

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

Frecuencia de *Piscirickettsia salmonis* en truchas de cultivo (*Oncorhynchus mykiss*) en el departamento de Junín

TESIS

para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR:

Jefferson Yunis Aguinaga

Lima – Perú

2010

DEDICATORIA

**Dedico este trabajo a mis padres que siempre creyeron en mí
y me apoyaron incondicionalmente en todos
mis proyectos, contribuyendo
a alcanzar mis
metas.**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Nieves Sandoval, por los conocimientos brindados,
paciencia, buen humor y ejemplo.

A los doctores Hermelinda Rivera, Alberto Manchego, Merci Ramírez y
Siever Morales; por la ayuda brindada en la elaboración de este trabajo.

A mis grandes amigos de la facultad Aldo, Diana, Fio, Gina,
Jahir, Marino, Randolph, Rony y Veronica;
no estuviera escribiendo estas palabras
sin su ayuda y amistad.

A mi familia, por ser mi inspiración.

ÍNDICE.....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS.....	vi
LISTA DE ANEXOS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA.....	3
2.2. TRUCHA ARCOÍRIS.....	6
2.3. PISCIRICKETTSIOSIS.....	8
2.3.1. Antecedentes históricos.....	8
2.3.2. Etiología.....	9
2.3.2.1. Taxonomía.....	10
2.3.2.2. Características de cultivo.....	12
2.3.2.3. Biotipos.....	12
2.3.3. Signos clínicos.....	13
2.3.4. Lesiones.....	14
2.3.5. Patogénesis.....	15
2.3.5.1. Caracterización antigénica.....	15
2.3.5.2. Patogenia.....	16
2.3.6. Aspecto epidemiológico.....	16
2.3.6.1. Transmisión.....	17
2.3.6.2. Susceptibilidad.....	17
2.3.6.3. Rango de hospederos.....	17
2.3.6.4. Distribución geográfica.....	19
2.3.7. Diagnóstico.....	20
2.3.8. Prevención y control.....	21

2.3.8.1. Prevención.....	22
2.3.8.2. Control.....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Lugar de estudio.....	23
3.2. Animales y muestras.....	24
3.3. Tamaño de muestra.....	24
3.4. Característica de la muestra.....	25
3.5. Metodología.....	26
3.5.1. Obtención de muestras.....	26
3.5.2. Procesamiento de muestras.....	26
3.5.2.1. Diagnóstico por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Análisis de agua.....	28
4.2. Examen de necropsia.....	29
4.3. Diagnóstico por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	35
5. DISCUSIÓN.....	36
6. CONCLUSIONES.....	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39
8. ANEXOS.....	45

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia del agente *Piscirickettsia salmonis* en truchas de cultivo (*Oncorhynchus mykiss*) en la cuenca del río Mantaro en el departamento de Junín mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. Se escogieron 180 truchas arco iris de manera aleatoria de tres piscigranjas de la cuenca (60 animales en cada una), las cuales fueron beneficiadas y necropsiadas, se colectaron asepticamente muestras de riñón y bazo. Los tejidos fueron sometidos a la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para determinar la presencia de la bacteria. Los signos clínicos más saltantes fueron úlceras en la piel, melanosis, nado irregular y en la superficie del agua, abultamiento del abdomen y exoftalmia. Las lesiones mas resaltantes fueron hemorragias petequiales en hígado, ciegos pilóricos y grasa abdominal, úlceras en la piel además de esplenomegalia y palidez hepática. El 100% de las muestras de truchas arcoíris resultaron negativas a la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. El resultado indica que este agente no esta presente en las piscigranjas evaluadas o su prevalencia fue muy baja y no pudo ser detectada.

Palabras clave: *Piscirickettsia salmonis*, *Oncorhynchus mykiss*, Junín, Inmunofluorescencia Indirecta.

ABSTRACT

This study aimed to determinate the presence of *Piscirickettsia salmonis* agent in culture rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Mantaro river basin in the region of Junin by Indirect Immunofluorescence test. Kidney and spleen samples at random of 180 culture rainbow trout from three fish farms of the basin (60 animals in each) were taken. The most outstanding clinical signs were sores on the skin, melanosis, irregular swimming in the water surface, swelling of the abdomen and exophthalmoses. The most outstanding lesions were petechial hemorrhage in liver, pyloric caeca and spleen, in addition to splenomegaly and pale liver. 100% of rainbow trout samples were negative for *Piscirickettsia salmonis*. The result indicates that this agent is not present in fish farms evaluated or the prevalence was very low and could not be detected.

Keywords: *Piscirickettsia salmonis*, *Oncorhynchus mykiss*, Junin, Indirect Immunofluorescence.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cosecha de trucha arcoíris en el Perú desde 1993 a 2008 expresada en Toneladas Métricas (TM)

Tabla 2. Exportaciones anuales de trucha arcoíris desde el Perú (1994-2008)

Tabla 3. Especies acuáticas donde se ha reportado la presencia de *Piscirickettsia salmonis*. Adaptado de Larenas *et al*, 1998

Tabla 4. Reportes de RLO en el mundo. Adaptado de Fryer y Mael, 1997

Tabla 5. Tamaño de muestra aleatoria en función de la supuesta prevalencia del patógeno en el lote, adjudicando a la técnica un 100% de sensibilidad y especificidad. Información obtenida del Manual de Animales Acuáticos de la OIE, 2006.

Tabla 6. Resultados del análisis de agua

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Relación filogenética de rickettsias de acuerdo al manual de Bergey y el análisis basado en la secuencia del gen RNA ribosomal 16S (Modificado de La Scola y Raoult, 1997)

Figura 2. Exoftalmia en trucha arco iris.

Figura 3. Melanosis en trucha arco iris.

Figura 4. Melanosis en trucha arco iris.

Figura 5. Abdomen abultado en trucha arco iris.

Figura 6. Abdomen abultado en trucha arco iris.

Figura 7. Úlceras en piel en trucha arco iris.

Figura 8. Úlceras en piel en trucha arco iris.

Figura 9. Nado superficial en trucha arco iris.

Figura 10. Nado superficial en trucha arco iris.

Figura 11. Palidez hepática en trucha arco iris.

Figura 12. Focos hemorrágicos en hígado de trucha arco iris.

Figura 13. Hemorragia petequial en hígado, ciegos pilóricos y grasa abdominal de trucha arco iris.

Gráfica 1. Producción acuícola continental por especies. Información obtenida del Ministerio de Producción.

Gráfica 2. Producción de trucha arcoíris en el Perú desde 1993 a 2008 expresada en Toneladas Métricas (TM)

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de Piscirickettsiosis mediante el kit SRS-FluoroTest Indirecto™ de BIOS Chile™

Anexo 2. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia. Piscigranja El edén.

Anexo 3. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia. Piscigranja Arco iris.

Anexo 4. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia. Piscigranja Rumihuasi.

LISTA DE ABREVIATURAS

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

CHSE-214: Células embrionadas de salmón chinook (Del inglés: "Chinook salmon embryo")

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Del inglés: "Food and Agriculture Organization")

TM: Toneladas Métricas

RLO: Organismos rickettsia-like (Del inglés: "Rickettsia like-organisms")

HE: Hematoxilina-Eosina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico (Del inglés: "Ribonucleic Acid")

CPE: Efectos citopáticos (Del inglés: "Cytopathic effect")

CHH-1: Corazón de salmón Chum (Del inglés: "Chum salmon heart")

RTG-2: Gónada de Trucha arco iris (Del inglés: "Rainbow trout gonad")

EPC: Epitelioma papiloso de ciprínidos (Del inglés: "Epithelioma papulosum cyprini")

FHM: "Fathead minnow"

TCID50: Dosis infectiva de cultivo celular (Del inglés: "Median tissue culture infective dose")

BFCG: Agar sangre de cordero, suero fetal bovino, cisteína y glucosa

DMDS: Diatrizoato de meglumina y diatrizoato de sodio

MLT: Transglicosidasa lítica de membrana (Del inglés: "Membrane-bounded lytic transglycosylase")

TBP: Proteína B de unión a la transferrina (Del inglés: "Transferrin-binding protein")

ATP: Adenosintrifosfato

NAD: Nicotinamida-adenina-dinucleótido

UDPG: Uridina-5'-difosfoglucosa

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés: "Polymerase Chain Reaction")

IFAT: Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (Del inglés: "Indirect Fluorescent Antibody Technique")

i.p.: Inoculación intraperitoneal.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la acuicultura en el Perú ha alcanzado un gran desarrollo, lo cual se ve reflejado en el aumento de derechos otorgados en hectáreas de espejos de agua aptas para el desarrollo de la acuicultura (PRODUCE, 2008). Así dentro del ámbito continental, el principal producto cultivado es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), siendo Puno y Junín los principales departamentos dedicados al cultivo de esta especie.

Este crecimiento en la acuicultura debe implicar así mismo la sanidad, ya que influye directamente sobre índices productivos y reproductivos de los peces. En nuestro país, el conocimiento del estatus sanitario de truchas aún está desarrollándose, es por ello que estudios relacionados a enfermedades infecciosas y no infecciosas son de gran repercusión.

Entre las enfermedades comunes en los principales países productores de trucha, se encuentra la Piscirickettsiosis. A pesar de no encontrarse actualmente dentro de las enfermedades con notificación obligatoria de la OIE, sigue siendo de gran importancia económica a nivel mundial, por las mermas que ocasiona en la producción.

En el Perú, el agente *Piscirickettsia salmonis* representa un riesgo para la crianza de trucha arcoíris debido a la constante importación de ovas que podría permitir el ingreso de la enfermedad a alguna instalación ocasionando problemas y pérdidas económicas. No existen estudios preliminares específicos acerca de esta bacteria en el país, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de este agente en la cuenca del Mantaro.

La técnica de Inmufluorescencia indirecta ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de *Piscirickettsia salmonis*, además de ser una prueba de relativo bajo costo y de fácil manejo.

Se considero importante en este trabajo realizar a manera de tamiz, la detección de *Piscirickettsia salmonis*, por medio de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta, en contribución a un mejor conocimiento del estado sanitario de la trucha arcoíris en el país.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

2.1. Situación Actual de la Acuicultura

La producción mundial de acuicultura reporto un incremento de 6.3% anuales (FAO, 2003), así mismo, la actividad de acuicultura en el Perú se ha venido incrementando en los últimos años. A finales del año 2000, se encontraba con 1 115 derechos otorgados en 10 809 hectáreas de espejo de agua vigentes, actualmente existen 3 130 derechos de acuicultura en 23 103.65 hectáreas de espejo de agua, lo cual señala que la actividad de acuicultura se está convirtiendo en una alternativa para el desarrollo de la población (MinProd, 2008a).

En el 2002, según informes de la FAO, sesenta y cuatro países se dedican a la producción de trucha arcoíris pero muchos de estos en menor escala en comparación a los principales centros de producción de trucha como Europa, Norteamérica, Chile, Japón y Australia (FAO, 2009).

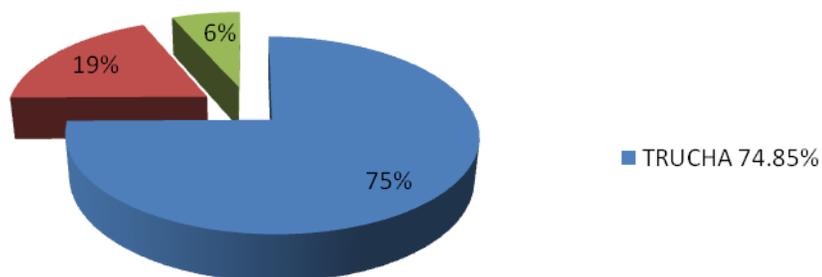
Dentro de las especies piscícolas cultivadas en nuestro país, la trucha es la especie que ha alcanzado un importante desarrollo en diversas regiones, principalmente en zonas altoandinas y su cultivo está dirigido al mercado local como al de exportación. Existen otras especies producidas en zonas tropicales tales como la gamitana, paco y boquichico y finalmente la tilapia que es cultivada en la selva alta y en la costa norte del país (MinProd, 2008a).

A nivel nacional, la producción acuícola continental ha venido incrementándose, así para el año 2007 ascendió a 9 348.67 TM, un incremento de 23.65% con relación al año 2006, dentro de esto, predomina la producción de trucha (74.85%) seguida de la tilapia (18.62%) y otras especies tropicales (6.53%). Las principales empresas dedicadas al cultivo de la trucha se encuentran en Puno y Junín (MinProd, 2008a).

La región Junín, en la sierra central del Perú, es una de las más importantes zonas de producción de truchas del país, está conformada por asociaciones y piscifactorías, las cuales

lograron producir en el año 2003, 1337 TM, en el año 2006, 1651 TM y en el año 2008, 2078 TM (MinProd, 2008b).

PRODUCCION ACUICOLA CONTINENTAL - PERÚ 2007



Gráfica 3. Producción acuícola continental por especies. Información obtenida del Ministerio de Producción.

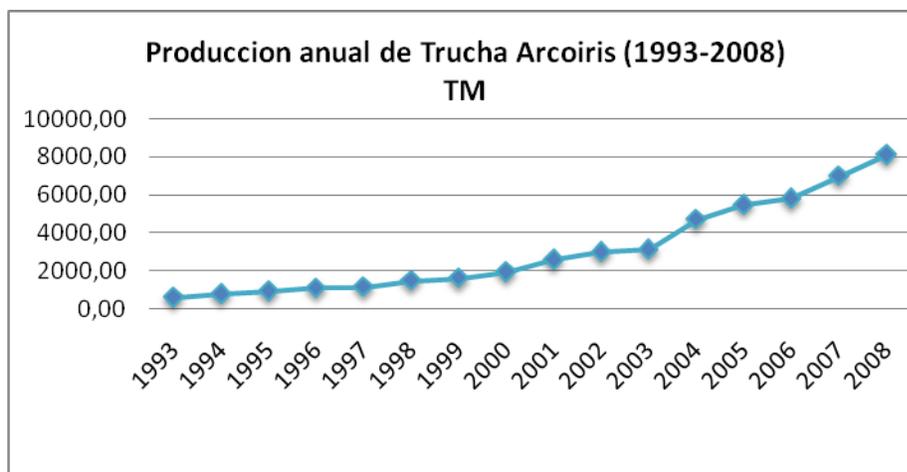
Considerando solo la producción de trucha en el país, ésta se ha venido incrementando en los últimos 10 años, sobrepasando las 8,000 TM en el 2008 (cuadro 1).

AÑO	TM
1993	584
1994	768
1995	930
1996	1 094
1997	1 147
1998	1 479
1999	1 608
2000	1 928
2001	2 586
2002	2 981
2003	3 111
2004	4 699
2005	5 475
2006	5 793,65
2007	6 997,26
2008	8 108,29

Fuente Produce 2008

Cuadro 3. Cosecha de trucha arcoíris en el Perú desde 1993 a 2008 expresada en Toneladas Métricas (TM)

Gráfica 4. Producción de trucha arcoíris en el Perú desde 1993 a 2008 expresada en Toneladas Métricas (TM)



Dentro de los principales recursos de acuicultura se tiene a los langostinos (9 023.36TM), concha de abanico (3 131.45TM), trucha (795.35TM) y tilapia (8.33TM), con ingresos por US\$ 78.21 millones. Así mismo, ha habido un incremento en las exportaciones de productos provenientes de la acuicultura, alcanzando las 12 958.49 TM el año 2007, cifra que sobrepasa a la registrada el año 2006 que mostró unas 10 701.27 TM (MinProd, 2008a).

Cuadro 4. Exportaciones anuales de trucha arcoíris desde el Perú (1994-2008)

AÑO	TM	US\$
1994 †	443	904 413
1995 †	183	860 724
1996 †	77	351 185
1997 †	196	825 220
1998 †	116	514 033
1999 †	181	713 896
2000 ‡	207	968 787
2001 ‡	276	1 182 251
2002 ‡	361	1 458 385
2003 ‡	441	1 616 395
2004 ‡	422	1 809 828
2005 ‡	754	3 279 426
2006 ‡	857	4 204 158
2007 ‡	795	4 919 866
2008 ‡	609,27	3 606 232

†: Fuente Aduanas Elaborado por : Gerencia del Sector Pesca – PROMPEX

* Enero a Setiembre de 2000

‡: Fuente: Empresas acuícolas y a partir del 2003 la Superintendencia Nacional de Administración Tributaria (SUNAT) - Oficina de Estadística.

Los principales países de exportación de trucha de nuestro país son Canadá, Estados Unidos, Suecia, Noruega y Alemania realizándose principalmente en dos formas, la de filete y la de trucha entera o HG (sin cabeza, sin vísceras) (PROMPERU, 2009).

2.2. Trucha Arco Iris

La trucha arcoíris es un pez resistente, fácil de desovar, de rápido crecimiento, tolerante a una amplia gama de ambientes y la manipulación. Los alevines pueden ser fácilmente separados y pasar a una dieta artificial (FAO 2009).

2.2.1 Clasificación Taxonómica

Según datos de FishBase basado en la publicación de Smith G. 1989:

Reino	:	Animalia
Phylum	:	Chordata
Clase	:	Actinopterygii
Orden	:	Salmoniformes
Familia	:	Salmonidae
Género	:	Oncorhynchus
Especie	:	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	:	trucha arcoíris

La trucha arcoíris es nativa de las desembocaduras de los ríos en el Océano Pacífico en Norte América, desde Alaska hasta México. Desde 1874 se ha introducido a las aguas en todos los continentes salvo en la Antártida, con fines de pesca recreativa y de acuicultura (FAO 2009). La

pesca, así como el cultivo de trucha se practica en las cuencas continentales tropicales y sub tropicales de muchos países de Asia, Este de África y Sudamérica (Dill y Cordone 1997; FAO 2009).

La trucha fue la primera especie en el desarrollo de la acuicultura peruana, es así que en 1982 se importaron 50 000 ovas embrionadas procedentes de los Estados Unidos, a un criadero particular de la Oroya (Godoy 2002).

2.2.2. *Características Biológicas*

La forma del cuerpo es alargada y fusiforme con 60-66 vértebras. Presenta una aleta adiposa, por lo general con borde negro. Coloración azul a verde oliva por encima de una banda de color rosa a lo largo de la línea lateral y plata por debajo. Tanto en el dorso como en los flancos, en la cabeza y aletas se encuentran cubiertos de pequeños puntos negros. La Coloración varía con el hábitat, tamaño y condición sexual. Hay una tendencia en truchas de río y reproductores de ser más oscuras y presentar colores más intensos, mientras que las truchas de lago son más brillantes y de color plateado (FAO 2009).

Pueden soportar una amplia gama de temperatura, desde 0 a 27 ° C, pero en las zonas de desove y el crecimiento se produce en una gama más reducida de 9 a 14 ° C. La temperatura del agua óptima para el cultivo de trucha arco iris está por debajo de 21 ° C. Como resultado, la temperatura y la disponibilidad de alimentos influyen en el crecimiento y desarrollo, haciendo que el tiempo para alcanzar la madurez varié, aunque normalmente es de 3-4 años (FAO 2009).

Las hembras son capaces de producir hasta 2 000 huevos /Kg de peso corporal. Los huevos son relativamente grandes en diámetro midiendo de 3 a 7 mm. La mayoría de los peces desovan sólo una vez al año, en la primavera (enero a mayo en el hemisferio norte); aunque la crianza selectiva y el ajuste del fotoperiodo han desarrollado cepas de incubación que puede madurar antes y desovar durante todo el año. También se han obtenido características superiores de selección mediante hibridación, incrementando las tasas de crecimiento, resistencia a las enfermedades, y prolificidad, y la mejorando la calidad y sabor de la carne (FAO 2009).

Las truchas no desovan naturalmente en los sistemas de crianza, por lo que los juveniles se obtienen de zonas de desove artificial en una incubadora o por recolección de huevos de

poblaciones silvestres. Las larvas están bien desarrolladas a la eclosión. En la naturaleza, los adultos se alimentan de insectos terrestres y acuáticos, moluscos, crustáceos, huevos de peces y otros pequeños peces, pero lo más importante es la alimentación con camarones de agua dulce, que contiene los pigmentos carotenoides responsables de la coloración naranja-rosa de la carne. En la acuicultura, la inclusión de los pigmentos sintéticos como la astaxantina y cantaxantina en el alimento produce esta coloración (FAO, 2009).

2.3. Piscirickettsiosis

La enfermedad ha sido denominada de diversas formas tales como, "síndrome de Huito", "síndrome del salmón coho", "síndrome rickettsial salmonídeo" (SRS) y "piscirickettsiosis" (Larenas *et al*, 2000), también es conocida como "salmonid rickettsial septicaemia" debido a la inflamación general que se puede encontrar en diversos órganos (Olsen *et al*, 1997).

2.3.2. Antecedentes Históricos

Dentro de los agentes infecciosos que afectan la truchicultura a nivel mundial, los agentes rickettsiales comenzaron a ser de gran importancia desde principios de los años 80, fecha desde la cual han producido pérdidas económicas por altas mortalidades. (Larenas *et al*, 1998) Es probable que la bacteria se encontrase por primera vez en Canadá, en la primera mitad de los años 1970s, a esto se le conoce como "paréntesis de la enfermedad", ya que no hay registros de otros brotes en estos años (Lannan *et al*, 1999). Los primeros brotes confirmados de Piscirickettsiosis se presentaron a mediados de los años 1980s en la décima región de Chile y fueron descritos sólo en salmón coho (Síndrome del salmón coho), pero pronto fueron afectadas todas las especies de salmónidos cultivados, llegando a producir hasta un 90% de mortalidad en algunos centros (Bravo y Campos, 1989; OIE, 2003). En Noruega, Canadá e Irlanda la mortalidad producida por este patógeno es alrededor del 10%, mucho menor que en el caso de Chile donde se han presentado grandes mortalidades de hasta el 90% (Lannan *et al*, 1999) con una pérdida solo por mortalidad de unos 50 millones de dólares por año (Smith *et al*, 1995).

Además existen reportes de la existencia de “organismos rickettsia-like” (RLO, por sus siglas en inglés), que han sido observadas en diversas especies de peces en todo el mundo. (Bravo, 1994; Almendras *et al*, 1997).

2.3.3. Etiología

Las Chlamydias y las Rickettsias están ampliamente establecidas como patógenos de invertebrados y esporádicamente relacionados con enfermedades de peces, hasta que surgieron los brotes en la piscicultura de Chile. El organismo fue formalmente reconocido como un nuevo taxón con el nombre de *Piscirickettsia salmonis* (Austin y Austin, 2007).

El agente etiológico identificado como *Piscirickettsia salmonis* corresponde a un microorganismo gramnegativo, no móvil, no encapsulado, pleomórfico, habitualmente cocoide, en pares o en forma de anillo y de un tamaño variable entre 0,5-1,5 μm de diámetro (Larenas *et al*, 2005); en una bacteria patógena intracelular obligada, se agrupa en la subdivisión gamma de las proteobacterias y se relaciona remotamente con el género *Coxiella* y *Francisella* (Lannan *et al*, 1999; OIE, 2003; Austin y Austin, 2007). Pero se diferencia de otras bacterias intracelulares obligadas como las del género *Chlamydia*, *Coxiella* y *Ehrlichia* porque crecen dentro de fagosomas o fagolisosomas (Wood y Azad, 2000).

En frotis de sangre y tejidos la bacteria se tiñe con hematoxilina-eosina (HE), Giemsa y azul de metileno, se observa la bacteria dentro de vacuolas citoplasmáticas rodeadas por una membrana, en forma esparcida o agrupaciones que le dan un aspecto de mórula. Mediante microscopía electrónica se ha observado que el agente posee en su superficie dos membranas, una externa ondulada y una interna citoplasmática que tiene características de una pared celular de Gram-negativa, lo que es característico de agentes rickettsiales. Posee además estructuras similares a ribosomas cerca de la membrana plasmática, un ADN fibrilar en la región central y estructuras esféricas electro densas (Lannan *et al*, 1999; Larenas *et al*, 2005).

Los “organismos rickettsia-like” no han sido caracterizados lo suficiente para determinar su relación con *Piscirickettsia salmonis*, son mas pequeños que esta, entre 0.2-0.8 μm y también presentan una forma cocoidal (Cvitanich *et al*, 1995; Fryer y Mael, 1997).

2.3.3.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica no está clara pero se encuentra emparentado con *Wolbachia persica* (con una similitud del 86,3%) y *Coxiella burnetii* (con una similitud del 87,75%), mucho más cercano que a los organismos representantes de *Ehrlichia*, *Rickettsia* o *Rochalimaea* con los que tiene una similitud aproximada de 80% (Mauel, 1996). Este organismo se ha clasificado en el orden Rickettsiales, familia Rickettsiaceae debido principalmente a sus características

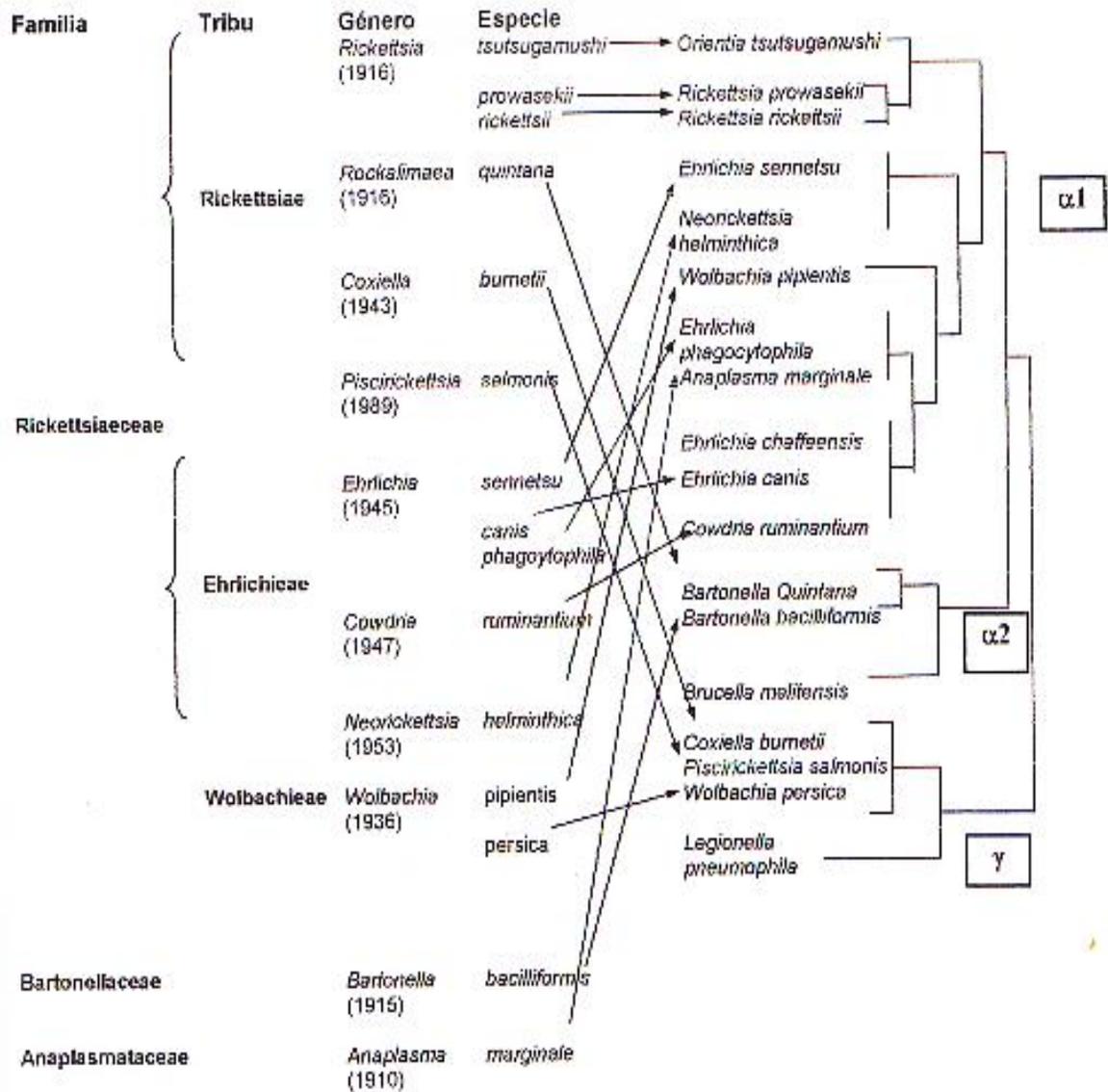


Figura 1. Relación filogenética de rickettsias de acuerdo al manual de Bergey y el análisis basado en la secuencia del gen RNA ribosomal 16S (Modificado de La Scola y Raoult, 1997)

morfológicas y a su naturaleza intracelular obligatoria. (Fryer *et al*, 1992) En conclusión se puede decir que este organismo es suficientemente nuevo como para clasificarlo en un nuevo género dentro de la familia Rickettsiaceae (Austin y Austin, 2007).

El desarrollo de la biología molecular y de métodos tales como el análisis del gen 16S rRNA han permitido determinar relaciones filogenéticas dentro de los miembros de la orden Rickettsiales, basados en la comparación de la secuencia de estos genes. Fig. 1.

2.3.3.2. Cultivo

Generalmente se realiza en cultivo celular, la replicación del organismo produce efecto citopático (CPE) en diversas líneas celulares de salmón y en algunas líneas celulares de peces de agua caliente, dentro de ellas destacan “Chinook salmon embryo” (CHSE-214), “Chum salmon heart” (CHH-1), “Rainbow trout gonad” (RTG-2), “Epithelioma papulosum cyprini” (EPC), “Fathead minnow” (FHM) (Lannan *et al*, 1999). La temperatura optima para la maduración *in vitro* es de 15-18 °C y dosis infectiva de cultivo celular (TCID₅₀) de 10⁶-10⁷. La aparición de efectos citopáticos (CPE) puede ser de hasta 28 días, usualmente se observan grupos de células redondeadas con grandes vacuolas, luego de varios pasajes la aparición de CPE es de 4 a 7 días, es posible encontrar células en lisis desde el día 14. El crecimiento se retarda debajo de los 10 °C y encima de los 20 °C, deteniéndose sobre los 25 °C. (Lannan *et al*, 1999; Austin y Austin, 2007). Además la *Piscirickettsia salmonis* es sensible al congelamiento, produciéndose una disminución de hasta el 99% de los títulos en un ciclo simple de congelamiento-descongelamiento a -70 °C. La adición de antibióticos al cultivo celular puede inhibir o retardar la replicación *in vitro* de la *P. salmonis* (Lannan *et al*, 1999).

Recientes investigaciones, aún poco difundidas, muestran que es posible cultivar *Piscirickettsia salmonis* en medios artificiales como en agar BFCG, que contiene agar sangre de cordero, 3% de suero fetal bovino, 0.1% de cisteína y 1% de glucosa cultivado a 16°C durante 6 días. (Mauel *et al*, 2008) Otros estudios realizados por Mikalsen *et al*, 2007, lograron el crecimiento de esta bacteria en agar sangre con 2% de NaCl, agar corazón cisteína 25g/L, glucosa 10g/L, L-cisteína 1 g/L, agar 15g/L, hemoglobina 2g/L, suplementada con 5% de sangre de cordero durante 14 días a 15°C.

2.3.3.3. Biotipos

Las diferencias en las virulencias y los promedios de mortalidad hicieron pensar en alguna diferencia genética entre los aislamientos realizados en Chile y los realizados en Irlanda, Escocia, Canadá y Noruega pero se demostró que todos los aislamientos pertenecen a la misma especie (Austin y Austin, 2007). Las mortalidades varían desde un 30-90% en Chile (Bravo y Campos, 1989) hasta un 0.6 -30% en Canadá, Noruega e Irlanda. Los motivos de estas grandes variaciones son probablemente debidos a factores intrínsecos de la bacteria, resistencia de los hospederos y factores medioambientales (Evelyn, 1992; Rodger y Drinan, 1993). Se han descrito diversas cepas de *P. salmonis*, sin embargo la cepa de referencia corresponde a la LF-89, la cual corresponde al primer aislado realizado en 1989. De Noruega y Escocia fueron aisladas las cepas ATL-4-91 y NOR-92 (Mauel *et al*, 1999). Posteriormente, han sido aisladas, en Chile, cepas más resistentes a los antibióticos y más virulentas, tales como la cepa SLGO-94 en 1994, y la SLGO-95 en 1995 (Smith *et al*, 1996).

Pequeñas diferencias en la secuencia del 16 ARNr permiten diferenciar cepas; estableciéndose diferencias entre la virulencia de la *Piscirickettsia salmonis* de acuerdo a la ubicación geográfica en la que se encuentre (Larenas *et al*, 2005).

2.3.4. Signos Clínicos

Una gran variedad de signos generales de la infección están presentes en los salmónidos infectados con *P. salmonis*, en algunos casos de infecciones agudas se puede suscitar casos de mortalidad sin signos clínicos aparentes (Lannan *et al*, 1999; OIE, 2003). En esta enfermedad no existen signos clínicos patognomónicos, en la mayoría de los casos se observan peces con letargia, nadando cerca de la superficie, oscurecimiento de la piel (Russell, 1997). Posiblemente los signos externos observados más evidentes durante la infección de *P. salmonis* sean las branquias pálidas como resultado de una anemia significativa, además se pueden presentar animales con anorexia e incluso lesiones en la piel, desde pequeñas áreas de escamas elevadas hasta úlceras superficiales. Las infecciones en el cerebro pueden causar un comportamiento irregular al nadar (Lannan *et al*, 1999; OIE, 2003).

2.3.5. Lesiones

Las manifestaciones más severas de la enfermedad suelen darse en intestino, riñón, hígado y bazo (Lannan *et al*, 1999). En algunos peces se puede observar inflamación en los riñones, esplenomegalia, anemia, ascitis, lesiones en el hígado y hemorragias petequiales en el estomago, intestino, vejiga natatoria, musculatura del cuerpo y grasa visceral; en el peritoneo se puede presentar ascitis (House *et al*, 1999; OIE, 2003), en el hígado se puede observar áreas grises y amarillentas a manera de un puntillero o en forma de anillos así como lesiones circulares y pálidas en diversos órganos en los peces más crónicamente afectados y en los casos agudos se puede observar una apariencia muy moteada (Lannan *et al*, 1999; OIE, 2003), en algunos casos se puede observar en la luz del intestino un material mucoso de color amarillento; en algunos animales incluso pueden presentar lesiones en la piel y hemorragias en el tegumento (Austin y Austin, 2007).

Los cambios histológicos más destacados se encuentran principalmente en el hígado, además se pueden encontrar cambios en riñón, bazo e intestino, pero también se pueden observar cambios patológicos en el cerebro, el corazón, los ovarios y las branquias (Olsen, 1997; OIE, 2003). Se puede observar necrosis a nivel de los órganos hematopoyéticos y del tejido linfático, además es posible con un aumento elevado ver agregados de microorganismos en el citoplasma de hepatocitos degenerados y en los macrófagos que generalmente se presentan hipertrofiados, es también común la inflamación de la lámina propia del intestino grueso, así como desprendimiento del epitelio de la mucosa (Lannan *et al*, 1999; OIE, 2003).

En el hígado, usualmente se observa una necrosis multifocal de hepatocitos, acompañada de un infiltrado inflamatorio crónico de células mononucleares, además de la necrosis perivascular y vascular, estas áreas focales de la necrosis son la base de las lesiones circulares observadas macroscópicamente (OIE, 2003). En el riñón, es común encontrar degeneración y necrosis del epitelio tubular (Olsen, 1997). A nivel del epitelio de las agallas es común observar fusión de las lamelas. También es posible encontrar diversos cambios patológicos en el corazón y otros órganos debido a la coagulación intravascular diseminada que causa trombos de fibrina en los vasos más importantes (Lannan *et al*, 1999; OIE, 2003). El hematocrito generalmente cae por debajo del 25% y se pueden observar macrófagos conteniendo *P. salmonis* en frotises de sangre periférica (Lannan *et al*, 1999).

2.3.6. Patogénesis

2.3.6.1. Caracterización Antigénica

Se han estudiado aislados purificados de *P. salmonis* mediante diferentes gradientes de densidad obtenidas por Percoll por centrifugación en búsqueda de su caracterización antigénica, detectándose la presencia de 4 antígenos proteicos y 2 antígenos de carbohidratos, tentativamente identificados como antígenos expuestos de superficie. Los pesos moleculares de tales antígenos fueron 65, 60, 54 y 51 Kda respectivamente (Kuzyk *et al* , 1996).

Estudios posteriores realizados utilizando gradientes de densidad con diatrizoato de meglumina y diatrizoato de sodio (DMDS), identificaron 9 proteínas bacterianas con pesos moleculares de 108, 95, 64, 60, 56, 40, 36, 32 y 20 Kda mediante inmunoblot, de las cuales, las proteínas de 56, 36 y 20 Kda fueron las mas importantes antigénicamente (Barnes *et al*, 1998).

Recientemente la evaluación mediante microscopia electrónica de transmisión, de un aislado de *P. salmonis* procedente de un cultivo celular, usando centrifugaciones diferenciales y purificado en una gradiente de Percoll al 30 %, ha encontrado partículas semejantes a fagos asociadas a algunos de los aislados de *P. salmonis* examinados (Yuksel *et al.*, 2001).

El análisis de secuencia de un segmento del ADN de *P. salmonis*, reveló la expresión de una proteína antigénica de superficie externa (OspA) de 17 Kda, la cual tuvo un 62 % de homología en la secuencia de aminoácidos con la lipoproteína de membrana externa de 17 Kda del género de *K. Rickettsia*. Así mismo, en este mismo estudio se detecto una fuerte respuesta de los anticuerpos contra OspA en sueros de salmón coho convalecientes (*Oncorhynchus kisutch*) (Kuzyk *et al*, 2001).

En otro estudio donde se realizó aislamiento, secuencia y expresión de genes de proteínas de membrana, también se aisló Osp A y otras proteínas tales como, transglicosidasa lítica de membrana (MLT), la proteína B de unión a la transferrina (TBP) y una proteína inmunogénica de 31 Kd de *P. salmonis* (Morales *et al*, 2001).

2.3.6.2. Patogenia

Independientemente de la ruta de infección, las rickettsias predominantemente replican en células del musculo liso y endoteliales vasculares, originando una degeneración y como consecuencia una vasculitis que puede complicarse por la formación de trombos, hemorragia, salida de fluidos y en casos severos fallo circulatorio agudo (Campbell, 1994; Walker *et al.*, 1996).

De acuerdo con el experimento realizado por Smith *et al*, 1999, se concluye que las principales rutas de infección son por lesiones en la piel y por las branquias, mientras que la vía oral no parece ser la forma más común de la infección.

La rickettsias ingresan a la célula del hospedero por fagocitosis inducida uniéndose a un receptor que contiene colesterol y activando un sistema fosfolipasa A. De esta manera, son endocitados dentro de fagosomas de donde escapan rápidamente al citoplasma de la célula hospedera. En el citosol, ellas son capaces de utilizar los componentes de gran energía presentes allí, tales como el adenosintrifosfato (ATP), nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) y uridina-5'-difosfoglucosa (UDPG), mediante sistemas de transporte especializados (Winkler, 1990; Wood y Azad, 2000).

Sin embargo, ellas retienen la habilidad de generar ATP vía fosforilación oxidativa y un ciclo de ácido tricarbónico intacto al ser estimuladas por diferentes sustratos pero más eficientemente por glutamato (Winkler, 1990; Wood y Azad, 2000).

El resultado final del crecimiento de la rickettsia es la lisis de la célula del hospedero, lo cual sería consecuencia de la multiplicación del parásito y/o la acción de la fosfolipasa A (Winkler, 1990; Wood y Azad, 2000).

2.3.7. Aspecto Epidemiológico

La temperatura y la densidad poblacional son factores importantes para la presentación de la enfermedad, habiéndose demostrado en condiciones de laboratorio que la enfermedad se presenta con mayor incidencia a una temperatura de 14 grados centígrados y con una densidad poblacional de 20 Kg/m³ (Larenas *et al*, 1997).

2.3.7.1. Transmisión

La Piscirickettsiosis es de transmisión vertical y horizontal. Se ha demostrado experimentalmente la penetración de la bacteria a través de la piel y branquias de animales intactos, produciendo lesiones macroscópicas e histopatológicas (Smith *et al*, 2004), además se ha demostrado, en condiciones de laboratorio, usando suspensiones de *Piscirickettsia salmonis* para

infectar peces a través del intestino que este es otra zona susceptible de ingreso, aunque poco común, de esta bacteria (Austin y Austin, 2007), en referencia a la transmisión vertical del agente se ha demostrado experimentalmente que la progenie tanto de hembras como de machos infectados por la bacteria, resulta positiva a la enfermedad en el estadio de ova con ojo; además se ha demostrado la presencia de esta bacteria en fluido celómico y seminal, observándose a la microscopía electrónica como la bacteria ataca la ova a través de unas extensiones similares a múltiples podosomas, lo que probablemente le permite la adherencia y la penetración a la ova durante su fertilización (Larenas *et al*, 2003).

2.3.7.2. Susceptibilidad

La susceptibilidad no varía por la edad los peces, se puede presentar desde alevines hasta peces adultos (OIE, 2003).

2.3.7.3. Rango de Hospederos

La inhabilidad de la *P. salmonis* para sobrevivir a temperaturas superiores a 25 °C, evita la posibilidad de que este patógeno se pueda replicar en los seres humanos o en algún otro mamífero por lo que no presenta ningún peligro para la salud pública (Lannan *et al*, 1999).

Piscirickettsia salmonis y la enfermedad que causa ha sido solo observada en peces de la familia salmonidae (Lannan *et al*, 1999). Ha sido reportada en salmón del atlántico cultivado (*Salmo salar*), salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*), salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), masu salmón (*Oncorhynchus masou*), trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) y peces juveniles de salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*) (Lannan *et al*, 1999; OIE, 2003).

Se ha postulado que una o más especies nativas de animales acuáticos, o que algunos artrópodos marinos puedan actuar como potenciales vectores o reservorios de *P. salmonis* (Fryer *et al*, 1990; Cvitanich *et al*, 1991).

Se ha detectado la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en diversas especies acuáticas como en jurel (*Trachurus murphyi*), cabrilla (*Paralabrax humeralis*), moluscos como el chorito (*Mytilus chilensis*), crustáceos, anélidos (Ver tabla 3); estos podrían estar actuando como reservorios de la bacteria (Garcés *et al*, 1991; Correal, 1996; Venegas 1996).

	Nombre común	Nombre científico	Referencia
Peces	Cabrilla	<i>Paralabrax humeralis</i>	Venegas, 1996
			Correal, 1995
	Jurel	<i>Trachurus murphyi</i>	Venegas, 1996
Moluscos	Chorito	<i>Mytilus chilensis</i>	Correal, 1995
Crustáceos	Picorocos	<i>Balanus psittacus</i>	Venegas, 1996
			Correal, 1995
	Copépodos de vida libre	Diversas especies	Venegas, 1996
Ectoparásitos			Correal, 1995
	Ceratotoa	<i>Ceratothoa gaudichaudii</i>	Venegas, 1996
			Venegas, 1996
Anélidos	Caligus	<i>Caligus sp.</i>	Correal, 1995
	Poliquetos	Diversas especies	Correal, 1995

Cuadro 3. Especies acuáticas donde se ha reportado la presencia de *Piscirickettsia salmonis*. Adaptado de Larenas *et al*, 1998

“Organismos rickettsia-like” han sido descritos en diversas especies de peces en todo el mundo, el primer reporte establece que en un pez enfermo de la especie *Tetrodon fahaka* proveniente del río Nilo en Egipto, se observaron dentro de monocitos y en el plasma, pequeñas formas cocoides que se teñían eosinofílicas con Giemsa, compatibles con un agente rickettsial (Mohamed, 1939). Posteriormente en Gran Bretaña, en las costas de Gales, se observó la presencia de RLO (Rickettsia Like Organism) en cortes histológicos y por microscopía electrónica de muestras de bazo de *Callionymus lyra*. La presencia del agente fue sólo un hallazgo casual, en un estudio que pretendía encontrar un parásito frecuente de la sangre denominado *Haemogregarina quadrigemina* (Davies, 1986).

En el año 1994 se describió la primera enfermedad producida por un RLO en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), tilapia azul (*O.*

aureus), Redbelly tilapia (*Tilapia zillii*), Wami tilapia (*T. hornorum*). La afección se produjo entre 1992 y 1993, provocando una tasa de mortalidad que en promedio fue de 30% y cuyo máximo alcanzó un 75% en algunas piscifactorías. Las lesiones principales se caracterizaron por necrosis, vasculitis, trombosis, inflamación crónica y presencia de nódulos blanquecinos en diversos órganos. En todos los tejidos analizados se observó la presencia de un microorganismo tipo rickettsia dentro de vacuolas intracitoplasmáticas. Este agente fue aislado a partir de muestras de bazo en la línea celular CHSE-214, sin embargo, en ésta no produjo efecto citopático. La enfermedad fue reproducida mediante la inoculación experimental de tejido esplénico proveniente de peces naturalmente infectados (Chem y Chao, 1994).

En el año 1995 se detectó la presencia de RLO en dos peces tropicales de agua dulce (*Panaque suttoni*), enviados desde Colombia a Estados Unidos. El hallazgo se efectuó mediante exámenes citológicos, histopatológicos y microscopía electrónica de transmisión. Las lesiones macroscópicas fueron reno y esplenomegalia. El organismo se detectó dentro de vacuolas citoplasmáticas de monocitos y macrófagos de bazo, corazón riñón e hígado (Khoo *et al*, 1995).

En el mar mediterráneo francés se encontró RLO en el cerebro de lubinas juveniles (*Dicentrarchus labrax*), los cuales presentaban comportamientos de nado anormal (Comps *et al*, 1996).

En el año 2002 se reportó la presencia de RLO en three-line grunt (*Parapristipoma trilineatum*) (Fukuda *et al*, 2002).

2.3.7.4. Distribución Geográfica

La enfermedad comenzó su distribución desde Chile hacia Norteamérica y Europa. (Austin y Austin, 2007). Los aislamientos realizados en Chile, Noruega, Irlanda y Canadá son morfológicamente similares y han sido identificadas por pruebas serológicas como *Piscirickettsia salmonis*. (Lannan *et al*, 1999) En Chile la enfermedad ha causado serias pérdidas económicas, del orden de los 100 millones de dólares anuales, debido principalmente a las altas tasas de mortalidad y a los elevados costos del tratamiento (Larenas *et al*, 2003).

En el cuadro 4 se puede observar la ubicación de los reportes de RLO

Nombre común del pez	Nombre Científico del pez	Localización	Año	Referencia
Fokaka Egypt	<i>Tetrodon fahaka</i>	Egipto	1939	Mohamed
Dragonet	<i>Callionymus lyra</i>	Gales	1986	Davies
Tilapia de Mozambique	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Taiwán	1994	Chem y Chao
Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	Taiwán	1994	Chem y Chao
Tilapia azul	<i>O. aureus</i>	Taiwán	1994	Chem y Chao
Redbelly tilapia	<i>Tilapia zillii</i>	Taiwán	1994	Chem y Chao
Wami tilapia	<i>T. hornorum</i>	Taiwán	1994	Chem y Chao
Lubinas	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Francia	1996	Comps <i>et al</i>
Three-line grunt	<i>Parapristipoma trilineatum</i>	Japón	2002	Fukuda <i>et al</i>
Plecostomus de ojo azul	<i>Panaque suttoni</i>	Colombia	1995	Khoo <i>et al</i>

Tabla 4. Reportes de RLO en el mundo. Adaptado de Fryer y Mauel, 1997

2.3.8. Diagnóstico

Los signos, lesiones macroscópicas y microscópicas derivados de la Piscirickettsiosis no son lo bastante importantes para permitir un diagnóstico definitivo de la enfermedad. Por tanto, el análisis para el diagnóstico de la Piscirickettsiosis se basa en la detección del agente causal (OIE, 2003).

El método de diagnóstico presuntivo consiste en frotis en fresco y cortes histológicos de tejidos afectados teñidos con Gram, hematoxilina-eosina o giemsa, naranja de acridina y azul de toluidina, observándose al microorganismo dentro de vacuolas citoplasmáticas rodeadas por una membrana, generalmente basófilas aunque se pueden presentar anfófilas. Debido a que estas técnicas son poco específicas, en cantidades bajas el organismo no es detectado (Leal, 2003; OIE, 2003). Además este método debe ser confirmado por métodos serológicos e inmunohistoquímicos, o pruebas moleculares (Lannan *et al*, 1999).

Aunque el aislamiento en cultivo celular es un método sensible para la detección de este patógeno, no se usa de rutina por la facilidad de la contaminación del cultivo, debido a lo difícil de

mantener la asepsia en el campo, sumado a la ausencia de antibióticos en el cultivo (Lannan *et al*, 1999).

La confirmación de *P. salmonis* en el cultivo celular puede hacerse mediante las pruebas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo (IFI) o por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (OIE, 2003).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) ha resultado ser una técnica sensible y específica. Posteriormente se modificó la prueba utilizando microondas, lo que reduce los tiempos de incubación para los anticuerpos, sin perder sensibilidad o especificidad. (Larenas *et al*, 2005).

2.3.9. *Prevención y Control*

Aunque *P. salmonis* es sensible a los mayoría de antibióticos (tetraciclinas, eritromicina, ácido oxolínico) en los cultivos celulares, la eficacia de estos en el tratamiento de piscirickettsiosis es muy baja (Lannan *et al*, 1999). La localización intracelular del patógeno permite a la mayoría de microorganismo permanecer fuera de las concentraciones letales de los antibióticos y continuar con la infección (Lannan *et al*, 1999).

Existen dos vacunas inactivadas (bacterinas) que se han aplicado con resultados buenos en Chile, aunque aún no están lo suficientemente documentadas en condiciones experimentales y de campo; estas son Ricketvac Oleo® (Lab. Recalcine) y Vac- SRS® (Aquaculture S.A. Services and Research) De acuerdo a los fabricantes estas pueden conferir un índice de protección de hasta 71% (Bravo, 2000; Carvajal, 2000).

La vacunación se realiza por la vía de inoculación intraperitoneal (i.p.), la cual es la más usada en la industria salmonera, ya que el antígeno entra en contacto directo con los órganos de la cavidad abdominal y se produce su absorción inmediata porque es la ruta más potente de vacunación, permitiendo el uso de coadyuvante. Es el método con mejor relación costo-beneficio en peces grandes. Otros medios de vacunación (inmersión y alimentación) no generan el rango de respuesta adecuada para una inmunización prolongada (Horne, 1997; Carvajal, 2000).

2.3.9.1. *Prevención*

Debido a la poca efectividad de los tratamientos, la única estrategia para el control de *P. salmonis* son las buenas practicas en producción acuícola (Lannan *et al*, 1999).

Las ovas deben desinfectarse, como parte de una buena práctica de crianza, con productos yodóforos a 100 ppm por 10 minutos, es importante considerar que la *Piscirickettsia salmonis* es una bacteria intracelular, por lo que este tipo de desinfección no garantiza la eliminación de la bacteria (OIE, 2003; Bravo 2005).

2.3.9.2. *Control*

El uso de especies salmonídeas más resistentes en los lugares donde esta enfermedad sea endémica (Lannan *et al*, 1999). El ácido oxolínico es usado para el control de esta enfermedad, pero con pobres resultados (OIE, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de Estudio

La colección de muestras del presente estudio se realizó en tres piscigranjas del Departamento de Junín, la piscigranja “El Edén” y la piscigranja “Arco Iris” en el mes de Febrero, que corresponde a época de lluvias, con una temperatura ambiental que oscila entre 10°C a 18°C; y la piscigranja Rumihuasi en el mes de agosto, que corresponde a la época seca, con temperaturas ambientales de -1°C a 13°C.

El centro piscícola “El Edén”, ubicado en la provincia de Concepción, a una altitud aproximada de 3 400 msnm. La temperatura del agua es de 12°C con moderada turbidez, 8.00 mg/L de oxígeno disuelto, y un pH de 6.8. La fuente hídrica es el río Achamayo, con un caudal mínimo de 3 000 L/s y máximo de 30 000 L/s. La piscigranja es de arquitectura americana con desarenadores y consta de aproximadamente de 28 pozas con una densidad de 0.18 peces/L. La producción anual es de 50 Tm. Abastece al mercado local y supermercados de Lima.

El Centro piscícola “Arco Iris” se encuentra en Distrito de Molinos en la Provincia de Jauja, a 3 430 msnm. La temperatura del agua se encuentra entre 10°C y 12°C con moderada turbidez, 4.7 mg/L de oxígeno disuelto y un pH de 7.9 en promedio. La piscigranja alcanza una producción anual de 25 Tm. Abastece al mercado local y supermercados de Lima mediante intermediarios.

El centro piscícola Rumihuasi se encuentra ubicado en la comunidad de Acopalca, en la provincia de Huancayo, a una altitud de 3400 msnm, la temperatura del agua es de 10°C con moderada turbidez, 8.00 mg/L de oxígeno disuelto, y un pH de 6.8. La producción anual es de 53 Tm. Abastece principalmente al mercado local.

El procesamiento de las muestras y el diseño experimental se realizó en la ciudad de Lima, en la sección de Ictiopatología del laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, así como en el laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria sección de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2 Tamaño de Muestra:

Para determinar el numero muestral, se utilizó el siguiente cuadro de Tamaño muestral indicado en el Manual de animales acuáticos de la OIE.

Cuadro 5. Tamaño de muestra aleatoria en función de la supuesta prevalencia del patógeno en el lote.

Tamaño de Lote	Tamaño de la muestra a prevalencia del	Tamaño de la muestra a prevalencia del	Tamaño de la muestra a prevalencia del
	2%	5%	10%
50	50	35	20
100	75	45	23
250	110	50	25
500	130	55	26
1000	140	55	27
1500	140	55	27
2000	145	60	27
4000	145	60	27
10 000	145	60	27
100 000 o más	150	60	30

Fuente: Manual de Animales Acuáticos de la OIE (2006)

Según el presente cuadro, asumiendo una prevalencia del 5 % y con un tamaño de lote mayor a los 2000 animales se sugirió la colecta de un mínimo de 60 truchas por piscigranja (OIE, 2006). Con lo que se obtuvo un número muestral total de 180 de las tres piscigranjas estudiadas.

3.3 Metodología

3.3.1 Obtención de muestra

La colección de las truchas se realizó de diferentes pozas donde se encontraban los peces juveniles. El sacrificio se realizó mediante la técnica de corte medular con hoja de bisturí, entre el cerebro y medula espinal (Roberts y Shepherd, 1980; Rosenthal, 2007). Una vez identificado y beneficiado el animal, se procedió a tomar la longitud y peso del mismo. Posteriormente se llevó a la mesa de necropsia donde se procedió a realizar el examen externo.

La necropsia se llevó a cabo mediante la metodología recomendada por Reimschuessel *et al* (1992) y Ostrande (2000), dejando expuestas las vísceras *in situ* para proceder luego a la toma de muestra. Se realizaron pequeños cortes de tejido renal de 5-10 mm aproximadamente con el cual se realizó la impronta en una lámina portaobjeto previamente desengrasada, otro de los cortes se colocó en bolsas plástica rotulándose debidamente y conservándose en frío (0°C) antes de su congelación (-20°C) para su posterior análisis en el laboratorio. De igual manera, se extrajo el bazo, realizando un pequeño corte exponiendo el parénquima y realizando la impronta. La porción del bazo restante fue colocado en bolsas plásticas rotulándose y conservando en frío antes de ser congelada. Las laminas con las improntas de riñón y bazo debidamente identificadas, se fijaron en acetona por 10 minutos antes de guardarse en el portaláminas. Así mismo, se llevaron a cabo las mediciones de temperatura, contenido de oxígeno y pH del agua.

3.5.2 Procesamiento de Muestras

3.5.2.1 Detección de la bacteria por Inmunofluorescencia Indirecta

Con las muestras de bazo y riñón se realizaron improntas para la realización de la prueba de Inmunofluorescencia indirecta, según lo indicado en el kit de Laboratorios BiosChile (2008)

- a) Se agregó sobre cada impronta 100 μ L del Reactivo Oligoclonal, previamente diluido 1:100 y se incubaron los portaobjetos a 37°C de temperatura por 30 minutos en una cámara húmeda cerrada.
- b) Se procedió a lavar con una solución previamente diluida 1:25 y se dejó reposar por 3 a 5 minutos. Se removió los portaobjetos del recipiente y se eliminó el exceso de solución evitando que el tejido se seque.
- c) Luego se agregó sobre cada muestra 100 μ L de anti-IgG de ratón conjugado con FITC, previamente diluido 1:100. Se incubó las muestras a 37°C de temperatura por 30 minutos en una cámara húmeda cerrada y en oscuridad.
- d) Se repitió el procedimiento de lavado descrito para el primer paso con el reactivo oligoclonal.
- e) Luego se aplicó 10 a 20 μ L de solución de montaje, y se cubrió la muestra con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.
- f) Las muestras se examinaron en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 100X utilizándose aceite de inmersión para realizar el diagnóstico.

Como control positivo se utilizaron láminas fijadas en xilol con la cepa LF-89 de *Piscirickettsia salmonis* procedente del laboratorio de Patobiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile.

4 RESULTADOS

4.1 Examen de necropsia

Entre los principales signos clínicos observados se encontraron: exoftalmia (Figura 2), melanosis (Figura 3), abdomen abultado (Figura 4), úlceras en la piel (Figura 5), nado errático y superficial (Figura 6, retraso en el crecimiento. Además se observaron lesiones como: esplenomegalia, palidez hepática (Figura 7), focos hemorrágicos en hígado (Figuras 8 y 9), intestinos, ciegos pilóricos y grasa peritoneal.



Figura 2. Exoftalmia en trucha arco iris



Figura 3. Melanosis en trucha arco iris



Figura 4. Abdomen abultado en trucha arco iris



Figura 5. Úlceras en piel en trucha arco iris



Figura 6. Nado superficial en trucha arco iris.

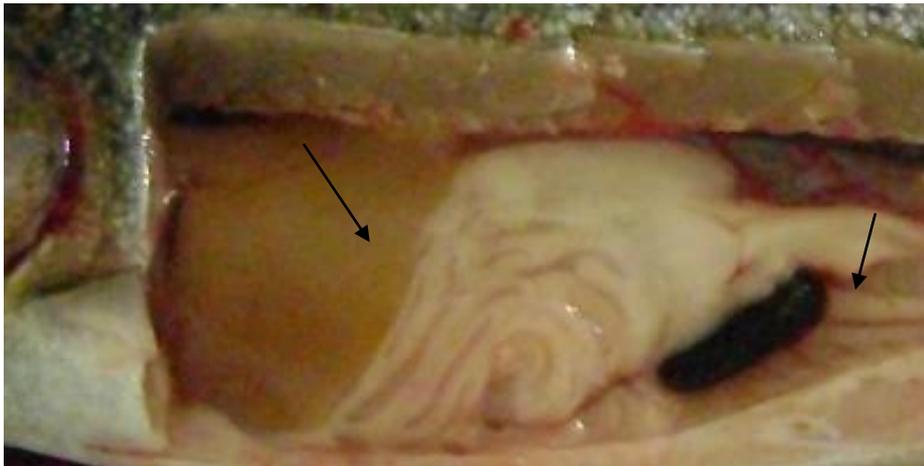


Figura 7. Palidez hepática y esplenomegalia en trucha arco iris.

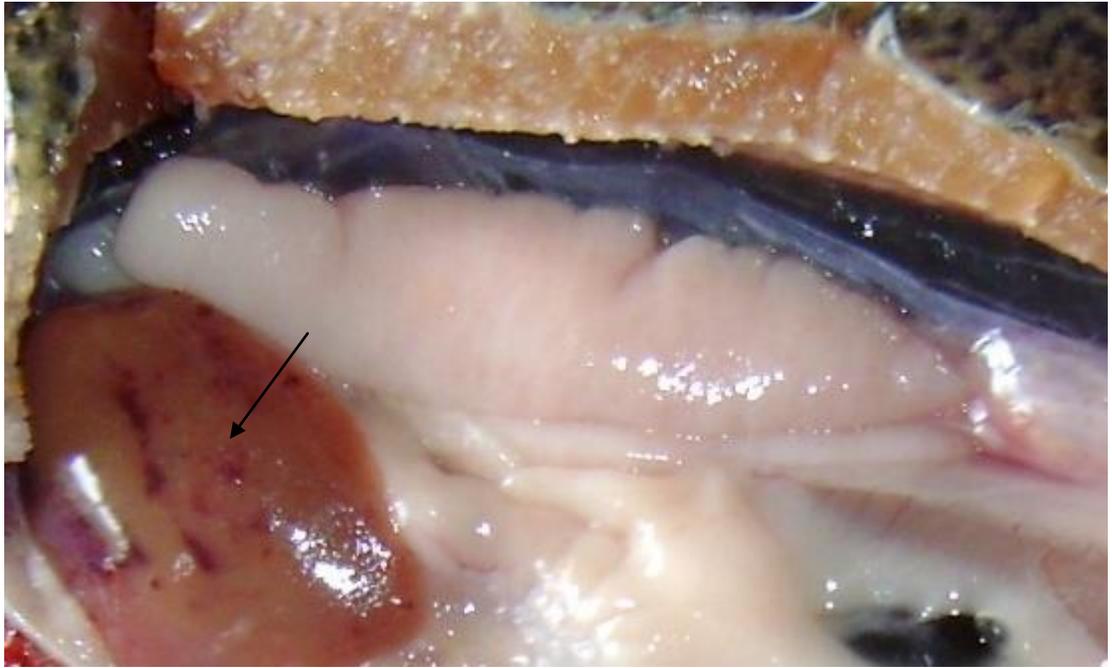


Figura 8. Focos hemorrágicos en hígado de trucha arco iris.

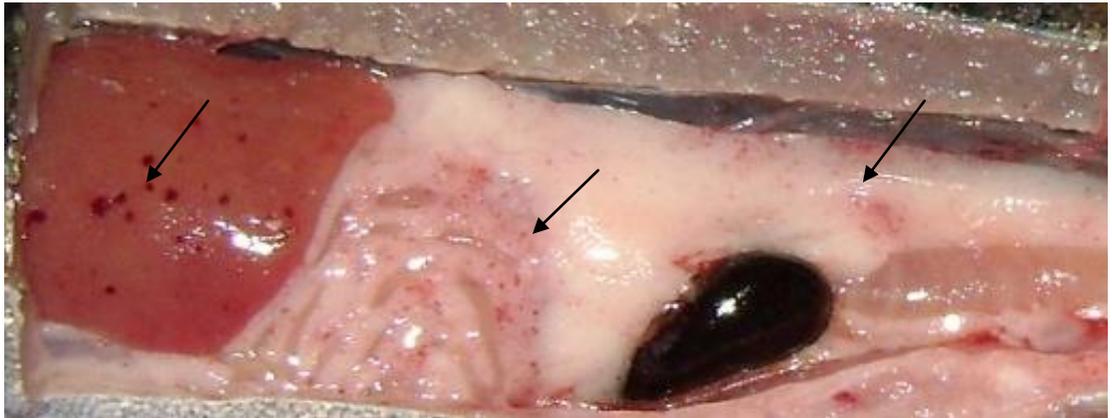


Figura 9. Hemorragia petequeial en hígado, ciegos pilóricos y grasa abdominal de trucha arco iris.

4.2 Detección de anticuerpos contra *Piscirickettsia salmonis* por Inmunofluorescencia Indirecta

Se procesaron las muestras de riñón y bazo de los 180 peces con la prueba de inmunofluorescencia indirecta, no encontrándose una frecuencia de *Piscirickettsia salmonis* en las piscigranjas estudiadas a la fecha de muestreo.

4.3 Análisis de Agua

Se llevaron a cabo las mediciones de temperatura, cantidad de oxígeno disuelto en el agua y pH. En la piscigranja El edén, la temperatura del agua era de 12°C, la cantidad de oxígeno disuelto era de 8mg/L, el pH de 6.8 y un moderado grado de turbidez. En la piscigranja Arco Iris, la temperatura del agua era de 11°C, 4.7 mg/L de oxígeno disuelto, pH de 7.9 y moderado grado de turbidez. En la piscigranja Rumihuasi, la temperatura del agua era de 12°C, la cantidad de oxígeno disuelto en el agua era de 4.5 mg/L, pH de 7.5 y un moderado grado de turbidez. Estos resultados se expresan mejor en la cuadro 6.

Piscigranjas	Temperatura	Cantidad de Oxígeno	pH	Grado de turbidez
El Edén	12°C	8mg/L	6.8	Moderado
Arco iris	11°C	4.7 mg/L	7.9	Moderado
Rumihuasi	12°C	4.5 mg/L	7.5	Moderado

Cuadro 6. Resultados del análisis de agua

5 DISCUSIÓN

Los signos clínicos y lesiones observadas en la mayoría de las enfermedades infecciosas y no infecciosas en los peces de cultivo son generales, lo que hace difícil llegar a un diagnóstico definitivo por lesiones. Entre los hallazgos de necropsia del presente estudio, se encontraron muchas observaciones de lesiones sugerentes de piscirickettsiosis, tales como, distensión abdominal, úlceras en la piel y musculatura, exoftalmia y melanosis, así como internamente se pudo apreciar esplenomegalia, palidez hepática, focos hemorrágicos en hígado, intestinos, ciegos pilóricos y grasa peritoneal; sin embargo ninguno de estos casos fueron positivos a Piscirickettsiosis por inmunofluorescencia indirecta; a diferencia de Branson & Nieto, 1991 que encontró en Chile un cuadro clínico similar en salmón coho y observó organismos rickettsiales en riñón ; Garces *et al*, 1991 y Cvitanich *et al*, 1991 encontraron también en salmónes coho de Chile un cuadro clínico similar pero en el 90 % de los casos y lograron aislar *Piscirickettsia salmonis* en cultivo celular; Fryer *et al*, 1992 encontró un cuadro clínico similar en el 100 % de los casos, luego de inocular salmónes chinook y truchas arco iris con *Piscirickettsia salmonis* en Chile; Olsen *et al*, 1997 encontró en Noruega lesiones similares en salmónes del atlántico juveniles en menos del 1 % de los casos e identificó al agente *Piscirickettsia salmonis* por Inmunofluorescencia Indirecta y por cultivo celular; Smith *et al*, 1999 encontró en trucha arco iris, luego de inocular *Piscirickettsia salmonis* por diferentes rutas (obteniéndose más del 90 % de peces afectados que fueron inoculados vía cutánea y a través de las branquias) , un cuadro clínico similar, en el cual se uso Inmunofluorescencia Indirecta para confirmar la infección por este agente.

Las diferencias entre las altas prevalencias que se encontraron en salmón coho en Chile en contraste con los resultados del trabajo puede deberse a que esta especie es más susceptible que la trucha arco iris. La baja prevalencia registrada en Noruega puede deberse a cepas menos virulentas de *Piscirickettsia salmonis*.

Según el Manual de Animales Acuáticos de la OIE, existen varias pruebas diagnosticas para la detección de Piscirickettsiosis, para un análisis rápido y confiable se utiliza inmunofluorescencia indirecta, así como, pruebas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales o policlonales o por medio de PCR con cebadores específicos para *Piscirickettsia salmonis*, para un diagnóstico definitivo es necesario el aislamiento del agente causal. Por ser este el primer estudio de esta bacteria en el país, se utilizó Inmunofluorescencia Indirecta a manera de tamiz para determinar la frecuencia de la misma y poder realizar estudios posteriores. Por otro lado no se debería descartar el uso de pruebas mas sensibles, como las moleculares, que pueden detectar ADN de la bacteria a bajas concentraciones.

Los resultados negativos por Inmunofluorescencia Indirecta a *Piscirickettsia salmonis*, nos sugiere que esta enfermedad no se encuentra presente en esta zona o se encuentra en una prevalencia muy baja, sin embargo es necesario realizar un mayor número de muestreos en la zona para confirmar este resultado, además de realizar muestreos sobretodo en las regiones con mayores producciones de trucha arco iris como Puno y Huancavelica para descartar la presencia de este agente en el país.

Si bien la presencia de *Piscirickettsia salmonis*, ha sido descartada mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se recomendaría continuar con los muestreos en las piscigranjas estudiadas, para realizar el descarte de otros agentes infecciosos como *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium sp* y *Aeromonas sp*. cuyas presencias han sido evidenciadas en nuestro medio (Sandoval, sin publicar) y cuyas lesiones también son compatibles a las halladas en la necropsia. Por otro lado la evaluación de la calidad de agua evidencia en las tres piscigranjas un grado de turbidez moderado que sumado a la baja concentración de oxígeno en las piscigranjas Arco iris y Rumihuasi son potenciales factores de riesgo para el incremento de la susceptibilidad de las truchas estudiadas a agentes infecciosos mencionados anteriormente y que podrían ser la causa de las lesiones y signos clínicos encontrados. Además se recomienda seguir realizando muestreos para descartar la presencia de esta bacteria debido a la constante importación de ovas de truchas que se hacen en el país, a las cuales, no se las evalúa a su ingreso.

6 CONCLUSIONES

No ha sido detectada la presencia del agente *Piscirickettsia salmonis* en las piscigranjas El edén, Arco Iris y Rumihuasi del departamento de Junín mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Almendras F., Fuentealba I., Jones S., Markham F, Spangler E. 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar*. Journal of Fish Diseases; 20:409-18.
2. Austin B., Austin D. 2007. Bacterial Fish Pathogens. Characteristics of the disease, Piscirickettsiaceae representative: *Piscirickettsia salmonis*
3. Barnes M., Landolt M., Powell D., Winton J. 1998. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and partial characterization of antigens. Diseases of Aquatic Organisms. 33: 33-41.
4. Branson E., Nieto D. 1991 Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. J Fish Dis 14: 147-156.
5. Bravo S.; Campos M. 1989. Síndrome del Salmón Coho. Chile Pesquero 54: 47-48.
6. Bravo S. 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. Bulletin of European Association of Fish Pathologists. 14:137-8.
7. Bravo S. 2000. Previniendo las enfermedades en la industria salmonera. *Chile Acuícola*: 21-25.
8. Bravo S., Dölz H.; Silva M., Lagos C., Millanao A., Urbina M. 2005. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura, informe final. Puerto Montt, Chile.
9. Campbell R. 1994. Pathogenesis and pathology of the complex rickettsial infections. Veterinary Bulletin. 64: 1-18
10. Carvajal P. 2000. Industria creciente, vacunas para la salmonicultura. *Salmonoticias* 83:11-15.
11. Chern R. y Chao C. 1994. Outbreaks of a disease caused by a rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. Fish Pathology 29:61-71.

12. Comps M., Raymond J., Plassiart G. 1996. Rickettsia-like organism infecting juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 16:30-3.
13. Correal P. 1995. Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos. Tesis (Médico Veterinario). Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 62 p.
14. Cvitanich J., Garate O., Smith C. 1991. The Isolation of Rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. Journal of Fish Disease. 14: 121-145.
15. Cvitanich J., Garate N., Silva P., Andrade V., Figueroa P., Smith C. 1995. Isolation of a new rickettsia like organism from Atlantic salmon in Chile. AFS/FHS Newsletter 23:1-3.
16. Davies A. 1986. A rickettsia-like organism from dragonets, *Callionymus lyra* L. (Teleostei: Callionymidae) in Wales. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 6:103.
17. Dill WA y Cordone AJ. 1997. History and status of introduced fishes in California, 1871-1996. California Department of Fish and Game. FISH BULLETIN 178. 414 p
18. Evelyn T. 1992. Salmonid rickettsial septicemia, Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes in the Pacific Northwest. Fish Aquat Sci, Vol 116.
19. FAO. 2003. Revisión del estado mundial de la acuicultura. Circular de Pesca N°886
20. FAO. 2009. Cultured Aquatic Species Information Programme. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Actualizado al 15 de Junio de 2005. [Internet] [7 Mayo 2009] Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en
21. Fryer J., Lannan C., Garcés H., Larenas J., Smith P. 1990. Isolation of a rickettsial-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. Fish Pathology. 25: 107-114.
22. Fryer J., Lannan C., Giovannoni S., Wood N. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. Int J Syst Bacteriol 42:120-6.
23. Fryer J. y Mauel M. 1997. The Rickettsia: an Emerging Group of Pathogens in Fish. Emerging Infectious Diseases Vol. 3, No. 2.
24. Fukuda Y., Okamura A., Nishiyama M., Kawakami H., Kamaishi T., Yoshinaga, T. 2002. Granulomatous of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum* caused by an intra-cellular bacterium. Fish Pathology. 37:119-24.
25. Garcés L., Larenas P., Smith P., Sandino S., Lannan C., Fryer L. 1991. Infectivity of a rickettsia isolated from Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Disease of Aquatic Organisms. 11: 93-97

26. Godoy M. 2002. Truchicultura. 2° Edición. Perú: Editorial Perú Impreso. 247 pp
27. House M., Bartholomew J., Winton J., Fryer J. 1999. Relative virulence of three isolates of *Piscirickettsia salmonis* for coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Disease of Aquatic Organism. Vol.35, 107-113.
28. Khoo L., Dennis P., Lewbart G. 1995. Rickettsia-like organisms in the blue-eyed plecostomus, *Panaque suttoni* (Eigenmann & Eigenmann). Journal of Fish Diseases 18:157-64.
29. Kuzyk M., Thornton J., Kay W. 1996. Antigenic characterization of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Infection and Immunity. 64: 5205-5210.
30. Kuzyk M., Burian J., Thornton J., Kay W. 2001. OspA, a lipoprotein antigen of the obligate intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Journal Molecular Microbiological Biotechnology. 3: 83-93.
31. Laboratorios BiosChile. 2008. SRS – Fluorotest indirecto
32. Lannan C.N., Bartholomew J.L. and Fryer J.L., 1999. Rickettsial and Chlamydial infections. Fish disease and disorders Vol.3, 245-267
33. Larenas J., Contreras J., Oyanedel S., Morales M., Smith P. 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*.
34. Larenas, J.; Contreras, J., Smith, P. 1998. Estado actual de la Piscirickettsiosis en Salmones. Revista Aquatic n°5.
35. Larenas J., Contreras J., Smith P. 2000. Piscirickettsiosis: Uno de los principales problemas en cultivos de salmónes en Chile. Tecnovet 2- agosto.
36. Larenas J., Bartholomew O., Troncoso O., Fernandez S., Ledezma H., Sandoval N., Vera P., Contreras J., Smith P. 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. Disease of Aquatic organisms. Vol. 56, 25-30
37. Larenas J., Zamorano E., Smith P. 2005. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. Patología Veterinaria. Disponible en: <http://www.patologiaveterinaria.cl>
38. La Scola B. y Raoult D. 1997. Laboratory Diagnosis of Rickettsioses: Current Approaches to Diagnosis of Old and New Rickettsial Diseases. Journal Clinical Microbiology 35: 2715-2727.
39. Leal, J. 2003. “Estudio de seguridad de dos vacunas bivalentes inyectables para la prevención de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) y de la Piscirickettsiosis (SRS) en salmónes del atlántico (*Salmo salar*).” UACH-FCV Instituto de patología animal. Tesis de grado.

40. Mauel M. 1996. Evidence for molecular diversity of *Piscirickettsia salmonis*. Corvallis (OR): Oregon State University.
41. Mauel M., Giovannoni S., Fryer J. 1999. Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23s ribosomal DNA sequencing. *Disease of Aquatic Organisms*. 35: 115-123
42. Mauel M., Ware C., Smith P. 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. Thad Cochran National Warmwater Aquaculture Center. Mississippi State University.
43. Mikalsen J., Skjærvik O., Wiik-Nielsen J., Wasmuth M., Colquhoun D. 2007. Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *Federation of European Microbiological Societies*.
44. Ministerio de la Producción (MinProd). 2008a. La Acuicultura en el Perú. [Internet], [23 Diciembre 2008], Disponible en: <ftp://descarga:descarga@ftp.produce.gob.pe/produce/dna/Panorama.Acuicultura.pdf>
45. Ministerio de la Producción. 2008b. Viceministerio de Pesquería. Información Sectorial. Cifras Estadísticas. Acuicultura (internet). Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/portal/portal/apsportalproduce/pesqueria?ARE=3>
46. Mohamed Z. 1939. The discovery of a rickettsia in a fish. *Ministry Agriculture Cairo, Technical Science Service, Veterinary Section Bulletin* 214:1-6.
47. Morales C., Erazo E., Wilhelm V., Martinez R., Roseblatt M., Burzio L., Valenzuela P. 2001. Aislamiento, secuencia y expresión de genes de las proteínas de membrana OspA, MLT, TBP y 31 Kd de *Piscirickettsia salmonis*. *XLIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile*.
48. OIE. 2003. *Piscirickettsiosis*. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Chapter 2.1.13.
49. OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2006. *Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos*. 5° Ed. París, Francia. p 73-87.
50. Olsen A. B., Melby H. P., Spielberg L., Evensen O., Hastein T. 1997. *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Norway. *Epidemiological, pathological and microbiological findings*. *Disease of Aquatic Organisms*, Vol 31, 35-48.
51. Ostrande GK. 2000. *The Laboratory Fish*. Academic Press, San Diego. 678 p.
52. PRODUCE. 2008. *La Acuicultura en el Perú*. Dirección General de Acuicultura. Lima, Perú: Ministerio de Producción. Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/pesqueria>
53. PROMPERU. 2009. *Desarrollo Del Comercio Exterior Pesquero En El Perú 2008*. Coordinación General de Pesca y Acuicultura. Informe Anual. [Internet] [7 Mayo 2009] Disponible en:

http://export.promperu.gob.pe/pesca/DESENVOLVIMIENTO%20PESQUERO%202008_PRO MPERU.pdf

54. Reimschuessel R, Bennett RO y Lipsky M. 1992. Communications: A Classification System for Histological Lesions. *Journal of aquatic animal health* 4(2): 135-143.
55. Roberts RC y Shepherd CJ. 1980. Enfermedades de la trucha y del salmón. 1ra edición. Editorial Acribia, España. 187p.
56. Rodger H., Drinan E. 1993. Observation of a rickettsia-like organism in Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Ireland. *Journal of Fish Disease* 16:361-369
57. Rosenthal S. 2007. Frecuencia de lipidosis hepática en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la sierra central del Perú. Tesis para optar el título de MV. Lima- Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 74 p.
58. Russell C. 1997. Salmonid Rickettsial Septicemia. Disponible en: <http://hmsc.oregonstate.edu>
59. Smith P., Lannan C.N., Garces L.H., Jarpa M., Larenas J., Caswell-Reno P., Whipple M., and Fryer J.L. 1995. Piscirickettsiosis: A bacterin field trial in coho salmon (*Oncorhynchus Kysutch*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14, 137-141.
60. Smith P., Vecchiola I., Oyanedel S., Garcés L., Larenas J., Contreras J. 1996. Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 16: 164-168.
61. Smith P., Pizarro P., Ojeda P., Contreras J., Oyanedel S., Larenas J. 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Disease of Aquatic Organisms*. Vol 37: 165-172.
62. Smith P., Rojas M., Guajardo A., Contreras J., Morales M., Larenas. 2004. Experimental infection of coho salmon *Orcorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Disease of Aquatic organisms*. Vol. 61, 53-57
63. Venegas C. 1996. *Piscirickettsia salmonis*. Prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Periodo Invierno-Primavera. Tesis Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.
64. Walker D., Dumbler J. 1996. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. *Infectious Diseases*. 2: 18
65. Winkler H. 1990. Rickettsia species (as organisms). *Annual Review of Microbiology*. 44: 131-153
66. Wood D. y Azad A. 2000. Genetic manipulation of Rickettsiae: a Preview. *Infection and Immunity*, V68: 6091-6093.
67. Yuksel S., Thompson K., Ellis A., Adams A. 2001. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and associated phage particles. *Diseases of Aquatic Organisms*. 44: 231-235.

8 ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico de Piscirickettsiosis mediante el kit SRS-FluoroTest Indirecto™ de BIOS Chile™

Reactivos:

- **Reactivo Oligoclonal (100X):** mezcla de anticuerpos monoclonales altamente específicos para *Piscirickettsia salmonis*. El anticuerpo está concentrado en una solución, que además contiene albúmina de bovino y 0.1% azida de sodio como estabilizadores. El anticuerpo debe ser diluido 1:100 con la Solución de Dilución antes de usar. Por ningún motivo se debe diluir por sobre lo recomendado, ya que una mayor dilución puede afectar tanto la sensibilidad, como la especificidad del ensayo.
- **Conjugado-FITC (100X):** Solución de anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato fluoresceína (FITC). Contiene 0,1% azida de sodio. El conjugado deber ser diluido antes de usarlo.
- **Solución de Lavado (25X):** solución amortiguadora-salina a pH 7,5 y concentrada 25 veces. Antes de usar se debe diluir 25 veces con agua destilada. La solución diluida tiene un pH alrededor de 7,5 y es estable por al menos 1 año a una temperatura de 4°C.
- **Solución de Dilución:** solución proteica opalescente para la dilución del Reactivo Oligoclonal y del Conjugado-FITC.

Procedimiento:

1. Agregue sobre cada frotis 100 μ L del Reactivo Oligoclonal, previamente diluido 1:100 con la Solución de Dilución e incube los portaobjetos a temperatura ambiente por 30 minutos en una cámara húmeda cerrada. Evite que se seque la solución del anticuerpo.
2. Para lavar, traslade los portaobjetos a un recipiente adecuado el cual debe contener abundante Solución de Lavado previamente diluida 1:25 y déjelos reposar por 3-5 minutos. Repita este procedimiento tres veces más. Remueva los portaobjetos del recipiente y elimine el exceso de solución evitando que el tejido se seque.
3. Agregue sobre cada frotis 100 μ L del Conjugado-FITC, previamente diluido 1:100 con la Solución de Dilución. Incube los portaobjetos a temperatura ambiente por 30 minutos en una cámara húmeda cerrada y en oscuridad.
4. Repita el procedimiento de lavado descrito en el paso 2.
5. Ponga 10 a 20 μ L de solución de montaje, cubra la muestra con un cubreobjeto evitando la formación de burbujas, y tome la precaución de sellar el cubreobjeto con algún adhesivo disponible comercialmente. Las muestras se deben examinar en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 100X e inmersión para realizar el diagnóstico.

Resultados:

- Se considerará a una muestra como positiva al presentar una fluorescencia verde difusa específica en el citoplasma de las células infectadas.
- Una muestra se considerará negativa por ausencia de fluorescencia en las células.

Anexo 2. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia

Piscigranja El edén

Muestra	Riñon	Bazo
ES-01	(-)	(-)
ES-02	(-)	(-)
ES-03	(-)	(-)
ES-04	(-)	(-)
ES-05	(-)	(-)
ES-06	(-)	(-)
ES-07	(-)	(-)
ES-08	(-)	(-)
ES-09	(-)	(-)
ES-10	(-)	(-)
ES-11	(-)	(-)
ES-12	(-)	(-)
ES-13	(-)	(-)
ES-14	(-)	(-)
ES-15	(-)	(-)
ES-16	(-)	(-)
ES-17	(-)	(-)
ES-18	(-)	(-)
ES-19	(-)	(-)
ES-20	(-)	(-)
ES-21	(-)	(-)
ES-22	(-)	(-)
ES-23	(-)	(-)
ES-24	(-)	(-)
ES-25	(-)	(-)
ES-26	(-)	(-)
ES-27	(-)	(-)
ES-28	(-)	(-)
ES-29	(-)	(-)
ES-30	(-)	(-)

Muestra	Riñon	Bazo
ES-31	(-)	(-)
ES-32	(-)	(-)
ES-33	(-)	(-)
ES-34	(-)	(-)
ES-35	(-)	(-)
ES-36	(-)	(-)
ES-37	(-)	(-)
ES-38	(-)	(-)
ES-39	(-)	(-)
ES-40	(-)	(-)
ES-41	(-)	(-)
ES-42	(-)	(-)
ES-43	(-)	(-)
ES-44	(-)	(-)
ES-45	(-)	(-)
ES-46	(-)	(-)
ES-47	(-)	(-)
ES-48	(-)	(-)
ES-49	(-)	(-)
ES-50	(-)	(-)
ES-51	(-)	(-)
ES-52	(-)	(-)
ES-53	(-)	(-)
ES-54	(-)	(-)
ES-55	(-)	(-)
ES-56	(-)	(-)
ES-57	(-)	(-)
ES-58	(-)	(-)
ES-59	(-)	(-)
ES-60	(-)	(-)

Anexo 3. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia

Piscigranja Arco Iris

Muestra	Riñon	Bazo
PS-01	(-)	(-)
PS-02	(-)	(-)
PS-03	(-)	(-)
PS-04	(-)	(-)
PS-05	(-)	(-)
PS-06	(-)	(-)
PS-07	(-)	(-)
PS-08	(-)	(-)
PS-09	(-)	(-)
PS-10	(-)	(-)
PS-11	(-)	(-)
PS-12	(-)	(-)
PS-13	(-)	(-)
PS-14	(-)	(-)
PS-15	(-)	(-)
PS-16	(-)	(-)
PS-17	(-)	(-)
PS-18	(-)	(-)
PS-19	(-)	(-)
PS-20	(-)	(-)
PS-21	(-)	(-)
PS-22	(-)	(-)
PS-23	(-)	(-)
PS-24	(-)	(-)
PS-25	(-)	(-)
PS-26	(-)	(-)
PS-27	(-)	(-)
PS-28	(-)	(-)
PS-29	(-)	(-)
PS-30	(-)	(-)

Muestra	Riñon	Bazo
PS-31	(-)	(-)
PS-32	(-)	(-)
PS-33	(-)	(-)
PS-34	(-)	(-)
PS-35	(-)	(-)
PS-36	(-)	(-)
PS-37	(-)	(-)
PS-38	(-)	(-)
PS-39	(-)	(-)
PS-40	(-)	(-)
PS-41	(-)	(-)
PS-42	(-)	(-)
PS-43	(-)	(-)
PS-44	(-)	(-)
PS-45	(-)	(-)
PS-46	(-)	(-)
PS-47	(-)	(-)
PS-48	(-)	(-)
PS-49	(-)	(-)
PS-50	(-)	(-)
PS-51	(-)	(-)
PS-52	(-)	(-)
PS-53	(-)	(-)
PS-54	(-)	(-)
PS-55	(-)	(-)
PS-56	(-)	(-)
PS-57	(-)	(-)
PS-58	(-)	(-)
PS-59	(-)	(-)
PS-60	(-)	(-)

Anexo 4. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia

Piscigranja Rumihuasi

Muestra	Riñon	Bazo
RS-01	(-)	(-)
RS-02	(-)	(-)
RS-03	(-)	(-)
RS-04	(-)	(-)
RS-05	(-)	(-)
RS-06	(-)	(-)
RS-07	(-)	(-)
RS-08	(-)	(-)
RS-09	(-)	(-)
RS-10	(-)	(-)
RS-11	(-)	(-)
RS-12	(-)	(-)
RS-13	(-)	(-)
RS-14	(-)	(-)
RS-15	(-)	(-)
RS-16	(-)	(-)
RS-17	(-)	(-)
RS-18	(-)	(-)
RS-19	(-)	(-)
RS-20	(-)	(-)
RS-21	(-)	(-)
RS-22	(-)	(-)
RS-23	(-)	(-)
RS-24	(-)	(-)
RS-25	(-)	(-)
RS-26	(-)	(-)
RS-27	(-)	(-)
RS-28	(-)	(-)
RS-29	(-)	(-)
RS-30	(-)	(-)

Muestra	Riñon	Bazo
RS-31	(-)	(-)
RS-32	(-)	(-)
RS-33	(-)	(-)
RS-34	(-)	(-)
RS-35	(-)	(-)
RS-36	(-)	(-)
RS-37	(-)	(-)
RS-38	(-)	(-)
RS-39	(-)	(-)
RS-40	(-)	(-)
RS-41	(-)	(-)
RS-42	(-)	(-)
RS-43	(-)	(-)
RS-44	(-)	(-)
RS-45	(-)	(-)
RS-46	(-)	(-)
RS-47	(-)	(-)
RS-48	(-)	(-)
RS-49	(-)	(-)
RS-50	(-)	(-)
RS-51	(-)	(-)
RS-52	(-)	(-)
RS-53	(-)	(-)
RS-54	(-)	(-)
RS-55	(-)	(-)
RS-56	(-)	(-)
RS-57	(-)	(-)
RS-58	(-)	(-)
RS-59	(-)	(-)
RS-60	(-)	(-)