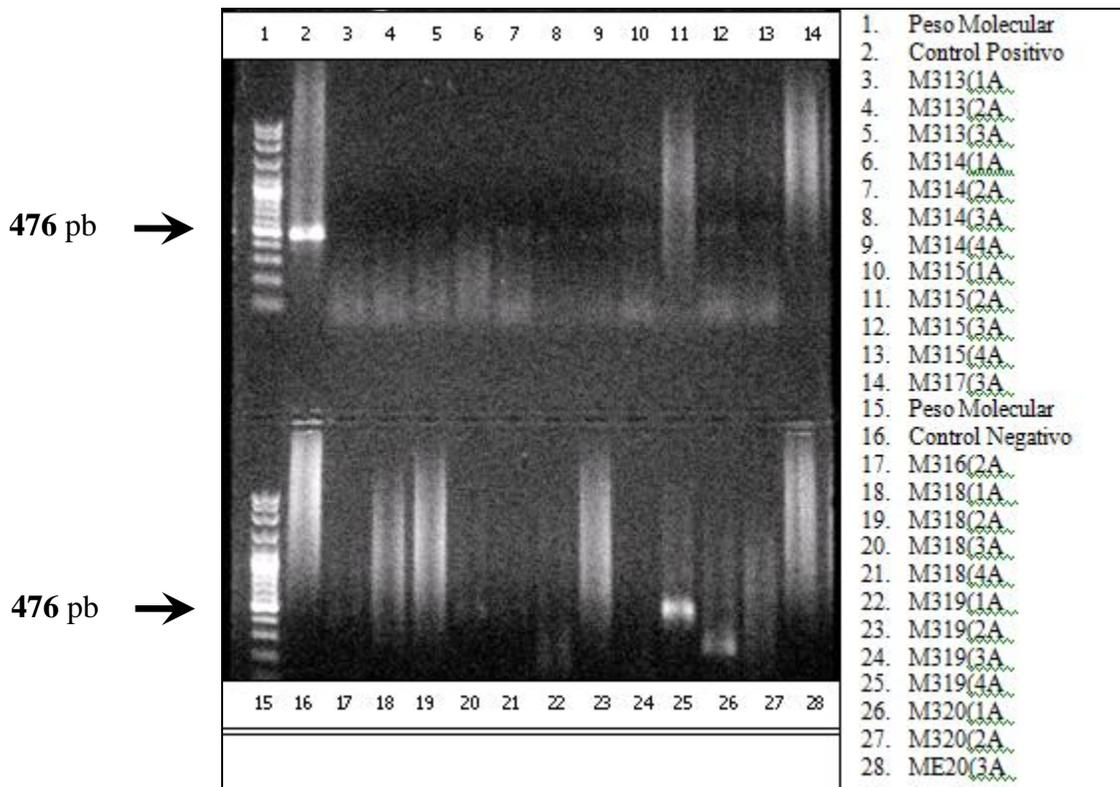


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa para muestras correspondientes al día cinco, nueve, 24, 35, 49. Moluscos expuestos a un ambiente controlado. Carril 1 y 15: Peso Molecular, Carril 2 y 16 control positivo y negativo, respectivamente.

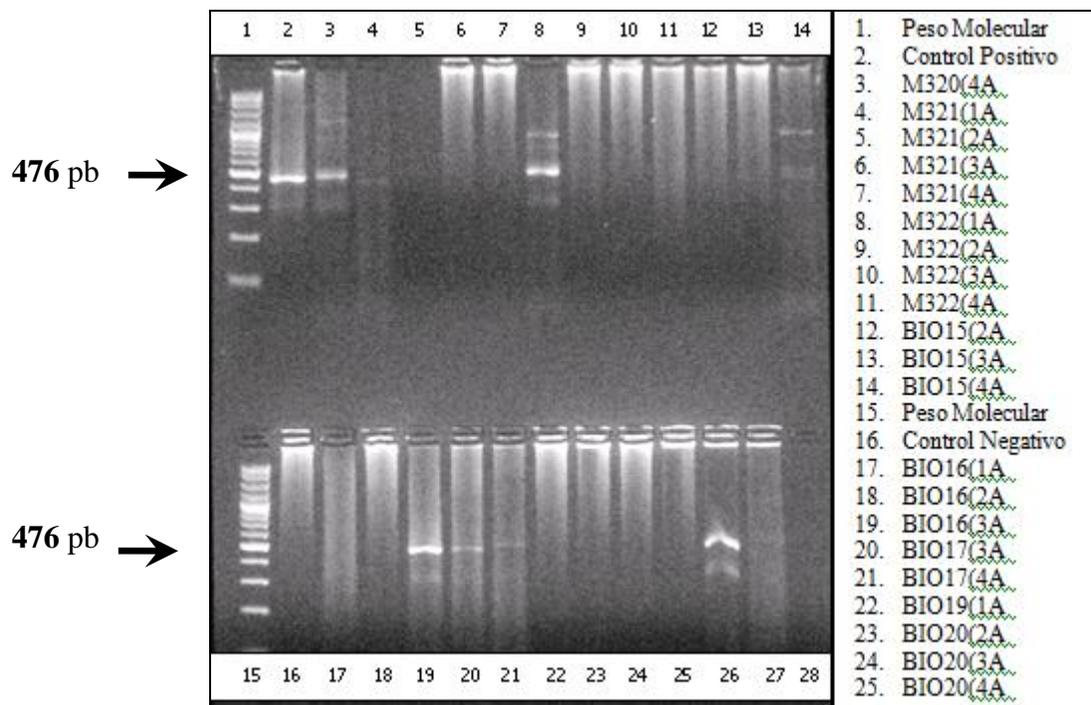


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa para muestras correspondientes al día 49, 57 y 67. Moluscos expuestos a un ambiente controlado. Carril 1y 15: Peso Molecular, Carril 2 y 16 control positivo y negativo, respectivamente

Anexo III

Tabla 16: Registro de temperatura (°C) del agua en los estanques de mantención de *M. chilensis*.

Dia	Temperatura °C			
	Estanque 1	Estanque 2	Estanque 3	Estanque 4
1	15,0	15,0	15,0	15,0
2	16,3	16,3	16,3	16,3
3	16,0	16,0	15,7	15,7
4	16,3	16,3	16,3	16,3
5	15,3	15,3	15,3	15,3
9	15,5	15,5	15,5	15,5
24	15,0	15,0	15,0	15,0
35	16,3	16,3	16,3	16,3
49	15,0	15,0	15,0	15,0
57	15,3	15,3	15,3	15,3
67	15,6	15,6	15,6	15,6
Promedio	15,6	15,6	15,6	15,6
Desviacion estandar	0,55	0,55	0,53	0,53

