



INFORME FINAL

EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA DE PISCIRICKETTSIOSIS (SRS), ESTUDIO DE LA CO-OCURRENCIA DE *PISCIRICKETTSIA SALMONIS* CON LA INFECCIÓN DE PISCINE ORTHOREOVIRUS/HSMI, *TENACIBACULUM* SP., VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPNV) Y *RENIBACTERIUM SALMONINARUM* (BKD) EN SALMÓNIDOS DE CULTIVO EN CHILE.

EQUIPO DE TRABAJO

Patricio Bustos, MV., Especialista en Ictiopatología.

Carla Rosenfeld, MV., Dr. Patología Animal.

Isabel Aguirre, MV., Dr. Ciencias Veterinarias.

Ricardo Enríquez, MV., Dr. Medicina Veterinaria.

Álvaro Sandoval, MV., Mg.Cs.Vet.



I. RESUMEN

Con el objetivo de establecer la coocurrencia entre la Piscirickettsiosis (SRS) con otras enfermedades prevalentes en la acuicultura chilena se ejecutó un estudio de base epidemiológica que consideró tres aspectos. Análisis de información sanitaria y productiva declarada por las empresas acuícolas entre 2011-2018; diagnóstico anatomo-patológico de campo y molecular de los agentes causales y enfermedades que producen *P. salmonis* (SRS), *R. salmoninarum* (BKD), *T. maritimum*, *T. dicentrarchi*, IPNV y PRV; y un bioensayo de desafío con *P. salmonis* a peces previamente infectados con PRV.

El análisis de la información sanitaria y productiva se realizó en base a la selección de 121 centros con operación permanente en el periodo. Se determinó un alto nivel de persistencia de los agentes infecciosos que pudiesen determinar los patrones temporales de presentación de mortalidades en los centros de cultivo. Además, se detectaron notorias diferencias en las dinámicas de presentación entre los diferentes barrios salmoneros, donde posiblemente influyen factores ambientales, pero de forma diferenciada para cada barrio o centro.

Respecto de la coinfección, la evaluación clínica y molecular demostraron una alta concomitancia, aunque sin asociación predisponente para desencadenar los brotes. No se identificaron centros afectados con un único agente. La mayor proporción de los centros, presentaron 3-4 agentes (considerando variantes genéticas de *P. salmonis* y PRV) en los centros muestreados (61%) aunque clínicamente sólo una patología predominaba en la coinfección, por lo que la forma de clasificación y registro de mortalidades puede estar subestimando la coocurrencia de la infección o de la enfermedad.

Finalmente, el bioensayo mostró que las cargas virales iniciales de PRV fueron disminuyendo en la medida que avanzaba el estudio, lo que coincidió con un mayor porcentaje de peces positivos a la infección con *P. salmonis*, aunque sin manifestarse una sinergia o mayor grado de severidad de las lesiones clínicas de SRS.

II. ABSTRACT

With the objective of establishing the co-occurrence between Piscirickettsiosis (SRS) with other prevalent diseases in Chilean aquaculture, an epidemiological based study considering three aspects was done. Health information and productive analyses declared by aquatic companies between 2011-2018; anatomo-pathological and molecular diagnosis of the causal agents and the diseases that *P. salmonis* (SRS), *R. salmoninarum* (BKD), *T. maritimum*, *T. dicentrarchi*, IPNV y PRV produce; and a challenge bioassay with *P. salmonis* to previously infected fish with PRV.

The analysis of health and productive information was made based on the selection of 121 farms with permanent operation in the period. A high level of persistence of the infectious agents was determined that could reveal temporal patterns in the presentation of mortalities in culture centers. Also, notorious differences were detected in the dynamics of presentation between the different salmon neighborhoods, where environmental factors possibly influence differently for each center or neighborhood.

About the coinfection, the clinical and molecular evaluation showed a high concomitance without predisposing association to trigger the outbreaks. Affected farms with a single agent were not identify. The largest proportion of the farms presented 3-4 agents (considering genetic variants of *P. salmonis* y PRV) in the sampled centers (61%) even though only one pathology predominated clinically in the coinfection so the way of classification and mortalities registry may be underestimating the co-occurrence of the infection or the disease.

Finally, the bioassay showed that the initial viral loads of PRV were decreasing as the study progressed, this coincided with a higher percentage of positive fish to the infection of *P. salmonis*, although without manifesting a synergy or greater degree of severity of the clinical lesions of SRS.

III. RESUMEN EJECUTIVO

La presente investigación se enfoca en el esclarecimiento de las relaciones que se producen entre agentes infecciosos tanto bacterianos como virales, en forma de coinfecciones, coocurrencias y comorbilidades, con especial énfasis en aquellas que involucran a *Piscirickettsia salmonis* con otros agentes patógenos de importancia durante la engorda de salmones en fase marina tales como el Piscine Reovirus (PRV), Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), *Renibacterium salmoninarum*, *Tenacibaculum dicentrarchi* y *Tenacibaculum maritimum*.

De esta forma se diseñó un estudio de base epidemiológica con el objetivo general de Identificar patrones de coocurrencia y sucesión temporal de enfermedades infecciosas prevalentes en salmónidos en fase marina de cultivo con Piscirickettsiosis (SRS). El estudio se abordó en base a tres componentes, correspondiendo el primero a un análisis epidemiológico para describir las coocurrencias infecciosas en centros marinos con diagnóstico de SRS prevalente, y caracterizar los patrones y sucesión temporal de enfermedades infecciosas prevalentes en salmónidos en fase marina. El análisis epidemiológico se efectuó a partir de la información registrada en la base de datos del Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca). La información fue ordenada y curada a fin de obtener la descripción epidemiológica de las presentaciones de SRS en las diferentes regiones salmoneras y barrios o asociaciones de concesiones (ACS) que las componen. La descripción y la construcción de las curvas se efectuó en base a la selección de 121 centros representativos que operaron durante el periodo 2011-2018, a saber 68 de la Región de Los Lagos, 49 de la Región de Aysén y cuatro de la Región de Magallanes.

Los resultados de este análisis mostraron que existe una robusta diferenciación en las dinámicas de presentación de enfermedades de los centros pertenecientes a las Regiones de Los Lagos/Aysén versus lo que ocurre en la Región de Magallanes. En las Regiones de Los Lagos y Aysén se presentan mortalidades por SRS con y sin Renibacteriosis (BKD); y con y sin HSMI. Por su parte en la Región de Magallanes la mortalidad es por BKD, con y sin HSMI; y sin SRS.

Se determinó además que la dinámica de presentación de SRS es propia de cada ACS, donde si bien se observa claramente una estacionalidad de la mortalidad existirían factores ambientales que desencadenarían los brotes, pero no de la misma forma en cada centro constituyente del barrio. Asimismo, se evidencia un alto grado de endemismo persistente de SRS evidenciado por el continuo registro de peces muertos por la enfermedad, sin necesidad de constituir un brote bajo los parámetros definidos por la norma y que de alguna forma estaría pasando desapercibido por parte de productores y autoridad en función de la implementación de medidas oportunas de control que aminoren los efectos de los brotes una vez que se desencadenan. En base al análisis de las curvas de mortalidad se plantea a modo de recomendación, explorar la utilización de cartas de control de

procesos, o sus adaptaciones, como herramienta de gestión sanitaria. Esta herramienta permite trabajar de una forma más individual a partir del establecimiento de límites teóricos determinados por el historial sanitario y de diagnósticos del centro de cultivo, pudiendo predecir brotes en la medida que las mortalidades por SRS vayan superando los niveles esperados.

El segundo componente del estudio consideró la evaluación clínica, anátomo-patológica y molecular para los diferentes agentes patógenos mencionados anteriormente, mediante visitas a centros de cultivo y muestreos de peces clínicamente enfermos. Se elaboró un registro de las lesiones detectadas externas e internas, y se aplicaron pruebas de RT-PCR para el diagnóstico molecular de las diferentes bacterias y virus. De esta forma se analizaron muestras de 46 centros de cultivo que fueron diagnosticados para los agentes: *P. salmonis* (genogrupos EM-90 like y LF-89 like), *R. salmoninarum*, *T. dicentrarchi*, *T. maritimum*, IPNV y PRV, incluyendo sus variantes PRV-1, PRV-2 y PRV-3. Los resultados mostraron plena consistencia con lo observado a partir del análisis epidemiológico: una alta infección con PRV (100% de los centros y 70% de los peces) y *T. dicentrarchi* (100% de los centros y 72% de los peces). Un 78% de los centros presentaron más de tres de los patógenos evaluados con un 17% con más de cinco.

En el aspecto clínico y anátomo patológico se evidenció una predominancia de la enfermedad de base (principalmente SRS), con pocos y sutiles elementos distintivos que permitan diagnosticar una coocurrencia o comorbilidad con otro patógeno. Lo más frecuente de observar correspondió a anomalías branquiales coocurrentes que pudiesen estar asociadas a la presentación del complejo branquial (CGD), descrita en Noruega y en Chile, pero con causas bastante diferenciadas. Esta situación pudiera determinar que de alguna forma la metodología de registro de mortalidades que existe en la actualidad pudiera estar subestimando la coinfección/coocurrencia, dado que las categorías se establecen como únicas, sin posibilidad de hacer el registro como una doble patología.

El tercer componente incluido en el estudio correspondió a un bioensayo de desafío por cohabitación de peces infectados con PRV-1. El objetivo de este bioensayo fue determinar la dinámica de la evolución de la coinfección a través del análisis de la presentación de mortalidades, carga bacteriana (*P. salmonis*) y viral (PRV), lesiones clínicas, anátomo-patológicas e histopatológicas, y expresión de genes marcadores de respuesta inmune innata y específica (IFN-1, IL-1 β , IL-8, IL-12 y proteína MX).

A partir del día 10 post infección se inició la mortalidad de los troyanos infectados intraperitonealmente, y partir del día 14 comenzó un muestreo semanal, considerando toma de muestra de sangre, riñón anterior y bazo para los análisis moleculares y de branquias, bazo, hígado, corazón y riñón para evaluación histopatológica.

Los resultados mostraron que las cargas virales de PRV fueron disminuyendo a medida que avanzaron los muestreos del estudio. Asimismo, esta disminución coincidió con un mayor porcentaje de peces positivos a la infección con *P. salmonis*. Por su parte, la expresión de los genes marcadores de IFN-1 e IL-12 son concordantes con la presencia de PRV-1 y *P. salmonis* respectivamente y la expresión de los otros genes evaluados podría estar influida por la coinfección y sin un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias en forma pronunciada en ninguno de los grupos evaluados.

Finalmente, y en consistencia con los resultados del análisis de la información epidemiológica y los resultados de campo, se observó que al menos durante el periodo del estudio, no se observaron lesiones macroscópicas características de SRS ni HSMI en forma simultánea.

IV. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas y no infecciosas son parte del ciclo de producción y constituyen un punto crítico a resolver para asegurar la sustentabilidad de los sistemas productivos de salmones. Dentro de las causas infecciosas la principal en el país es causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, y se describen otras enfermedades prevalentes que incluyen agentes virales (PRV, IPNv) y otros agentes bacterianos (*Renibacterium salmoninarum*, *Tenacibaculum sp.*), además de síndromes de etiología no determinada. Existe evidencia de que los agentes infecciosos pueden interactuar entre sí, dentro de un mismo hospedero, presentándose en forma simultánea como coinfecciones, o con diferentes agentes infecciosos prevalentes. Estas co-infecciones podrían estar interfiriendo y complicando los sistemas de diagnóstico y control de las infecciones bacterianas y virales. Es por esto que esta propuesta de investigación, apunta al esclarecimiento de las relaciones que se producen entre agentes infecciosos tanto bacterianos como virales, en forma de coinfecciones con especial énfasis en coinfecciones que involucran a *P. salmonis*.

Objetivo general

Identificar patrones de coocurrencia y sucesión temporal de enfermedades infecciosas prevalentes en salmónidos en fase marina de cultivo con Piscirickettsiosis.

Objetivos específicos

1. Describir epidemiológicamente las coocurrencias infecciosas en centros marinos con diagnóstico de Piscirickettsiosis prevalente en salmónidos de cultivo.
2. Caracterizar patrones y sucesión temporal de enfermedades infecciosas prevalentes en salmónidos en fase marina de cultivo con Piscirickettsiosis.
3. Analizar molecular y clínicamente la coocurrencia y/o comorbilidades infecciosas (BKD, IPN, PRV/HSMI) asociadas a Piscirickettsiosis en salmónidos en fase marina de cultivo.
4. Evaluar el efecto de la infección previa con PRV en la respuesta a la infección con *P. salmonis* en cohabitación.

V. ACTIVIDADES

A continuación, se presentan los detalles de actividades según las etapas definidas en el plan de trabajo y los resultados comprometidos.

ETAPA 1. SELECCIÓN DE CENTROS

Corresponde a la selección de centros para ejecutar el análisis epidemiológico y los muestreos en terreno a partir del análisis de reportes históricos de mortalidad en centros marinos activos productores de salmónidos. En la Tabla 1 se presenta el estado de avance de las actividades correspondientes a la etapa.

Tabla 1. Estado de avance de la etapa 1, selección de centros para el estudio en base al riesgo de SRS.

Etapas	Actividad	Estado actual del resultado
Selección de centros para el estudio en base al riesgo de Piscirickettsiosis	Solicitud de bases de datos de causas de mortalidad (PSGM) a SERNAPESCA de 6 años.	Finalizada
	Validación de la base de datos	Finalizada
	Selección de 100 centros con información del ciclo productivo y reportes de brotes de Piscirickettsiosis y co-ocurrencia de otras enfermedades	Finalizada

ETAPA 2. IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE SUCESIÓN TEMPORAL

Tabla 2. Estado de avance de la etapa 2, identificación de patrones de sucesión temporal de enfermedades prevalentes.

Etapa	Actividad	Estado actual del resultado
Identificación de patrones y sucesión temporal de enfermedades prevalentes	Construcción de curvas de mortalidad por Piscirickettsiosis por centro, por ciclo productivo, por especie y región	Finalizada
	Identificación y cuantificación de mortalidades asociadas a centros con Piscirickettsiosis	Finalizada
	Construcción de curvas de mortalidad por Piscirickettsiosis asociadas temporalmente a IPN, BKD, PRV y Tenacibaculum y otras, por centro, por ciclo productivo, por especie y región	Finalizada
	Identificación de patrones y establecimiento de sucesión temporal de curvas de mortalidad por Piscirickettsiosis y co-ocurrencia con IPN, BKD y PRV.	Finalizada

Los resultados de las etapas antes indicadas y obtenidos hasta la fecha son los siguientes:

Resultado 1: Descripción epidemiológica de centros con diagnóstico de Piscirickettsiosis

Los centros marinos analizados se agruparon por barrios por especies tanto S. salar, con S. coho y Trucha arcoíris. Para el análisis se tomó un periodo de permanencia o actividad de los centros de 6 a 8 años correspondiente al periodo 2011-2018.

En la Región de Los Lagos se estudiaron 68 centros agrupados en trece barrios o asociación de concesiones (ACS), en Aysén 49 centros de 14 barrios y en Magallanes cuatro centros pertenecientes a cuatro barrios.

Tabla 3.-Distribución por región de los centros marinos del estudio agrupados por barrios, periodo 2011-2018.

Región	Centros		Barrios	
	n°	%	n°	%
Los Lagos	68	56,2	13	41,9
Aysén	49	40,5	14	45,2
Magallanes	4	3,3	4	12,9
Total	121	100	31	100

Con respecto a las especies producidas por lo centros del estudio, conforme se indica en la Tabla 4 predomina el S. salar seguida de S. coho y Trucha arcoíris.

Tabla 4.-Distribución por región de los centros marinos del estudio según especie producida, periodo 2011-2018.

Región	S. salar		S. coho		T. arcoíris		Total
	n°	%	n°	%	n°	%	
Los Lagos	44,0	64,7	13,0	19,1	11,0	16,2	68,0
Aysén	41,0	83,7	3,0	6,1	5,0	10,2	49,0
Magallanes	4,0	100,0		0,0		0,0	4,0
Total	89,0		16,0		15,0		121,0

Distribución geográfica de los centros del estudio y las especies producidas se presentan en la figura 1 (A, B y C).

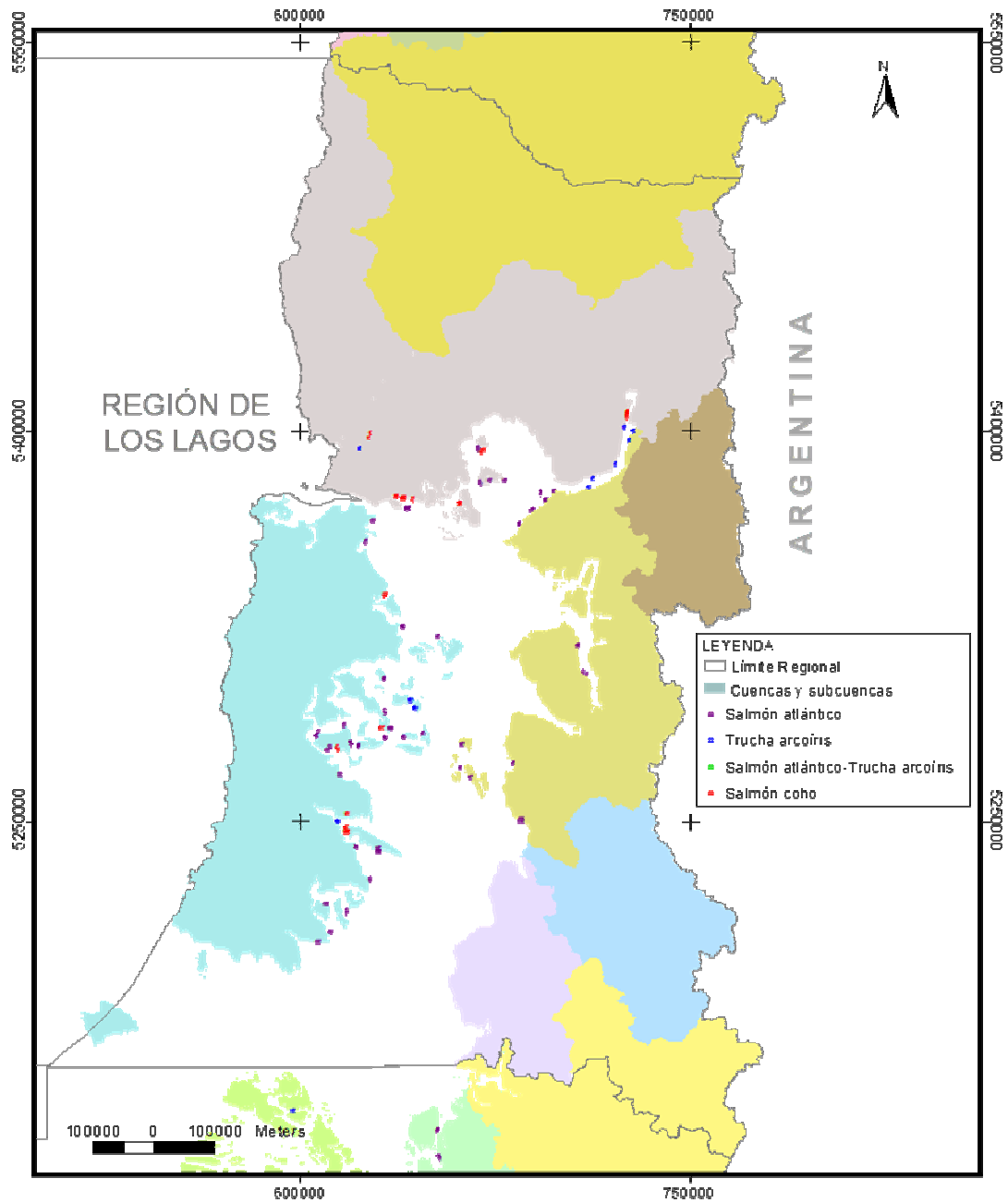


Figura 1A.- Mapa de los centros del estudio en la Región de Los Lagos, periodo 2011-2018.

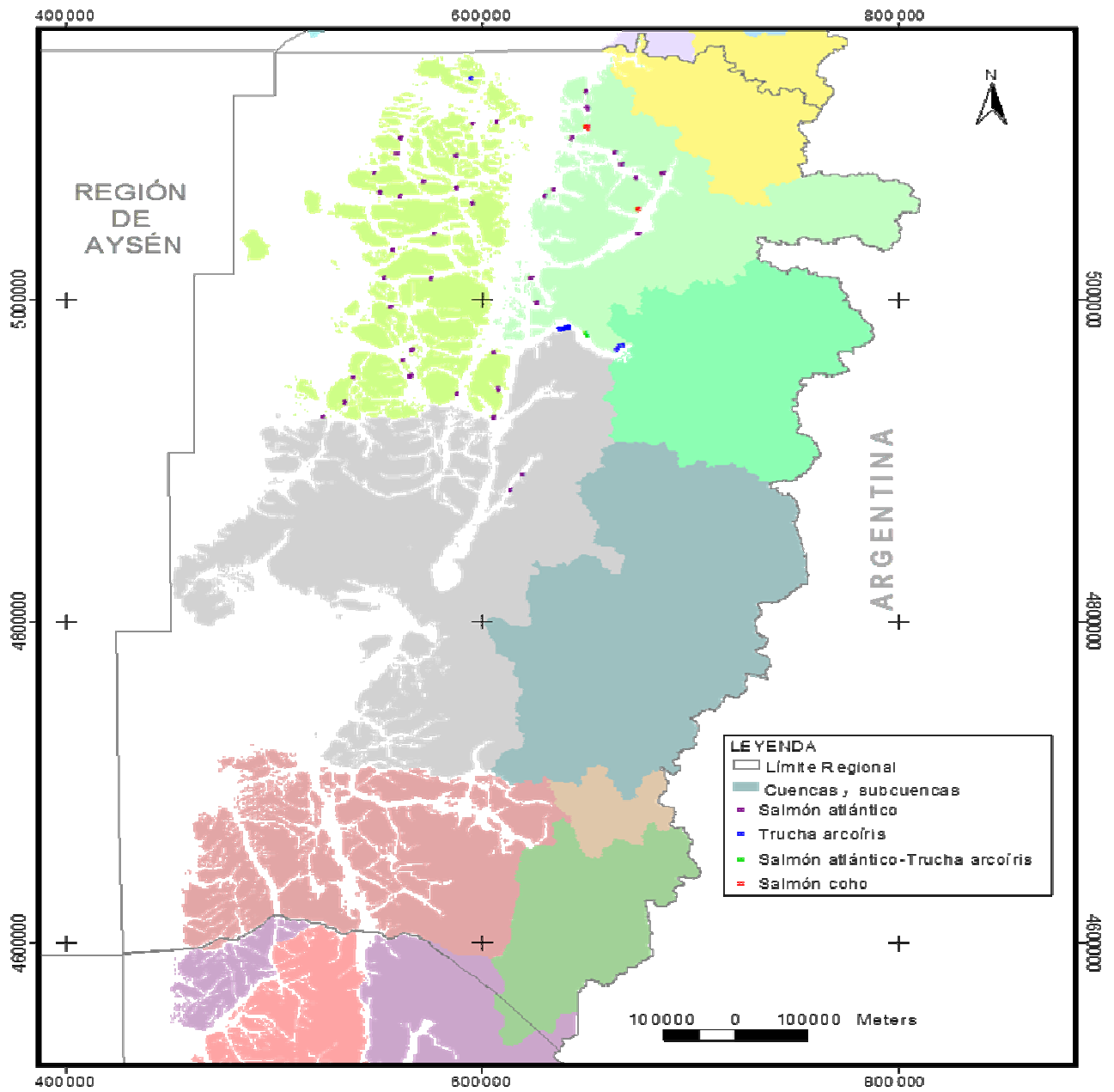


Figura 1B.- Mapa de los centros del estudio en la Región de Aysén, periodo 2011-2018.

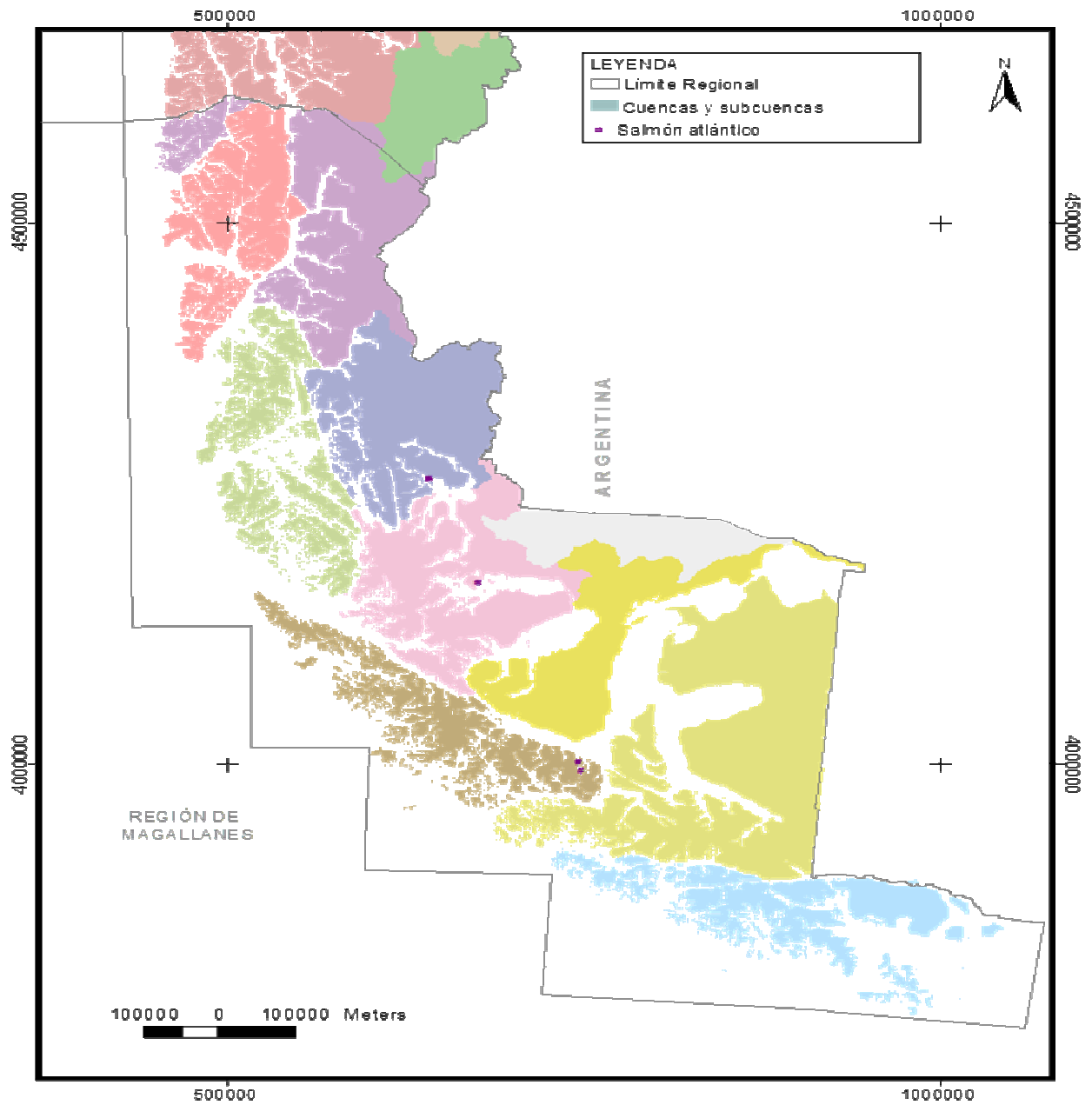


Figura 1.- Mapa de los centros del estudio en la Región de Magallanes, periodo 2011-2018.

Se determinó a través de un análisis estadístico descriptivo multivariado (Análisis de correspondencias simples), la mortalidad asociada a las principales enfermedades que afectan a los peces de los centros seleccionados en el año 2017. El resultado del análisis indica que se observan dos grandes grupos, que se señalan en la figura 2:

- Primer grupo formado por centros de las regiones de Los Lagos y Aysén en donde se presentan centros con mortalidades asociadas a SRS, con y sin BKD y con y sin HSMI.
- Segundo grupo formado por centros de la región de Magallanes con mortalidades asociadas a BKD con y sin HSMI y sin SRS.

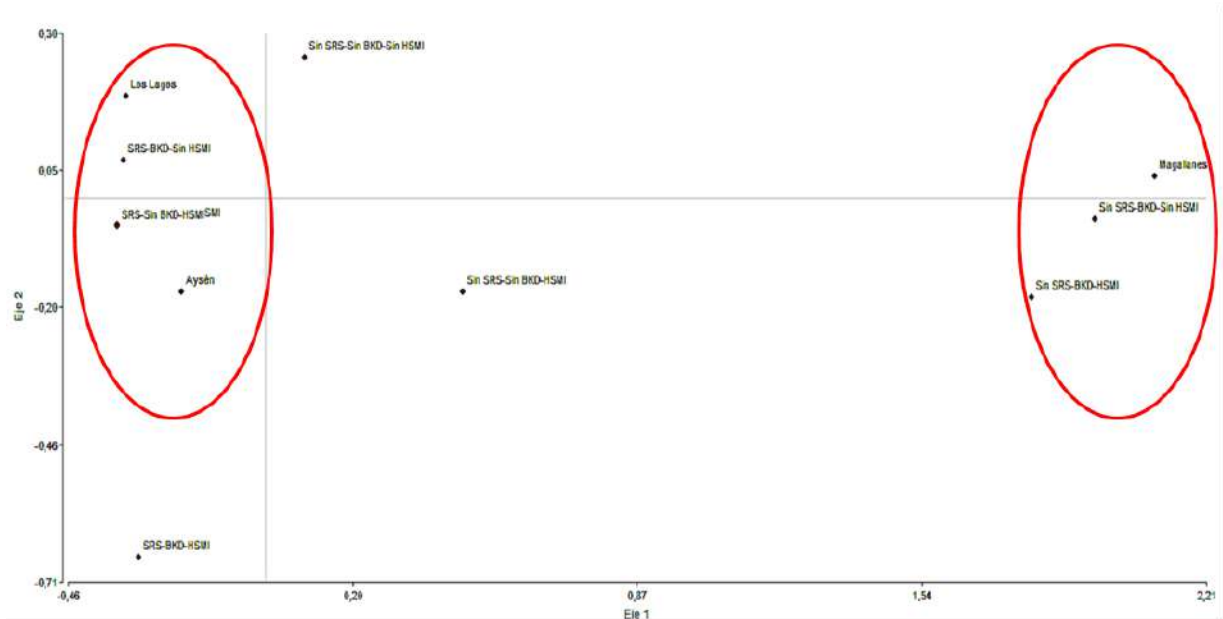


Figura 2. Análisis de correspondencias simples según mortalidades asociadas a enfermedades según región, año 2017. Chi $p > 0,05$

Este análisis nos indica que desde el punto de vista estadístico, **existen similitudes en la presentación de enfermedades entre las regiones de Los Lagos y Aysén, en cambio habría diferencias con la región de Magallanes**, situación que se ha corroborado empíricamente a partir de la observación de profesionales del sector. Por otro lado, da cuenta que los centros presentan diferencias en la presentación de las patologías generando subgrupos dentro de las regiones por ejemplo SRS, con y sin BKD y con y sin HSMI y que en Magallanes sean grupos de centros asociados a brotes de BKD con o sin HSMI sin SRS.

Resultado 2: Caracterización de patrones y establecimiento de la sucesión temporal de enfermedades infecciosas prevalentes en salmónidos en fase marina de cultivo con Piscirickettsiosis.

Para el estudio de los patrones de presentación de mortalidades asociadas a enfermedades endémicas del sistema productivo marino de salmónidos en Chile, nos basaremos el modelo SIR. Este modelo explica que los mecanismos de transmisión de muchas enfermedades infecciosas se fundamentan en el contacto entre un individuo sano y otro infectado.



Figura 3. Modelo de transmisión de enfermedades infecciosas SIR.

De acuerdo con dicho modelo, la población se divide en 3 grupos o compartimentos diferentes: **SUSCEPTIBLES-INFECTADOS-RECUPERADOS/MUERTOS**. En el modelo SIR, los individuos susceptibles pueden contagiarse y pasar del estado S (susceptible) al I (infectado). A su vez, los infectados se recuperan y pasan del estado I (infectado) al estado R (recuperado). La relación entre las tasas de transición de un estado a otro es lo que determina la evolución de una epidemia o brote, es decir, tenemos un ritmo de entrada de individuos al estado I (infectado) y otro de salida. Si el número de individuos infectados a cada instante es mayor que el número de individuos que se recuperan de la enfermedad o mueren, entonces la epidemia o brote evoluciona más rápido en el tiempo. Si por el contrario, el número de individuos recuperados es mayor que el número de infectados, el ritmo de la epidemia comienza a descender. En base a este modelo se fundamenta este estudio.

Se debe recordar que desde el punto de vista epidemiológico un brote epidémico es definido como un número des usual o no esperados de casos. En acuicultura se establece que a partir de un cierto porcentaje se define como brote, en donde, dé además de incluir el criterio de un número no esperado de casos se agrega el impacto productivo.

A.-Identificación y caracterización de patrones y establecimiento de la sucesión temporal de Piscirickettsiosis.

A.1.- A nivel de Centros.

Se analizaron centros con mortalidades por SRS con distintos niveles de mortalidad a través de las semanas epidemiológicas donde se identificaron 3 curvas de mortalidad:

- 1.-Curvas con alta mortalidad, definidas como brote epidémico.
- 2.-Curvas con baja mortalidad, pero con forma de brote.
- 3.-Curvas con mortalidades persistentes en el tiempo.

Con respecto de la frecuencia de las curvas observadas, la curvas con baja mortalidad, con forma de brote fue la más frecuente, seguida de Curvas con mortalidades persistentes en el tiempo y en menor frecuencia fueron los Curvas con brotes epidémicos. En algunos casos se presenta más de un patrón de los descritos. Con los centros estudiados no se observó que exista diferencia por especie o región.

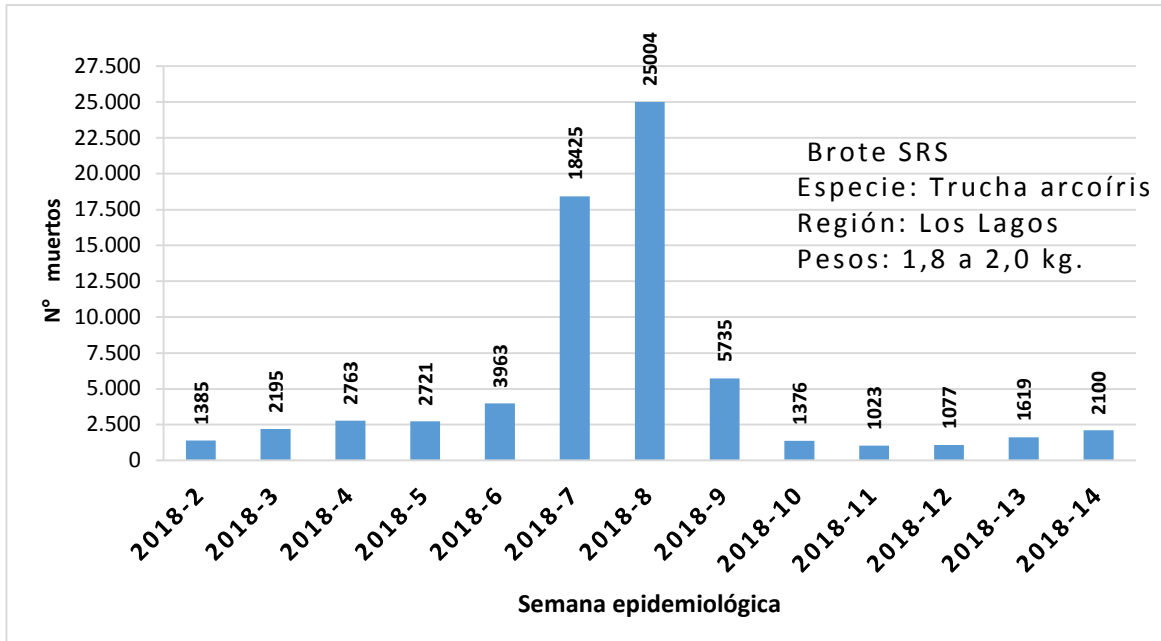
1.-Curvas con alta mortalidad, definidas como brote epidémico.

Si bien la definición de alta mortalidad es un término relativo y depende del contexto y nivel de endemismo y de la letalidad de la enfermedad. Si consideramos de acuerdo a lo establecido por la autoridad SERNAPESCA como brote de alta mortalidad (centro CAD) aquellos centros que presentaron curvas de mortalidad mayor al 0,35%.

1.1.-Caso 1

Esta curva de un brote SRS se produjo en los inicios del año 2018. En el gráfico 1 podemos observar la curva del brote, que empezó en la semana 2 del año 2018, mes de enero, produciendo un aumento relativo de las mortalidades de peces hasta la semana 6 y un aumento brusco la semana 7 de 3963 a 18425 y llegando a su máximo de 25004 de peces muertos, en la semana 8. Posterior al máximo de mortalidades se registró una disminución progresiva de éstas hasta la semana 14, pero persisten mortalidades asociadas. El brote presentó una duración total de 14 semanas. Al analizar la curva en términos de porcentaje de mortalidad se observa una forma similar (Gráfico 1, A y B).

A



B

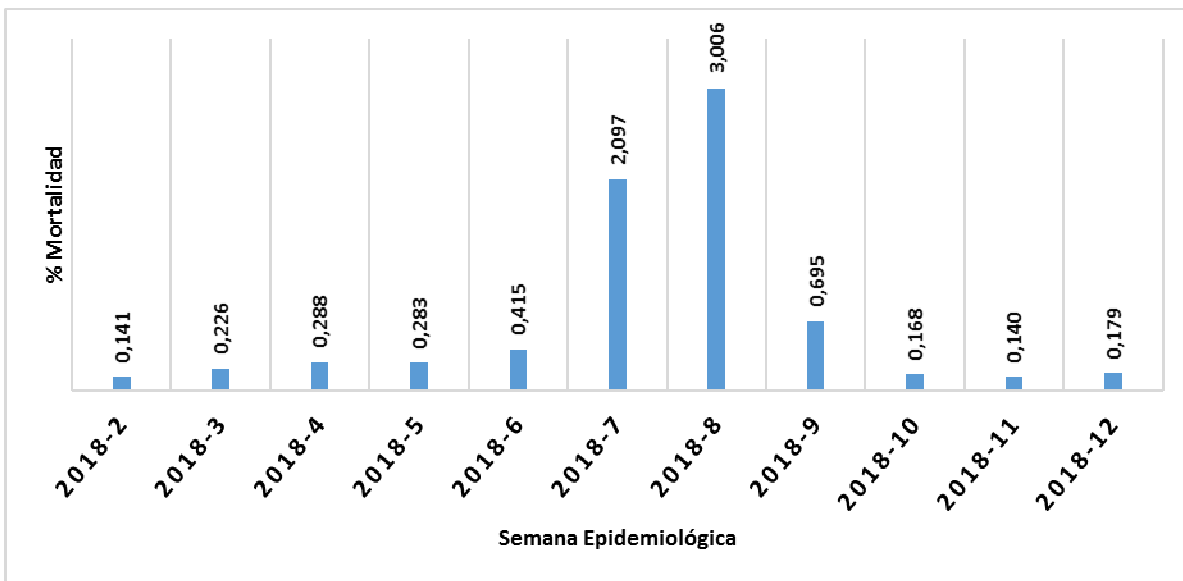


Grafico 1. Curva de mortalidad por SRS (número y porcentaje), en centro productor de trucha arcoíris de región de Los Lagos en el año 2018. A: mortalidad en cifras absolutas; B: porcentaje de mortalidad.

Al estudiar las formas de las curvas de mortalidades según las especies salmónidas (Figura 4) podemos observar que la forma de las curvas es similar en las tres especies. Los brotes de altas mortalidades pueden presentar diferentes magnitudes como se observa en las gráficas del anexo 2, pero como se indica, manteniendo la forma de las curvas.

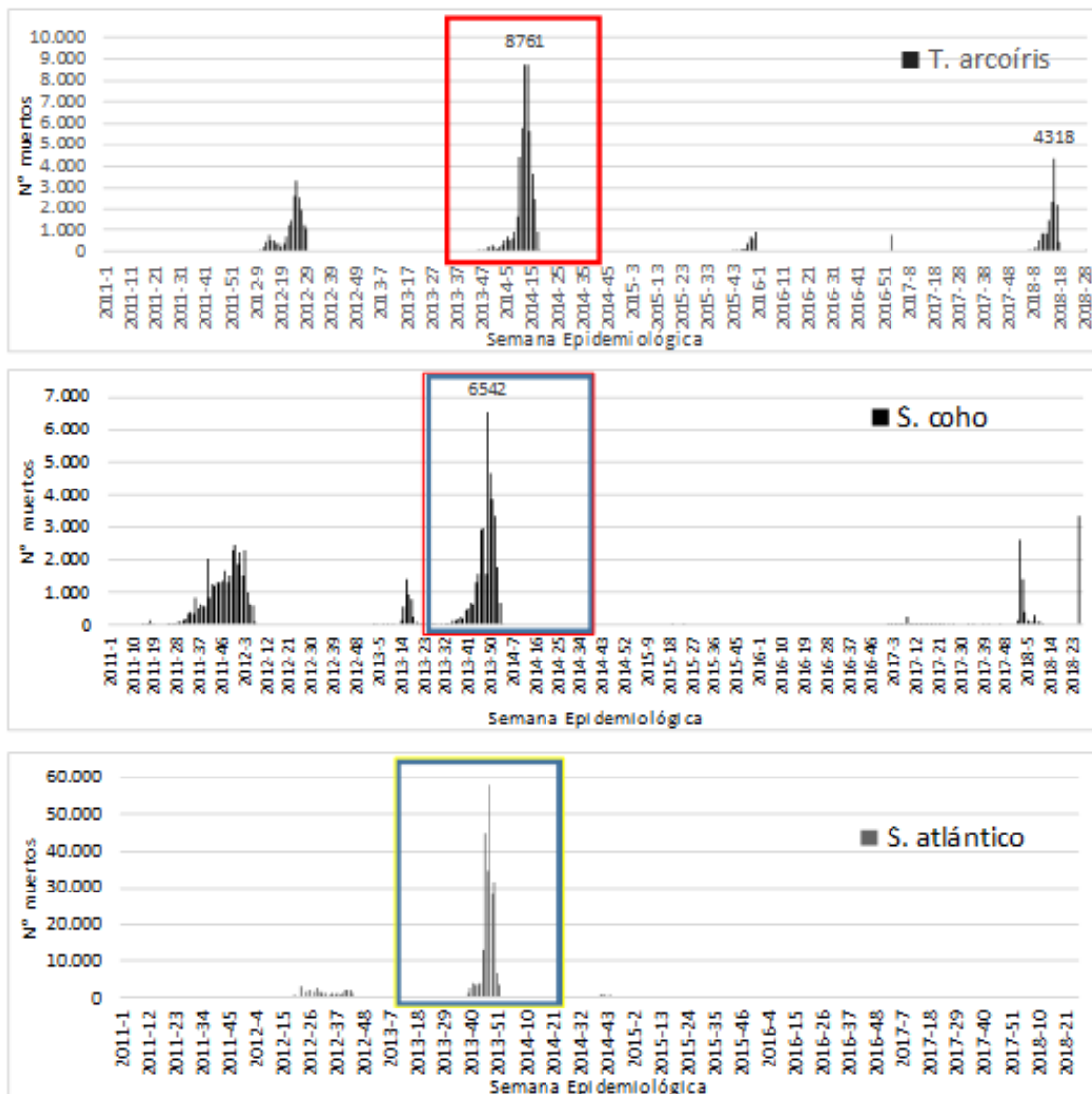


Figura 4. Formas de las curvas de alta mortalidad (número) de peces según especie de salmonídeos.

1.1.-Caso 2 en un contexto de barrio y ciclos productivos.

El segundo centro estudiado es productor de T. arcoíris y en este análisis agregaremos el contexto de barrio. En este barrio se analizaron doce centros que producen S. salar, Trucha arcoíris y S. coho. En el periodo de aproximadamente ocho años se destacan pocos brotes, específicamente tres con semanas sobre los diez mil peces muertos, situación que se presenta en los años 2013 con dos centros y uno en el año 2018 y brotes de menor magnitud en otros años.

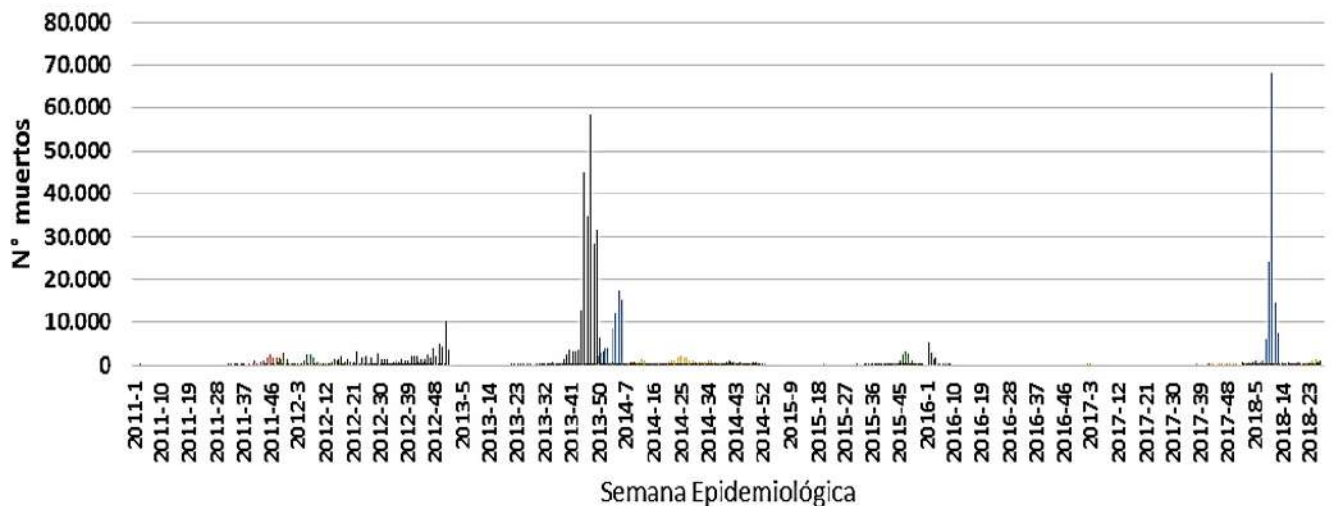
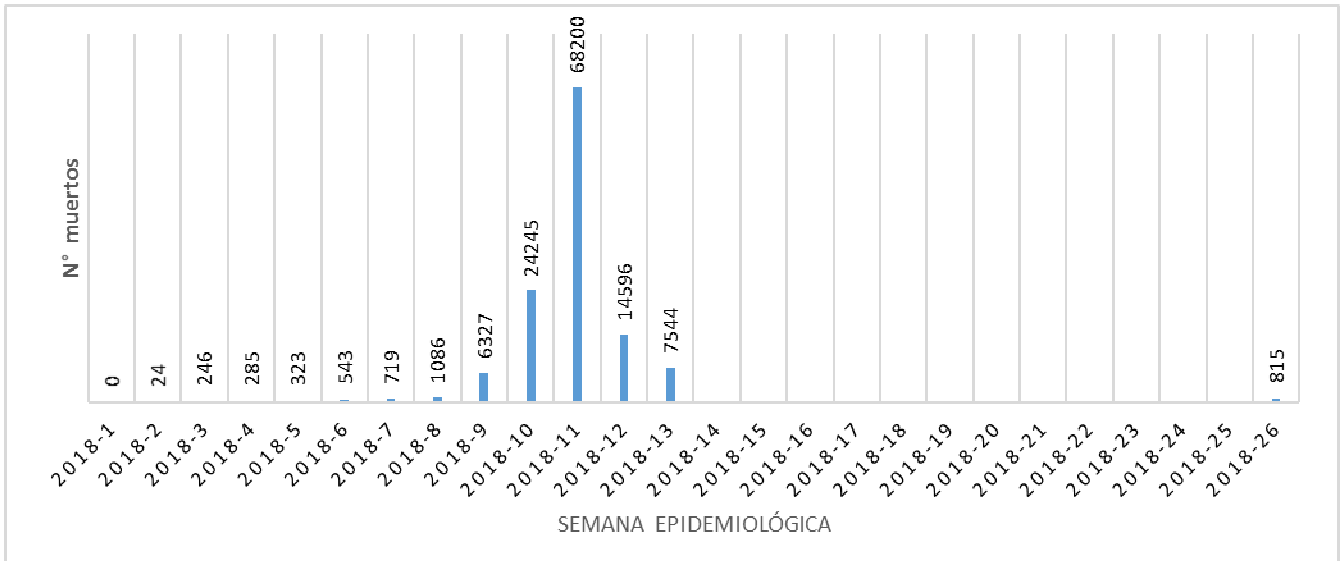


Gráfico 2. Curva de mortalidad por SRS en centros de un barrio de la región de Los Lagos, periodo 2011-2018 (Caso 2).

Al evaluar la evolución del centro que en promedio presento una población de 955.416 peces, podemos ver en los gráficos 3, 4 y 5 un incremento sistemático de las mortalidades a partir de la semana 2 produciéndose un aumento alarmante en la semana 9 con 6.327 para saltar a 24.245 en la semana 10 y llegando a la máxima mortalidad en la semana 11. El brote comienza a disminuir hasta la semana 13 y se reportan un nuevo reporte en la semana número 26.

A



B

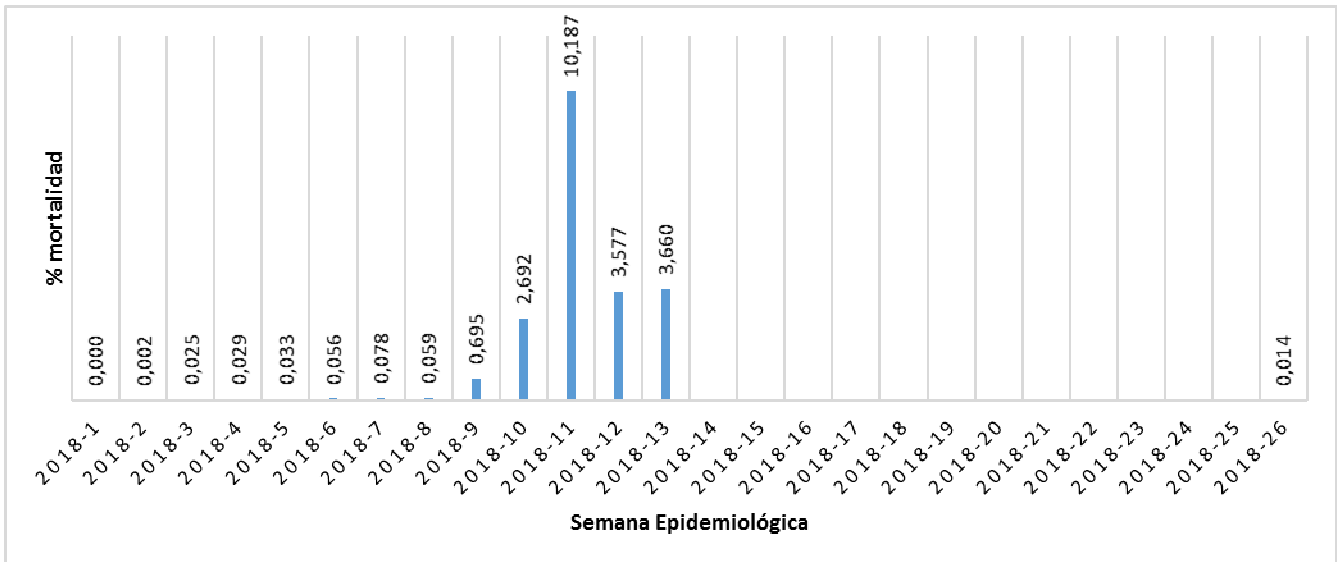


Grafico 3. Curva de mortalidad por SRS (número y porcentaje), en centro productor de Trucha arcoíris de región de Los Lagos en el año 2018. A: mortalidad en cifras absolutas; B: porcentaje de mortalidad.

Al analizar en detalle podemos ver que el aumento es significativo, con una alta correlación y por otro lado se observa un aumento de las mortalidades directamente proporcional con el tiempo en semanas (R^2 91%) una vez llegado al máx. mortalidades se produce una relación inversamente proporcional, lo que indicaría una efectividad de las medidas aplicadas para controlar el brote como son la aplicación de antibióticos y eliminación de mortalidades o que éste sea auto limitante.

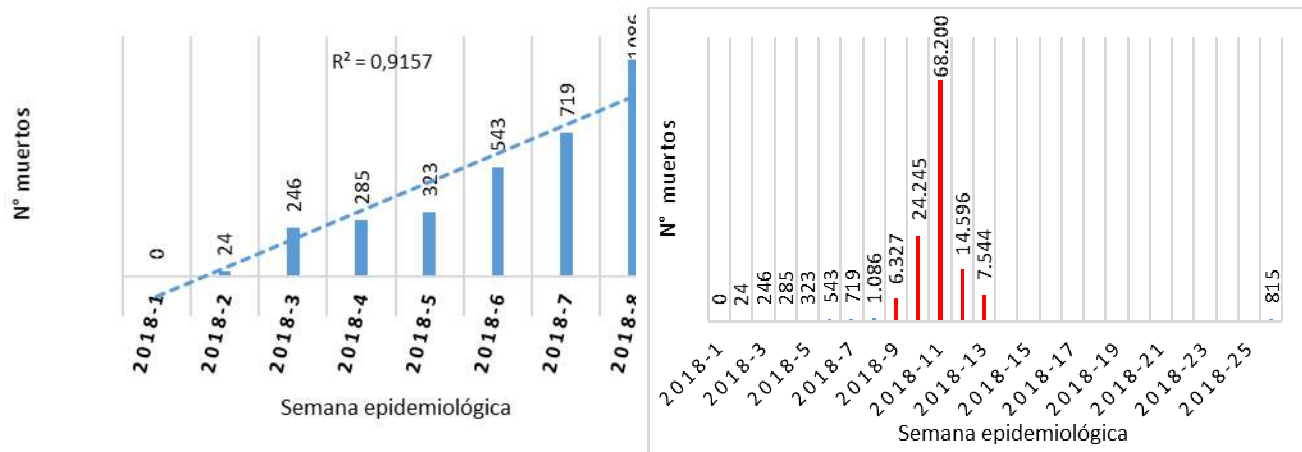


Gráfico 4. Curva de mortalidad por SRS y regresión prebrote, en centro productor de Trucha arcoíris de región de Los Lagos en el año 2018 (caso 2).

En este punto surge la posibilidad de considerar herramientas que pudieran utilizarse para predecir brotes en un centro, como son los gráficos de control de procesos. Al realizar el análisis a través de un gráfico de control de proceso se puede observar que a si a partir de un límite teórico establecido se supera lo esperado, se da inicio al brote considerando un número inusual de casos por mortalidades por SRS.

De esta forma, un centro de cultivo que está diagnosticando diariamente mortalidades por SRS, es capaz de determinar el nivel que acepta por día, dado que ha estudiado y registrado su evolución en cada semana epidemiológica. Así, al momento de utilizar una herramienta de control estadístico de procesos, puede detectar si se produce una “racha” o aumento progresivo de mortalidades, teniendo la posibilidad de advertir que se está en una potencial condición de fuera de control y que pudiera desencadenar una situación de brote epidémico. Esta herramienta no es susceptible de aplicar para cualquier enfermedad, no obstante, esta recomendación se hace al momento de observar y analizar los distintos comportamientos del número de peces muertos asociados a SRS en el presente estudio, concluyéndose que su implementación es perfectamente factible como herramienta de gestión para el control de esta patología.

En este contexto, es imprescindible la profundización en la utilización de esta herramienta, existiendo la necesidad de evaluar comportamientos de modo de buscar la carta que mejor logre predecir los brotes. Por ejemplo, tomando un centro de referencia de alta mortalidad con 983.342 peces se pudiera realizar el análisis a través de un gráfico de control de proceso por unidades individuales con 3 desviaciones estándar (3σ). De esta forma si se observa que a partir del límite teórico establecido de 4.823 peces (definido como límite central crítico de la carta) se supera lo esperado, se da inicio a la condición de brote considerando un número inusual de casos por mortalidades por SRS (Ver anexo 4).

Diagrama de control para unidades individuales de mortalidades asociadas a SRS

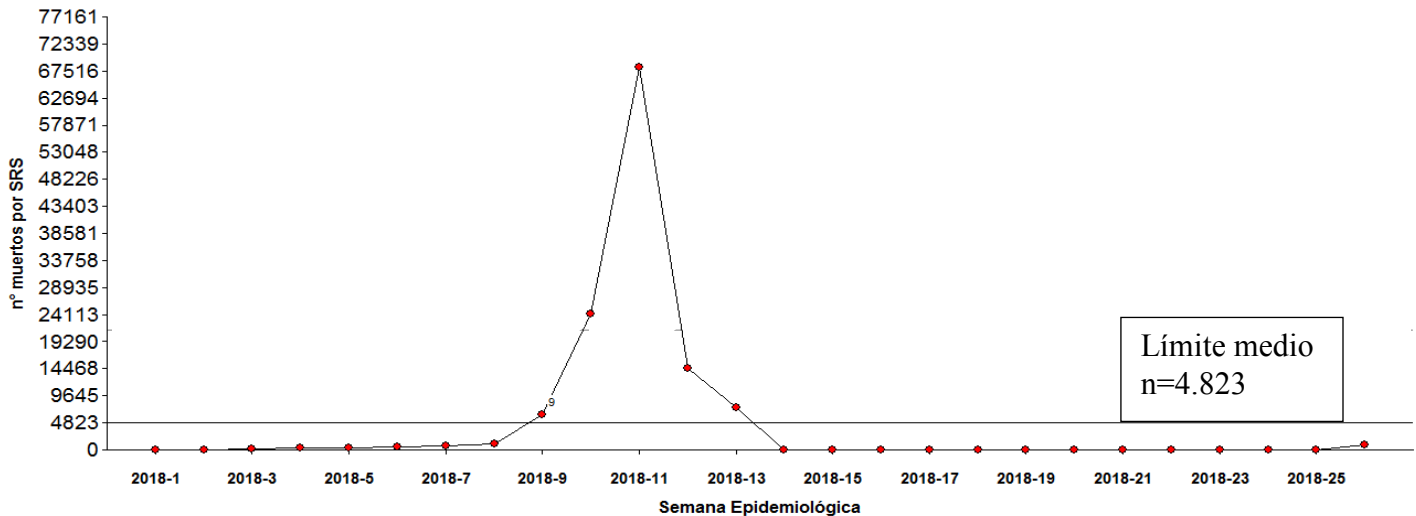


Grafico 5. Curva de mortalidad por SRS, representada por un Diagrama de control para unidades individuales en brote epidémico Caso 2.

Otro ejemplo es a partir del análisis de las curvas con un bajo número de mortalidad y trabajar con el límite medio y el límite superior, que son más bajos que en condición de brote, pero ambos análisis permitirían explorar alternativas de límites que posteriormente serían validados empíricamente (Gráfico 6).

Diagrama de control para unidades individuales

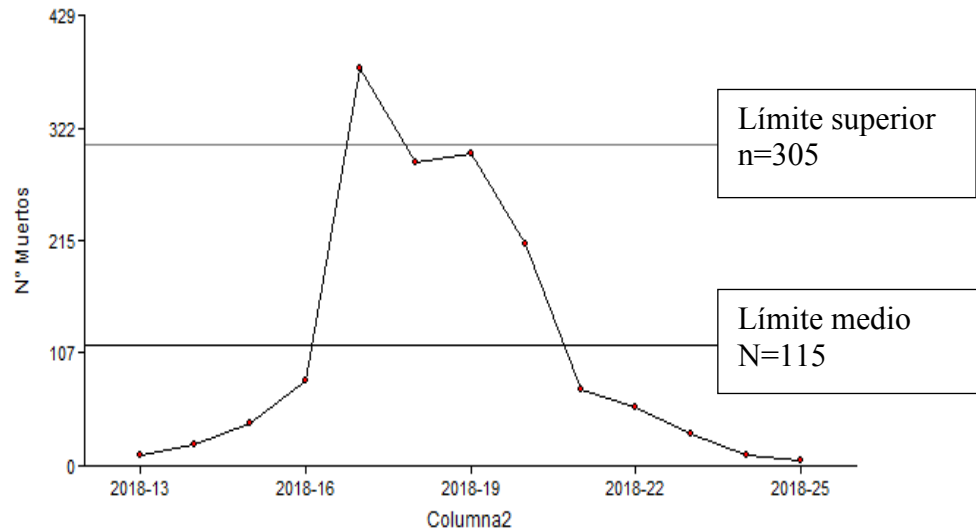


Grafico 6. Curva de mortalidad por SRS, representada por un Diagrama de control para unidades individuales en brote de baja mortalidad.

Como se puede observar a través del análisis de los comportamientos del ciclo y de los ciclos productivos en condiciones de los patrones de curvas que generan los centros con o sin brote epidémico, se podría determinar el valor límite ya sea asociado a un centro o al barrio.

Cartas de control de proceso

Para el uso metodológico de las cartas debe de trabajar con variables con distribución normal, lo que debe ser tenido en consideración al analizar los brotes. Para ello se debe de establecer, al momento de elaborar las curvas de mortalidad, la capacidad diagnóstica de mortalidades por centro, así como también los efectos de las medidas aplicadas para el control del brote, lo que generaría un corte abrupto de la curva que puede deberse entre otras, a las siguientes situaciones.

- 1.-Buen resultado de terapia antibiótica
- 2.-Eliminación de la jaula con el brote o cosecha
- 3.-Un brote auto-limitado

No obstante, se puede realizar una adaptación a esta metodología a través de la normalización de las variables o utilizar cartas para variables sin normalidad. Es por ello que surge la necesidad de seguir estudiando, para lo cual se debe incorporar un grupo de centros de cultivo que presente información histórica en detalle y con una alta

sensibilidad diagnóstica en términos de la capacidad cierta de detectar a los verdaderos enfermos y considerando además los siguientes aspectos:

- Estudio de las distribuciones y opciones de normalización.
- Determinar a través del estudio histórico (ciclos productivos con y sin programa de control) de los brotes y establecer sus comportamientos.
- Determinar qué tipos de cartas de control de procesos predicen mejor un brote.
- Validación de la información a partir de datos empíricos.

A este análisis se debe de agregar aspectos asociados a manejos sanitarios como el uso de vacunas, tratamientos antibióticos, además de los barrios o macrozonas. Cabe señalar también que existen software especializados en el análisis de cartas de control como por ejemplo Statgraphics®, lo que también debiese ser considerado para la implementación de esta herramienta.

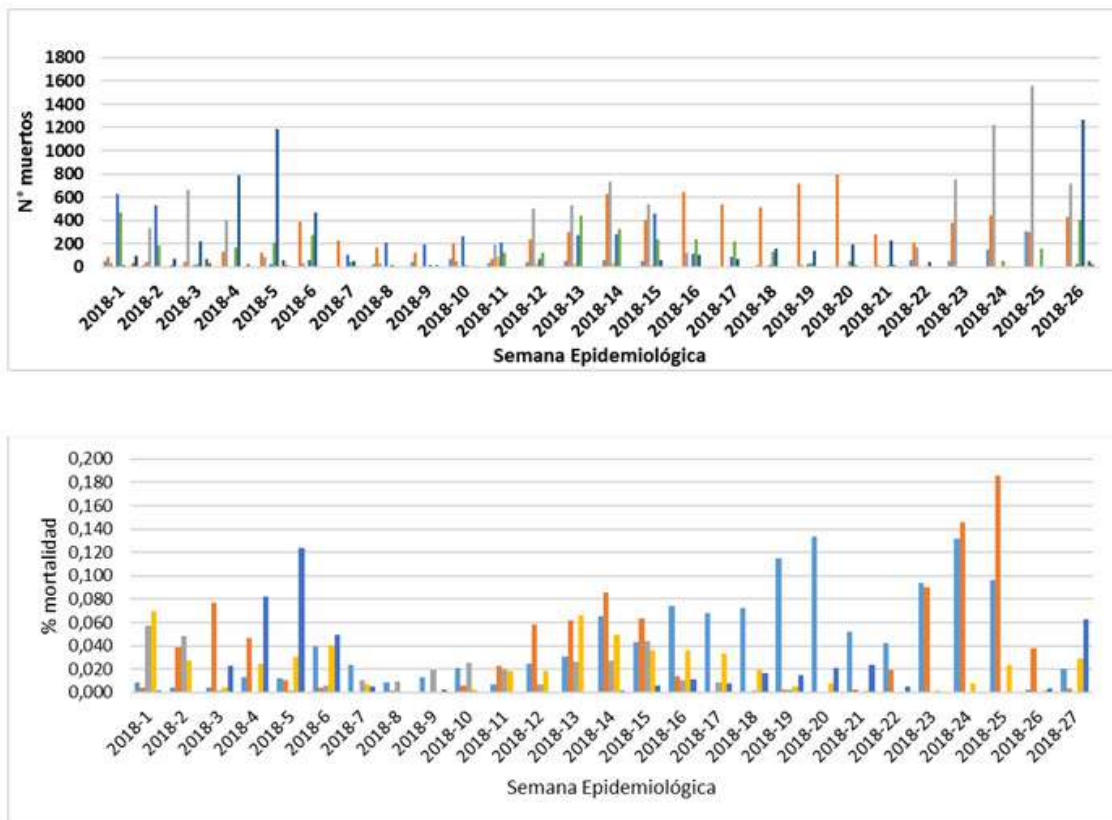


Grafico 7. Mortalidades por SRS (número y porcentaje) en centros aledaños al centro en brote por SRS (Caso 2), año 2018.

Con respecto de las mortalidades en los otros centros del barrio, podemos observar que presentan reportes de mortalidad asociadas a SRS, en prácticamente en todos los centros, por lo que nos indica el nivel de endemismo de la bacteria se mantiene durante todo el periodo. Si observamos lo que ocurre con los reportes en otros centros durante el brote, no se observa un aumento significativo como se podría esperar (Gráfico 7).

2.-Curvas con baja mortalidad, con forma de brote.

En este caso (Gráfico 8) se observan dos centros que presentan mortalidades persistentes uno productor de *S. salar* y el otro de *S. coho*. En este caso su presentación se asemeja a una curva de brote pero en baja escala, donde se observa un aumento progresivo hasta llegar a un máximo número de mortalidades para posteriormente disminuir. En el caso de centro de *S. salar* repite este patrón en el tiempo en cambio el centro *S. coho* no repite el patrón. Se observa que las mortalidades son fluctuantes y en forma agrupada sin llegar a un alto número que se transforme en un brote epidémico ya que se autolimita. Esta presentación se podría asociar a la acción de las vacunas, pero requiere de mayor información para realizar esta asociación.

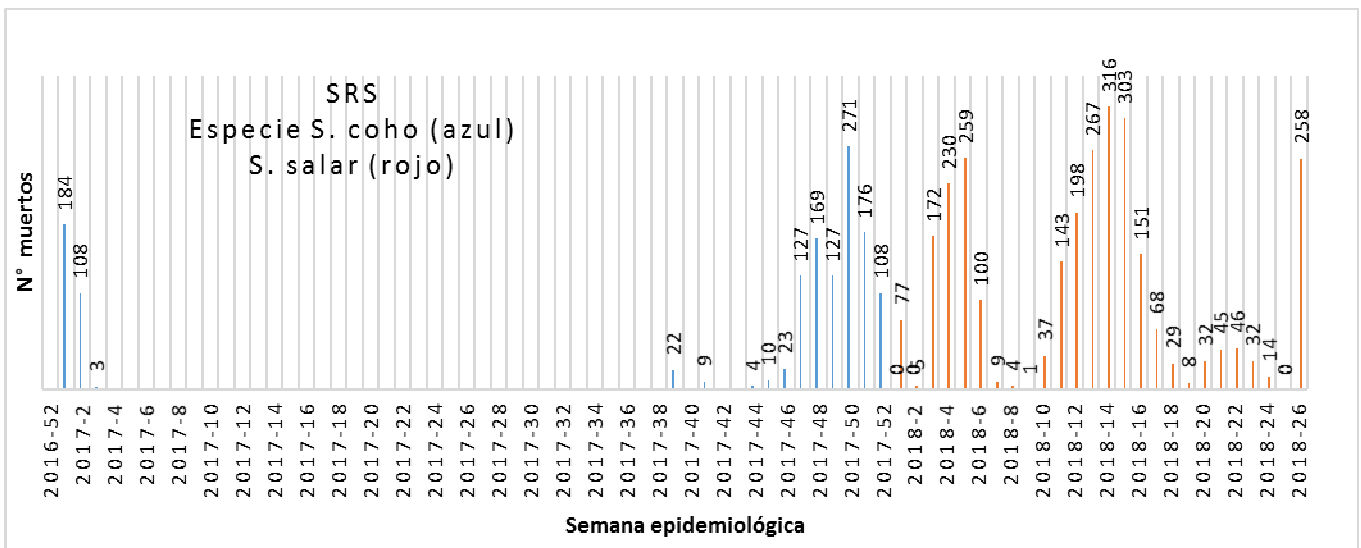


Gráfico 8. Curva de baja mortalidad por SRS y con forma de brote, región de Los Lagos en el año 2018 (Caso 3).

3.-Curvas con mortalidades persistentes en el tiempo.

En el análisis de las curvas se identificó una presentación de mortalidades causadas por SRS en forma persistente más de 26 semanas y con un bajo número de peces muertos, como se muestra en el Gráfico 9. Se debe de destacar que en estos centros se mantienen como fuente de infección de la *P. salmonis* a otros peces y posiblemente a otros centros del mismo barrio.

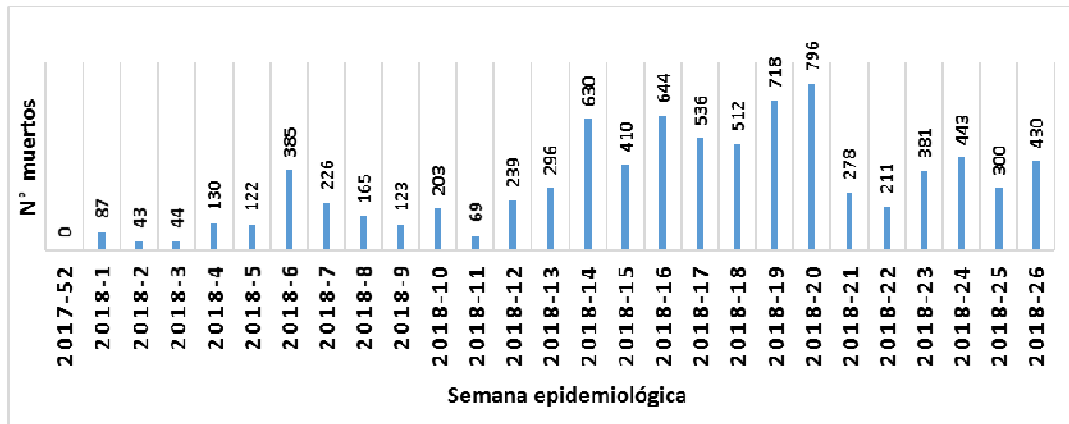


Gráfico 9. Curva de baja mortalidad por SRS y persistente, región de Los Lagos en el año 2018 (Caso 3).

A.2.-Patrones de mortalidades por SRS en centros a nivel de barrios.

Al analizar las curvas de mortalidades por centros agrupados en barrios y en ciclos productivos, se observó que en general y si bien existen ciertos patrones asociados a los ciclos de producción y estaciones del año, **a nivel de centros se pudieron observar diferentes tipos de patrones en la presentación temporal de las mortalidades de peces asociadas como causa a SRS.** Esta evidencia indica que no hay un patrón específico de presentación de la enfermedad por lo que la aplicación de un estudio estadístico inferencial como regresiones, series de tiempo entre otras metodologías para tratar de modelar un patrón específico no se justifica.

Como podemos observar en la figura 5 y anexo 3, **cada barrio presenta su propia dinámica de presentación de centros con mortalidades asociadas, en donde hay ciclos que un centro presenta un brote y en otro ciclo productivo lo hace otro centro.** Este comportamiento se evidenció en centros de las tres regiones; Los Lagos, Aysén y Magallanes.

Al comparar entre ciclos productivos se observa en general una disminución del número de centros que presentan brotes con altas mortalidades (brotes epidémicos) y se debe destacar que entre el año 2016 y 2017 en prácticamente todos los centros hubo una disminución de mortalidades. Esta situación en algunos casos podría deberse al Bloom de algas. Por otro lado, se observó que el aumento de las mortalidades fue de tipo estacional a temperaturas más altas del agua.

En las ASC se observaron centros que presentan mortalidades asociadas a SRS en forma persistente en el tiempo, por lo que **los peces actuarían como reservorio de la enfermedad.** A partir de la experiencia de campo y publicaciones realizadas por el equipo

de trabajo¹ es posible hipotetizar que el presentar brotes epidémicos podría estar asociado a los genogrupos de la *P. salmonis*, como sería del genogrupo EM-90 con brotes agudos y disminuciones abruptas como respuesta al control del brote, debido a que esta variante posee mayor susceptibilidad a los antibióticos, además de la susceptibilidad de la especie así como de las medidas de manejo asociadas al tipo de vacuna, tipo y dosis de antibiótico y momento de su aplicación. En el caso del barrio estudiado en Magallanes se determinó que existe una circulación de la bacteria en el sistema, aunque no se asocia a brotes epidémicos de la enfermedad.

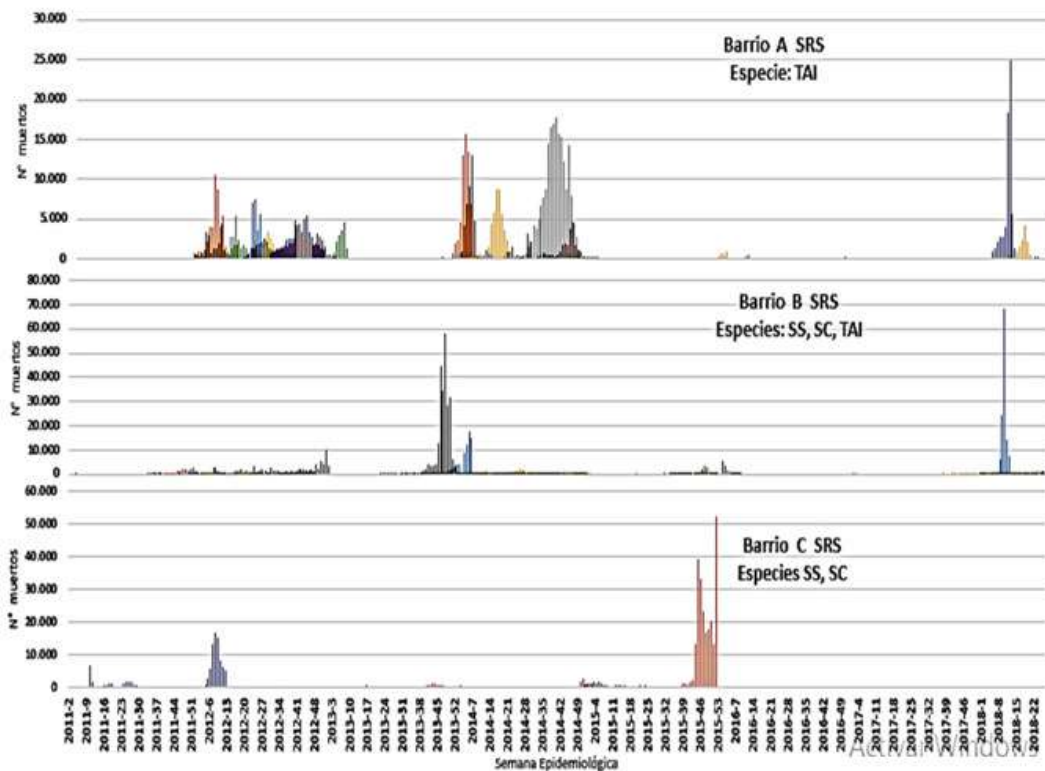


Figura 5. Serie de curvas de mortalidades asociadas a SRS por centros, en barrios de la región de Los Lagos, 2011-2018.

¹ Bohle, H., Henriquez, P., Grothusen, H., Navas, E., Sandoval, A., Bustamante, F., Bustos, P., Mancilla, M. 2014. Comparative genome analysis of two isolates of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* from different hosts reveals major differences in virulence-associated secretion systems. *Genome Announc* 2, e01219-14.

Henriquez, P., Kaiser, M., Bohle, H., Bustos, P., Mancilla, M. 2015. Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean *Piscirickettsia salmonis* field Isolates. *J Fish Dis* 39, 441-48.

Saavedra, J., Hernandez, N., Osses, A., Castillo, A., Cancino, A., Grothusen, H., Navas, E., Henriquez, P., Bohle, H., Bustamante, F., Bustos, P & Mancilla, M. 2017. Prevalence, geographic distribution and phenotypic differences of *Piscirickettsia salmonis* EM-90-like isolates. *J Fish Dis*. DOI: 10.1111/jfd.12581.

Nourdin-Galindo, G., Sanchez, P., Molina, C.F., Espinoza-Rojas, D.A., Oliver, C., Ruiz, P., Vargas-Chacoff, L., Carcamo, J.G., Figueroa, J.E., Mancilla, M., Maracaja-Coutinho, V. & Yanez, A.J. 2017. Comparative Pan-Genome Analysis of *Piscirickettsia salmonis* Reveals Genomic Divergences within Genogroups. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 459

Con respecto de la frecuencia de las curvas observadas, la Curvas con baja mortalidad, con forma de brote fue la más frecuente, seguida de Curvas con mortalidades persistentes en el tiempo con un 70% y en menor frecuencia fueron los Curvas con brotes epidémicos con un 30%. En algunos casos se presenta más de un patrón de los descritos. Con los centros estudiados no se observó que exista diferencia por especie o región.

A.3.- Patrones y establecimiento de la sucesión temporal de enfermedades infecciosas prevalentes (BKD, IPN y HSMI) en salmónidos en fase marina de cultivo con Piscirickettsiosis.

De los centros seleccionados en el estudio, se observaron mortalidades asociadas a las cuatro enfermedades más prevalentes que son; SRS, IPN, BKD y HSMI, de esta última enfermedad se presentan reportes solo en el año 2017. En cuanto a centros afectados en importancia por enfermedad el más importante fue por SRS, seguido por BKD y en menor medida IPN. En el año 2017, los diagnósticos por HSMI superaron a los diagnósticos de IPN.

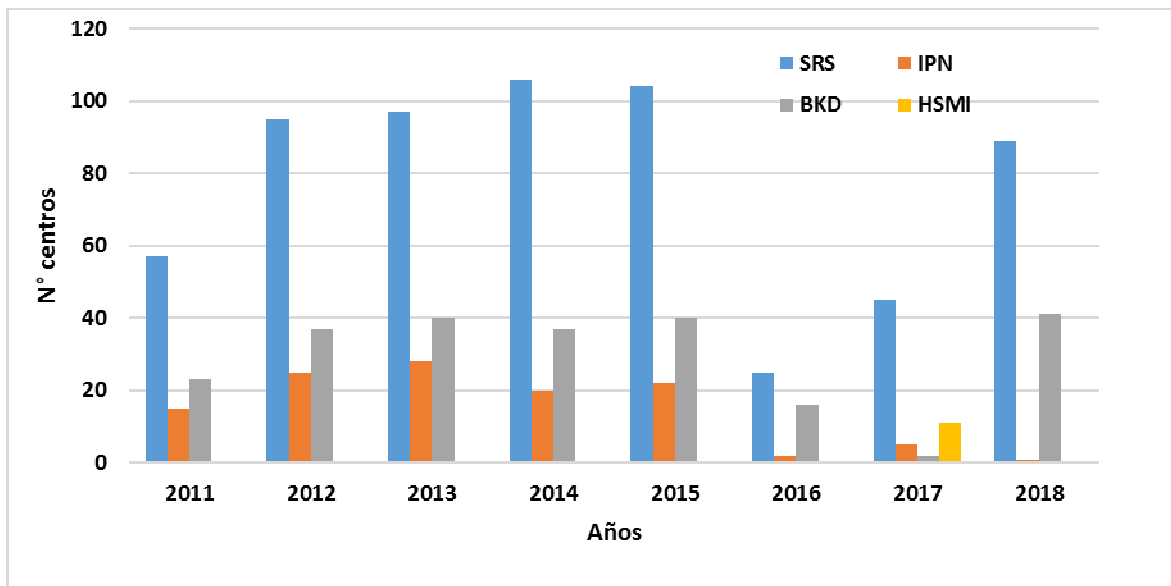


Grafico 10.- Frecuencia anual de centros marinos que reportaron mortalidades por distintos agentes patógenos, periodo 2011-2018.

En los centros con reportes de SRS, se estableció que entre un 30% a un 50% estaban asociado en ese año a mortalidades por otros agentes (grafico 11).

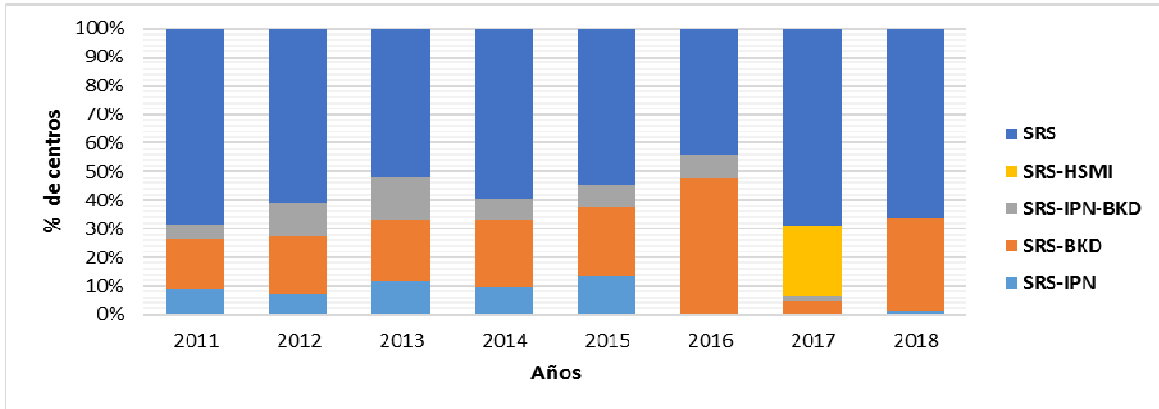


Grafico 11.- Diagnósticos de mortalidades por SRS y coocurrencias de patógenos (IPN, BKD y HSMI) en centros marinos, periodo 2011-2018.

Al analizar un centro con SRS, se pudo observar que en forma concomitante estaba presente más de un agente patógeno (BKD e IPN), **por lo que es importante de considerar que durante el diagnóstico de una patología se puede enmascarar las lesiones por otro agente o se dé más importancia al agente que causa mayor número de mortalidades** (grafico 12 A y B).

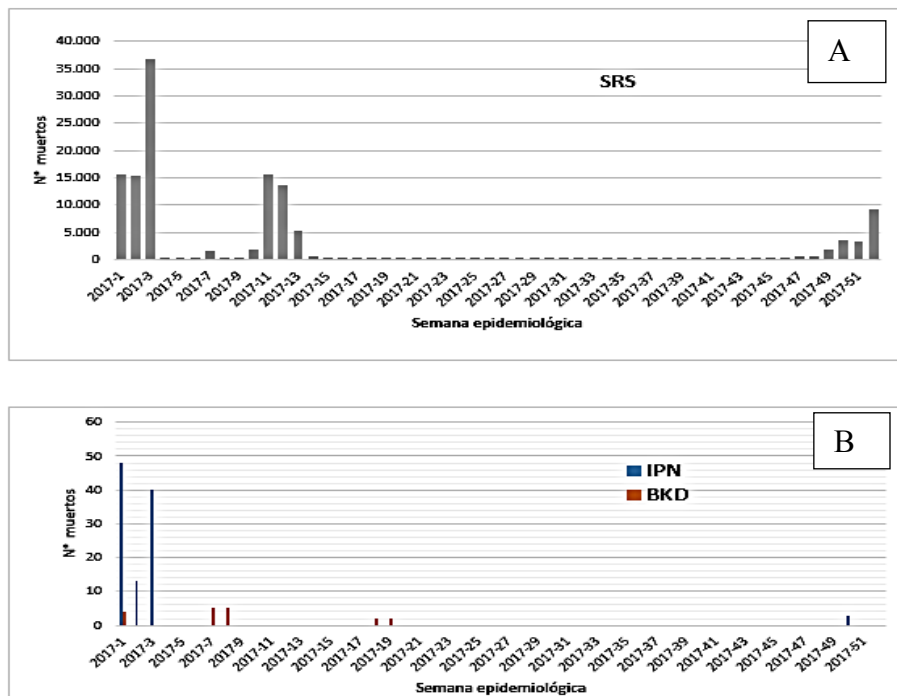


Grafico 12.- Diagnósticos de mortalidades por SRS y coocurrencias de patógenos (IPN, BKD) en centros marinos, periodo 2017.

En el siguiente ejemplo se puede observar que dentro de una misma semana se detectan mortalidades causadas por dos enfermedades como son BKD y SRS.

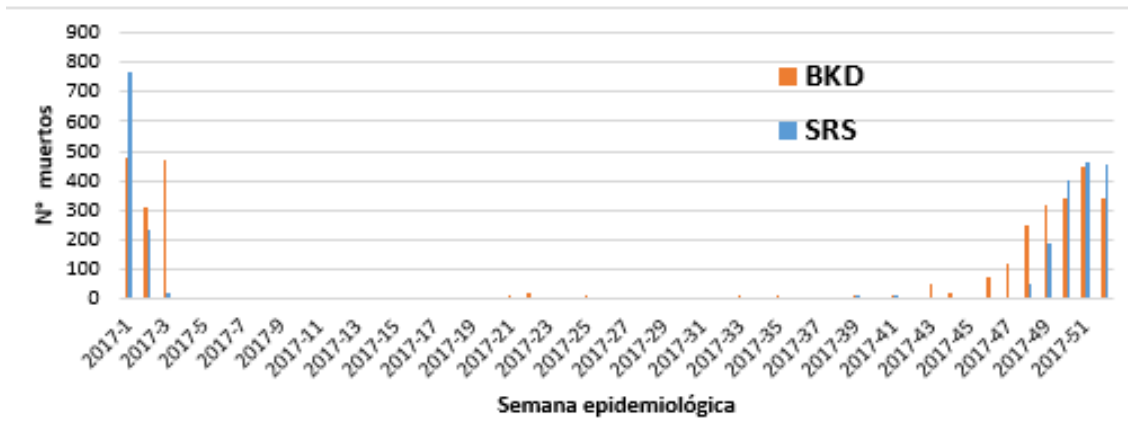


Grafico 13.- Diagnósticos de mortalidades por SRS y las coocurrencias de BKD en un centro marino, periodo 2017.

En cuanto a la presentación de las mortalidades en el tiempo en varios ciclos productivos, como se observa en el gráfico 14 no se observó en los centros del estudio una secuencia de presentación de mortalidades asociadas a SRS y BKD, por lo que su aparición puede estar asociadas a factores propios de los centros.

Finalmente, cabe señalar que si bien originalmente se consideró la construcción de curvas de mortalidad asociadas a Tenacibaculosis (*T. dicentrarchi* y/o *T. maritimum*), esto no fue posible de realizar, dado que la base de datos utilizada para la construcción de las curvas no incluía a estos agentes en el registro de categorización de la mortalidades.

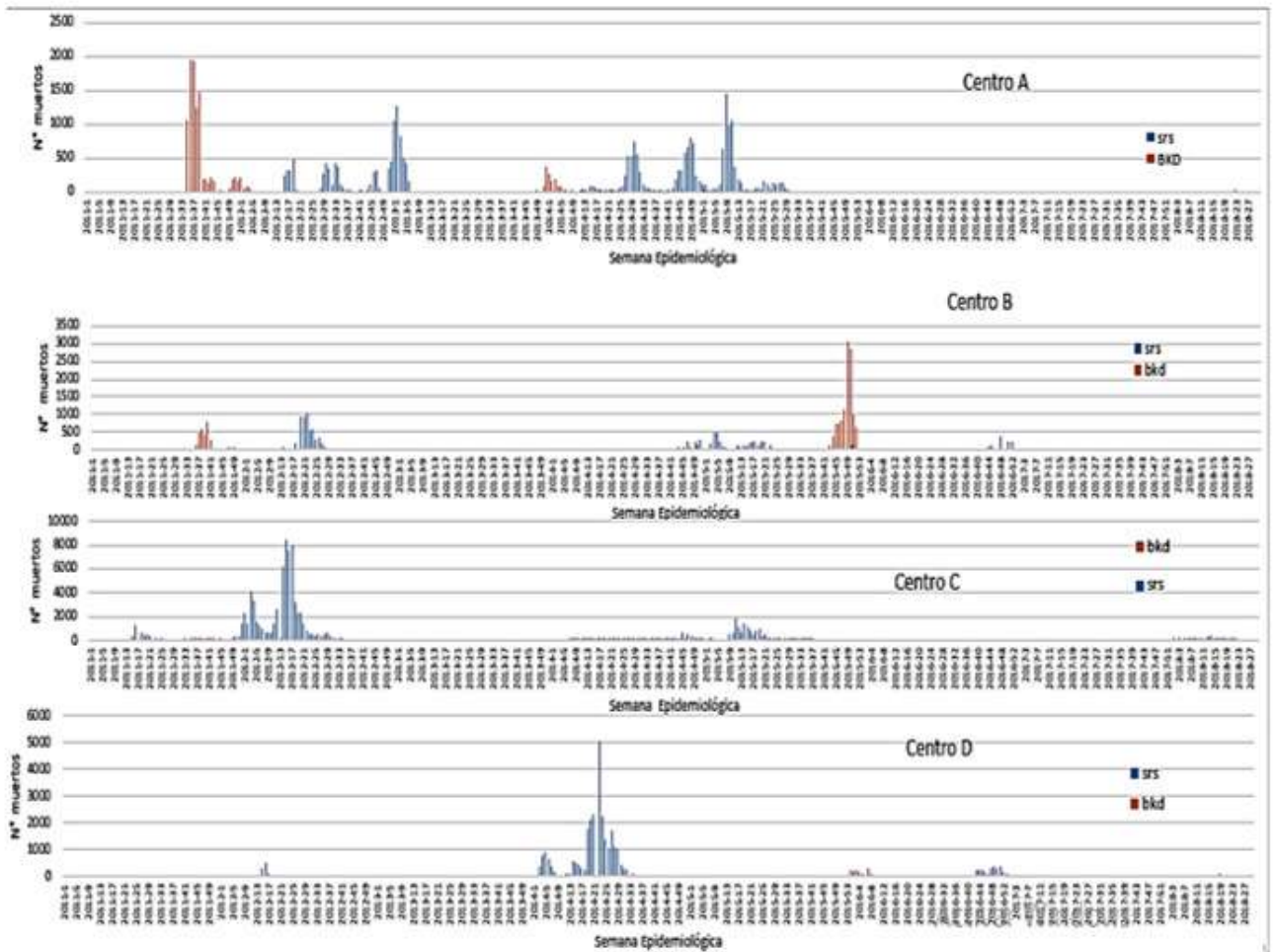


Gráfico 14. Presentación en el tiempo de BKD y SRS en cuatro centros de cultivo. No se advierte una secuencia de presentación, por lo que ambas enfermedades obedecen a patrones independientes, posiblemente asociadas al respectivo centro de cultivo.

ETAPA 3. ESTUDIO MOLECULAR, CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DE CAMPO

Etapa	Actividad	Estado actual del resultado
Estudio molecular, clínico e histopatológico de las co-morbilidades de Piscirickettsiosis con enfermedades prevalentes	Obtención de muestras de peces moribundos y mortalidades en centros activos con diagnóstico de mortalidades por SRS.	Finalizada
	Análisis clínico de peces moribundos y mortalidades en centros activos con diagnóstico de mortalidades por SRS y con lesiones de otras infecciones co-ocurrentes.	Finalizada
	Realización de diagnósticos de RT-PCR	Finalizada
	Realización de análisis histopatológicos	Finalizada
	Análisis estadístico y epidemiológico de los resultados.	Finalizada

Resultado 1. Se obtuvieron muestras de 23 centros de cultivo seleccionados por su historia sanitario, que fueron visitados analizándose clínicamente la mortalidad total del día presente en cada centro. Para completar el número mínimo de centros a incluir en el estudio, se revisó el banco de contramuestras de centros seleccionados, pero no operativos dentro del periodo que se ejecutó el estudio. De esta forma se incluyeron 23 centros más, totalizando 46 centros en el estudio.

Resultado 2. A partir de esa evaluación clínica se seleccionaron peces que cumplieran con la manifestación anátomo-patológica consistente primariamente con SRS, y en segundo lugar, para completar el tamaño muestral con alguna otra enfermedad de las incorporadas en el estudio. De estos peces se obtuvieron muestras para análisis moleculares y análisis histopatológico y se construyó un set fotográfico de las lesiones macroscópicas más relevantes.

Piel: Las lesiones tegumentarias, son las primeras en evidenciar el curso clínico de SRS. Pueden observarse en las tres especies, la presentación de úlceras cutáneas, a menudo contaminadas con *Tenacibaculum spp.* u otras bacterias ambientales.

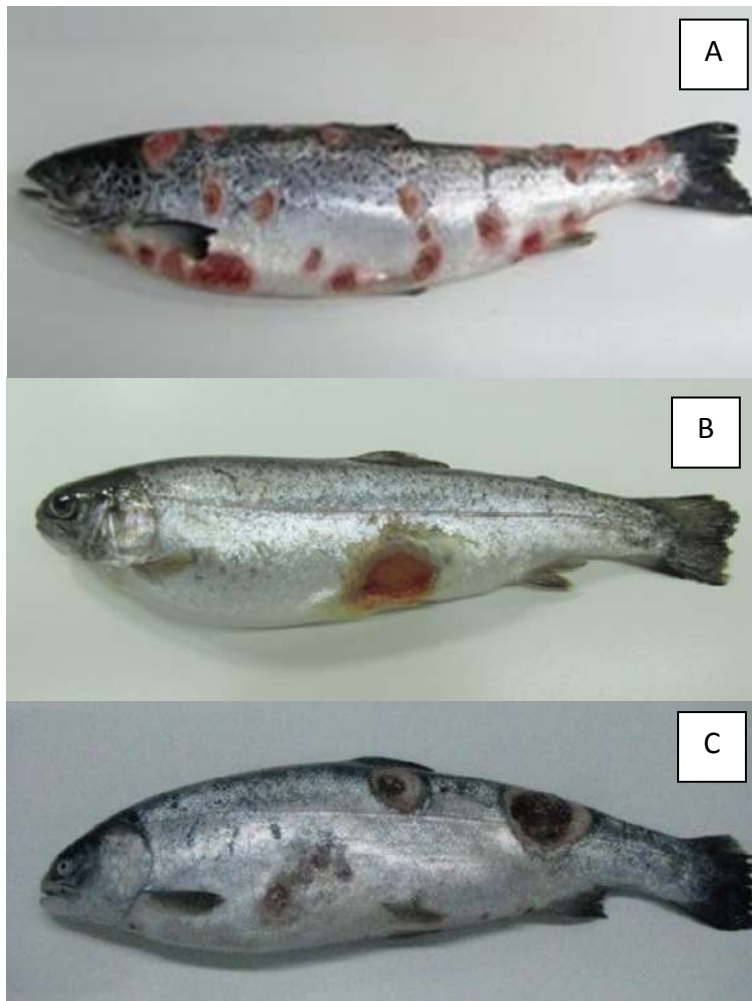


Figura 6. Úlceras cutáneas. A: Salmón del Atlántico; B: Salmón coho; C: Trucha arcoíris.

Hígado: Las lesiones anátomo-patológicas más frecuentes de observar en hígado, corresponden a diversos grados de tumefacción y congestión con o sin hemorragias. Estas lesiones normalmente se atribuyen a SRS. Esta enfermedad fue la predominante en cuanto patología de base para presentaciones coocurrencias (Figura 7).

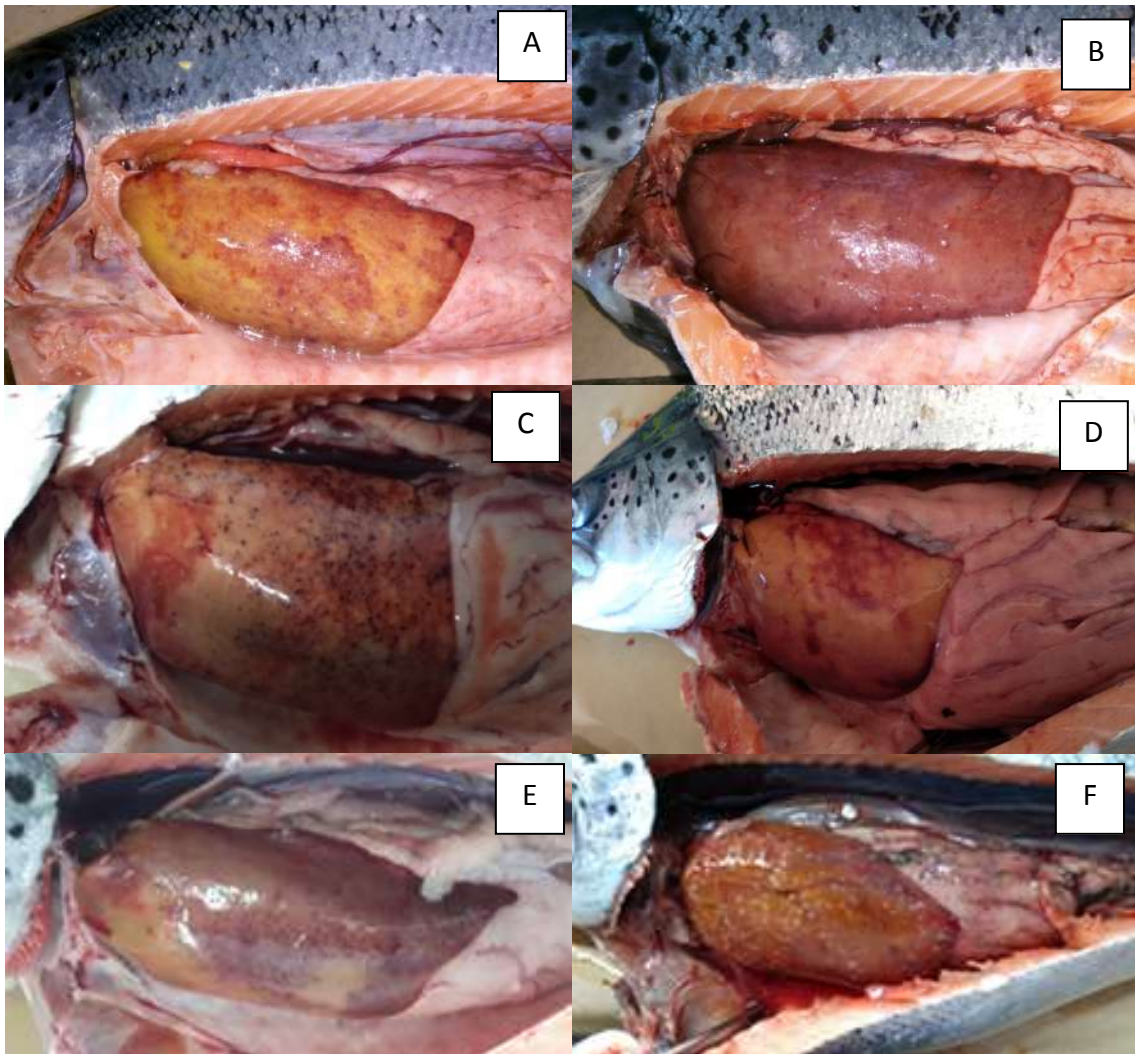


Figura 7. Lesiones hepáticas más frecuentemente detectadas. Las cuatro fotografías muestran tumefacción, congestión y hemorragia. F: nodulaciones hepáticas de tonalidad blanquecina, asociadas a BKD.

Bazo: El bazo suele verse reactivo para el caso de infecciones bacterianas, por lo que normalmente para el caso de SRS como enfermedad predominante y tal como se observa en la Figura 8, se presenta con diversos grados de tumefacción. Cabe señalar que para el caso una coocurrencia de BKD, es posible observar nodulaciones blanquecinas semejantes a las que se encuentran en riñón. Por otra parte, para el caso de afecciones tegumentarias, presumiblemente por *Tenacibaculum spp.*, el aspecto del bazo puede tornar más globoso, aunque no en todos los casos ocurre esta situación.

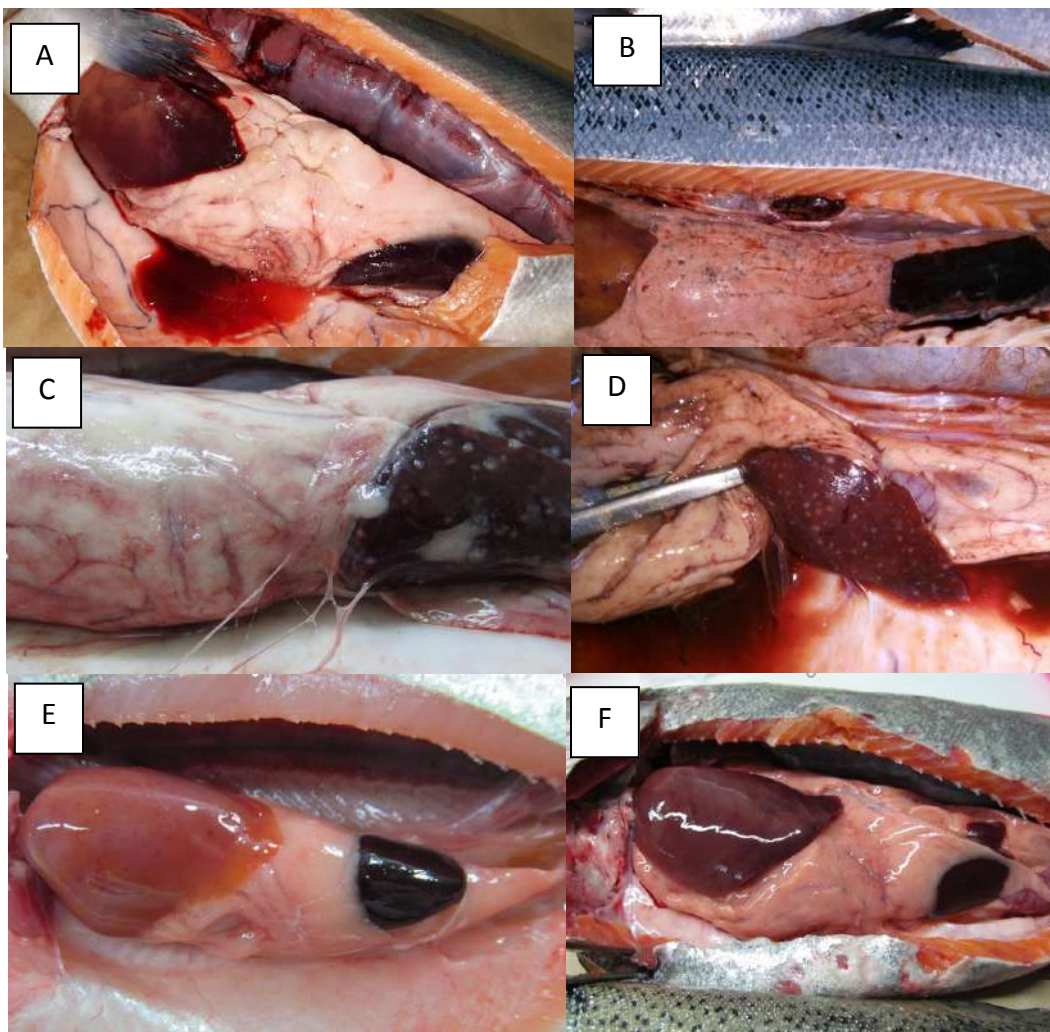


Figura 8. Lesiones esplénicas detectadas. Las fotografías muestran diversos grados de tumefacción y congestión. C y D muestran presencia de pequeñas granulaciones asociadas a cuadros severos de BKD. E y F muestran tumefacción esplénica de morfología globosa que puede observarse ocasionalmente en coocurrencia de SRS y *Tenacibaculosis*.

Corazón: Como se muestra en la Figura 9 existen lesiones cardíacas asociadas a HSMI, no obstante estas son inespecíficas y pueden también presentarse en SRS, por lo que el diagnóstico clínico debe necesariamente asociarse al diagnóstico histopatológico y molecular. El hallazgo más frecuentemente detectado en corazón correspondió a palidez y presencia de coágulos. Estos signos bien pueden corresponder a cambios *post mortem*. Una lesión más de base podría corresponder a la presencia de focos congestivos e hidropericardio que podría evidenciar algún grado de reacción inflamatoria (miocarditis), no obstante como se indicó, la apreciación clínica es insuficiente en ese sentido.

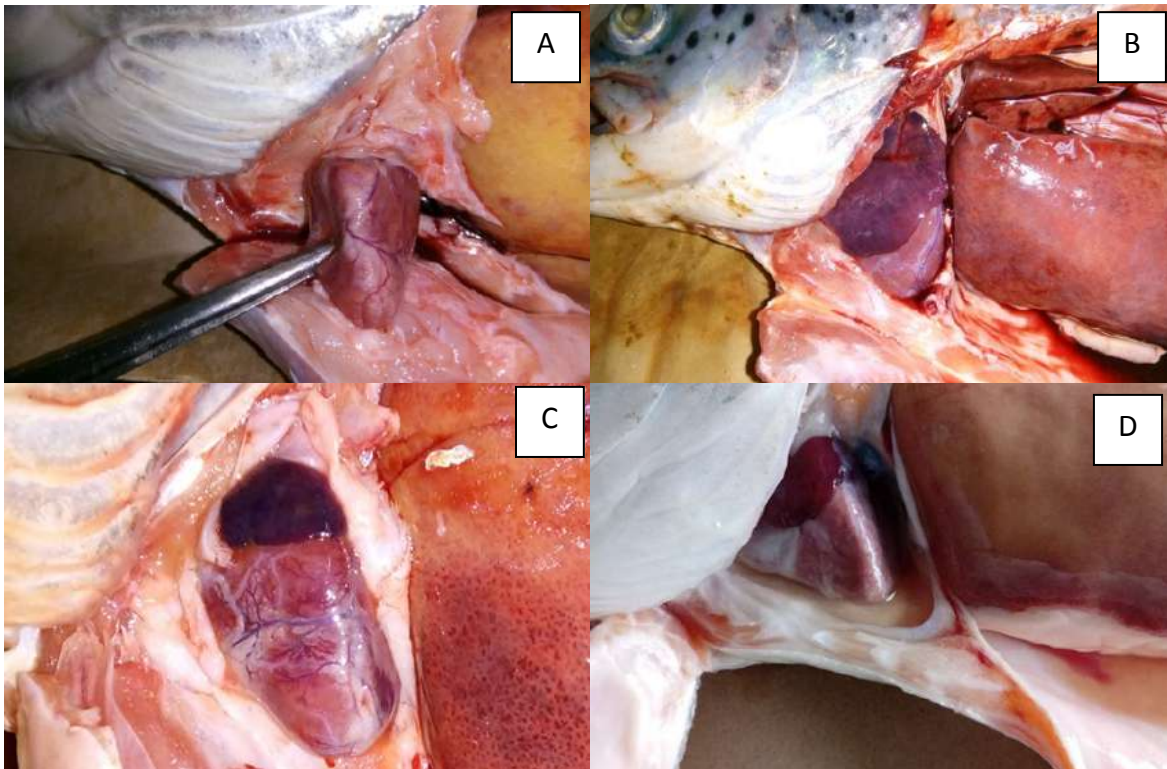


Figura 9. Hallazgos anátomo-patológicos detectados. A-C: palidez cardíaca (posible cambio *post mortem*); A y C: vasos sanguíneos pletóricos; D: congestión e hidropericardio presumiblemente asociados a algún grado de miocarditis.

Resultado 3. Análisis la relación causal de las co-ocurrencias y/o co-morbilidades infecciosas (BKD, IPN, PRV/HSMI) asociadas a diagnóstico de Piscirickettsiosis en salmónidos en fase marina de cultivo.

Para establecer las coocurrencias o comorbilidades, se realizaron diagnósticos moleculares de SRS, BKD, PRV, *Tenacibaculum* asociados al diagnóstico clínico, histopatológico y la gradiente de enfermedad de SRS, BKD, PRV/HSMI y *Tenacibaculum spp.* En el estudio participaron 46 centros, con producción de *S. salar* (85%), seguido de *S. coho* (13%) y Trucha arcoíris (2%).

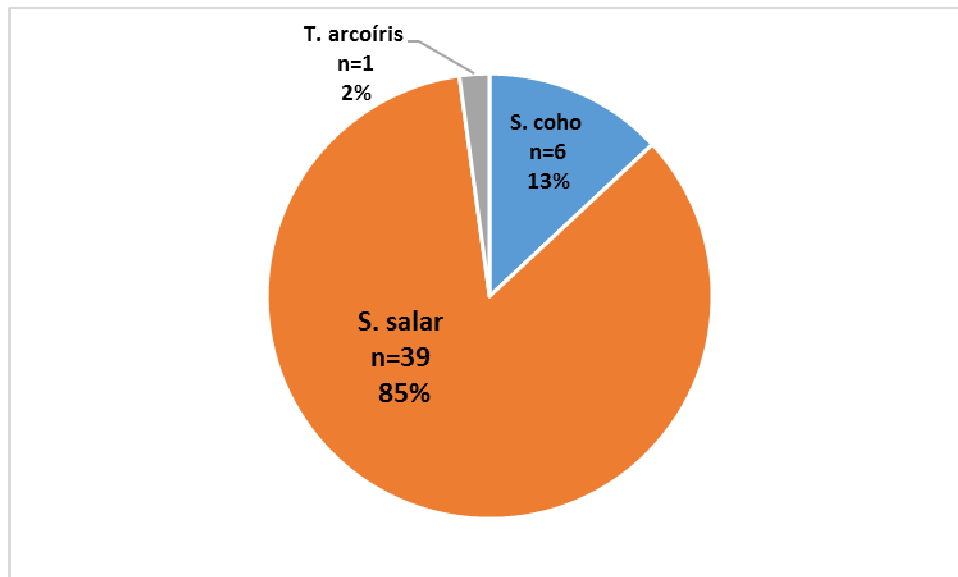


Gráfico 15. Distribución por especie de los centros incorporados al estudio.

Como resultado del estudio se determinó una alta coinfección en los centros que participaron en la investigación. Como se observa en la Tabla 5, un 78,3 de los centros se diagnosticaron tres o más agentes patógenos y en ocho de ellos hasta cinco agentes. **Esta evidencia nos indica una alta carga de agentes patógenos que circulan en los centros del estudio.**

Tabla 5.- Frecuencia de agentes patógenos identificados en 46 centros marinos, año 2018.

n° agentes	n° centros	%
2 agentes		
SRS90+TD	1	
BKD+TD	1	
PRV1+TD	6	
SRS89+TD	2	
Total centros	10	21,7
3 agentes		
IPN+PRV1+TD	2	
SRS90+PRV1+TD	10	
BKD+PRV1+TD	4	
SRS89+BKD+TD	2	
Total centros	18	39,1
4 agentes		
SRS90+SRS89+PRV1+TD	3	
SRS90+BKD+PRV1+TD	3	
SRS90+IPN+PRV1+TD	1	
SRS89+PRV1+TD+TM	2	
IPN+PRV1+TD+TM	1	
Total centros	10	21,7
5 agentes		
SRS90+SRS89+BKD+PRV1+TD	2	
SRS89+BKD+PRV1+TD+TM	3	
SRS89+IPN+PRV1+TD+TM	2	
SRS90+IPN+PRV1+TD+TM	1	
Total centros	8	17,4
Total	46	100

En la región de Aysén se determinó una mayor carga de patógenos por centro que la región de Los Lagos, presentando unas 6,5 veces más posibilidades de detectar 4 o más agentes patógenos.

Tabla 6.- Frecuencia de agentes patógenos identificados en 46 centros marinos por región, año 2018.

Agentes	Los Lagos	%	Aysén	%
SRS90-89-BKD-PRV1-TD	2			
SRS90-89-PRV1-TD-TM			1	
SRS90-IPN-PRV1-TD-TM			1	
SRS98-BKD-PRV1-TD-TM			2	
SRS98-IPN-PRV1-TD-TM			2	
Total	2	8,0	6	28,6
SRS90-89-PRV1-TD	3			
SRS90-BKD-PRV1-TD			3	
SRS90-IPN-PRV1-TD			1	
SRS98-PRV1-TD-TM			2	
IPN-PRV1-TD-TM			1	
Total	3	12,0	7	33,3
BKD-PRV1-TD	3		1	
IPN-PRV1-TD	1		1	
SRS90-PRV1-TD	8		3	
SRS98-BKD-TD	2			
Total	14	56,0	5	23,8
PRV1-TD	3		3	
SRS89-TD	2			
BKD-TD	1			
Total	6	24,0	3	14,3
Total General	25	100	21	100

OR=6,5 (1,7-24,2) $p < 0,05$

Asimismo, al evidenciar el nivel de desarrollo de los peces muestreados y por especie:

S. salar

Agentes	<1,6 kg	1,7-3,2kg	3,3-5kg	>5 kg	Total	%
SRS EM-90 (A)	0	2	19	25	46/232	19,83
SRS LF-89 (B)	0	5	4	2	11/232	4,74
BKD	4	0	3	12	19/232	8,19
IPN	1	4	0	0	5/232	2,16
PRV1	36	24	69	34	163/232	70,26
PRV2	0	0	0	0	0/232	0,00
PRV3	0	0	0	0	0/232	0,00
<i>T. dicentrarchi</i>	35	28	48	57	168/232	72,41
<i>T. maritimum</i>	1	0	5	0	6/232	2,59
Sin detección	3		5	7	15/232	6,47
	80	63	153	137		
N° agentes identificados	4	5	5	5		

S. coho

Agentes	<1,3 kg	1,3-2,6 kg	>2,7 kg	Total
SRS LF-89 (B)	0	0	3	3/24
BKD	0	11	5	16/24
<i>T. dicentrarchi</i>	0	12	12	24/24
N° agentes identificados	0	2	3	

Trucha Arcoíris

Agentes	<1,3 kg	Total	%
SRS LF-89 (B)	6	6/12	50
<i>T. dicentrarchi</i>	12	12/12	100
N° agentes identificados	2		

Resultado 4. Para histopatología se analizaron 115 peces incluyendo cinco tejidos cada uno, totalizando 575 tejidos para caracterizar histopatológicamente las condiciones clínicas presentadas durante el periodo que duró el estudio. No se evidenció un patrón común de lesiones coocurrentes que permitiese orientar un diagnóstico de comorbilidad, sino que más bien se observó el predominio de una patología basal.

Branquias: en branquias los hallazgos más frecuentes corresponden a cuadros proliferativos del epitelio branquial consistentes con la expresión del complejo branquial (CGD), de naturaleza crónica y cuadros más agudos que se expresan con anomalías vasculares (congestión, aneurismas, hemorragias), proliferación de células mucosas y/o células inflamatorias, con alta incidencia de factores ambientales, como por ejemplo organismos asociados al plancton.

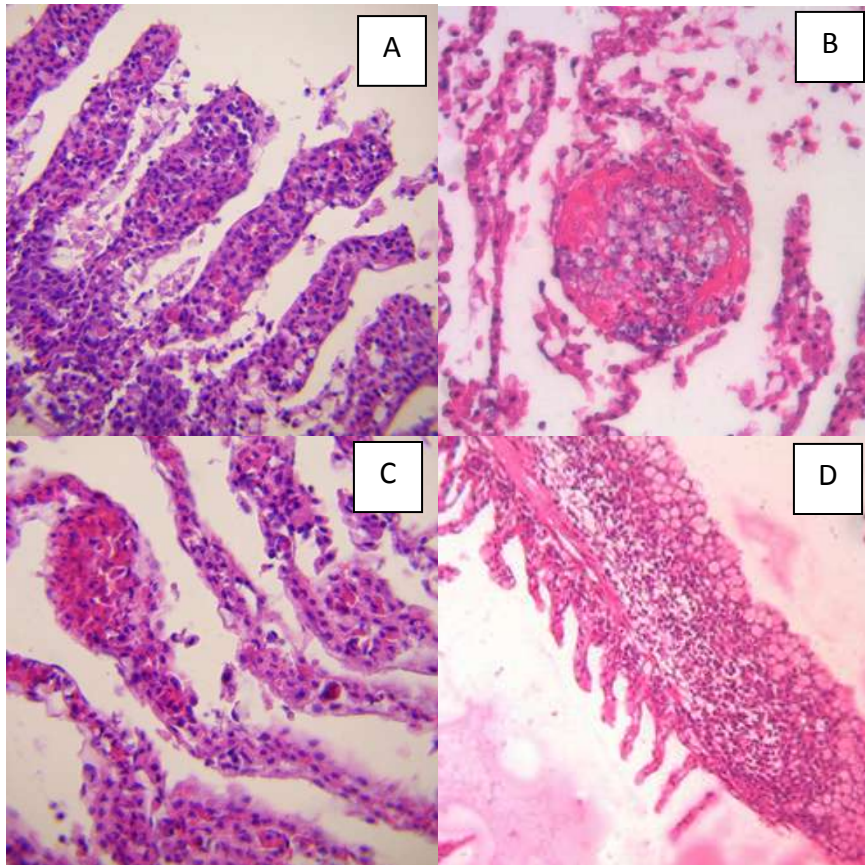


Figura 10. Lesiones branquiales relevantes. A: hiperplasia del epitelio branquial (asociada a CGD); B: trombo en laminilla secundaria (lesión vascular inespecífica); C: hiperplasia epitelial con congestión leve (asociada a CGD). D: Proliferación de células mucosas con infiltrado mononuclear (reacción aguda inespecífica).

Hígado: las lesiones hepáticas fueron las más frecuentemente pesquisadas. La mayor parte asociadas a cuadros clínicos de SRS, sin presentar características de alguna condición de coocurrencia. Destacan diversos grados de esteatosis, presumiblemente asociados a dietas, necrosis y fibrosis como secuelas de procesos inflamatorios producto de SRS.

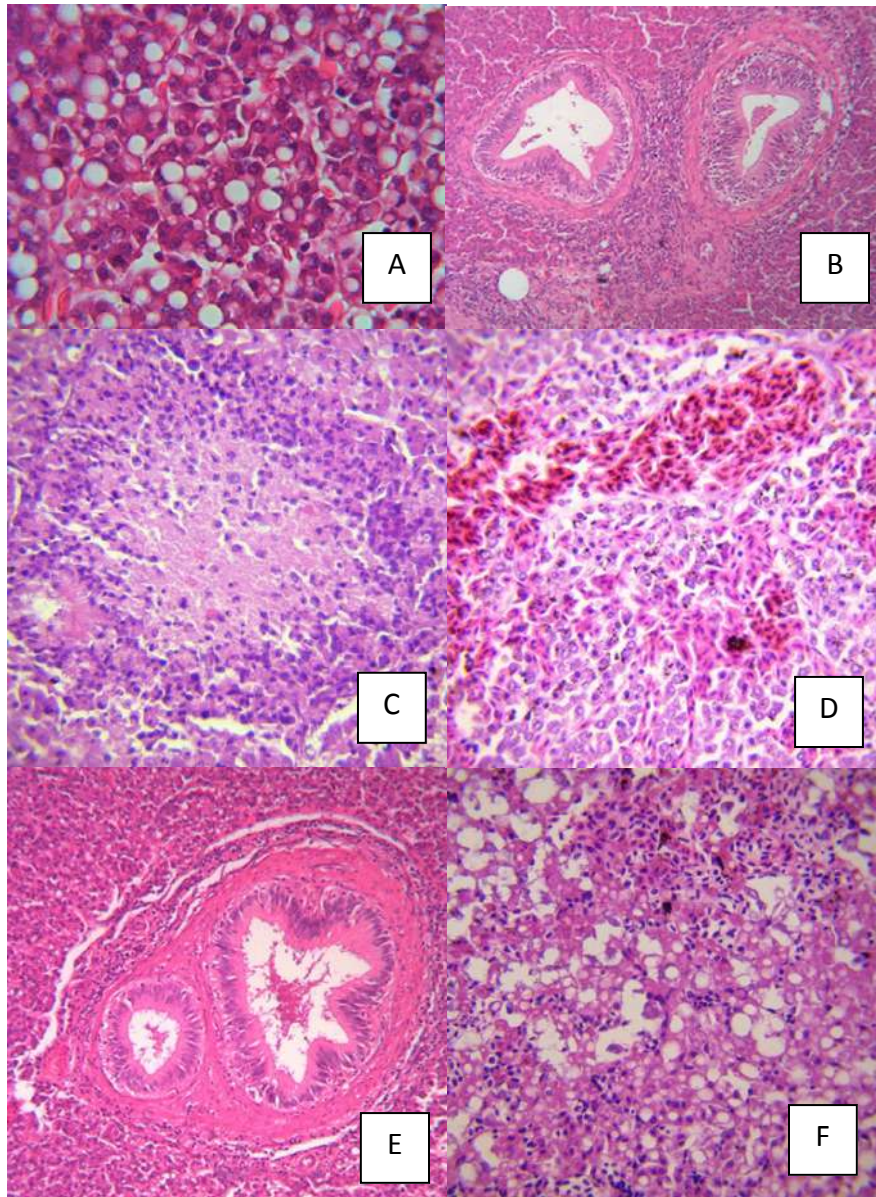


Figura 11. A: degeneración vacuolar macrovesicular (esteatosis) B: Fibrosis hepática perivascular; C: foco de necrosis con infiltrado mononuclear en el parénquima (granuloma); D: atrofia severa de hepatocitos con focos de congestión y hemorragia; E: fibrosis e infiltrado mononuclear alrededor de conductos biliares; F: foco de necrosis con infiltrado mononuclear y hemorragia.

Riñón: las lesiones renales siguen el mismo patrón de inespecificidad de los otros tejidos evaluados. En la práctica clínica suelen encontrarse una patología de base a nivel renal (fundamentalmente diversos grados de nefritis intersticial y/o glomerulonefritis) que no compromete necesariamente la funcionalidad del órgano, ya que este normalmente es capaz de compensar el daño que pudiese presentar. Dado que el riñón de los peces posee diversas funciones (hematopoyéticas, inmunológicas, excretoras y endocrinas) es habitual encontrar en cortes histológicos la presencia de centros melanomacrófagos. Estas estructuras funcionan en forma análoga a lo que podría efectuar el sistema linfático de los vertebrados superiores, es decir son zonas donde se lleva a cabo fagocitosis de elementos potencialmente dañinos para el individuo (ya sea de naturaleza biológica patológica como bacterias o virus, u otros productos inertes).

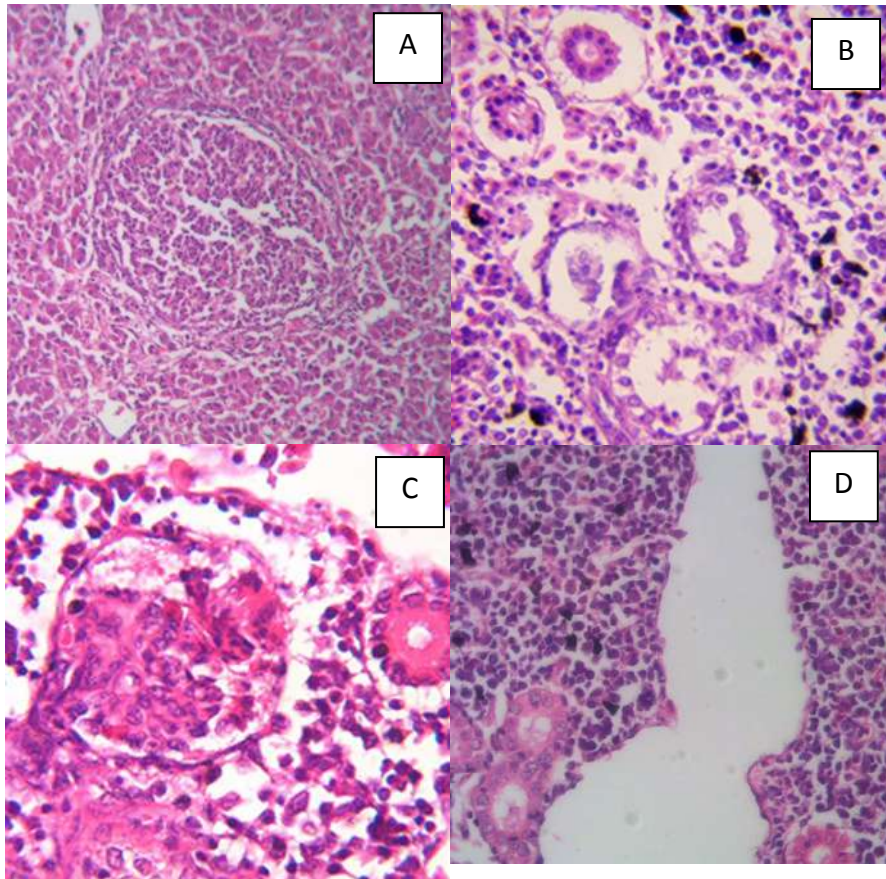


Figura 12. A: granuloma renal (BKD); B: necrosis tubular renal y presencia de células melanomacrófágicas; C: lomerulonefritis con exudación proteica; D: nefritis intersticial mononuclear con presencia de células melanomacrófágicas.

Corazón y músculo esquelético: el tejido muscular, tanto cardíaco como esquelético es la elección para el diagnóstico histopatológico de HSMI. Como se ha mencionado, no corresponde a una signología patognomónica, sino que son lesiones que pueden presentarse en otras enfermedades, como SRS. En consecuencia, las lesiones histopatológicas cardíacas, fundamentalmente del tipo inflamatorio cardíaco (miocarditis) y necrosis, tanto en músculo esquelético como corazón, pueden dar una orientación diagnóstica, no obstante, el diagnóstico definitivo debe complementarse con pruebas moleculares. Durante el estudio se identificaron lesiones cardíacas y musculares coocurrentes en individuos positivos a *P. salmonis* y PRV, no obstante no fue posible atribuir el daño tisular a uno o al otro patógeno, predominando el diagnóstico por una de las condiciones, principalmente SRS.

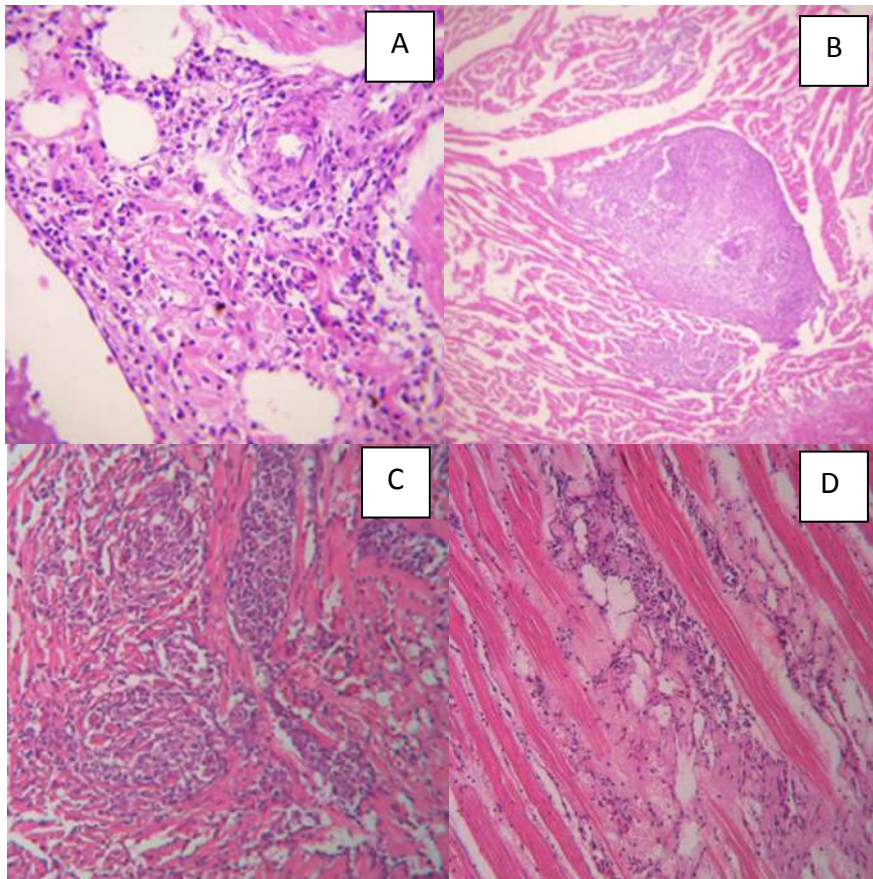


Figura 13. A: Epicarditis mononuclear; B: granuloma cardíaco; C: granulomas en capa esponjosa con infiltrado mononuclear (HSMI); D: músculo esquelético: necrosis de miositos con infiltrado mononuclear (HSMI).

ETAPA 4. INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *P. salmonis* EN COHABITACIÓN

Metodología infección experimental

Esta infección experimental se realizó con dos grupos de peces clínicamente sanos provenientes de dos pisciculturas localizadas en las regiones de Los Lagos y de la Araucanía. Los dos grupos de peces presentaban pesos promedio de 50 y 70 gramos al ingresar a Salmon Clinical Trials (SCT), respectivamente. Una muestra de 16 peces tomada al azar de cada lote, fue sometida a eutanasia y posterior necropsia para chequear el estatus de órganos internos y tomar muestras de sangre y riñón anterior para diagnóstico molecular de patógenos prevalentes. Los resultados del examen macroscópico post-mortem indicaron ausencia de lesiones en los órganos internos y en las cavidades. Los resultados de los análisis moleculares sólo indicaron la presencia de PRV-1 en la totalidad de las muestras de sangre de los peces evaluados. Los valores de Ct promediaron valores cercanos a 20. Este hallazgo es indicativo de la alta prevalencia de la infección con PRV-1 en salmón del Atlántico en pisciculturas de diferentes regiones del país.

La información previa generada por el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática apuntaba a frecuencias de infección cercanas al 60% durante los años 2014 y 2015. Al parecer la prevalencia ha ido en aumento durante los últimos años, datos de campo obtenidos por ADL en este estudio, sugieren frecuencias sobre el 75-80% en muestras individuales y 100% de las pisciculturas con al menos 1 diagnóstico positivo a la presencia de PRV. Se decidió entonces continuar el bioensayo para evaluar la patogénesis y la respuesta inmune de peces infectados previamente con PRV-1 y expuestos a un desafío por co-habitación con peces troyanos infectados con PRV-1 e inoculados intra-peritonealmente con *P. salmonis*.

Se realizó la infección intraperitoneal (IP) con *P. salmonis* en un grupo de 84 peces *Salmo salar* 100g de peso en promedio, previamente infectados con PRV-1 para generar una presión de infección de 35%. La dosis de infección correspondió a $5,2 \times 10^6$ UFC de *P. salmonis* contenidas en 100 μ L de solución buffer fosfato pH 7,2.

Tres grupos de 28 peces previamente marcados e inyectados IP, fueron alojados en co-habitación con tres grupos de 52 peces infectados naturalmente con PRV-1 en tres estanques conectados hidráulicamente y en recirculación, a una densidad de 12kg/m³, mantenidos a una temperatura promedio del agua de 12°C y una salinidad del 13‰. Desde el inicio del desafío, los peces fueron monitoreados dos veces al día.

A partir del día 10 post-inyección (IP), comenzó la mortalidad de los peces troyanos. El día 14 post-desafío y coincidiendo con la máxima mortalidad de los peces troyanos, se comenzó el muestreo semanal de los peces cohabitantes. El procedimiento consistió en la sedación profunda de los peces con benzocaína 20%, luego se extrajo la muestra de sangre

y se procedió a la denervación de los peces para continuar con la toma de muestra de los tejidos: branquias, bazo, hígado, corazón y riñón anterior en formalina tamponada al 10% para análisis histológico y de riñón anterior y bazo para las determinaciones de respuesta inmune y carga bacteriana. Durante el muestreo en los diferentes tiempos post-desafío, los peces cohabitantes no presentaron lesiones macroscópicas concordantes con SRS.

Resultado 1: Valores de Ct de individuos infectados con PRV

Las muestras de sangre obtenidas fueron sometidas a la extracción de ARN total, para esto 50 μ L de sangre fueron mezcladas con micro-esferas de cerámica y el reactivo Trizol (Invitrogen). Posterior a la adición de cloroformo la fase acuosa obtenida fue acoplada al kit de detección E.Z.N.A. RNA extracción kit (Omega-biotek) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El ARN total obtenido fue posteriormente amplificado a través de RT-qPCR con partidores y sonda específicos para el gen L1 de PRV usando química TaqMan (Life Technologies) en un equipo QuantStudio 3 (Applied Biosystems).

Los valores de Ct obtenidos en el RT-qPCR fueron utilizados como reflejo de la carga viral. La distribución de los valores de Ct en los diferentes tiempos post-desafío fue evaluada a través de la prueba de Shapiro-Wilk. Como resultado, se encontró que los valores de Ct poseían una distribución normal, por lo que se procedió con análisis de varianza para evaluar las diferencias entre los diferentes tiempos post desafío con *P.salmonis*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ct PRV	120	0,56	0,55	12,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1109,74	2	554,87	74,53	<0,0001
dpc	1109,74	2	554,87	74,53	<0,0001
Error	871,10	117	7,45		
Total	1980,84	119			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,44840

Error: 7,4453 gl: 117

dpc	Medias	n	E.E.	
14,00	17,78	40	0,43	A
21,00	21,00	40	0,43	B
30,00	25,20	40	0,43	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

A los 14 días post desafío, los valores de Ct se presentaron muy homogéneos y relativamente bajos indicando una alta carga viral. Esta situación va cambiando a lo largo del tiempo aumentando la variabilidad y los valores de Ct. Se observa entonces una disminución significativa de las cargas virales a lo largo del tiempo en el ensayo de co-

infección con *P. salmonis* evidenciada por un aumento en los valores de Ct de PRV ($p < 0,05$).

A continuación, se muestra la Figura 14 con la evolución de los valores de Ct para PRV obtenidos durante el bio-ensayo de co-infección con *P. salmonis*

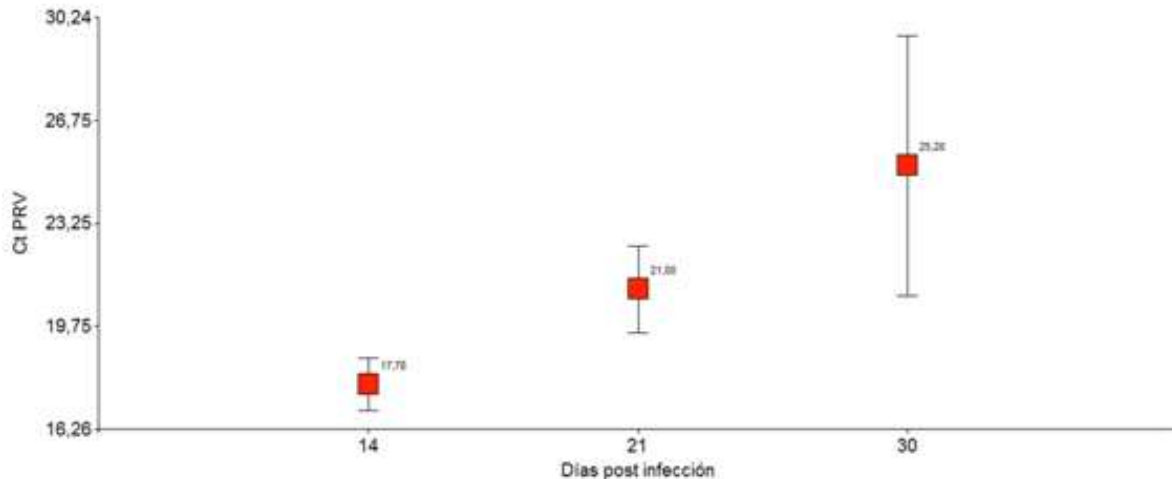


Figura 14. Variación de los valores de Ct de PRV en salmón del Atlántico naturalmente infectados durante el ensayo de co-infección con *P. salmonis*.

Los resultados que se muestran en la Figura 14, sugieren que las cargas virales de PRV-1 en smolts de salmón del Atlántico, durante la co-infección con *P. salmonis*, disminuyen a medida que aumenta el tiempo post-exposición a la bacteria. Esto podría sugerir un efecto de desplazamiento del agente viral por el bacteriano, o que el agente bacteriano está perturbando el curso de la infección viral, evidenciado por una mayor variabilidad en las cargas virales a medida que aumenta la proporción de peces infectados con la bacteria.

Resultado 2: Cargas bacterianas de *P. salmonis*

Muestras de riñón anterior obtenidas desde los peces cohabitantes a diferentes tiempos post-desafío fueron sometidas a la extracción de ADN total utilizando el kit E.Z.N.A Tissue DNA kit (Omega Bio-tek) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN eluido fue analizado con partidores y sonda específicos para el gen 16S de *P. salmonis* con química Agpath-ID (Agilent Technologies) en un equipo AriaMx (Agilent Technologies). Los valores de Ct obtenidos en la detección molecular fueron utilizados como reflejo de la presencia o ausencia de cargas bacterianas de *P. salmonis* en los peces cohabitantes a partir del día 14 hasta el día 30 post-desafío.

El día 14 post-desafío una proporción de 17,5% de s. Atlántico presentó cargas bacterianas, esta proporción se mantuvo hasta el día 21 post-desafío, pero aumentó a 40% al día 30 post-desafío (Figura 15).

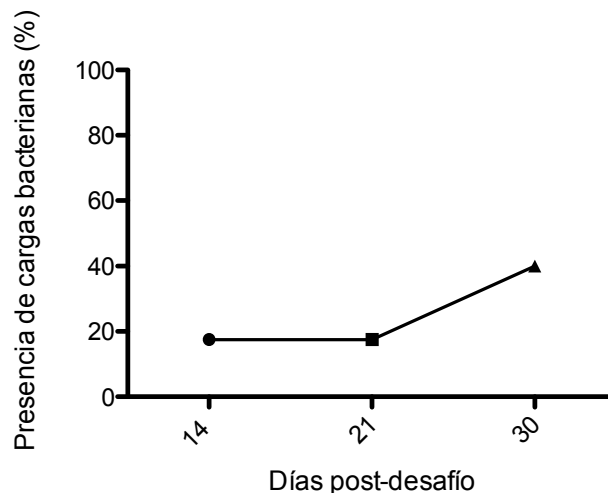


Figura 15. Porcentaje de cargas bacterianas de *P. salmonis* en salmones del Atlántico cohabitantes a diferentes tiempos post-desafío con peces troyanos infectados con *P. salmonis*.

Esta dinámica de las cargas bacterianas muestra una clara diferencia de lo que ocurre con la infección con PRV-1, a pesar de que la proporción de peces infectados con PRV-1 se mantiene en 100%, los valores de Ct van aumentando con el tiempo, reflejando una disminución en las cargas virales. Las cargas bacterianas se van presentando en una mayor proporción de los peces cohabitantes a medida que aumenta el tiempo post exposición a *P. salmonis* y las cargas virales van disminuyendo, aunque no desaparecen.

Resultado 3: Respuesta inmune

Muestras de riñón anterior obtenidas desde los peces cohabitantes a diferentes tiempos post-desafío fueron sometidas para extracción de ARN total; para esto, 30 mg de tejido fueron mezcladas con microesferas de cerámica y 500 μ L del reactivo Trizol (Invitrogen). Posterior a la adición de 100 μ L cloroformo, homogenización y centrifugación, la fase acuosa obtenida fue acoplada al kit de detección E.Z.N.A. RNA kit de extracción (Omega-biotek) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El ARN eluido fue sometido a transcripción reversa con AffinityScript cDNA Synthesis kit (Agilent Technologies) en un equipo termociclador Veriti (Applied Biosciences). A partir del cDNA generado se procedió a la amplificación por qPCR de genes inmunes con partidores específicos y química Brilliant II SYBR MM (Agilent Technologies) en un equipo QuantStudio 3 (Applied Biosystems). Los resultados de la expresión génica fueron normalizados con el factor de elongación y

analizados a través del método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En la tabla 6 se indican los partidores utilizados en este ensayo.

Tabla 6. Partidores utilizados en este ensayo para evaluar la expresión de genes inmunes en salmón del Atlántico infectados con PRV-1 y desafiados por cohabitación con *P. salmonis*.

Determinación	Partidor (5'-3')	Referencia
IFN-I	Fwd: ACTGAAACGCTACTTCAAGAAGTTGA	McBeath et al., 2006
	Rev: GCAGATGACGTTTTGTCTCTTTCCT	
IL-8	Fwd: GGCCCTCCTGACCATTACT	Xu et al., 2012
	Rev: ATGAGTCTACCAATTCGTCTGC	
Mx	Fwd: GGTGATAGGGGACCAGAGT	Rosæg, 2017
	Rev: CTCCTCACGGTCTTGGTAGC	
EIF 1 \square	Fwd: TGCCCTCCAGGATGTCTAC	Løvoll et al., 2011
	Rev: CACGGCCACAGGTACTG	
IL-1b	Fwd: GCTGGAGAGTGCTGTGGAAGAACATATAG	Pooley et al., 2013
	Rev: CCTGGAGCATCATGGCGTG	
IL-12	Fwd: GAGCCAAGTCTTATGGCTGC	Valenzuela et al., 2017
	Rev: GTTCAAACCTCCAACCCTCCA	

Al examinar los datos de la respuesta inmune con la prueba de Shapiro-Wilk se evidenció que éstos no se distribuyen normalmente, por lo tanto, se eligió la prueba de Kruskal-Wallis para continuar con el análisis de las veces de cambio de la expresión de transcritos de genes inmunes a lo largo de los diferentes tiempos post-desafío.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
promINF1	119	12,32	12,79	0,79	<0,0001
promIL1B	119	0,39	0,21	0,84	<0,0001
promIL8	119	12,48	14,52	0,71	<0,0001
promIL12	119	0,05	0,14	0,38	<0,0001
promMx	119	2,73	3,79	0,65	<0,0001

R.4.3.1. Interferón tipo I

La expresión de IFN-I es un reflejo de la actividad antiviral y generalmente se presenta aumentada en casos de infección viral. Concordante con lo mencionado en la literatura, durante este ensayo, la expresión de IFN-1 va disminuyendo en los peces cohabitantes a medida que aumenta el tiempo de exposición a la bacteria por parte de los peces troyanos (Figura 16). La prueba de Kruskal Wallis indica que esta disminución es significativa en los tiempos evaluados.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	dpc	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
promINF1	14	40	22,32	14,83	21,27	83,47	<0,0001
promINF1	21	39	12,88	7,62	11,77		
promINF1	30	40	1,77	1,19	1,40		

Trat.	Ranks
30	20,50 A
21	71,69 B
14	88,10 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

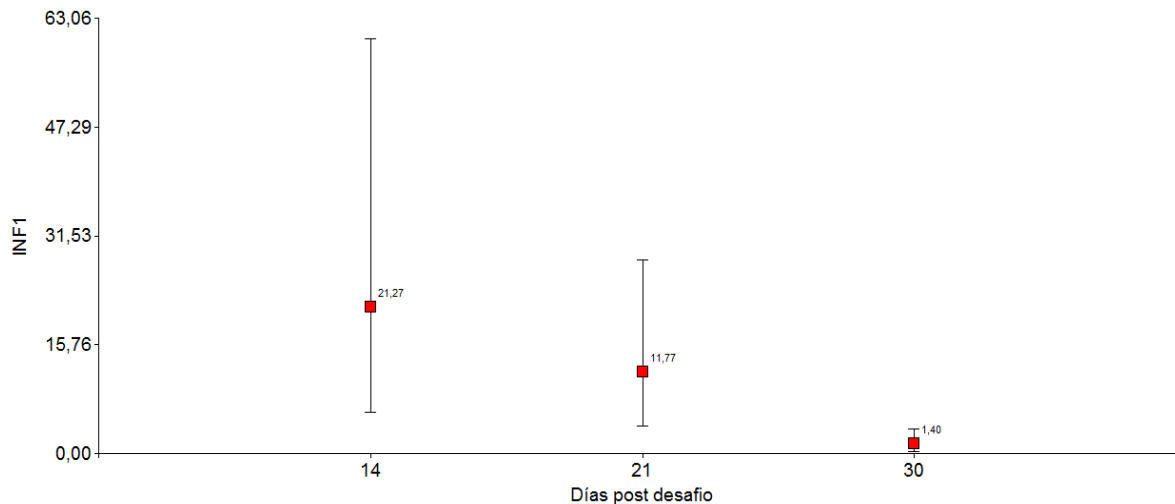


Figura 16. Niveles de expresión de IFN-1 en salmones del Atlántico cohabitantes infectados con PRV-1, a diferentes tiempos post-desafío con peces troyanos infectados con *P.salmonis*.

R.4.3.2. Interleuquina 1 β (IL-1 β)

La interleuquina 1 β posee funciones pro-inflamatorias y generalmente aumenta su expresión frente a la presencia de patógenos de naturaleza bacteriana. En este caso, no se aprecian diferencias substanciales en la expresión de esta citoquina (Figura 17).

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	dpc	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
promIL1B	14	40	0,47	0,21	0,38	12,26	0,0022
promIL1B	21	39	0,32	0,12	0,30		
promIL1B	30	40	0,38	0,26	0,34		

Trat.	Ranks
21	49,74 A
30	54,70 A
14	75,30 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

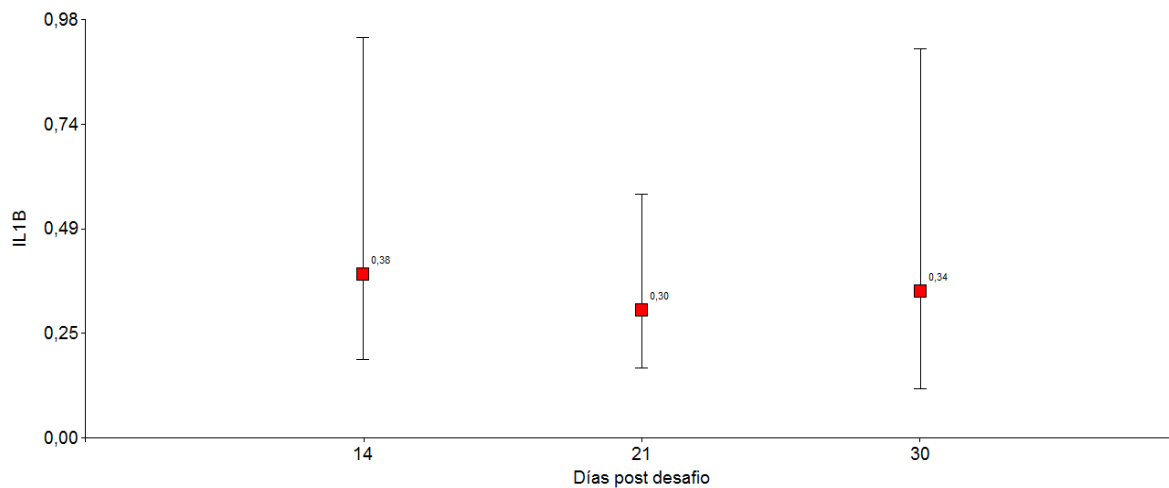


Figura 17. Niveles de expresión de IL-1 β en salmones del Atlántico infectados con PRV-1 cohabitantes a diferentes tiempos post-desafío con peces troyanos infectados con *P.salmonis*.

R.4.3.3. Interleuquina 8 (IL-8)

La interleuquina 8 se considera una quimioquina que aumenta fundamentalmente frente a estímulos de tipo bacterianos. En este caso, la expresión de IL-8 disminuye entre el día 14 y el día 30 post-desafío. Esta disminución podría estar relacionada con el efecto de la co-infección del agente viral y el bacteriano (Figura 18).

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	dpc	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
promIL8	14	40	15,10	11,28	12,43	37,58	<0,0001
promIL8	21	39	18,19	19,94	7,89		
promIL8	30	40	4,28	3,77	2,74		

Trat.	Ranks
30	32,80 A
21	72,41 B
14	75,10 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

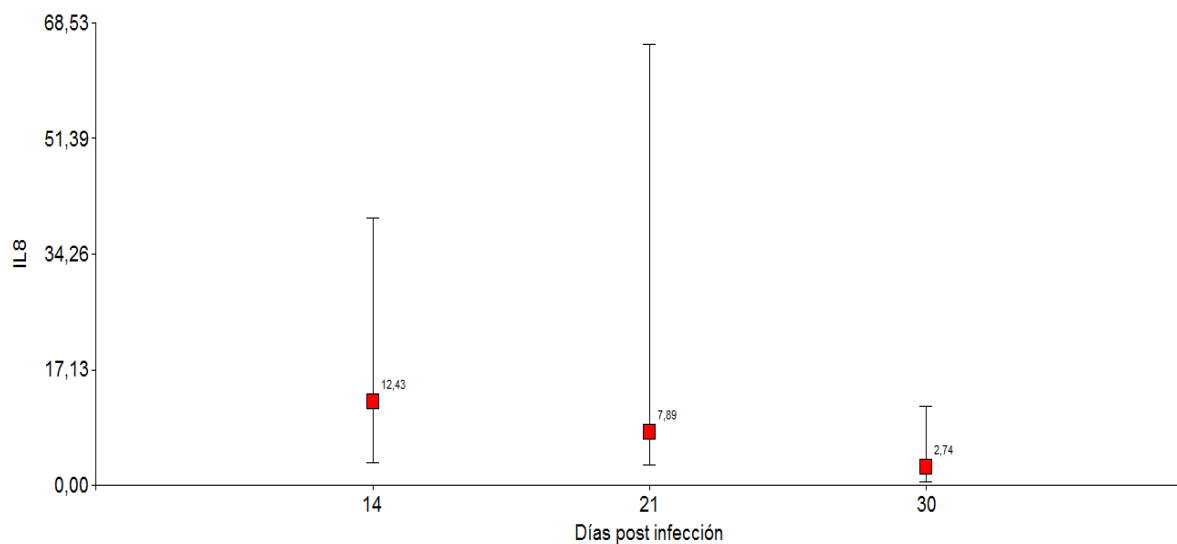


Figura 18. Niveles de expresión de IL-8 en salmones del Atlántico infectados con PRV-1 cohabitantes a diferentes tiempos post-desafío con peces troyanos infectados con *P. salmonis*.

R.4.3.4. Interleuquina 12 (IL-12)

Interleuquina 12 es una citoquina pro-inflamatoria que aumenta en peces, en órganos como riñón anterior, frente a infecciones principalmente bacterianas para gatillar respuestas inmunes de tipo Th1. En este caso, la expresión de esta citoquina no se encuentra aumentada en los días 14 y 21 post-desafío y presenta un aumento leve, pero significativo al día 30 concordando con el mayor porcentaje de peces cohabitantes que presentan cargas bacterianas de *P. salmonis* (Figura 19).

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	dpc	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
promIL12	14	40	0,00	0,00	0,00	19,75	<0,0001
promIL12	21	39	0,00	0,00	0,00		
promIL12	30	40	0,15	0,22	0,04		

Trat.	Ranks
21	50,00 A
14	50,00 A
30	79,75 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

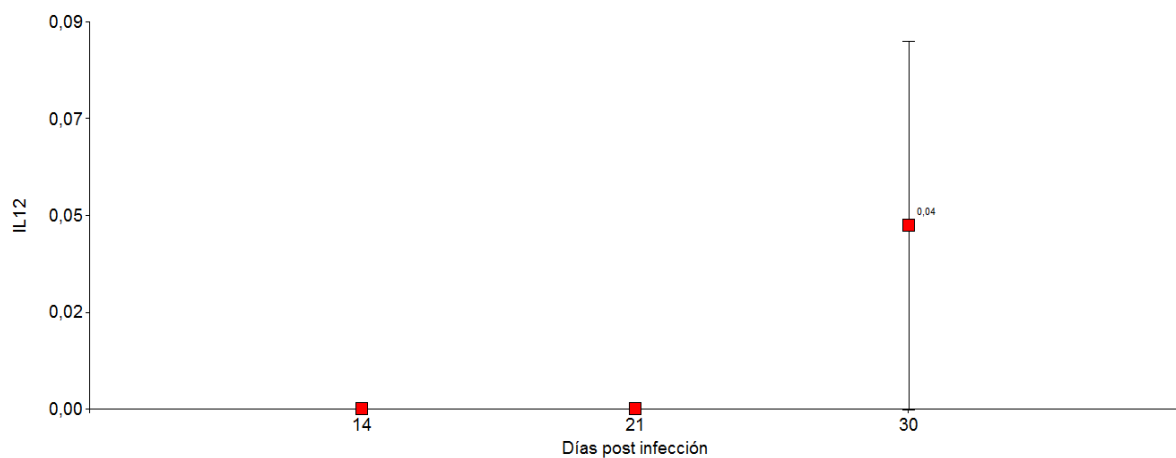


Figura 19. Niveles de expresión de IL-12 en salmones del Atlántico infectados con PRV-1 cohabitantes a diferentes tiempos post-desafío con peces troyanos infectados con *P. salmonis*.

R.4.3.5. Mx

Las proteínas Mx son sintetizadas después de la liberación de interferón 1 frente a algunas infecciones virales. En la célula impiden el ensamble de las cápsides virales. En el caso de esta co-infección experimental, la expresión del gen *mx-1* aumenta en los peces cohabitantes sólo entre el día 21 y el día 30 post-desafío (Figura 20). Esta respuesta es inesperada, ya que los peces se encuentran infectados con el virus PRV-1, pero las cargas virales van disminuyendo con el tiempo.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	dpc	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
promMx	14	40	1,10	0,98	0,71	65,61	<0,0001
promMx	21	39	0,72	0,45	0,54		
promMx	30	40	6,33	4,70	5,65		

Trat.	Ranks
21	37,85 A
14	45,90 A
30	95,70 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

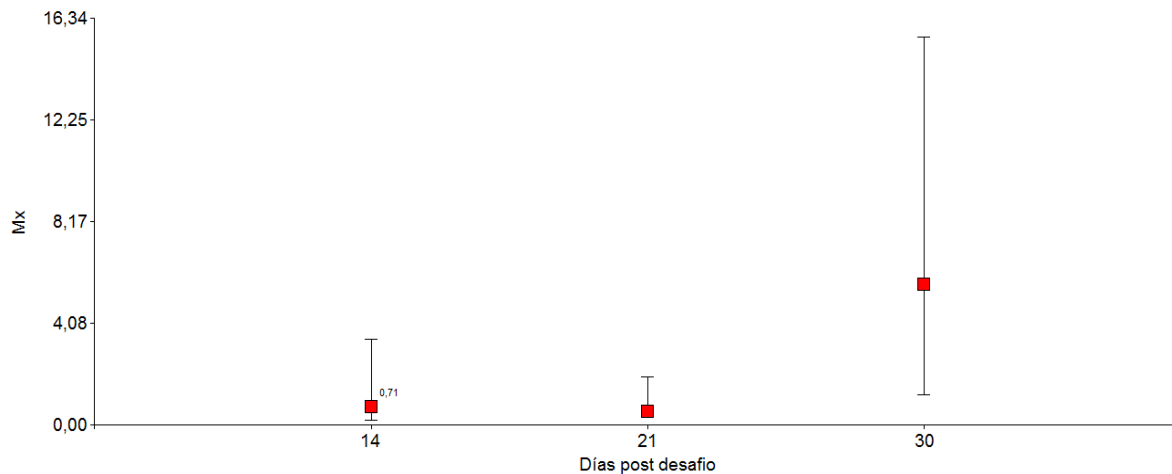


Figura 20. Niveles de expresión de Mx en salmones del Atlántico infectados con PRV-1 cohabitantes a diferentes tiempos post-desafío con peces troyanos infectados con *P.salmonis*.

En conclusión, en este estudio se observan aumentos de genes inmunes relacionados con la infección viral, como el caso de IFN-1 y relacionados con la infección bacteriana como IL-12. Sin embargo, hay genes que mantienen su expresión como el caso de IL-1B y IL-8 y que no reflejan un efecto bacteriano o viral específico; pero, que podrían estar reflejando un estado de balance entre la modulación que generan cada uno de los patógenos en la respuesta inmune de los hospederos.

Resultado 4: Histopatología

Para el bioensayo fueron analizadas 650 muestras de diferentes tejidos, según evaluación clínica y anátomo-patológica, correspondientes a muestreos de aproximadamente 40 peces cada uno, a partir del día 14 al día 30 post desafío intraperitoneal de los troyanos.

14 días post desafío

A los 14 días post desafío la mayoría de las muestras evaluadas no presentaron lesiones o presentaron lesiones de tipo leve.

En la evaluación del tejido cardíaco, un 27% (11 de 40 peces) de los cohabitantes no presentaron lesiones. Del total de animales muestreados en este tiempo, las lesiones cardíacas leves que se observaron fueron epicarditis mononuclear leve (47%) y congestión cardíaca leve (15%). Ninguna de estas lesiones se relaciona directamente con la infección con PRV o con *P. salmonis*.

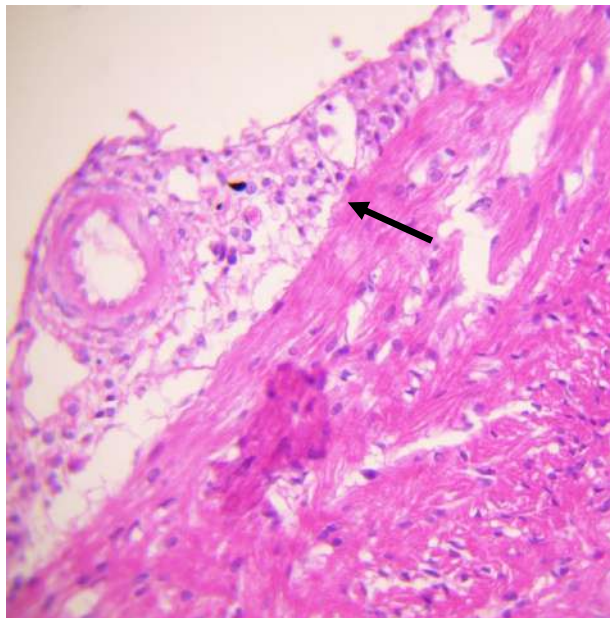


Figura 21. Corazón. Epicarditis mononuclear leve (flecha negra). HE, 40x.

En la evaluación del tejido hepático las lesiones más frecuentemente encontradas fueron congestión (47%) Atrofia (42%) y dilatación de vasos hepáticos (40%) todas ellas de tipo leve.

Un 50% de las muestras de riñón evaluadas no presentaron lesiones, mientras entre las restantes, los principales hallazgos fueron congestión (27%), degeneración glomerular (20%) y glomerulonefritis (15%). Todas ellas de carácter leve.

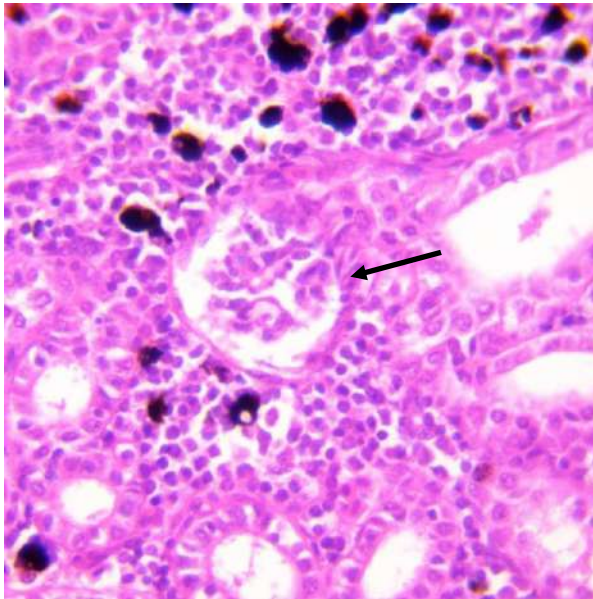


Figura 220. Riñón. Degeneración glomerular leve (flecha negra). HE, 40x.

Del total de muestras de bazo evaluadas, un 17,5% no presentó lesiones. Del resto, un 62% presentó congestión leve y un 45% presentó depleción linfoide leve.

Finalmente, del total de muestras de branquias un 40% no presentó lesiones y el resto de las muestras presentaron más frecuentemente hiperplasia de células epiteliales de las laminillas secundarias (25%), congestión leve (25%) y acortamiento y fusión de ápex de laminillas secundarias (17%).

Día 21 post desafío

Durante este muestreo se observó un aumento en la severidad de las lesiones con respecto al día 14 post desafío, esto tanto en riñón como en hígado, corazón, bazo y branquias. Sin embargo, las proporciones de individuos con lesiones disminuyeron en algunos tejidos con excepción de riñón donde el 100% de las muestras presentaron lesiones. El 60% de muestras no presentaron lesiones cardíacas, 56% no presentó lesiones en hígado, 20% no presentó lesiones en bazo y 56 no presentó lesiones en branquias.

Con respecto a corazón, se observó con mayor frecuencia epicarditis mononuclear focal leve (33%) y en menor proporción aparece miositis mononuclear leve (5%).

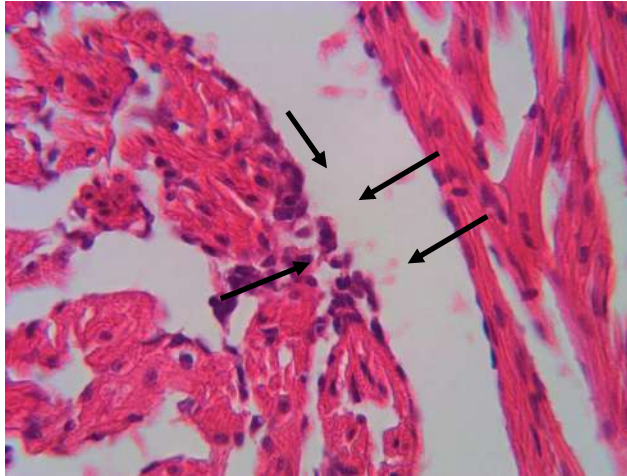


Figura 23. Corazón. Foco infiltrado inflamatorio mononuclear en capa esponjosa (flechas negras). HE, 40x.

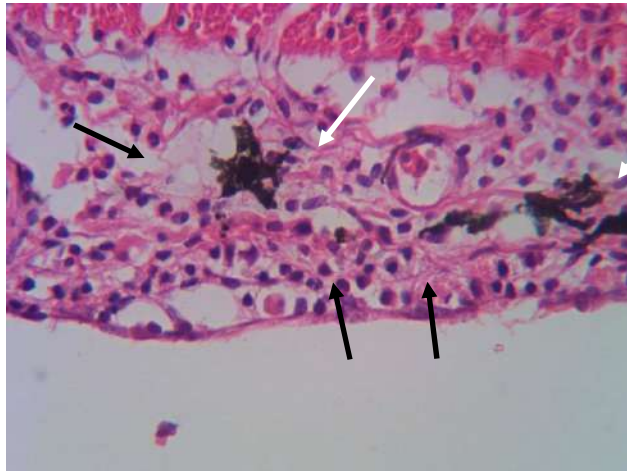


Figura 24. Corazón. Infiltrado inflamatorio mixto en epicardio (flechas negras) acompañado de células melanomacrofágicas (flechas blancas). HE, 40x

En hígado a los 21 días post desafío se observa infiltración inflamatoria mononuclear perivascular (38%), necrosis (12%) y hemorragias (5%).

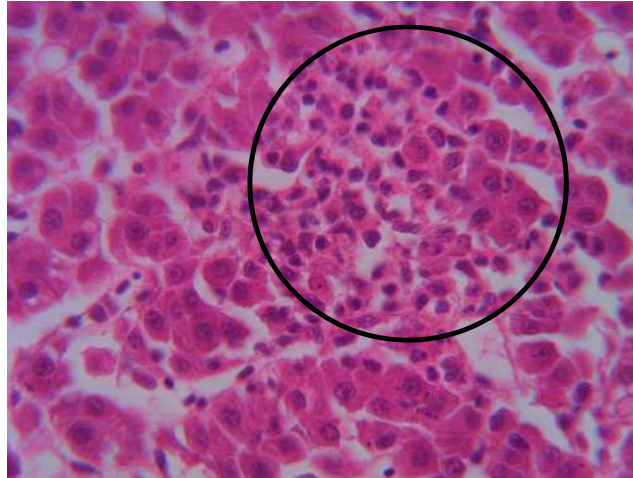


Figura 25. Hígado. Infiltrado inflamatorio mononuclear (círculo negro). HE, 40x.

A nivel renal, el 100% de las muestras de los peces cohabitantes presentó nefritis intersticial moderada en conjunto con hiperplasia de células melanomacrofágicas también moderada.

Las lesiones de bazo corresponden principalmente a congestión en grado moderado y severo en una proporción de 36 y 15%, respectivamente. Además, se observó hiperplasia de pulpa blanca en 15% de las muestras e hiperplasia de células melanomacrofágicas en 5%.

Finalmente, las lesiones branquiales correspondieron a infiltración inflamatoria mononuclear leve y telangetasia (74 y 5% del total de muestras evaluadas, respectivamente)

Día 30 post desafío

A los 30 días post desafío, disminuyó la proporción de peces con lesiones histopatológicas. De igual forma, la severidad las lesiones se aminoró. Del total de peces evaluados, un 95% no presentó lesiones cardíacas, un 37,5% no presentó lesiones en bazo, un 47,5% no presentó lesiones hepáticas, un 90% no presentó lesiones renales y un 85% no presentó lesiones en branquias. Esta situación es comparable a lo encontrado el día 14 post desafío. Las principales lesiones encontradas correspondieron a congestión leve a nivel cardíaco, atrofia leve y congestión leve en bazo, dilatación de vasos hepáticos y congestión hepática leve, congestión renal leve y congestión branquial leve.

Como conclusión se puede mencionar que durante la infección experimental con *P. salmonis* en un grupo de peces positivos a PRV, se presentaron lesiones histopatológicas leves a moderadas en diferentes órganos evaluados (hígado, bazo, riñón, corazón y branquias). Un pequeño grupo de lesiones, principalmente provenientes de peces del día 21 post desafío, fueron compatibles con fases iniciales de SRS y HSMI (15% y 5%,

respectivamente). Sin embargo, estas lesiones no fueron detectadas al día 30 post desafío. La evaluación de muestras en los días 14, 21 y 30 post desafío, sugieren que la infección previa con PRV-1 no tiene un efecto negativo en la infección experimental con *P. salmonis*. La coinfección, por lo tanto, de PRV-1 con *P. salmonis*, no tiene un efecto sinérgico para ninguno de los dos patógenos durante un período de tiempo de 30 días posterior a la infección intraperitoneal de peces troyanos con *P. salmonis*.

Como proyección de este trabajo queda la evaluación de tiempos de infección superiores, como por ejemplo hasta 16 semanas post desafío. De forma de seguir la infección hasta su desaparición en la población cohabitante infectada.

Otro desafío importante para una nueva investigación que involucre a PRV debiera ser la obtención de poblaciones de Salmón del Atlántico negativas a la infección con PRV. Esto permitiría esclarecer en forma definitiva el papel de PRV en las coinfecciones con *P. salmonis* ya sea como un agente neutral o como un agente protector de la severidad de las infecciones con *P. salmonis*.

VI. COMENTARIOS

Los resultados de la primera etapa del estudio confirman y robustecen de una forma objetiva, a través del análisis epidemiológico, los patrones y tendencias de presentación de SRS y las otras enfermedades en las diferentes zonas salmoneras, que eran muchas veces presumidos de una forma observacional o empírica. La demostración estadística de esta situación, y que evidencia por ejemplo las notables diferencias de presentación de enfermedades en la zona birregional Los Lagos-Aysén en comparación con la Región de Magallanes indicarían la necesidad de implementación de herramientas de gestión sanitaria y normativas diferenciadas en cada Región. Esta situación puede ser observable incluso a nivel de barrio dentro de una región o macrorregión, por lo que se requerirían estudios que pudiesen profundizar en este sentido, de modo de establecer metodologías de análisis, control y/o monitoreo que permitan llevar a la gestión sanitaria a un óptimo local y no lo que pudiese estar sucediendo actualmente donde las medidas de control pueden ser excelentes para un barrio o Región, pero absolutamente insuficientes para otra zona.

Tradicionalmente la industria acuícola ha llevado los controles productivos y sanitarios a partir de la construcción y seguimiento de curvas porcentuales o tasas, fundamentalmente mortalidad, ya sea general o según causa según establece la normativa. No obstante, para este estudio, la utilización de cifras absolutas de los brotes nos permite dimensionar el número de peces muertos sin incorporar el efecto del tamaño del centro o jaula (número de peces). En la tabla 7 se presentan las mortalidades de tres centros, con jaulas de distinto tamaño. Los centros con jaulas con un menor número de peces requieren un menor número de peces muertos para obtener el 0,35% semanal por jaula, en cambio un centro con jaulas de mayor tamaño requiere un número de peces mayor para lograr el mismo porcentaje, en el ejemplo podemos observar que número de peces por jaula y semana, para el centro a) 152, en b) 190 y en c) 298. Es por esto que se decidió realizar el análisis y clasificación de los brotes en cifras absolutas, de modo de evidenciar el aporte permanente y sostenido que puede hacer un centro a la mantención de la enfermedad en el barrio y que por la forma de monitoreo tradicional de la mortalidad en términos de porcentaje pasa inadvertido ya que no gatilla las alertas requeridas.

Si este análisis lo llevamos a centros de mayor tamaño, la infección estaría más diseminada que en centros de menor tamaño, al momento de usar un porcentaje de mortalidad.

Tabla 7. Comparación de las mortalidades absolutas y relativas de tres centros con mortalidades asociadas a SRS, en la región de Los Lagos, año 2018.

a)

JAULA 109	2018-10	2018-11	2018-12	2018-13	2018-14	2018-15	
SRS	8	26	51	161	582	4.414	152
N° INDV	43.939	43.700	43.596	43.445	43.233	42.580	43.445
% mortalidad por SRS	0,02	0,06	0,12	0,37	1,35	10,37	0,35

b)

JAULA 110	2018-17	2018-18	2018-19	2018-20	2018-21	2018-22	
SRS	59	189	288	350	144	185	190
N° INDV	55.936	55.808	55.591	55.206	54.662	54.449	54.449
% mortalidad por SRS	0,105	0,339	0,518	0,634	0,263	0,340	0,35

c)

JAULA 102	2018-16	2018-17	2018-18	2018-19	2018-20	2018-21	2018-22
SRS	81	379	289	298	212	73	56
N° INDV	86.331	86.214	85.818	85.515	85.189	84.917	84.745
% mortalidad por SRS	0,09	0,44	0,34	0,35	0,25	0,085	0,07

Para efecto de un proceso infeccioso se requiere evidenciar la circulación de los patógenos y fuentes de infección. Cuando aparecen peces muertos, su magnitud se asocia a la tasa de letalidad o sea de los individuos enfermos (infectados) cuantos mueren, lo que es en términos de la evolución de la enfermedad “punta del iceberg” y el número de peces infectados es mucho mayor. Como se observa en la figura n° 1 cuando aparece un pez muerto hay un mayor número de peces infectados ya sea en etapa subclínica o clínica.

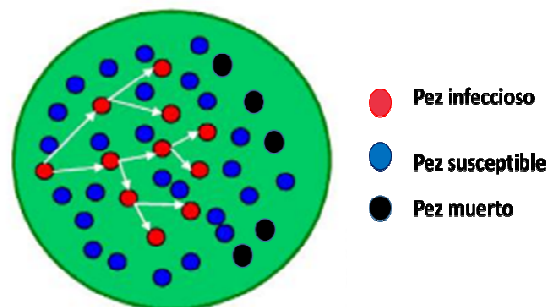


Figura 24. Esquema de diseminación de una enfermedad.

De esta forma y conforme a los resultados obtenidos, las recomendaciones pudieran orientarse ya hacia la profundización de investigaciones relacionadas por ejemplo con el comportamiento de la enfermedad más allá del registro de mortalidades, sino que también en el estudio la morbilidad y tasas de contacto en la población global “no muerta” que normalmente no es abordada en términos productivos.

Asimismo, considerando el análisis de los resultados de las curvas y la variabilidad de las mortalidades, se refuerza la propuesta de dar una mirada individual por centro. La validez de los resultados utilizando el análisis individual es más robusto que el querer generalizar, planteando en este caso una extrapolación la técnica, y no un resultado. Al modelar y trabajar con estadística poblacional, se pierden posibilidades de detectar en el proceso de gestión para el control de la enfermedad, los distintos desempeños por centros. Por tanto, se propone el uso de cartas de control de proceso como herramienta en la industria, ya que entregaría información desde el contexto individual y no grupal, por lo que podría ser una metodología a considerar pensando en ser utilizada o adaptada al estudio de los brotes. Estudios para la construcción de los límites a utilizar en las cartas de control de procesos debiesen implementarse, incorporando elementos de amplia temporalidad, capacidad y eficacia diagnóstica, y también la utilización de software licenciado que permita la presentación y comparación con las realidades de otros países salmoneros.

Por otra parte, coinfección clínica se presentó bastante difusa y poco concluyente. Lo fundamentalmente detectado se relaciona con el predominio de una patología de base, fundamentalmente SRS, aunque se observó algo de BKD, sobre la cual se identifican signos característicos y signos inespecíficos, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Si bien se registró un alto nivel de coinfección, detectada a nivel molecular, en los centros de cultivo muestreados, a la luz del análisis de las curvas de presentación de las coocurrencias, no existe evidencia de alguna asociación potenciadora o predisponente entre los diferentes agentes. Sí se observó en el bioensayo que las cargas virales iniciales de PRV iban disminuyendo en la medida que avanzaba la infección con *P. salmonis*, a la luz del análisis de lesiones es posible concluir que al menos dentro del periodo del estudio, no existe un efecto sinérgico de la infección en ninguno de los dos patógenos. Por tanto, serían necesarios estudios más extensos que permitan evaluar por ejemplo la situación hasta la finalización de la presencia del agente en los peces desafiados, sin dejar fuera la evaluación en peces sin infección previa de PRV.

VII. CONCLUSIONES FINALES

Los resultados de la presente investigación han mostrado lo siguiente:

1. Los barrios, ACS o compartimentos epidemiológicos muestran dinámicas de presentación de mortalidades y/o brotes por SRS en forma diferenciada. Vale decir, los factores que determinan una alta o baja presentación de mortalidades por SRS, o presentación/no presentación de brotes, son propios de cada barrio y del ambiente o centros que lo componen.
2. Los niveles de mortalidad registrada por SRS demuestran la persistencia de un endemismo del agente a lo largo del tiempo. Esta situación puede subvalorarse en cuanto a su contribución en la mantención de la enfermedad o en el desencadenamiento de los brotes, en la medida que esta mortalidad persistente no supere los valores referenciales definidos por la normativa vigente o bien por las políticas del manejo de salud de las empresas que componen el barrio.
3. El patrón de presentación de enfermedades coocurrentes evaluadas a partir del registro de mortalidades, se manifiesta de forma diferente en las regiones salmoneras. La Región de Los Lagos y Aysén se manifiestan de forma semejante, con una predominancia de SRS que se presenta con y sin BKD, y SRS con y sin HSMI. Por su parte la Región de Magallanes presenta predominancia de mortalidades por BKD con y sin HSMI; y BKD sin SRS.
4. En la coocurrencia de patógenos y/o enfermedades, evaluada por el análisis epidemiológico de la información de mortalidades y por los muestreos de campo, se observó la existencia de una concomitancia, pero no una predisposición. Es decir, IPN, BKD, HSMI/PRV no serían predisponentes a SRS.
5. La evaluación clínica y los muestreos de campo mostraron que en los peces enfermos existe una predominancia de lesiones atribuibles a la enfermedad de base, principalmente SRS. La presentación de coinfección o comorbilidad pasaría más desapercibida para una evaluación clínica de una persona con poca experiencia o capacitación. El cuadro concurrente más detectado fue SRS con lesiones branquiales propias del complejo branquial (GCD) descrito en Chile y en Noruega, aunque sin una etiología de base común, ya que las lesiones branquiales en Chile son más bien del tipo proliferativo, generadas por condiciones medioambientales que permiten la persistencia de organismos marinos asociados al plancton.
6. Derivado de lo anterior es posible inferir que la coinfección/comorbilidad/coocurrencia podría estar subestimada por el sistema de clasificación de mortalidades, fundamentalmente por dos motivos. El primero se refiere a un denominado efecto “matadero”, donde ante la presencia de una alta mortalidad generada por una enfermedad

en particular y de mayor prevalencia que las demás, la clasificación de mortalidades se registra en base a esa única enfermedad sin considerar otras que eventualmente pudiese estar presentándose en ese momento, particularmente cuando además la signología clínica es inespecífica. El otro motivo es que el actual sistema de clasificación y registro de mortalidades asigna una categoría única a cada pez muerto, sin considerar una eventual coocurrencia. Los registros de empresas tampoco utilizan una doble clasificación ya que eso generaría una sobrestimación de peces muertos que incidiría en la mortalidad total.

7. Los resultados del bioensayo mostraron que las cargas virales de PRV fueron disminuyendo a medida que avanzaron los muestreos del estudio. Asimismo, esta disminución coincidió con un mayor porcentaje de peces positivos a la infección con *P. salmonis*. Existen varias hipótesis que pueden formularse en para explicar este hallazgo, pero que debiesen ser abordadas en estudios posteriores, particularmente en cuanto a la biología de la infección con PRV que aún es bastante desconocida.

8. La expresión de los genes marcadores de IFN-1 e IL-12 son concordantes con la presencia de PRV-1 y *P. salmonis* respectivamente y la expresión de los otros genes evaluados podría estar influida por la coinfección y sin un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias en forma pronunciada en ninguno de los grupos evaluados.

9. La signología clínica y lesiones histopatológicas registradas en el bioensayo no definen con claridad la manifestación de una patología de base ni el potenciamiento de uno u otro agente. Es posible que la severidad de las lesiones se incremente con el tiempo, por lo que se sugiere considerar esta variable en próximos bioensayos de esta naturaleza, más extendidos en el tiempo.



ALVARO SANDOVAL ESPINOZA
Director del Proyecto



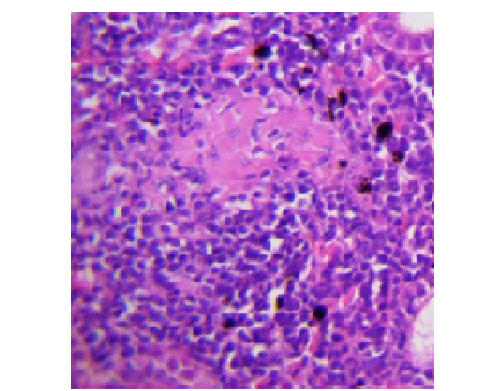
Puerto Montt, 26 de diciembre de 2018.

ANEXO 1 FICHAS DE COINFECCIÓN/COOCURRENCIA





Las condiciones con componentes clínicos reconocibles y diferenciables pesquisadas en el tiempo que duró el estudio correspondieron a la coinfección/coocurrencia de: P.salmonis/PRV; P. salmonis/T. dicentrarchi; SRS/CGD (Complejo branquial); y BKD/CGD.

SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*)

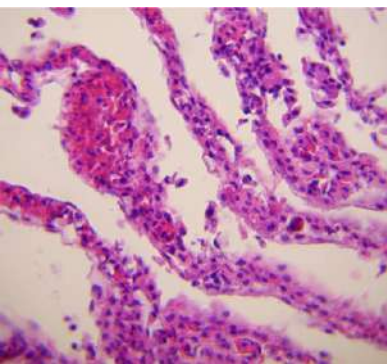
1. Aspectos lesionales identificados coocurrencia SRS/PRV en salmón del Atlántico.

	<p>Individuos con manifestación clínica de SRS coocurrente con infección de PRV presentaron signología externa predominantemente atribuida a SRS enmascarando otro tipo de signología.</p>
	<p>De la misma forma en la evaluación interna los signos, existe un amplio predominio de lesiones atribuibles a la septicemia generada por SRS, sin necesariamente identificarse hallazgos propios de HSMI.</p>
	<p>Histopatológicamente las lesiones también pueden presentar un componente inespecífico, particularmente si se trata de un cuadro de SRS generado pro genogrupos de P. salmonis EM-90 like.</p> <p>En este caso se presentó una miocarditis mononuclear leve en capa compacta y esponjosa.</p>

2. Aspectos lesionales identificados coocurrencia SRS/*Tenacibaculum dicentrarchi*.


	<p>Individuos con manifestación clínica de SRS coocurrente con infección de <i>Tenacibaculum dicentrarchi</i>, existe también un predominio de lesiones atribuibles a SRS, particularmente a nivel de piel, con compromiso de aletas, observándose principalmente aletas raídas.</p>
	<p>Las lesiones ulcerativas pueden comprometer la boca y la zona opercular. Se recomienda para el diagnóstico realizar aislamiento del agente desde lesiones de estas zonas en medio agar marino.</p>
	<p>Internamente destaca la congestión de órganos internos y la esplenomegalia.</p>
	<p>Ocasionalmente pueden presentarse cavernas musculares asociadas al SRS. Si bien es la matriz de elección para el aislamiento de <i>P. salmonis</i>, no se recomienda utilizarla para el caso de coocurrencia con <i>Tenacibaculum</i> si es que posee fistulaciones al exterior, ya que puede ser contaminada secundariamente por otras bacterias ambientales.</p>

3. Aspectos lesionales identificados coocurrencia BKD/Complejo Branquial (CGD).

	<p>La presentación de BKD puede estar ocasionalmente asociada a la presentación secundaria de CGD, la que a su vez puede estar subdiagnosticada si es que no se cuenta con la experiencia suficiente para ser reconocida.</p>
	<p>Para el caso de enfermedades primarias como BKD, es posible observar la patología típica asociada al cuadro: baja de la condición corporal, ascitis, renomegalia.</p>
	<p>Si bien no es patognomónico ocasionalmente pueden observarse nodulaciones o granulomas en riñón y otros órganos, como en esta fotografía donde pueden observarse en bazo.</p>
	<p>Si bien existe una multicausalidad descrita en la presentación de CGD, en Chile debiese clasificarse como tal los cuadros que presenten fundamentalmente hiperplasia del epitelio branquial.</p> <p>Como su nombre lo indica la causalidad es múltiple no obstante a nivel nacional las causas más frecuentes corresponden a efectos ambientales con proliferación de microalgas, amebas y otros microorganismos del plancton.</p>




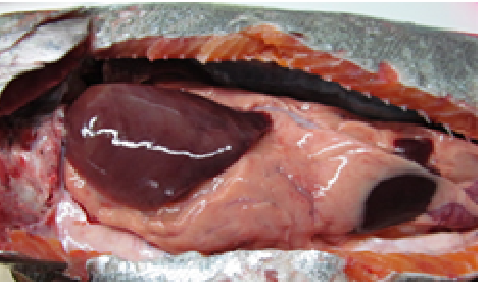
SALMÓN COHO (*Oncorhynchus kisutch*)

1. Aspectos lesionales identificados coocurrencia *SRS/Tenacibaculum dicentrarchi* en salmón coho.

	<p>Los de esta especie que son afectados, cursan con lesiones externas predominantemente asociadas a SRS. Al igual que para salmón del Atlántico <i>T. dicentrarchi</i> actúa como agente oportunista a nivel de tegumento.</p>
	<p>Aletas dorsales, pectorales y pélvicas se presentan habitualmente raídas.</p> <p>Se recomienda realizar cultivos bacteriológicos en agar marino de estas lesiones para aislamiento diagnóstico del agente.</p>
	<p>Aletas con hemorragias en la base también es recomendable para la obtención de muestras para cultivo bacteriológico diagnóstico.</p>
	<p>Internamente se pueden observar lesiones típicas de SRS: nodulaciones hepáticas, congestión de la vejiga gaseosa, cavernas musculares y encefalitis. Para el caso de la coocurrencia con <i>T. dicentrarchi</i> puede observarse también tumefacción esplénica, adoptando una forma más globosa.</p>

TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

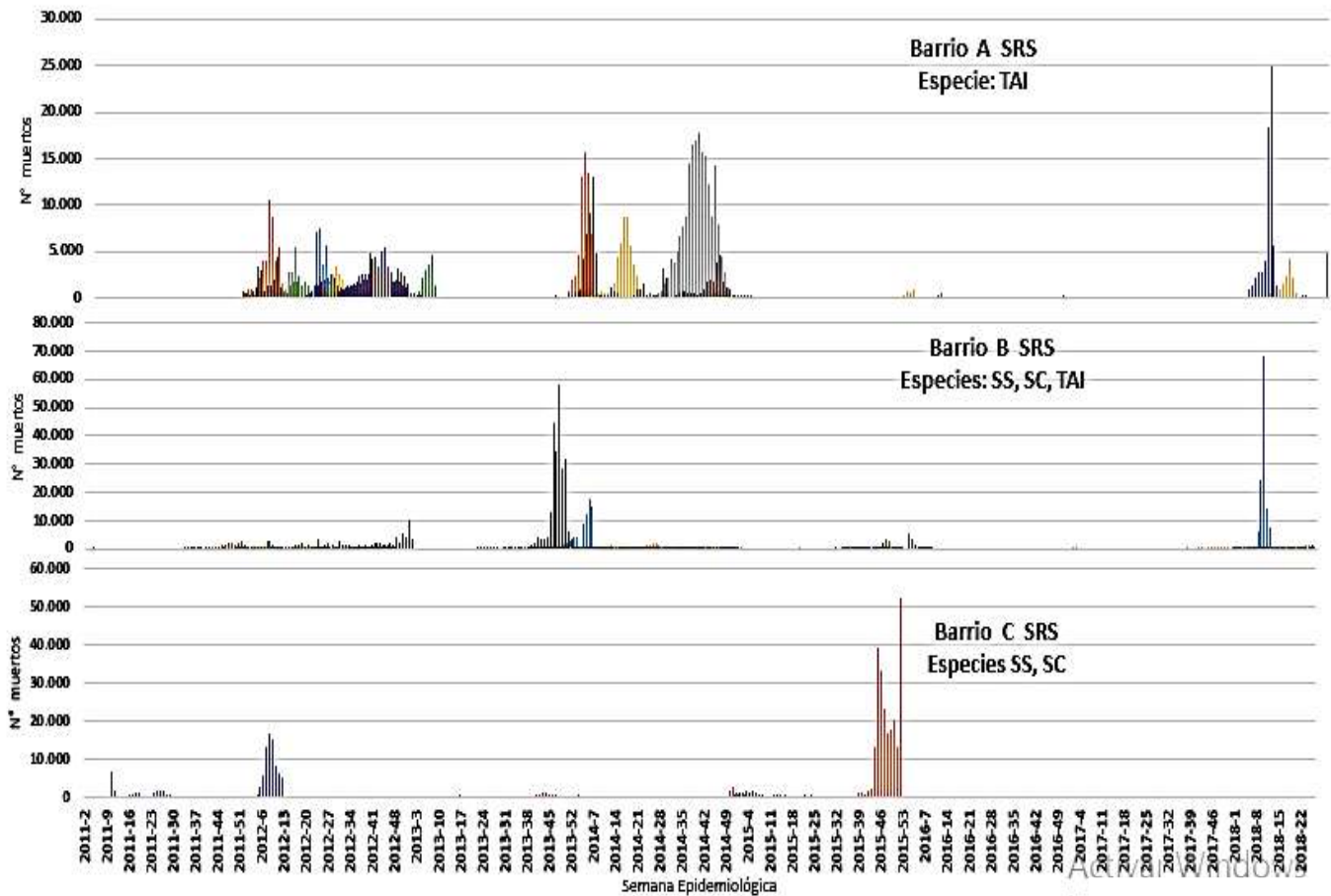
1. Aspectos lesionales identificados coocurrencia SRS/*Tenacibaculum dicentrarchi* en trucha arcoíris.

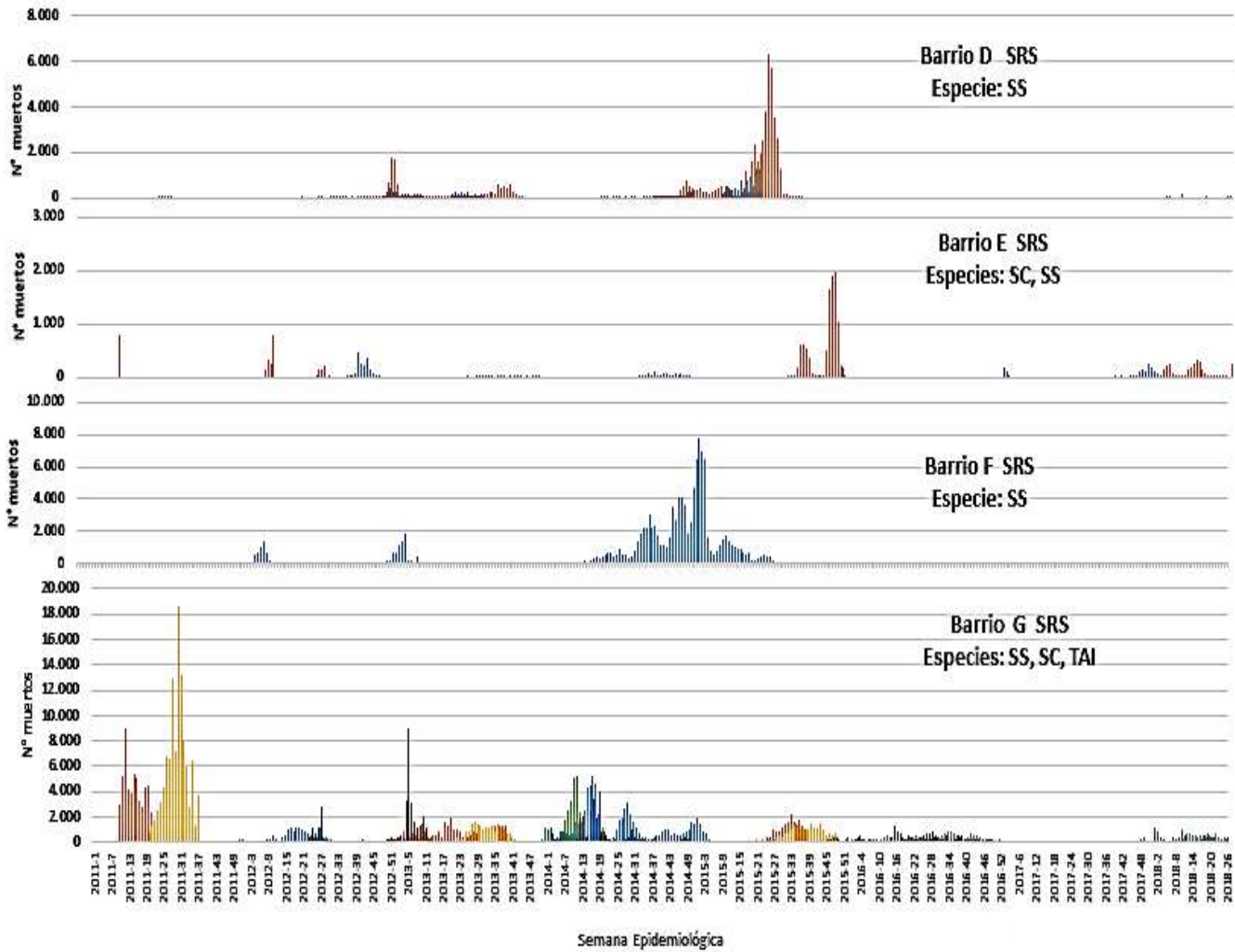
	<p>La trucha presenta un patrón de lesiones externas en la coocurrencia SRS/<i>T. dicentrarchi</i>, muy semejante a lo que ocurre con salmón del Atlántico y salmón coho, donde <i>T. dicentrarchi</i> actúa como patógeno oportunista incrementando la severidad de las lesiones, particularmente en aletas.</p>
	<p>Los peces frecuentemente presentan en la coinfección severa lesiones a nivel de boca y opérculo. Se sugiere utilizar estas zonas como matriz para cultivo y aislamiento diagnóstico del agente.</p>
	<p>Presencia de aleta caudal raída es uno de los signos más frecuentes de observar en la coocurrencia SRS/<i>T. dicentrarchi</i>.</p>
	<p>Las lesiones internas se presentan en diferente grado de severidad, según sea la respuesta individual del pez. Si bien no es determinante, frecuentemente se puede observar tumefacción esplénica con morfología globosa.</p>

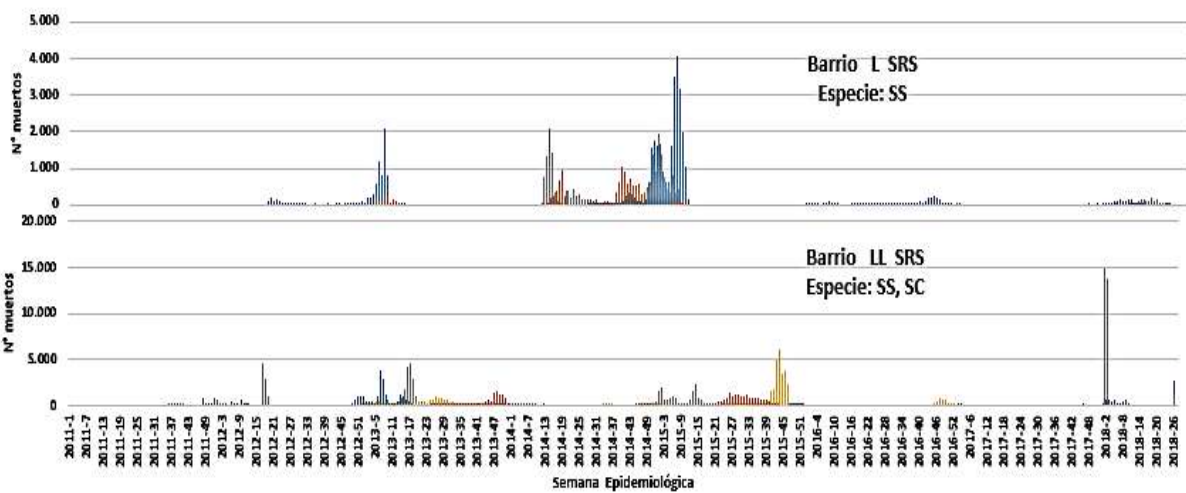
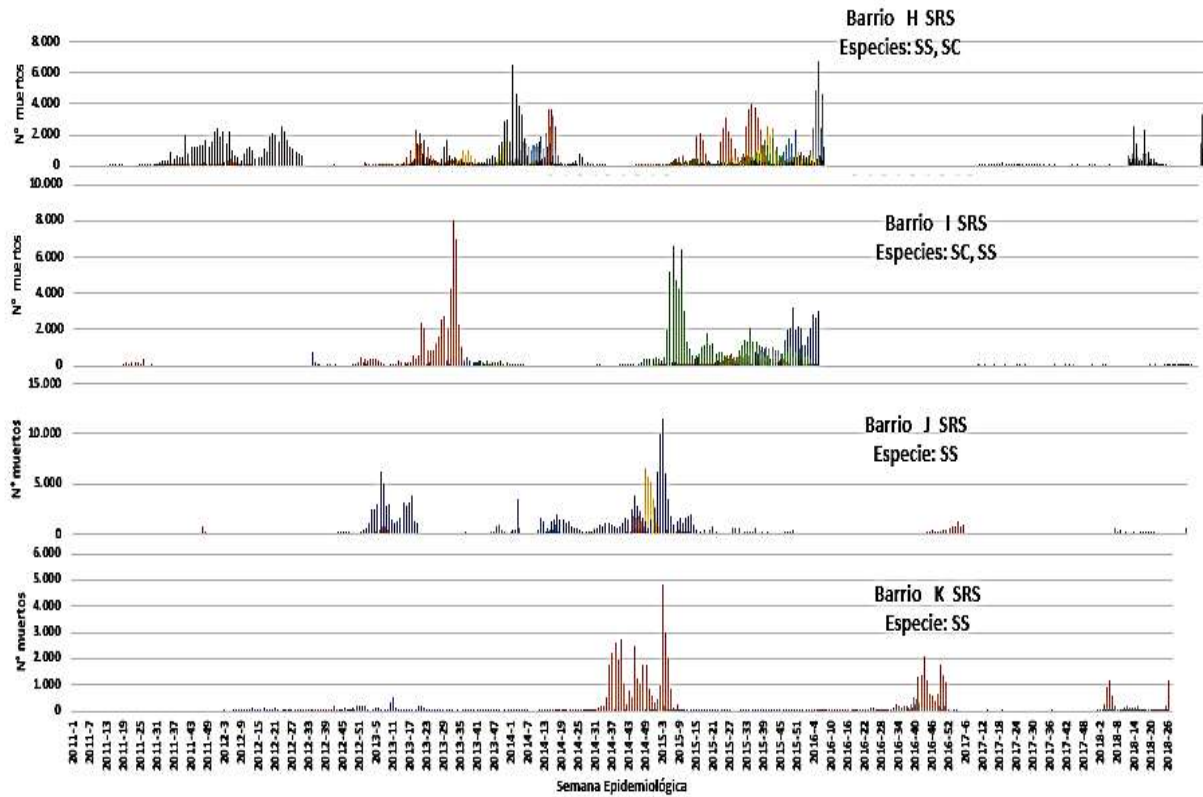
ANEXO 2

Curvas de mortalidades por SRS según especie, barrio y Región. Las gráficas muestran que si bien existen diferencias significativas en la magnitud de las curvas de mortalidad, las formas se mantienen independientemente de la especie.

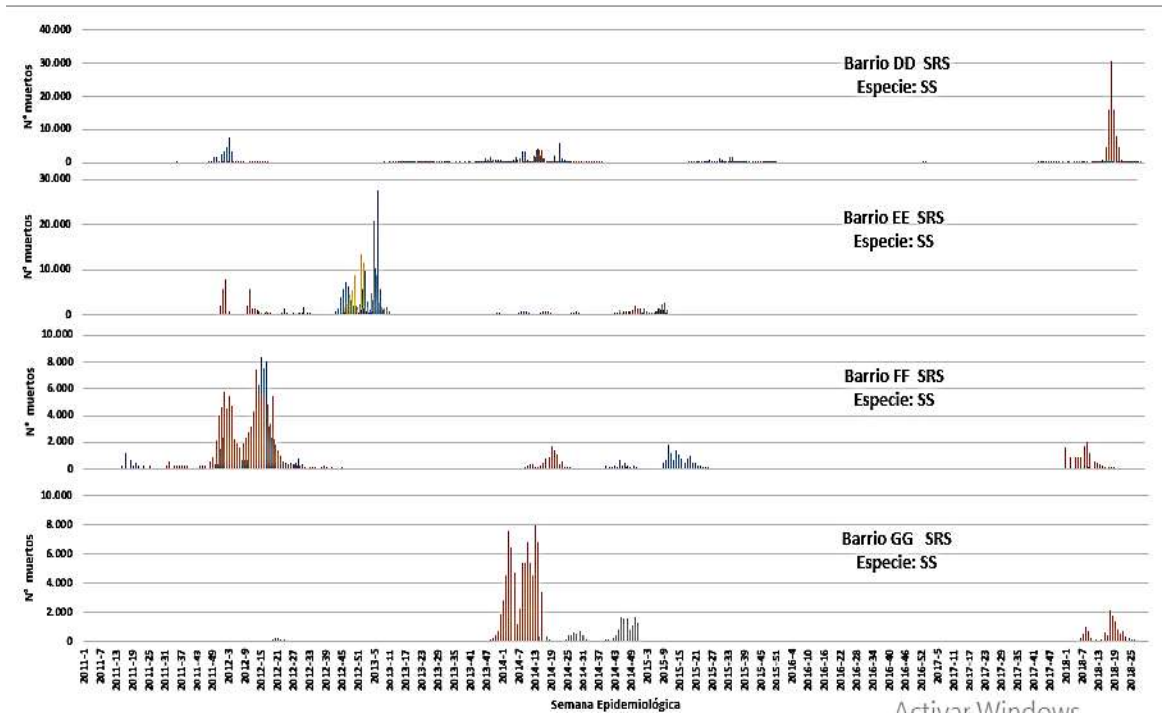
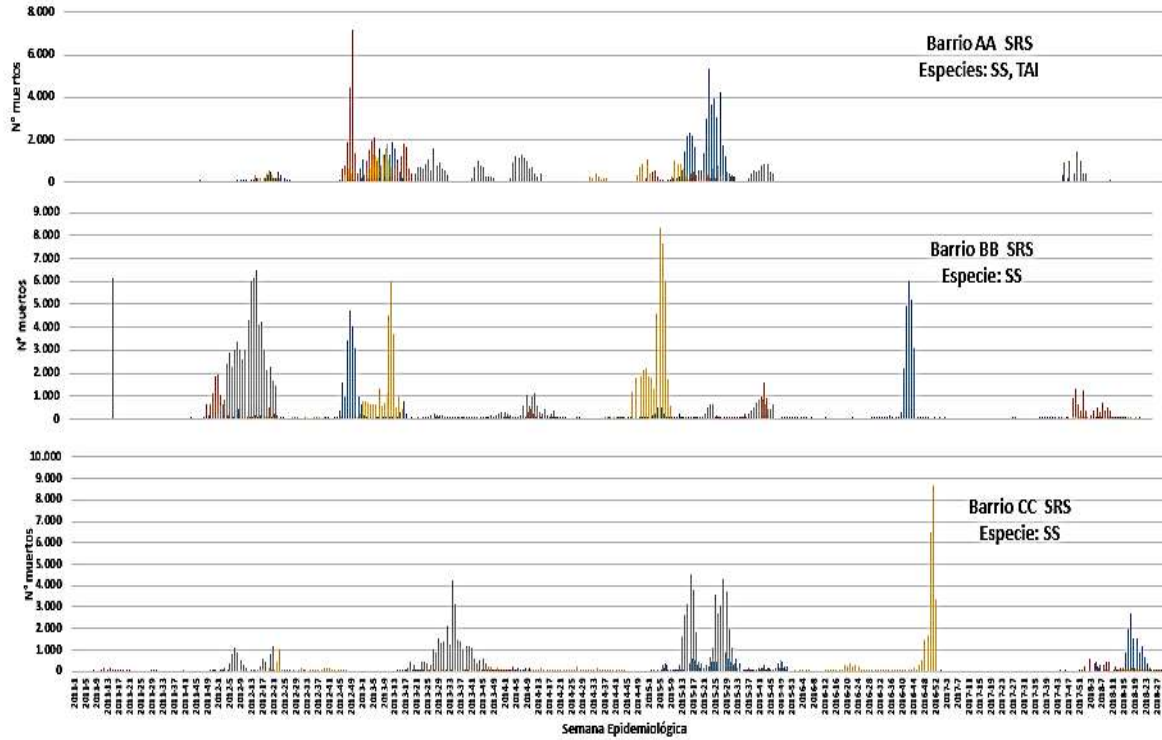
Región de Los Lagos

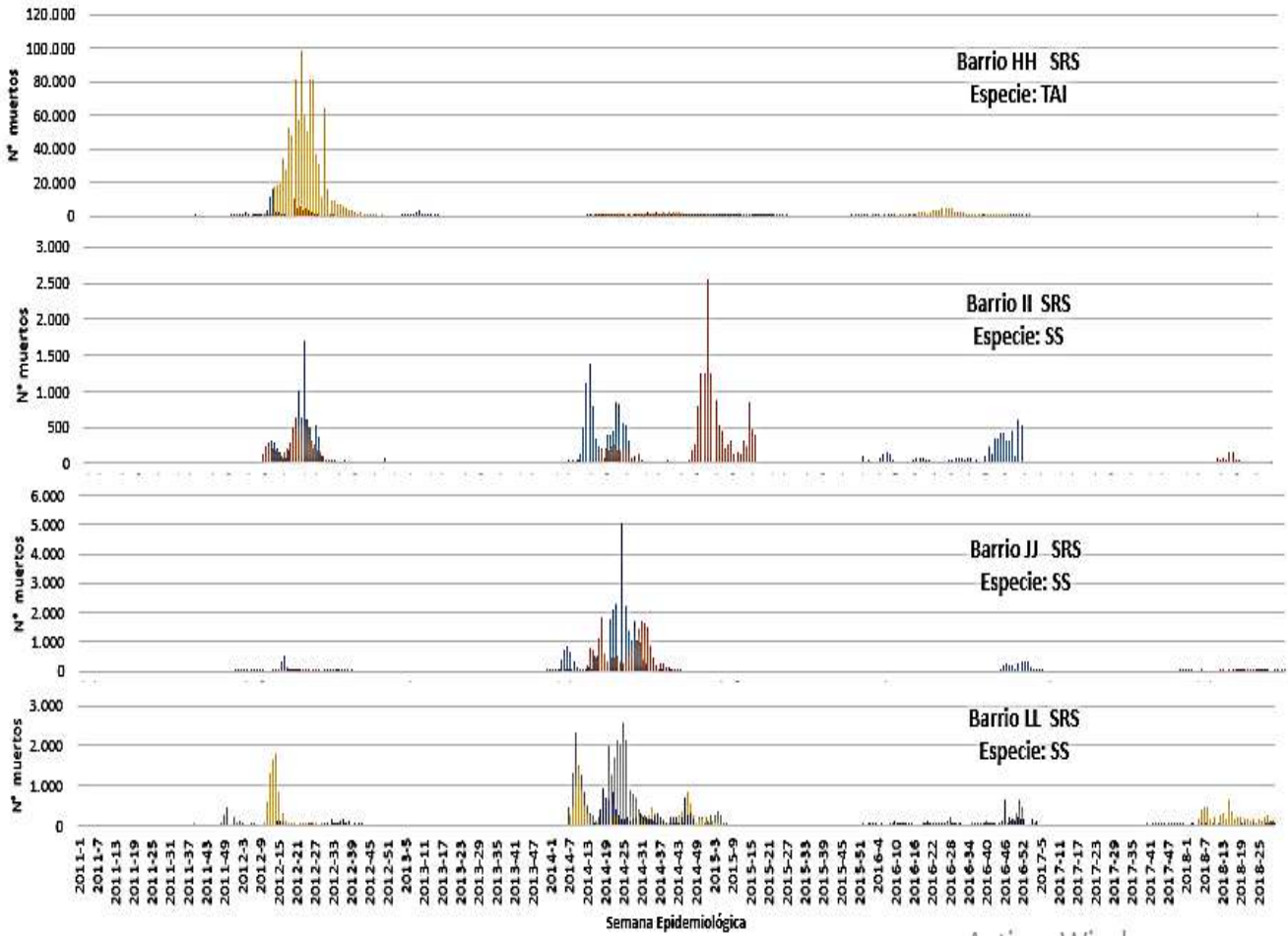




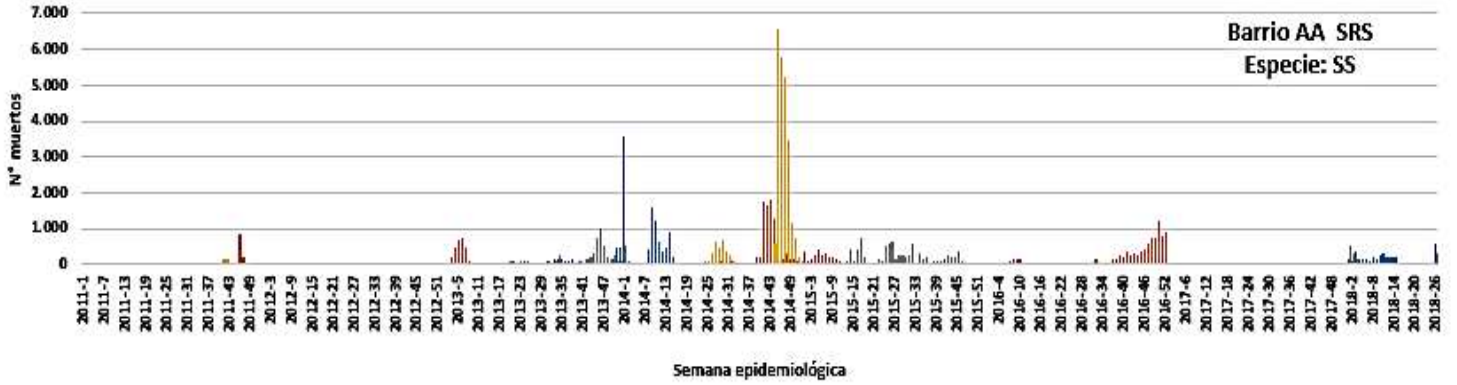


Región de Aysén





Región Magallanes



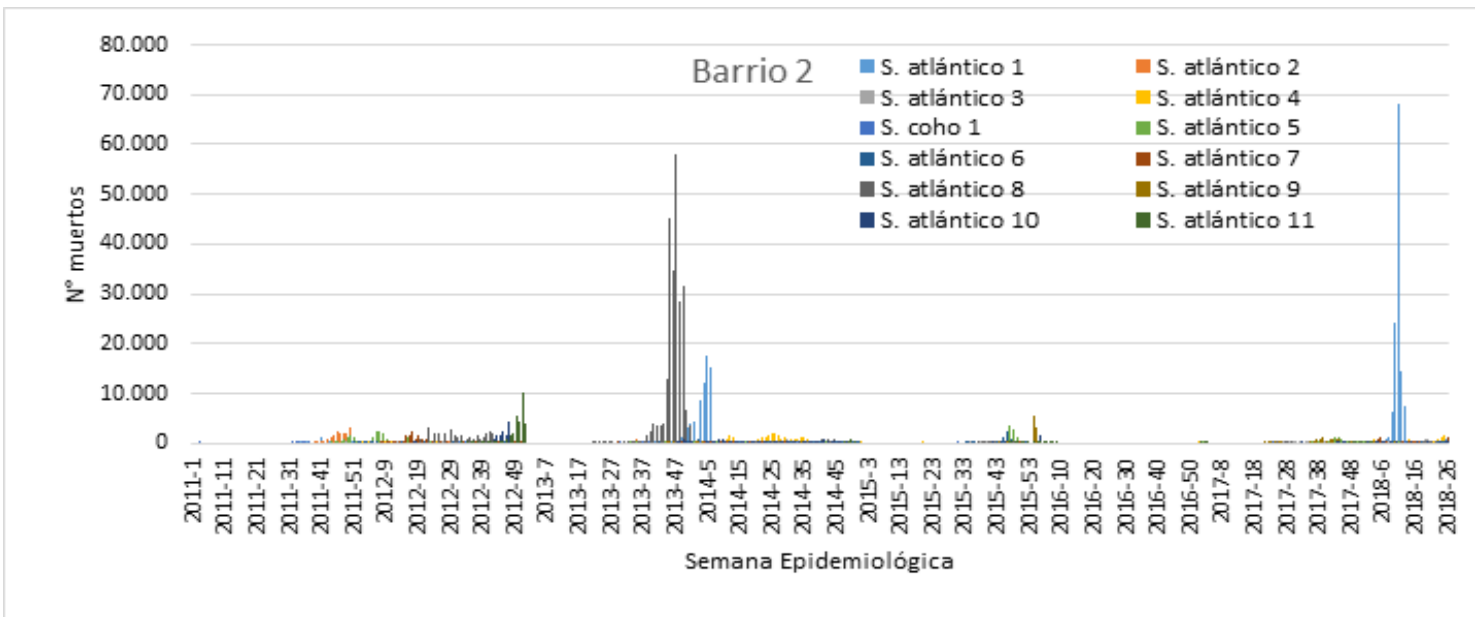
ANEXO 3

PATRONES DE MORTALIDADES POR SRS EN BARRIOS Y CENTROS

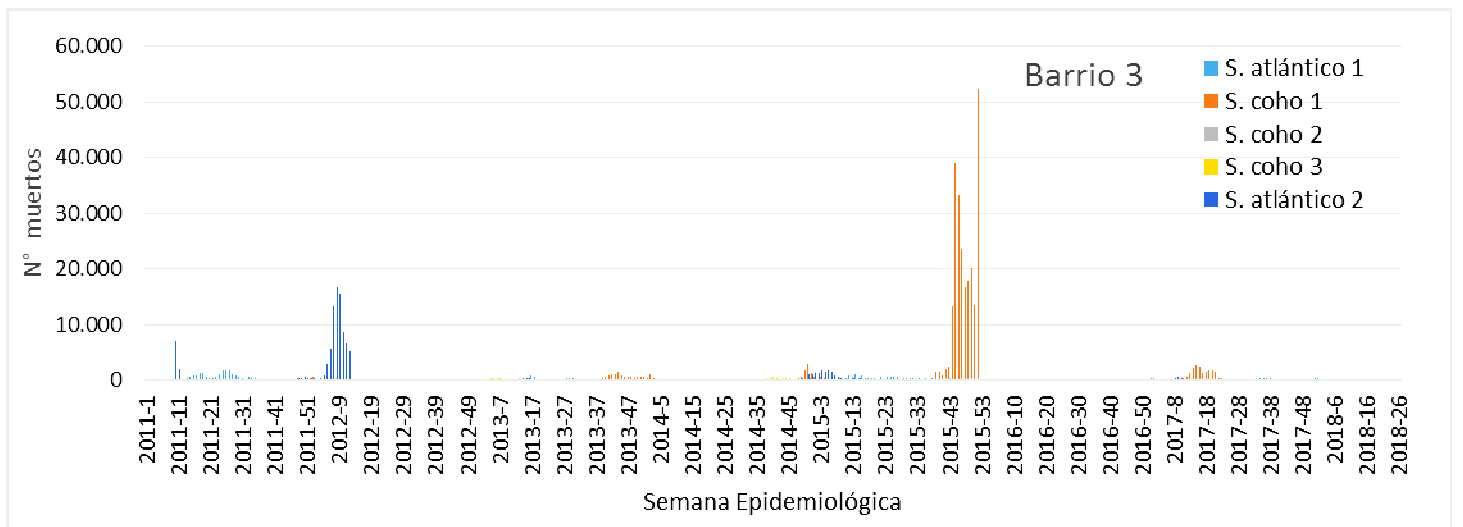
A continuación, se presentan los patrones de mortalidad por SRS según centro y barrio en cada región. Las gráficas muestran la evidencia de que no existe un patrón “regional” común de presentación de mortalidades por SRS, sino que cada barrio responde a sus propias características individuales.

REGIÓN DE LOS LAGOS

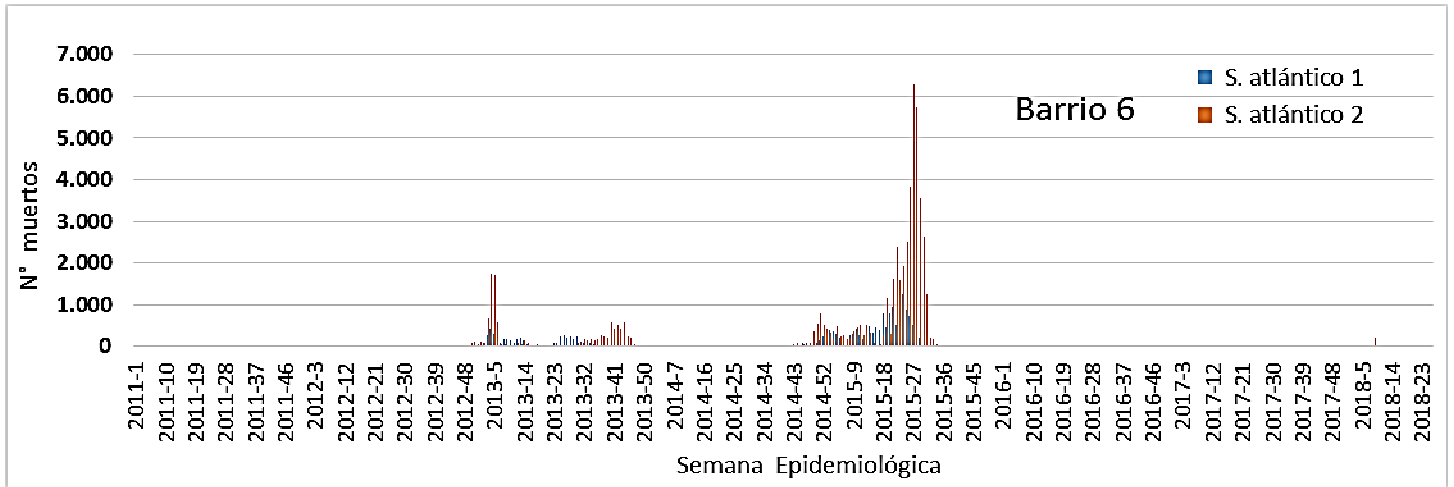
BARRIO 2



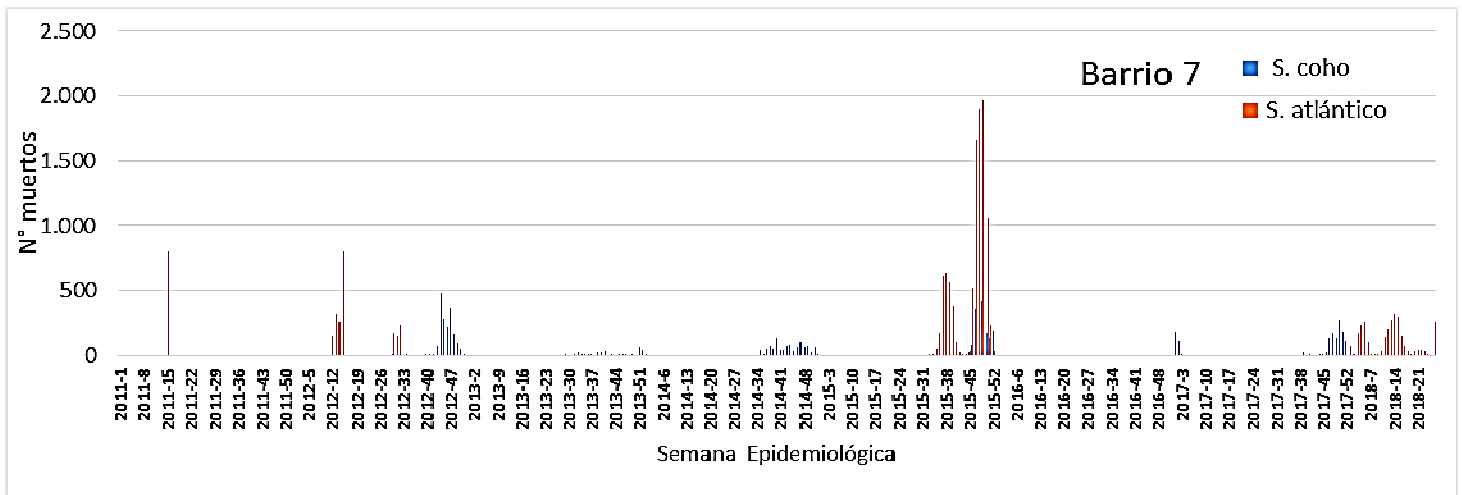
BARRIO 3



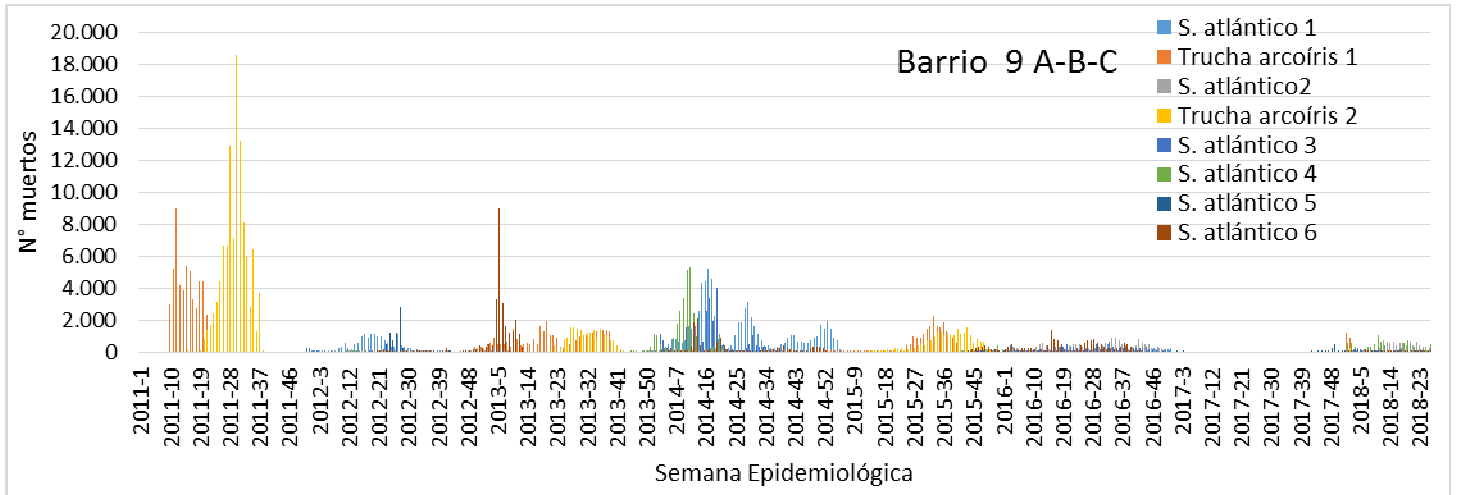
BARRIO 6



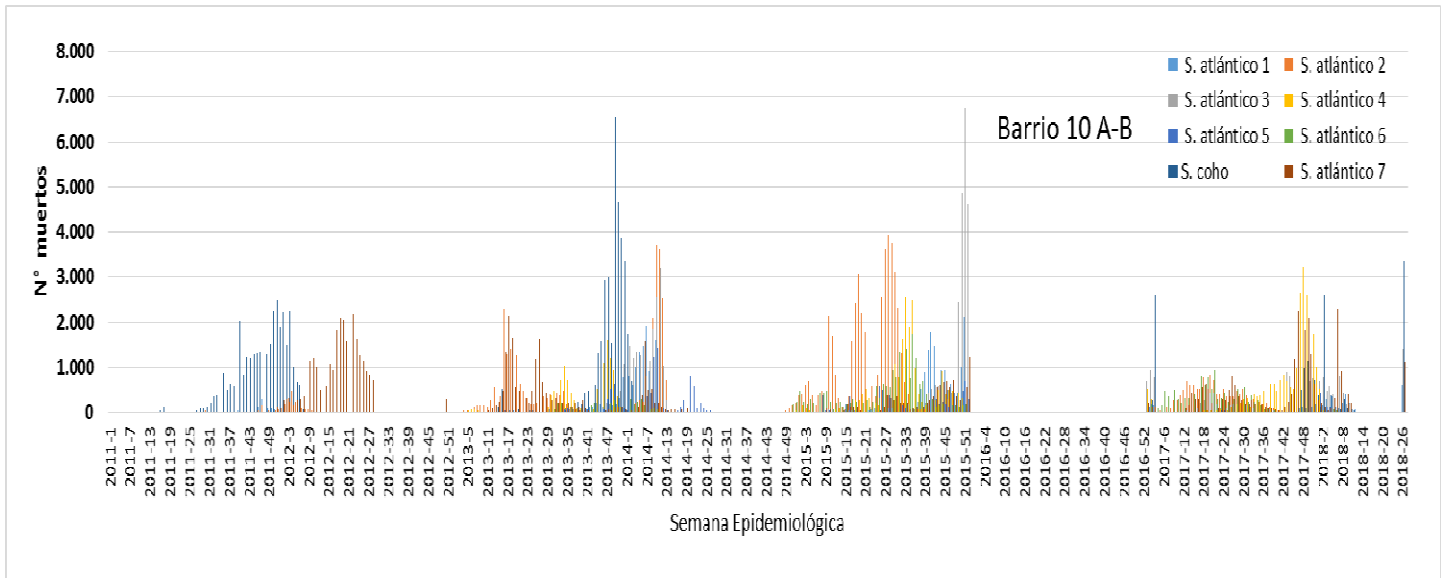
BARRIO 7



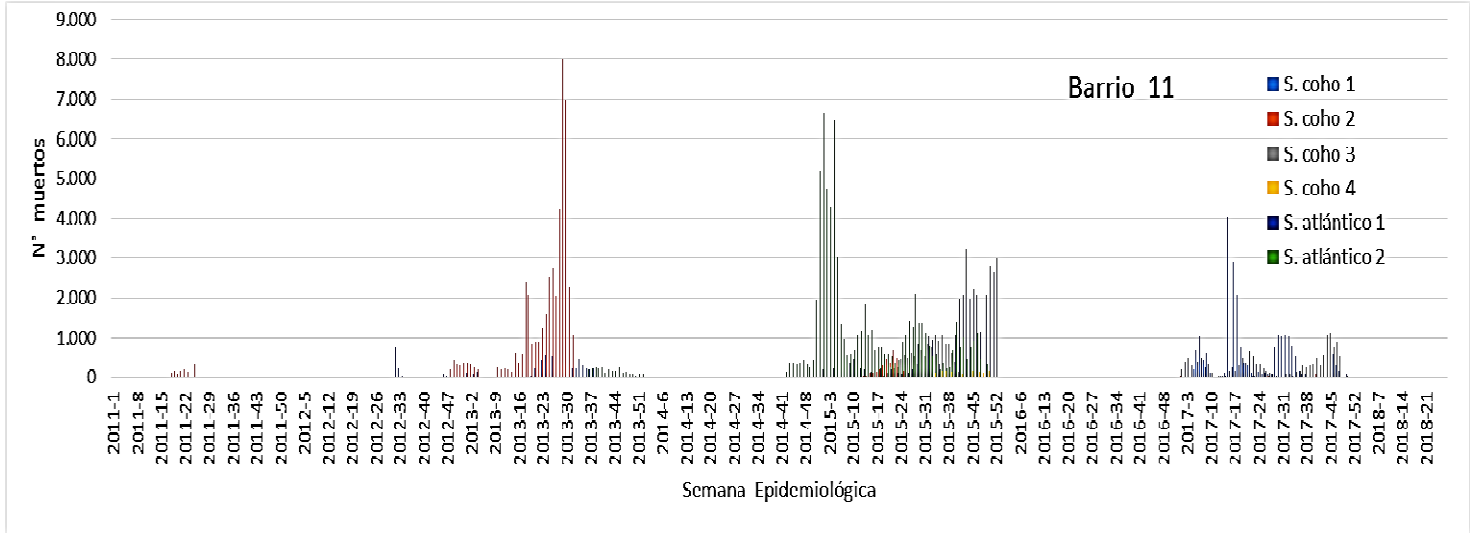
BARRIO 9



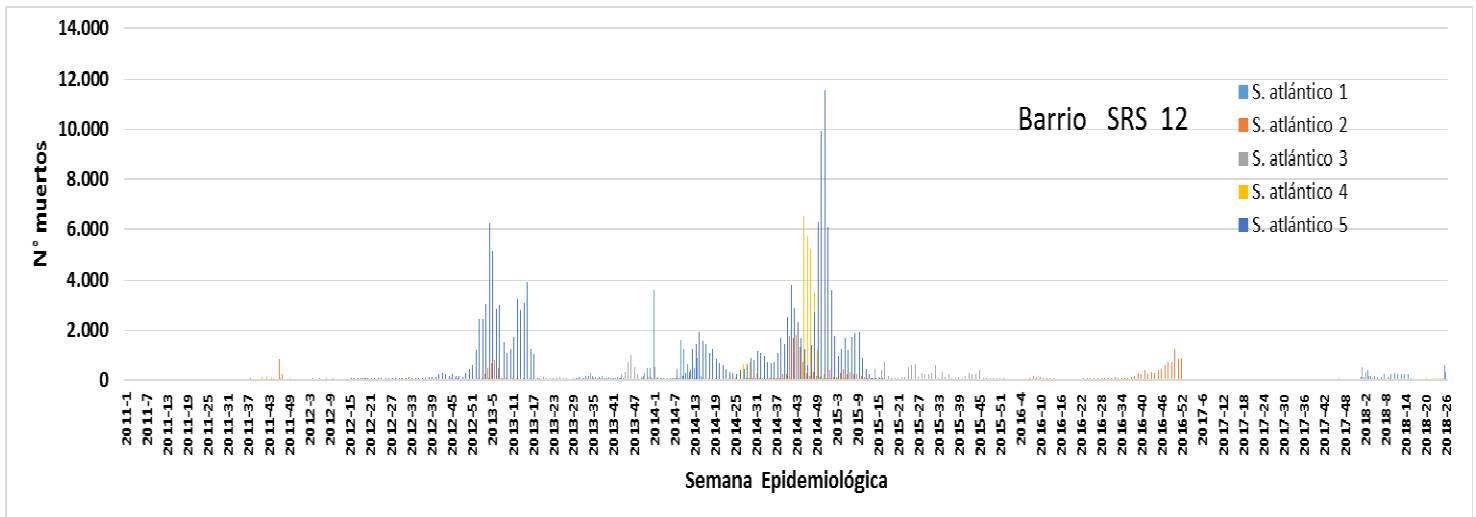
BARRIO 10



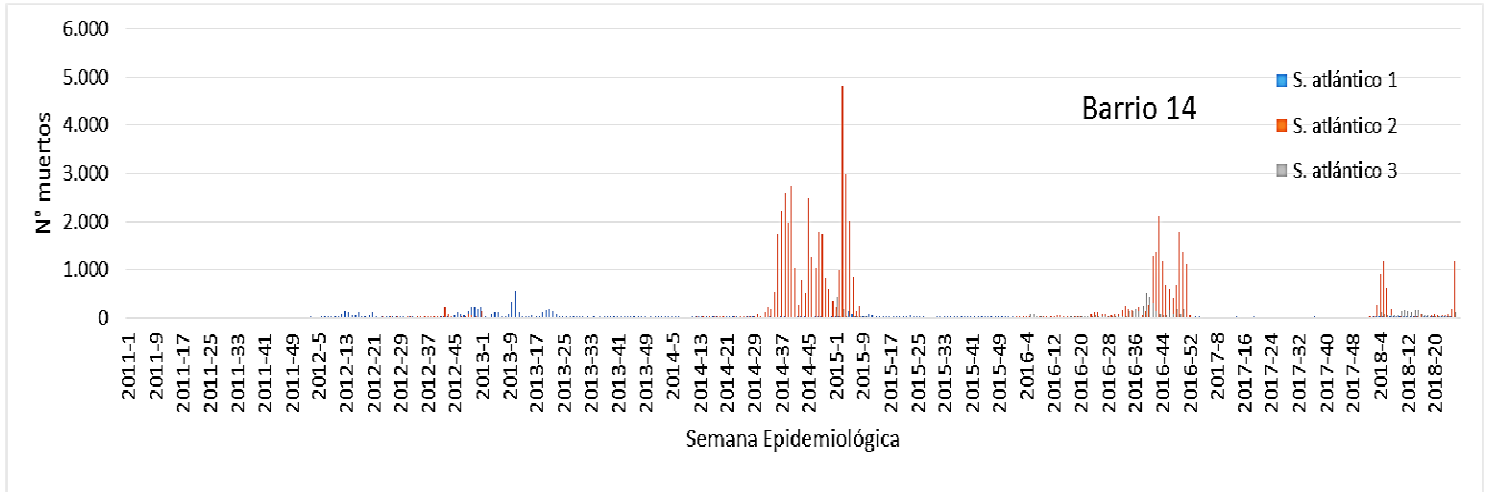
BARRIO 11



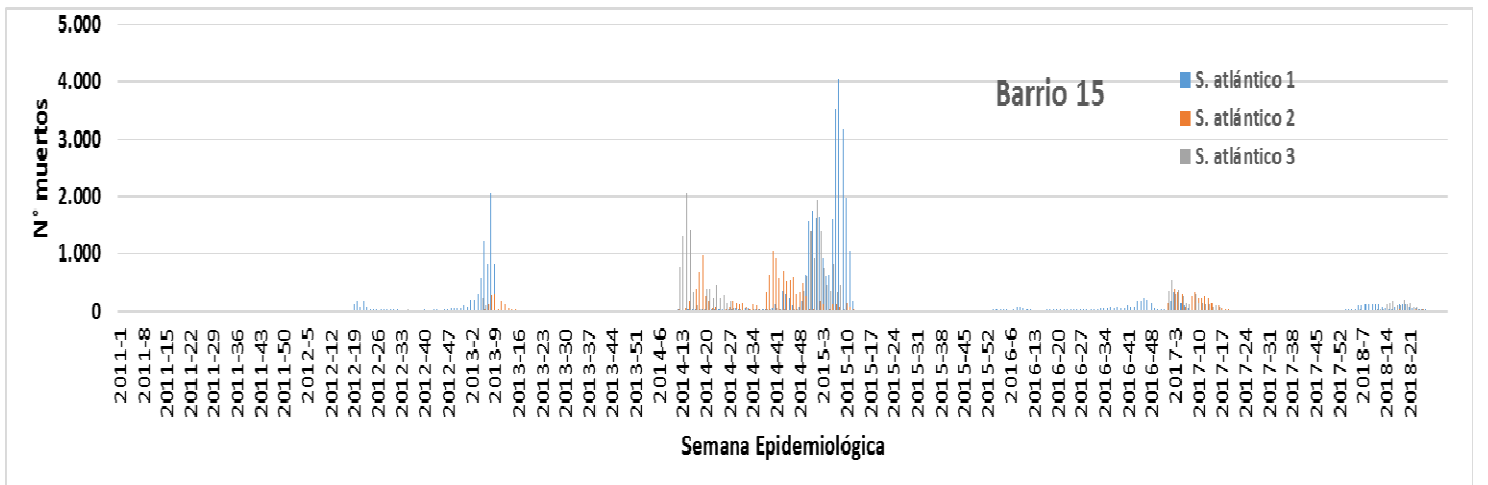
BARRIO 12



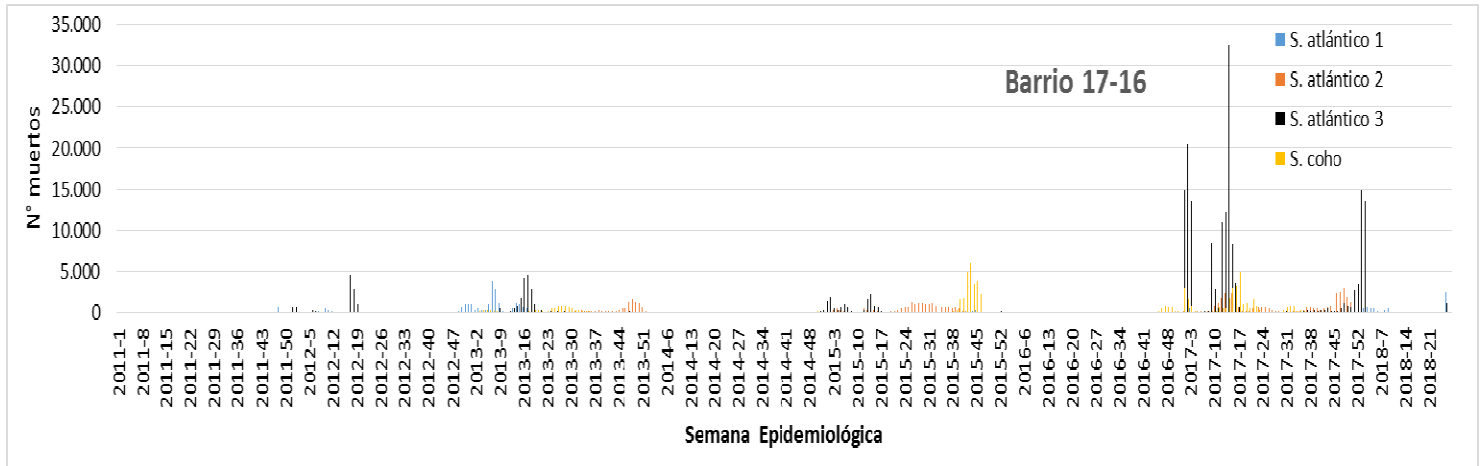
BARRIO 14



BARRIO 15



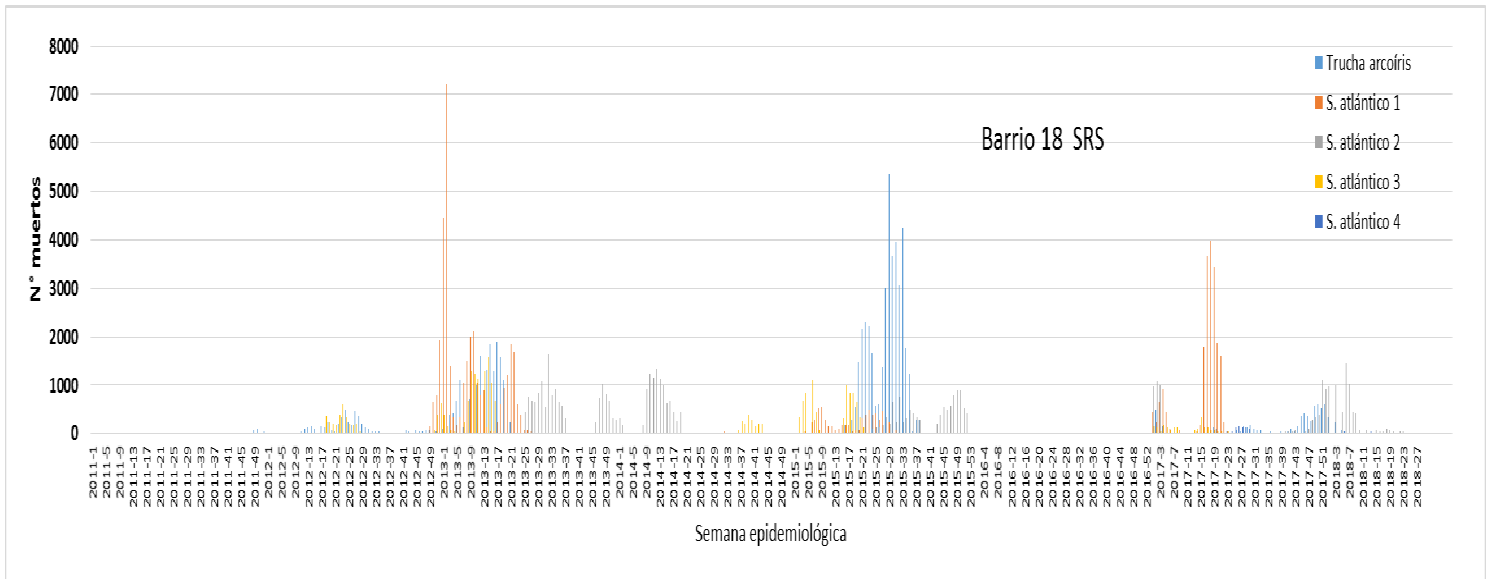
BARRIOS 16-17



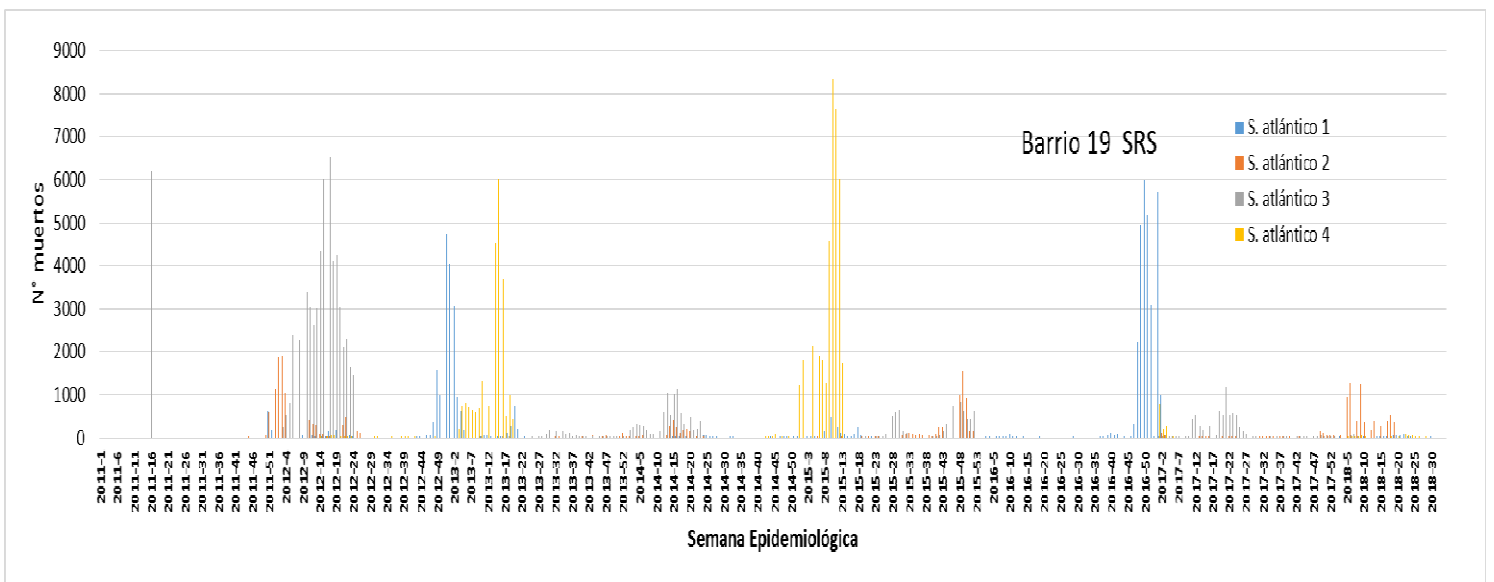
REGION DE AYSÉN

En la Región de Aysén ocurre algo semejante a lo que sucede en la Región de Los Lagos, donde no se presentan un patrón común de presentación de SRS en los diferentes barrios, sino que la dinámica obedece a características exclusivas de su compartimentalización y los centros de cultivo que la componen.

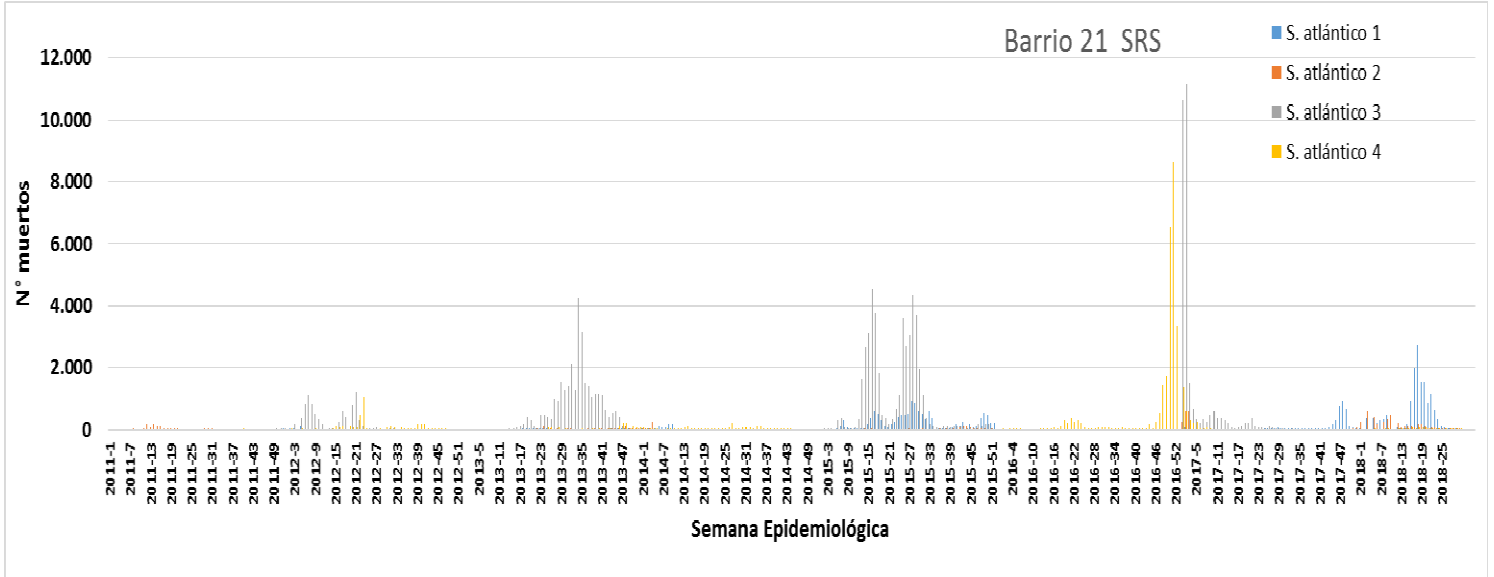
BARRIO 18



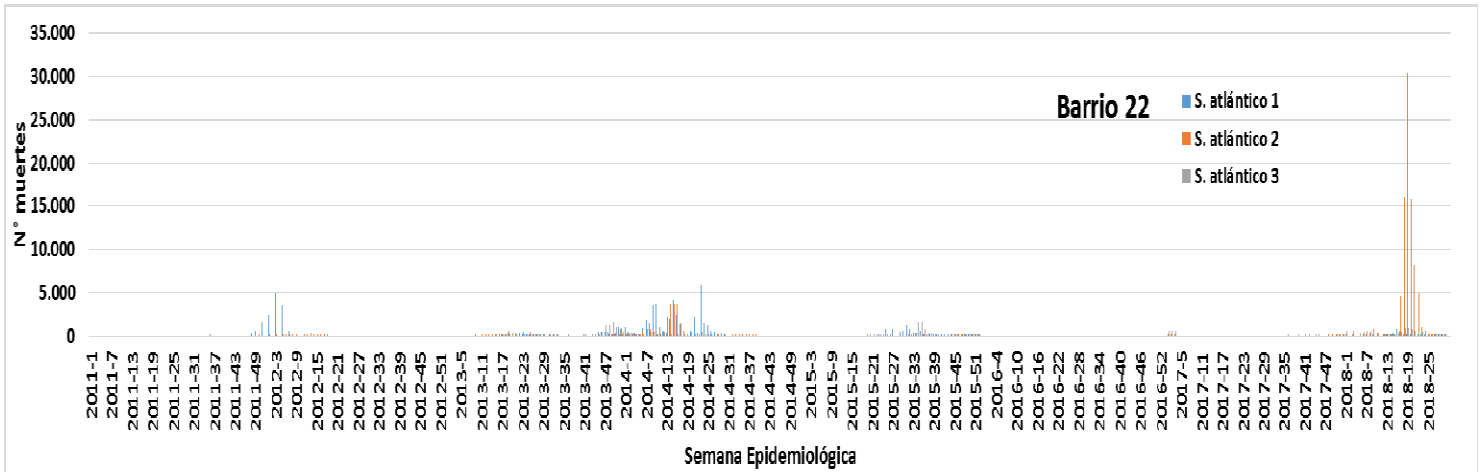
BARRIO 19



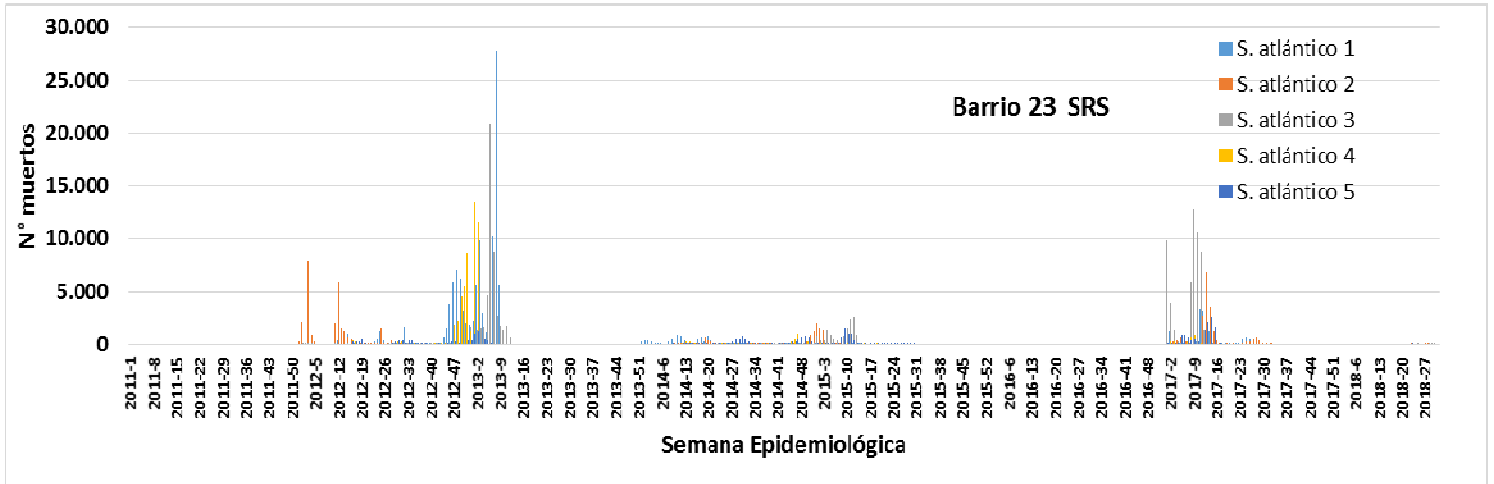
BARRIO 21



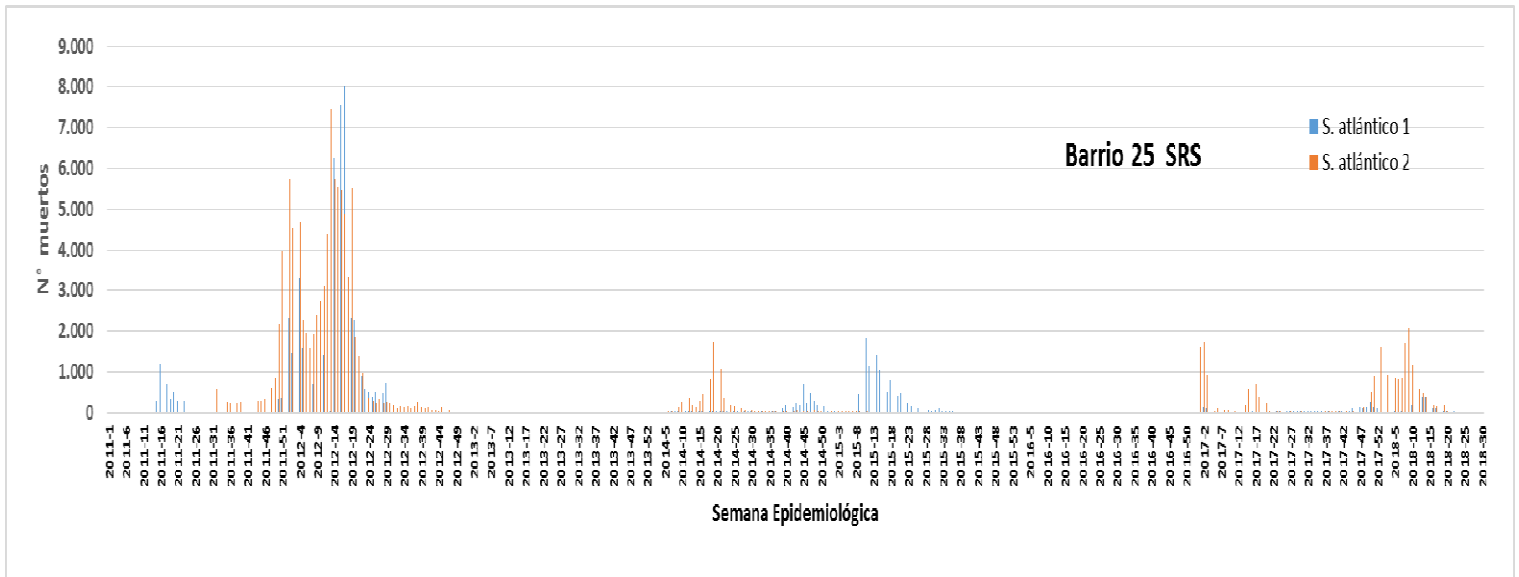
BARRIO 22



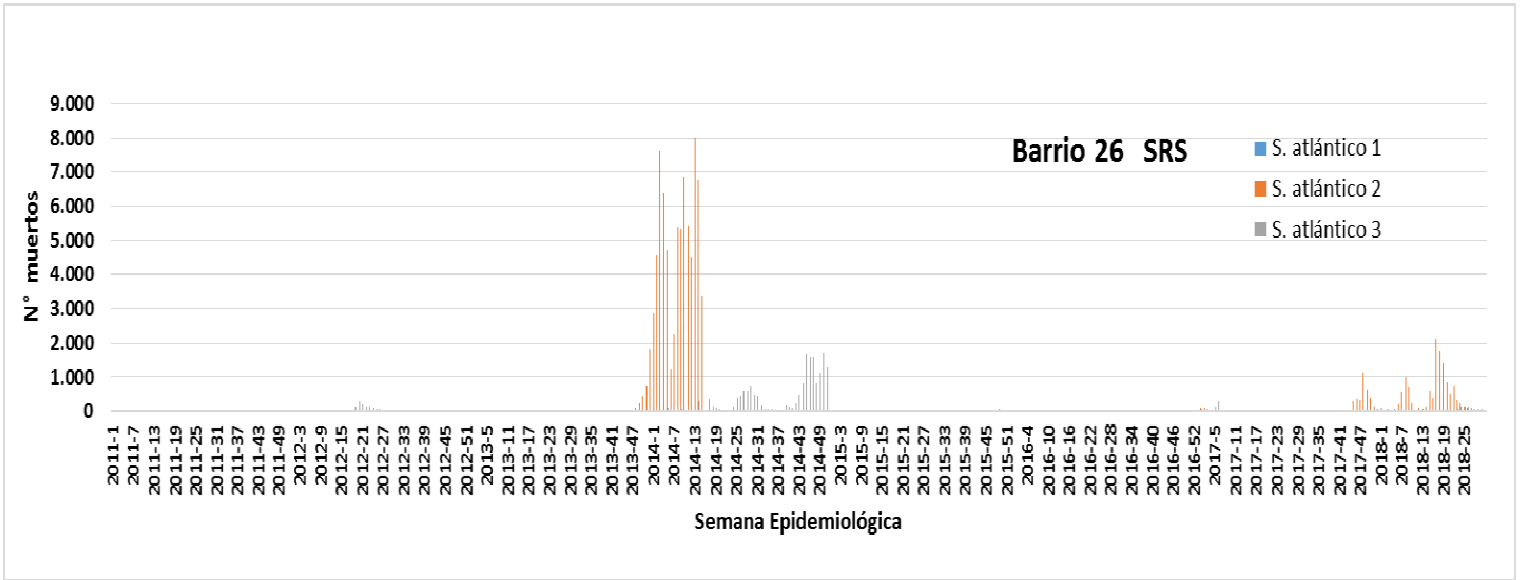
BARRIO 23



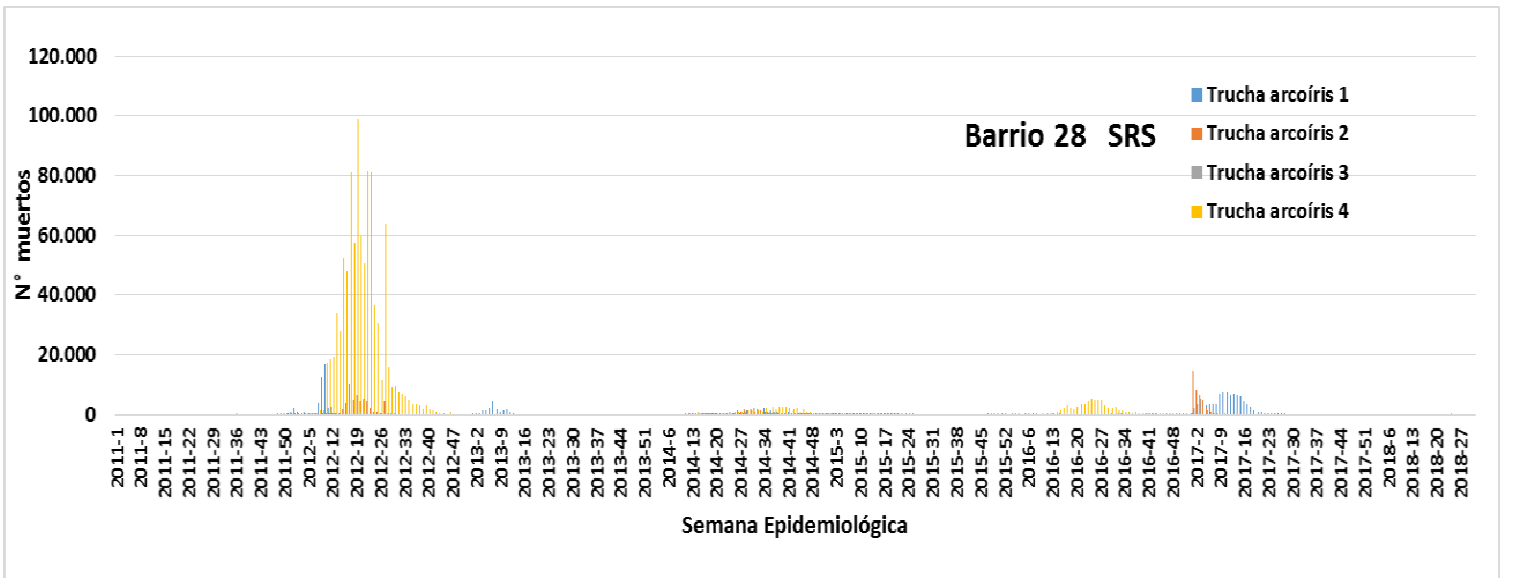
BARRIO 25



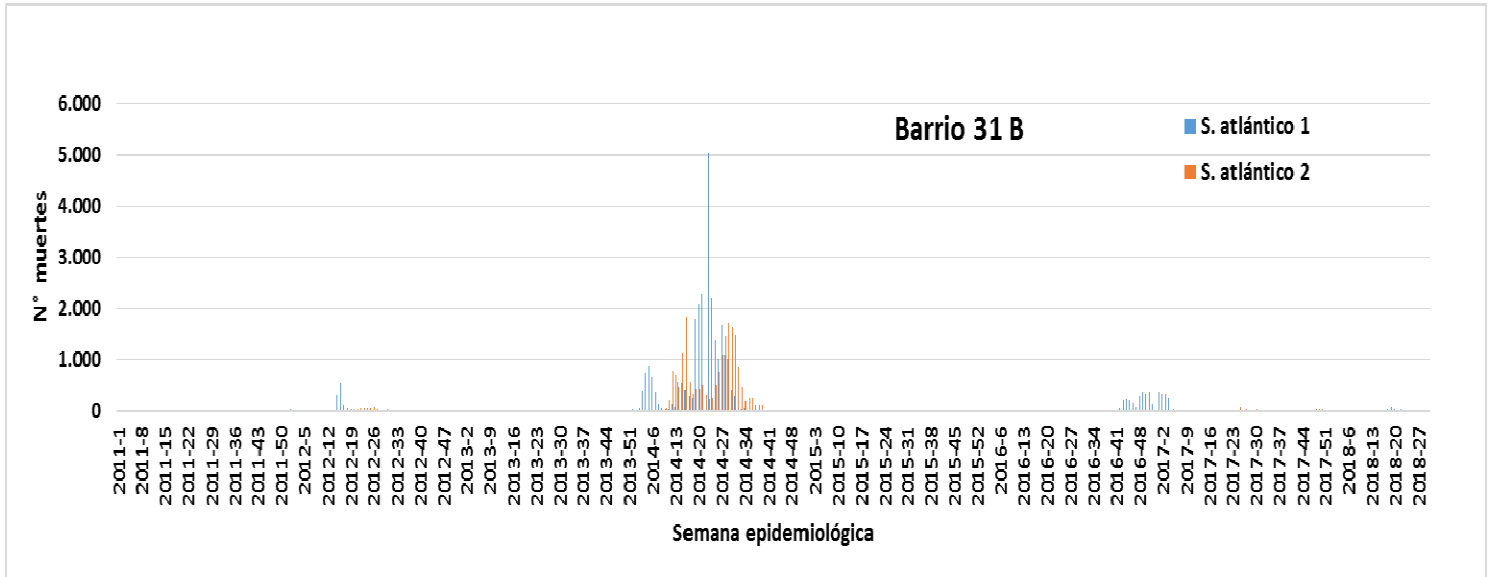
BARRIO 26



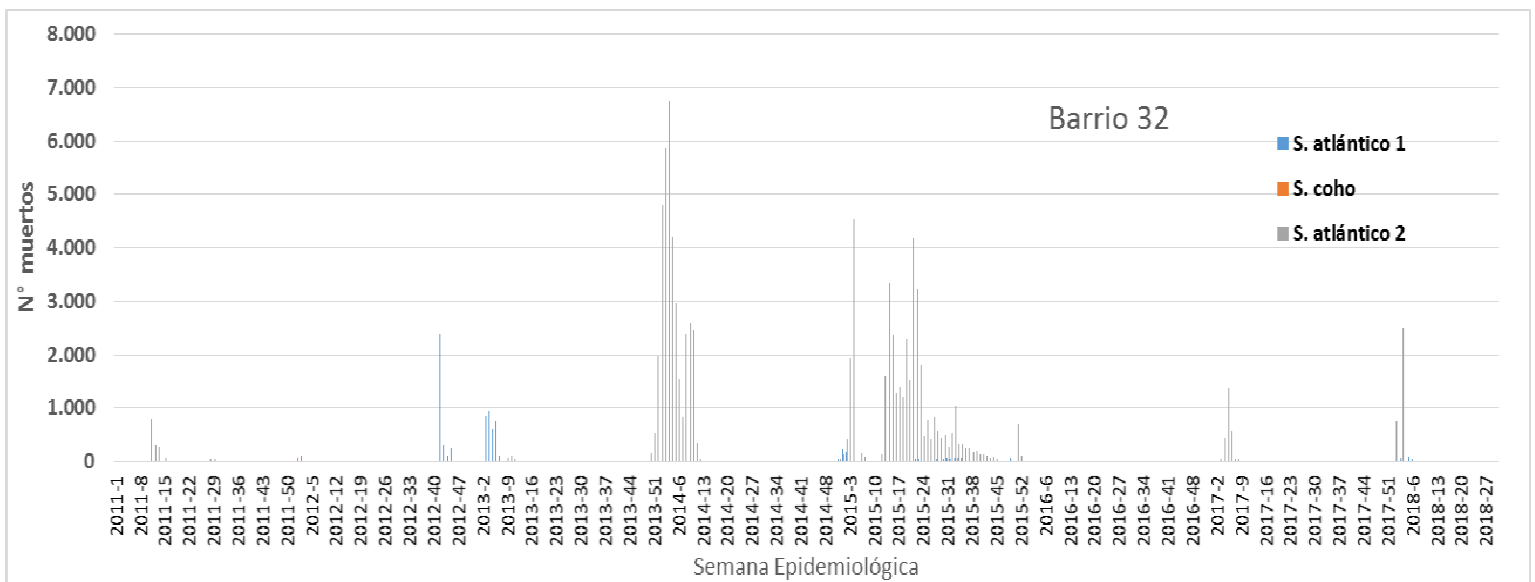
BARRIO 28



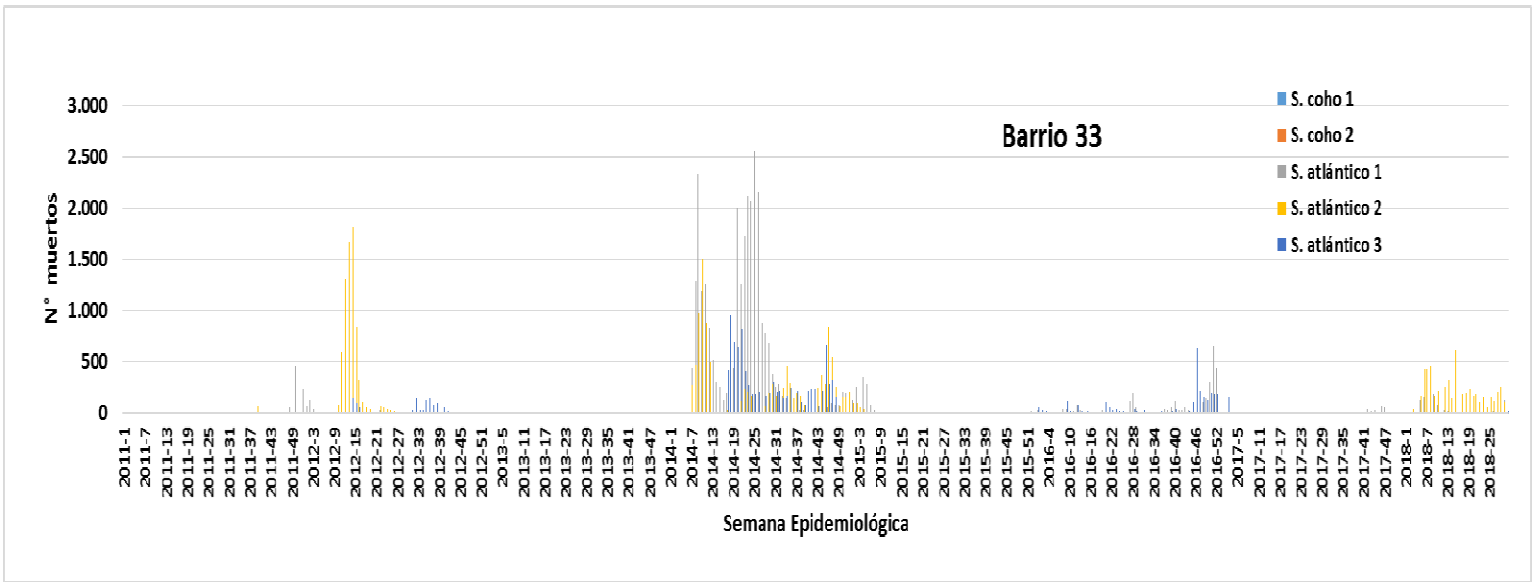
BARRIO 31



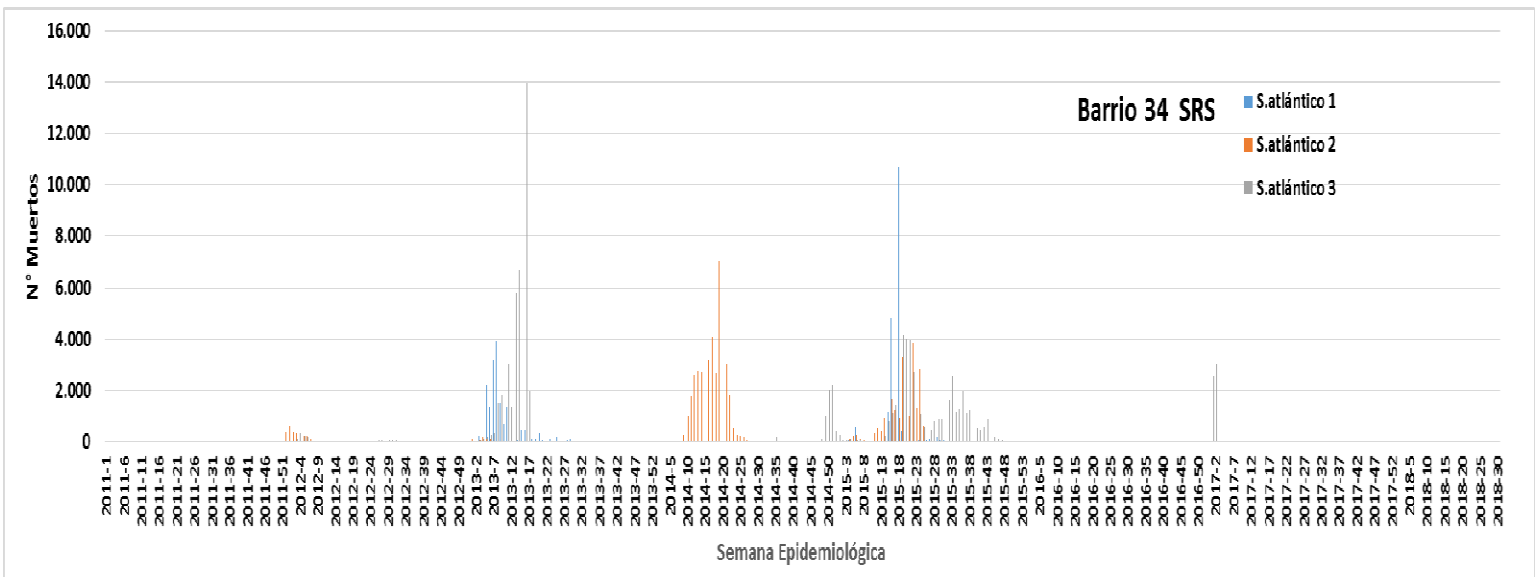
BARRIO 32



BARRIO 33

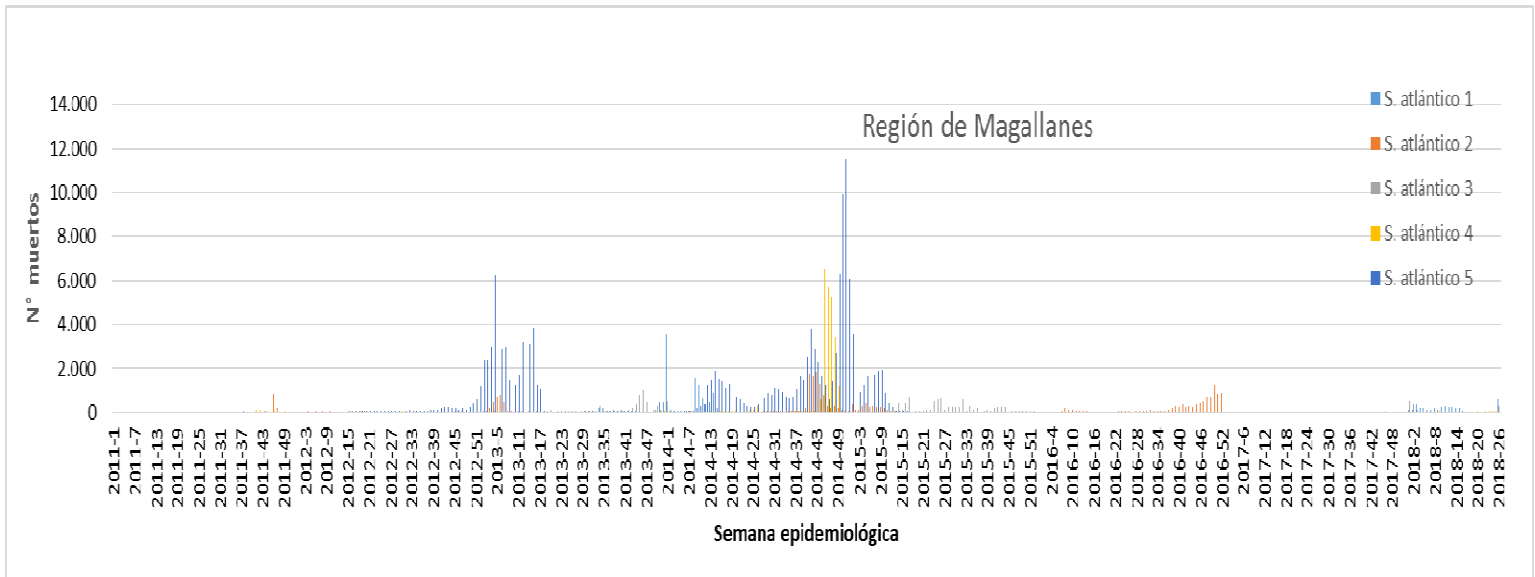


BARRIO 34



REGIÓN DE MAGALLANES

La región de Magallanes al estar compuesta por un menor número de barrios y centros de cultivo se resumió como una gráfica única. No obstante, el patrón de presentación debiese operar de manera análoga a las otras regiones, por lo que el criterio de implementación de herramientas de gestión considerando la individualidad de sus barrios también debiese ser considerada.



ANEXO 4

PATRONES DE MORTALIDADES POR SRS EN BARRIOS Y CENTROS DE LA REGIÓN DE LOS LAGOS

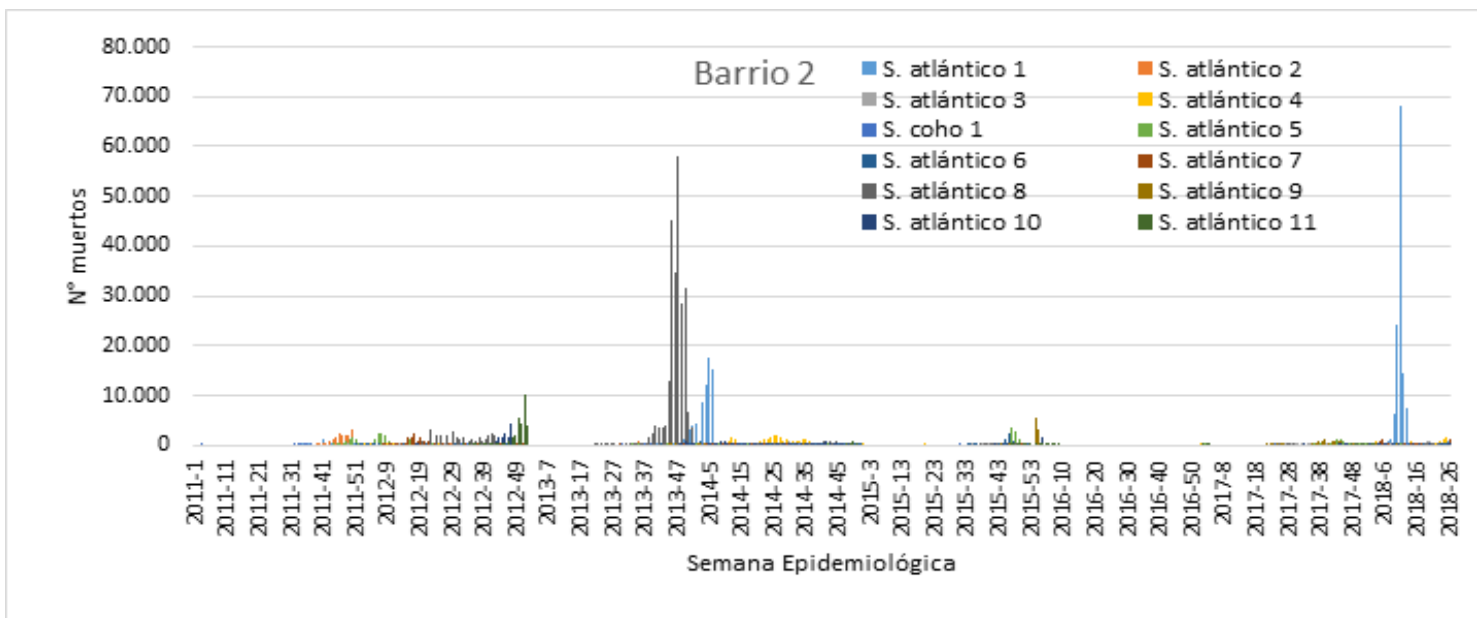
Ejemplo de definición de límites en un gráfico de control de procesos, considerando límites teóricos definidos por un centro de tamaño 955.416 peces y con jaulas de aprox. 63.000 peces en promedio, con una mortalidad semanal de 3.343 ejemplares corresponderían al 0,35%. En caso de tener el 50 de las jaulas (7 de 15) con el 0,35% de mortalidad, el número límite de peces 1.560.

Curva de alta mortalidad brote epidémico 

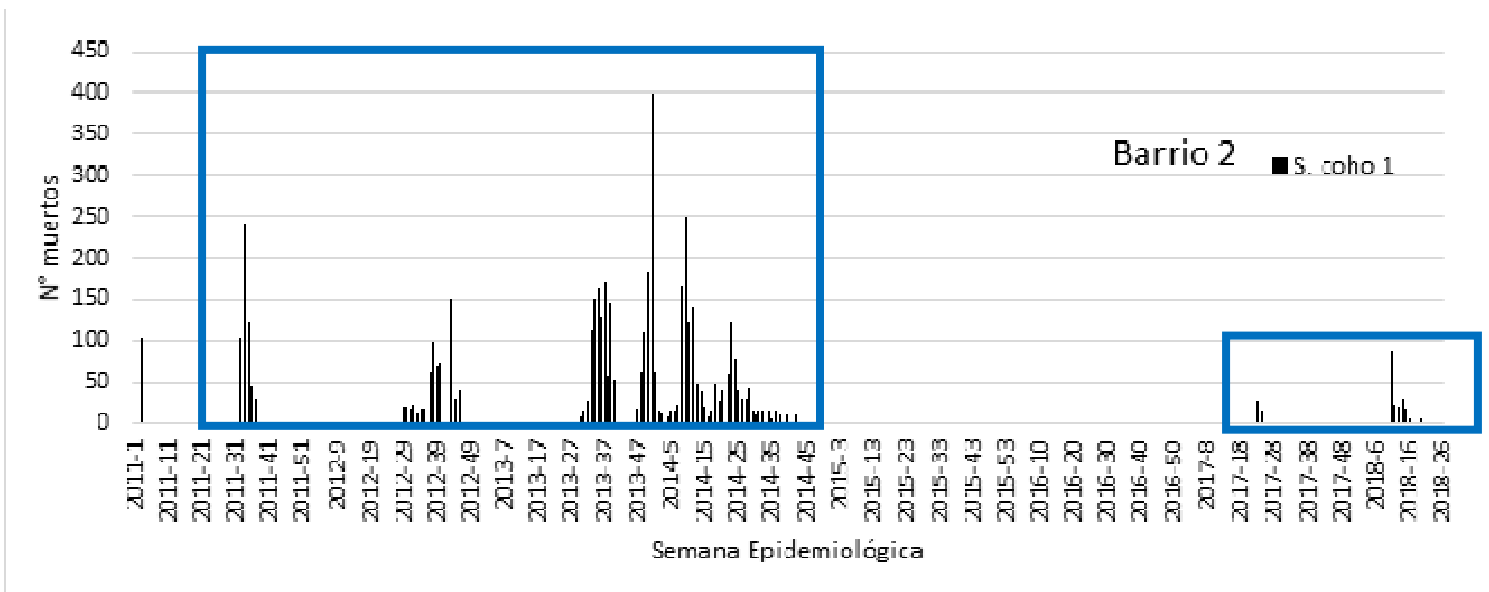
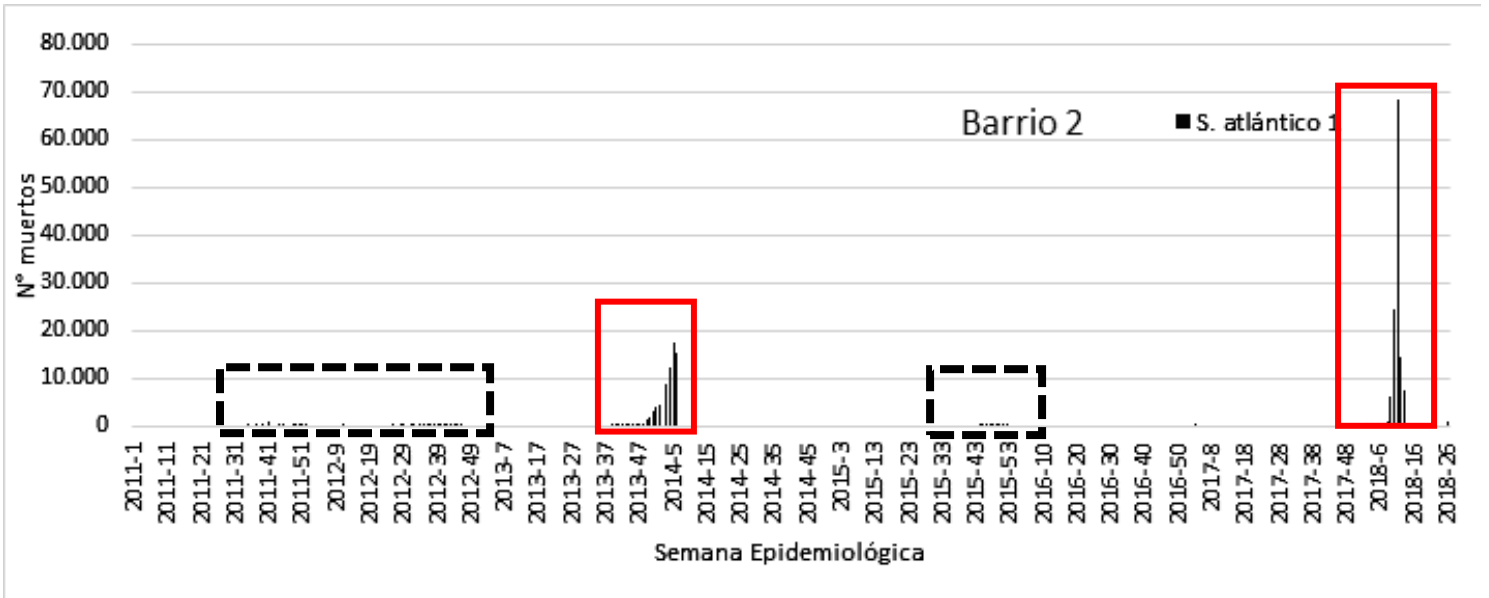
Curva con baja mortalidad con forma de brote 

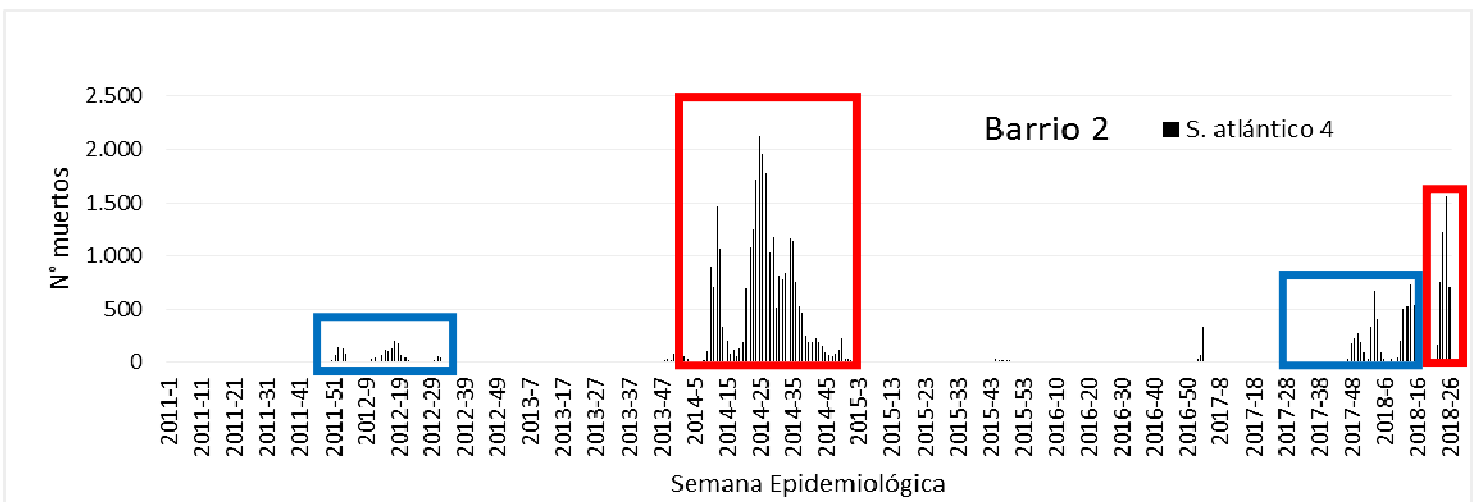
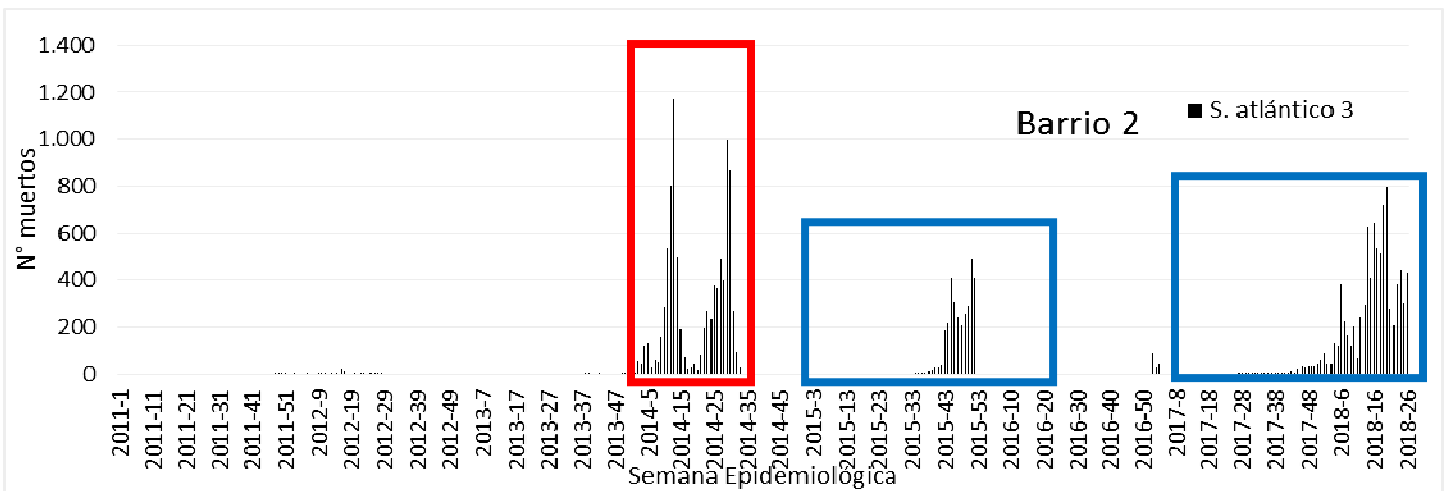
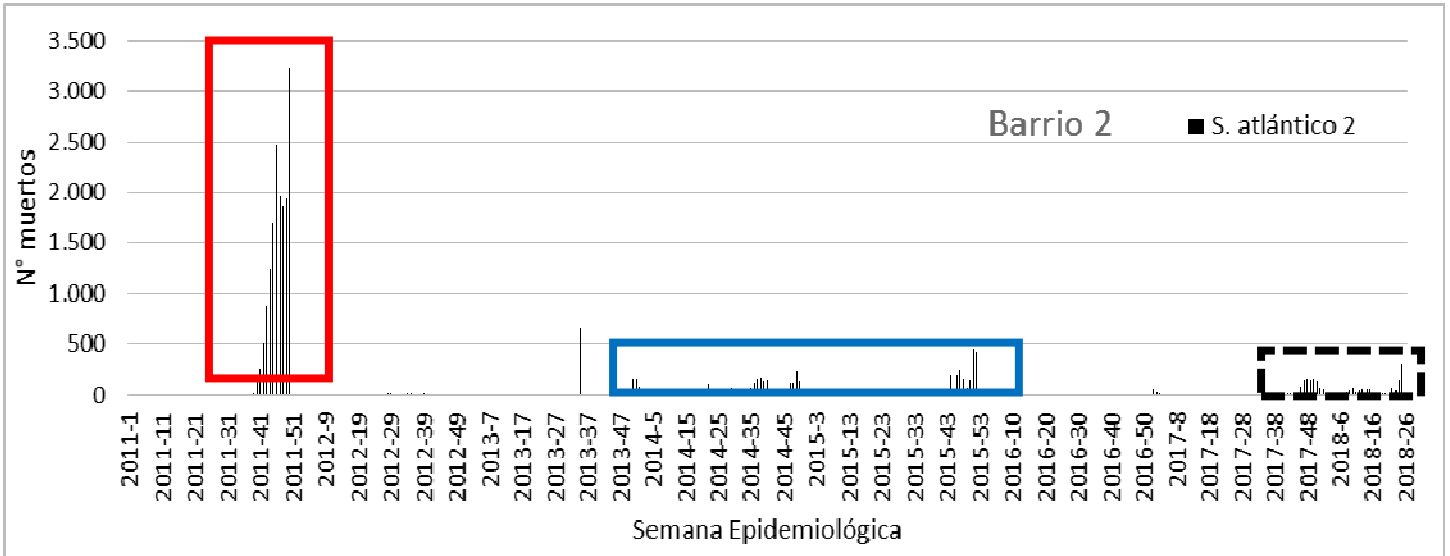
Curva con mortalidades persistentes 

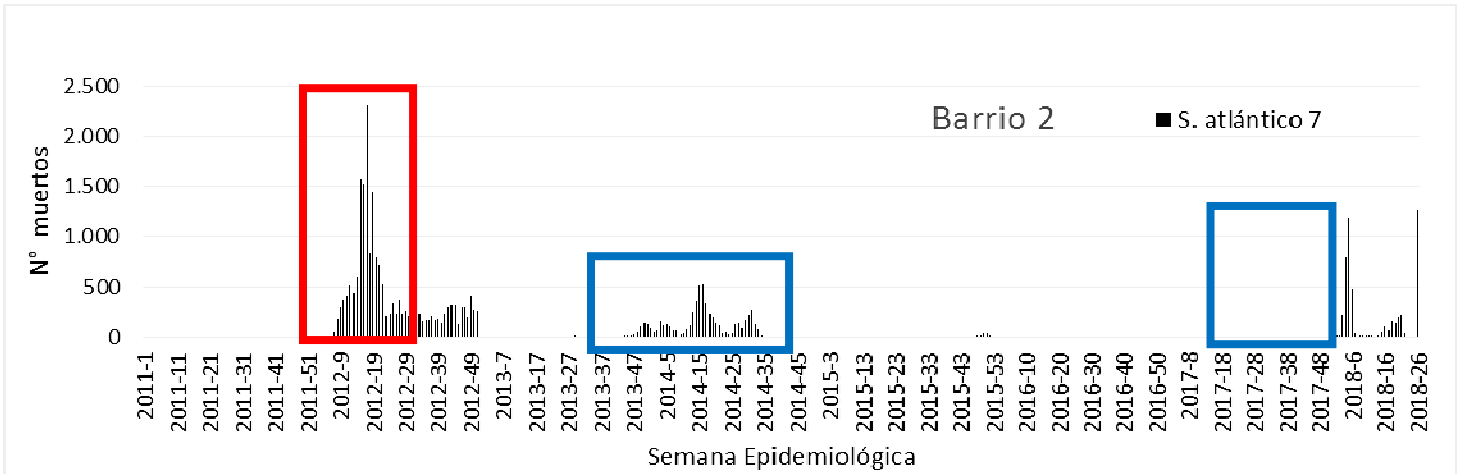
BARRIO 2:



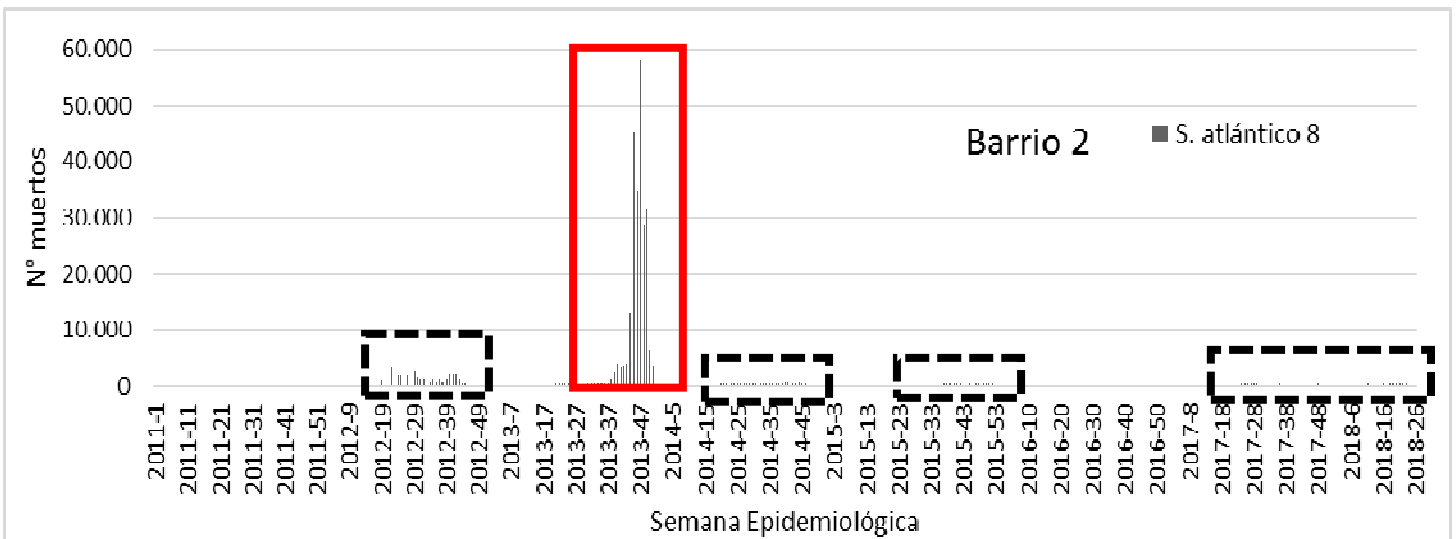
Curvas de mortalidad por centros del barrio 2

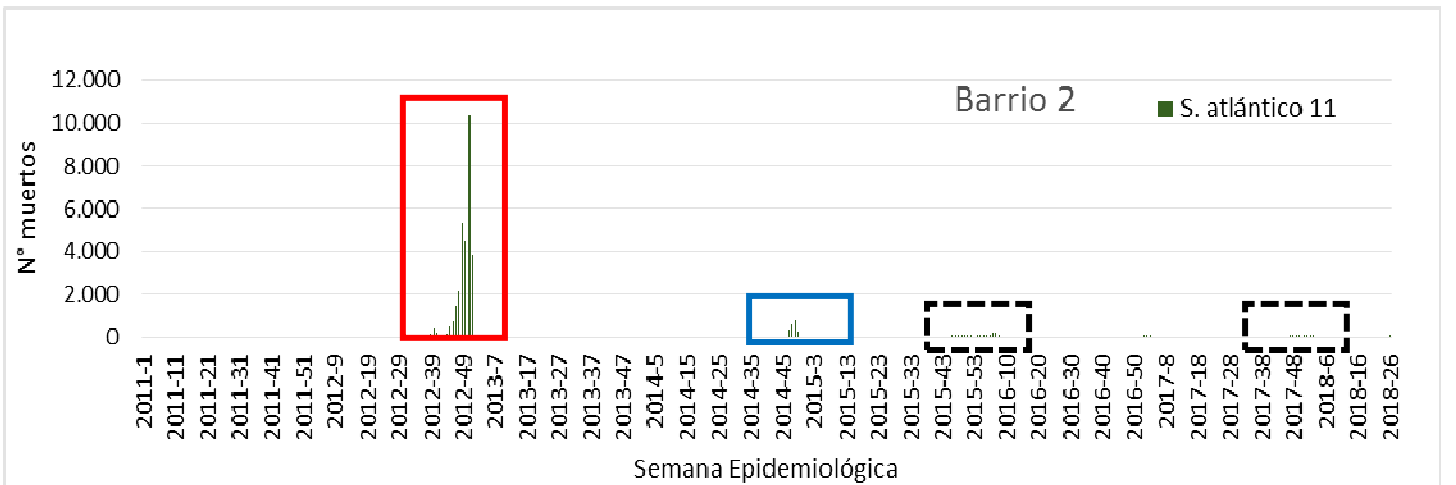
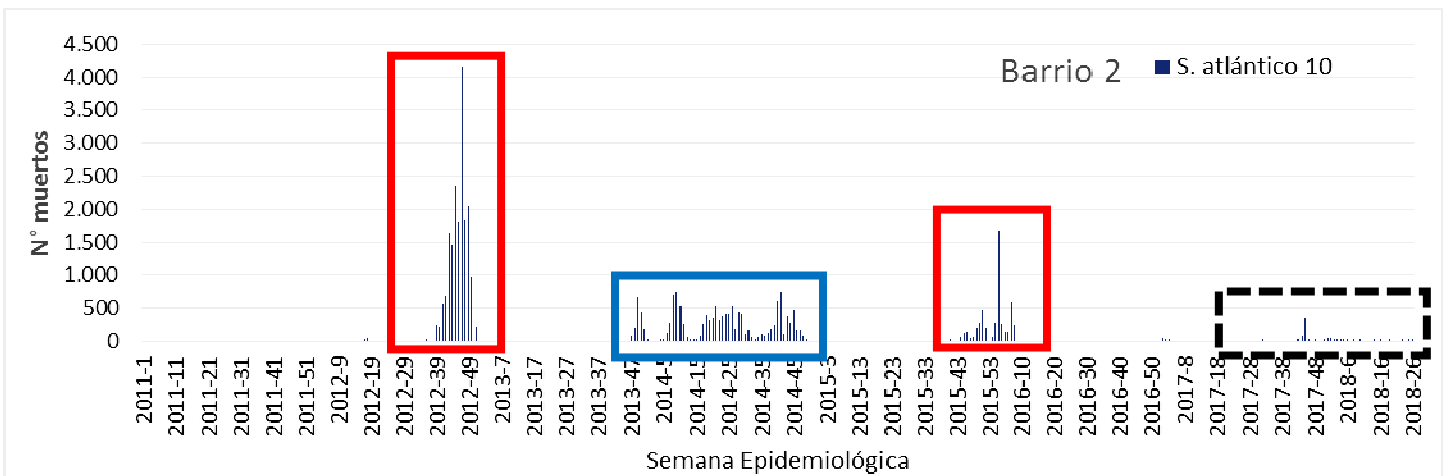
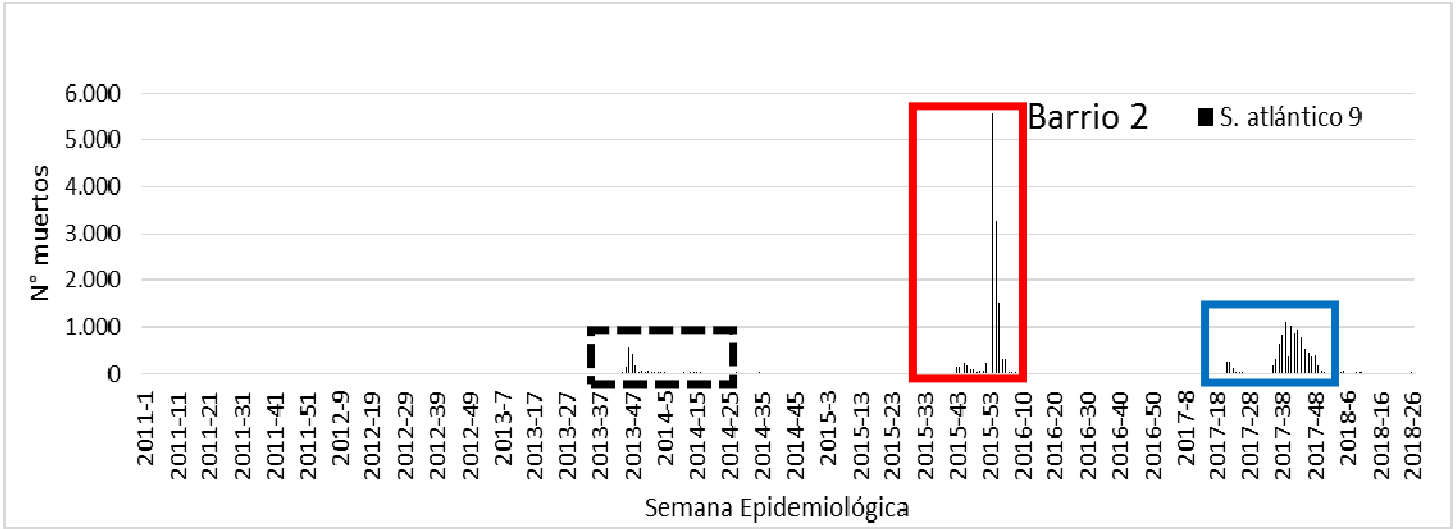




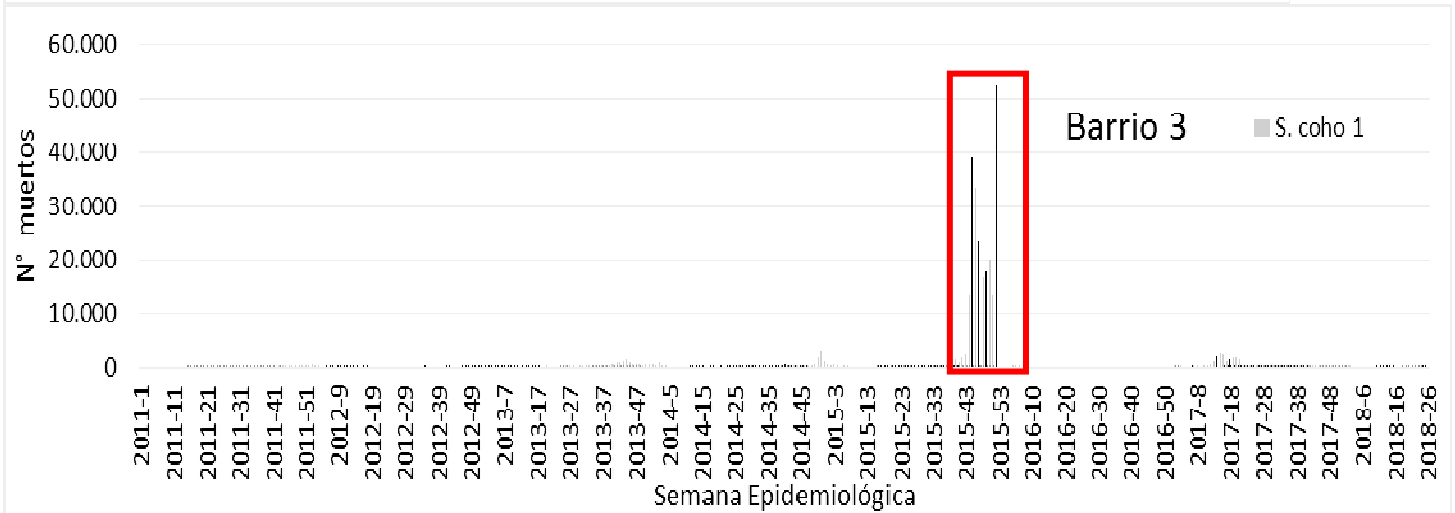
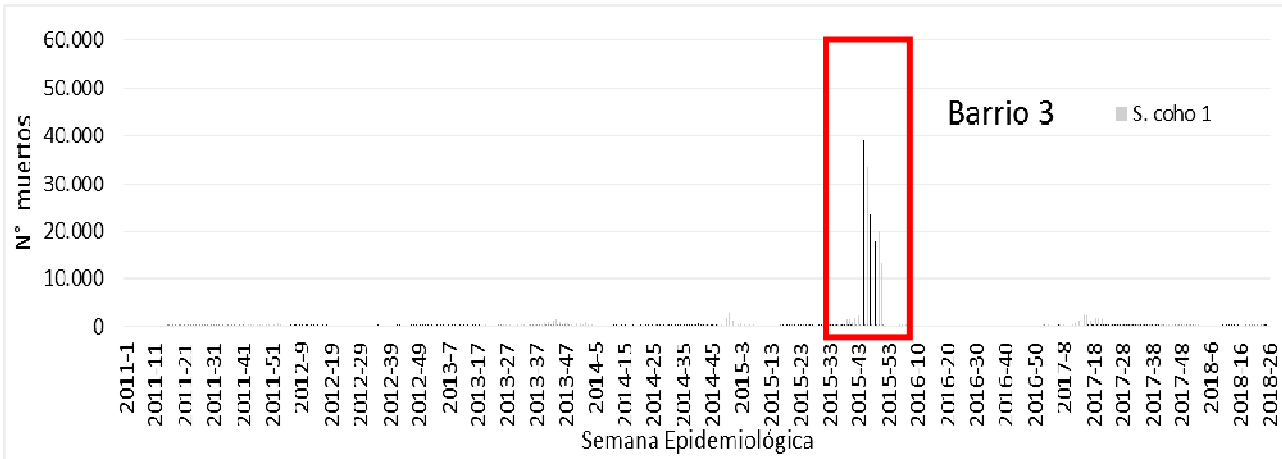
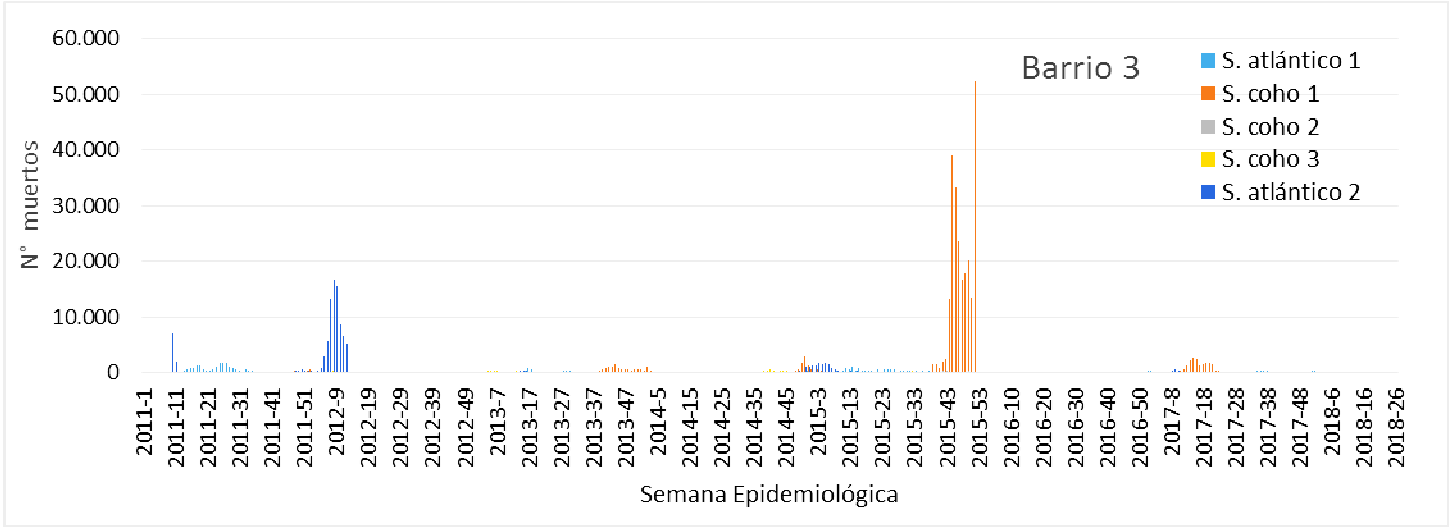


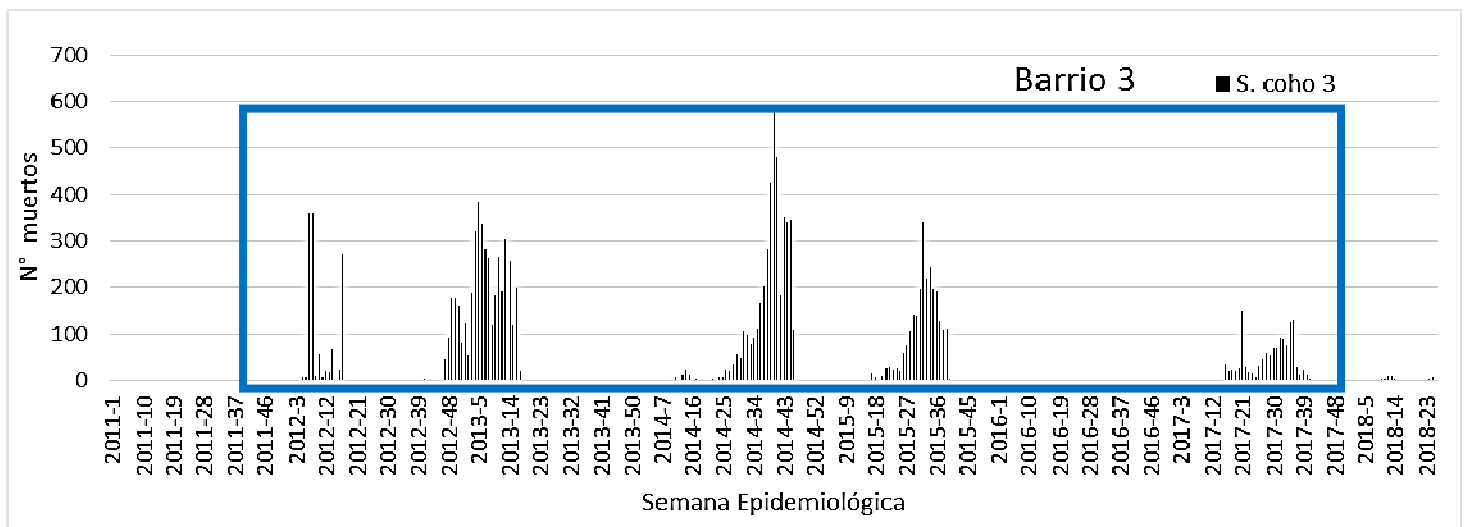
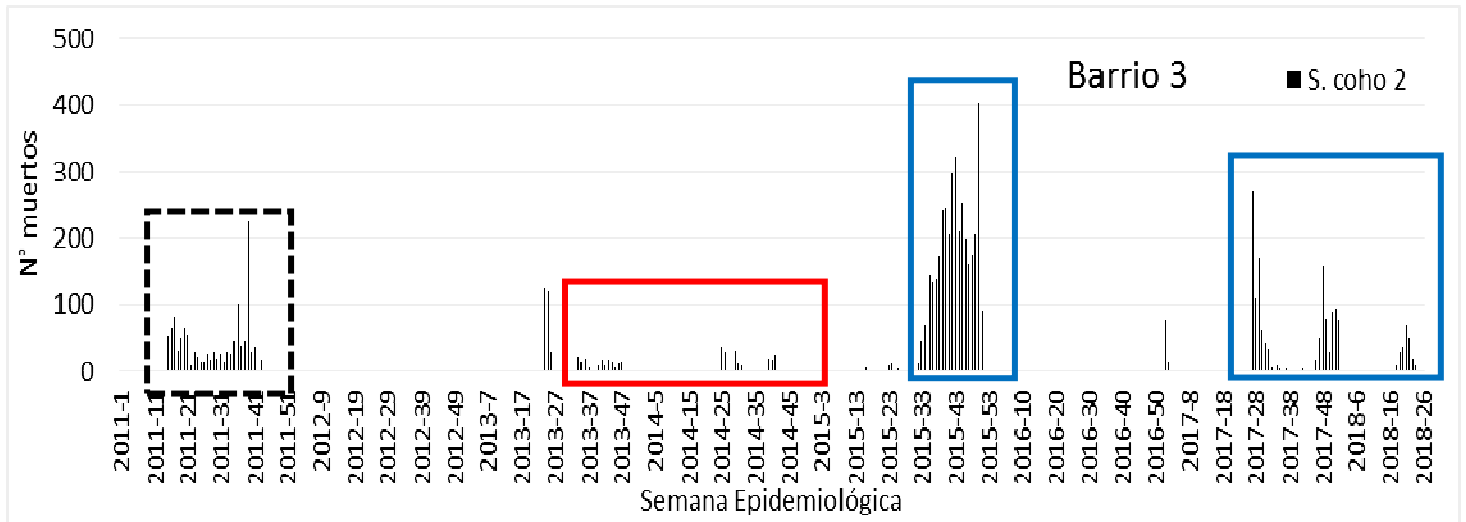
Curva de alta mortalidad brote epidémico

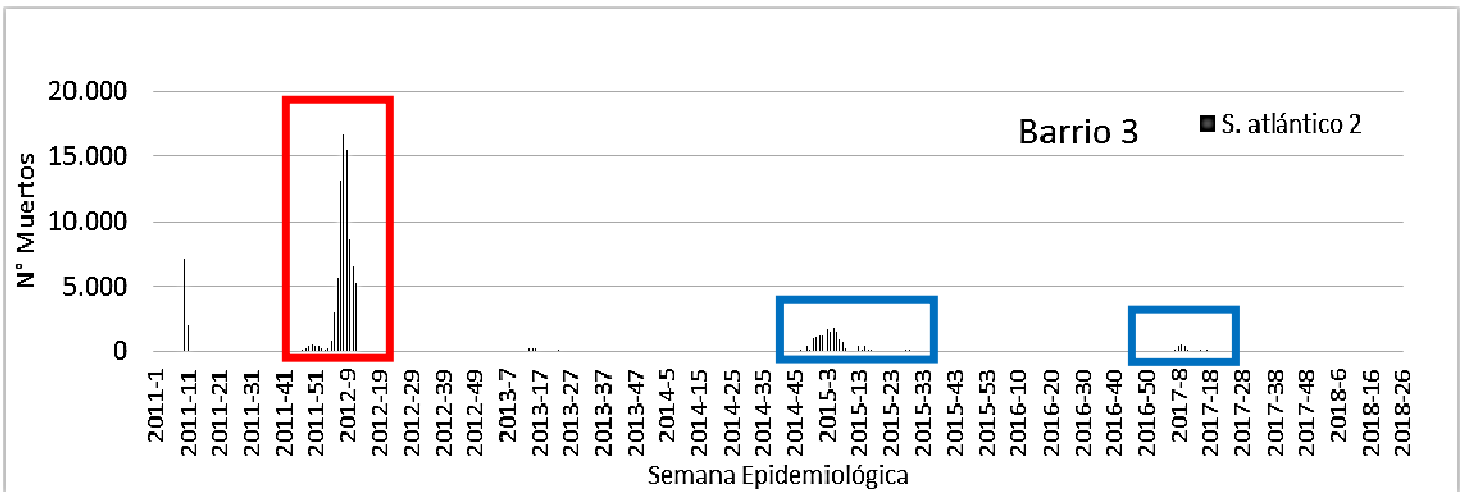
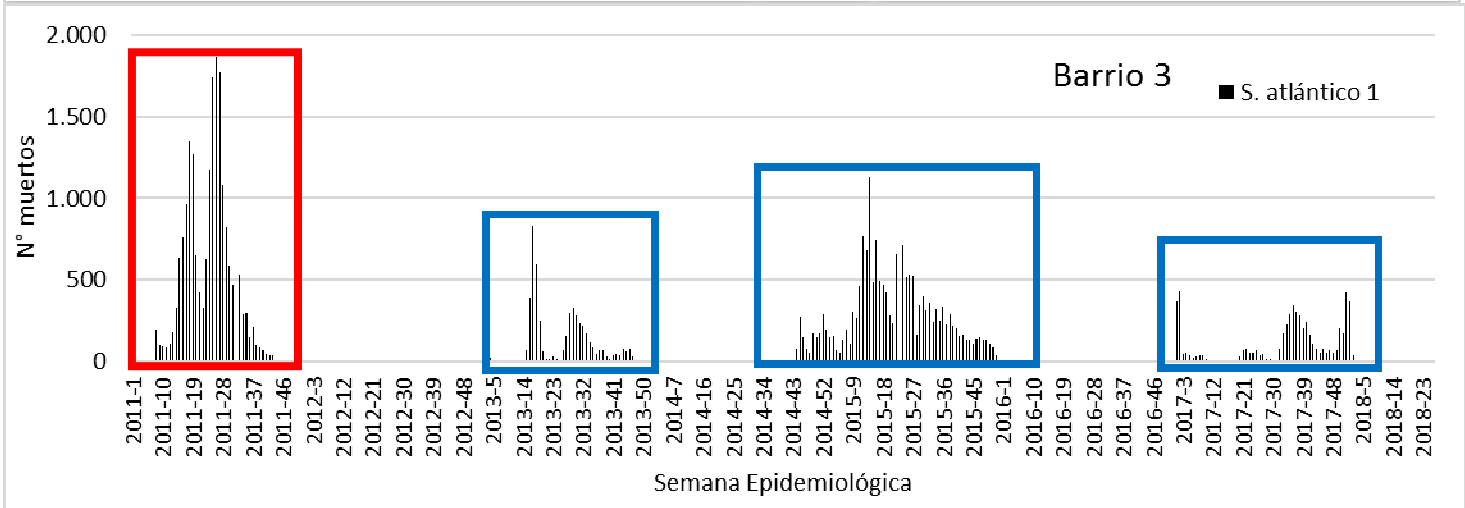
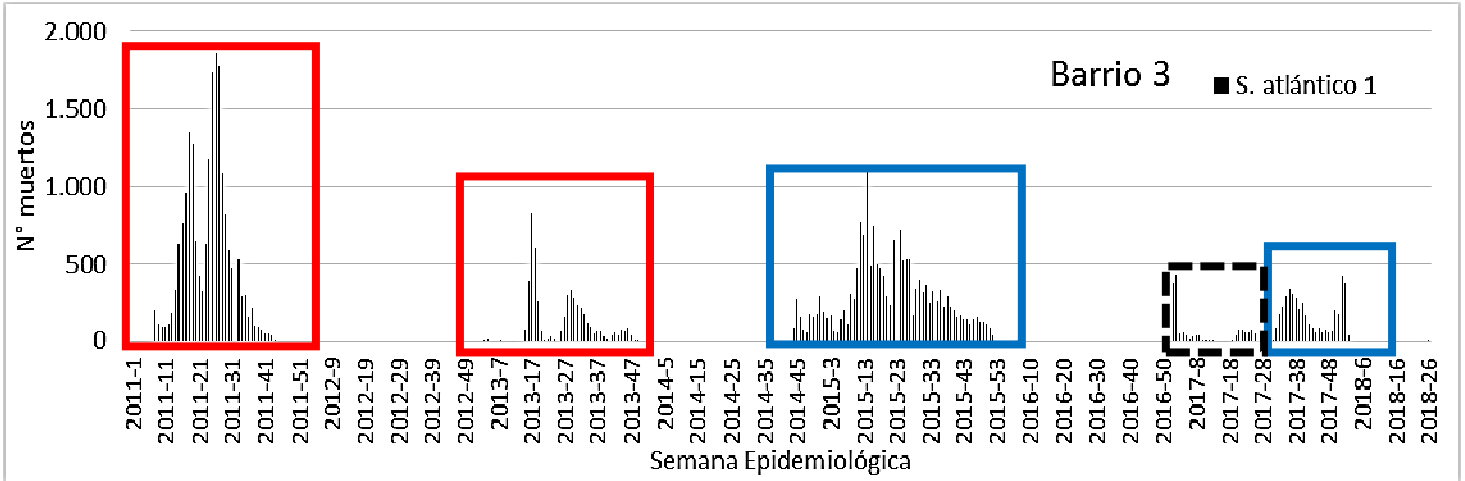




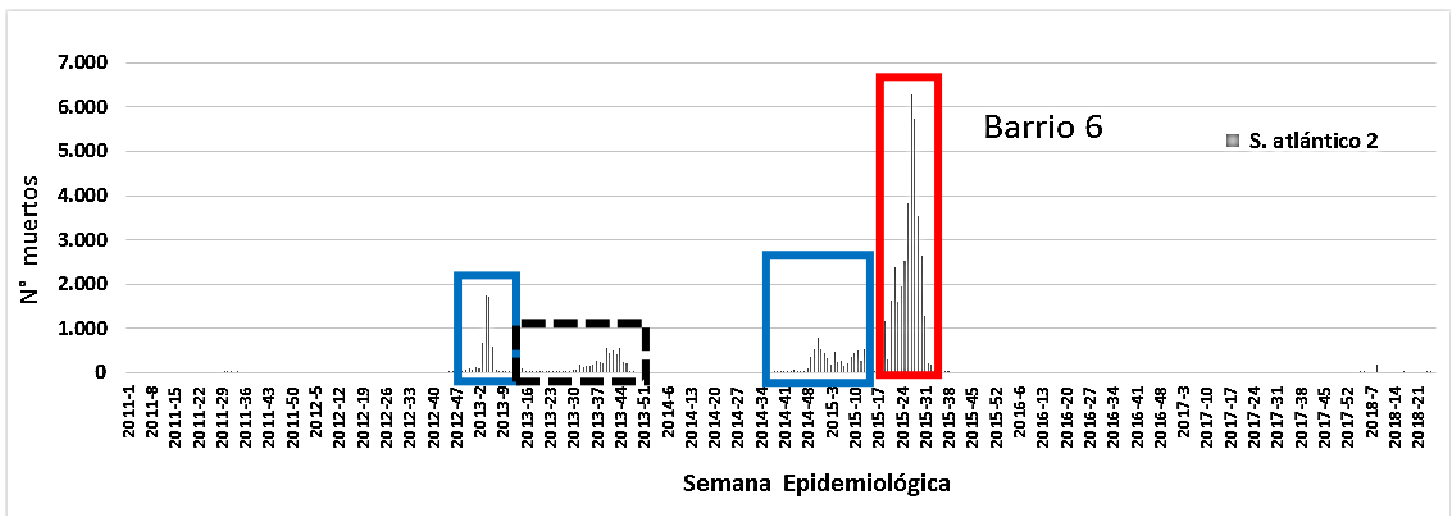
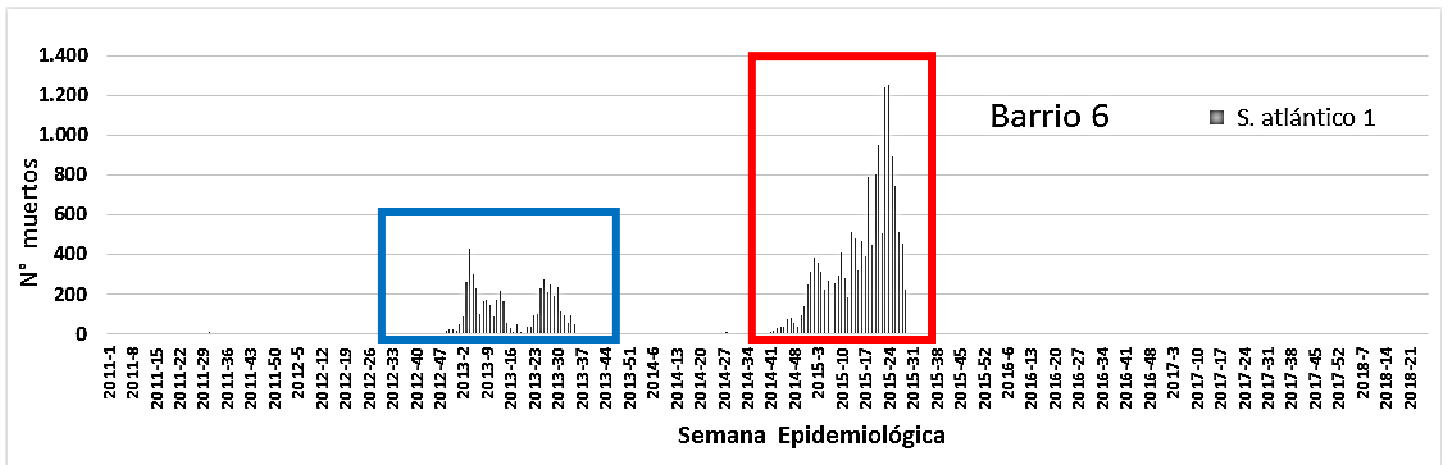
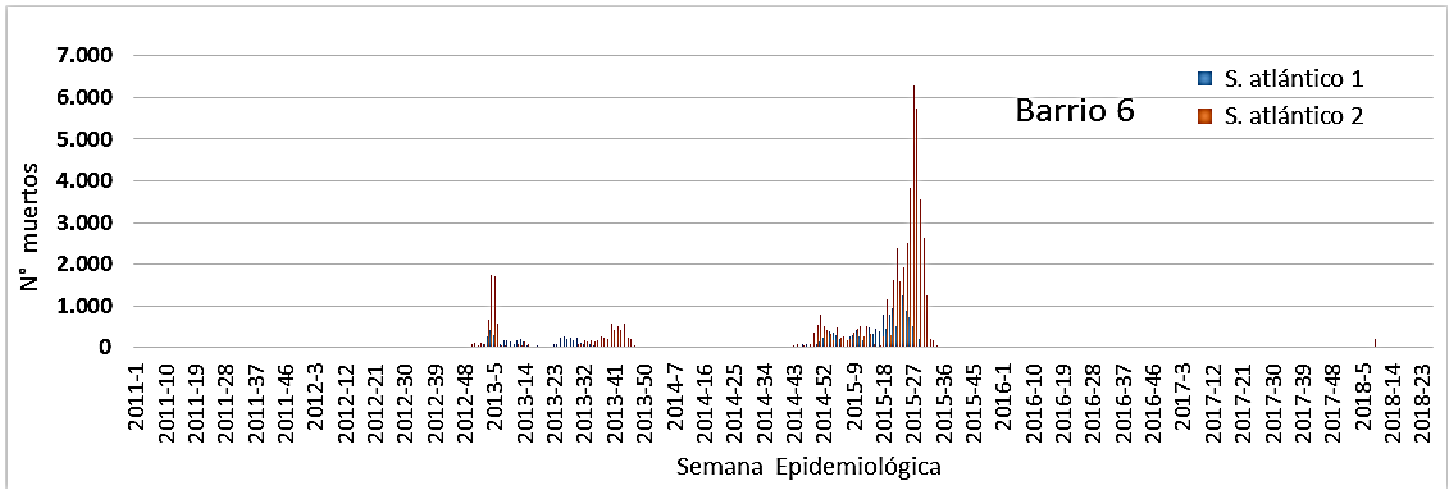
BARRIO 3



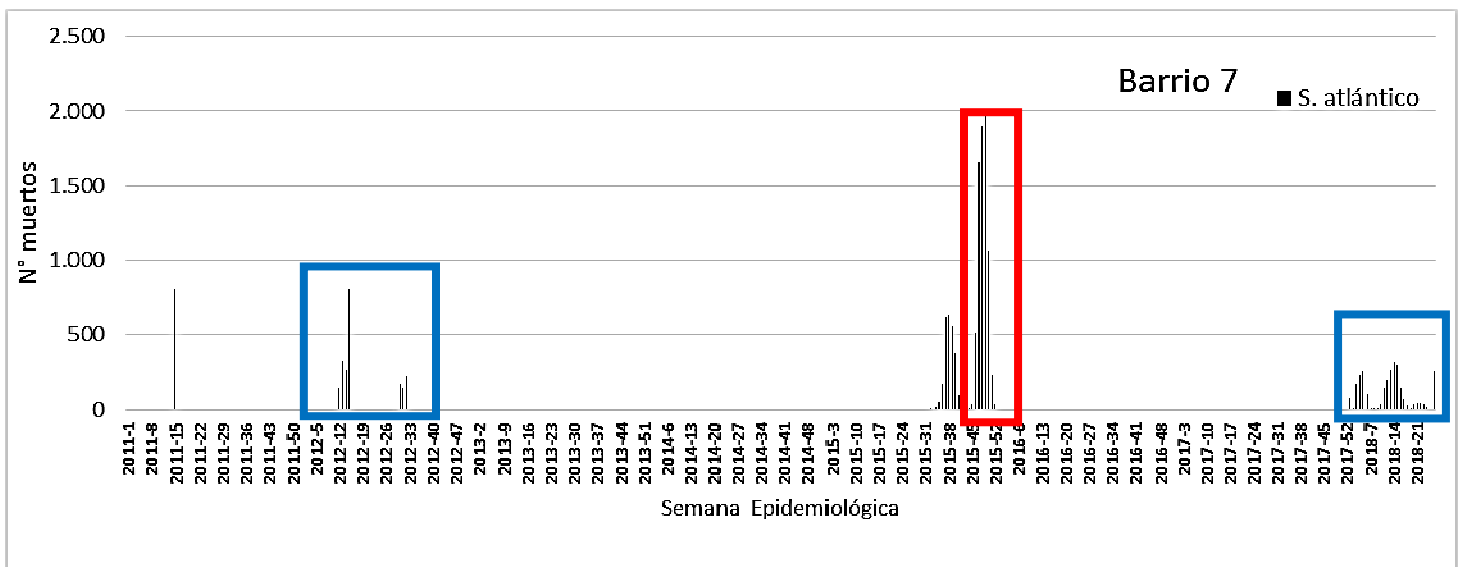
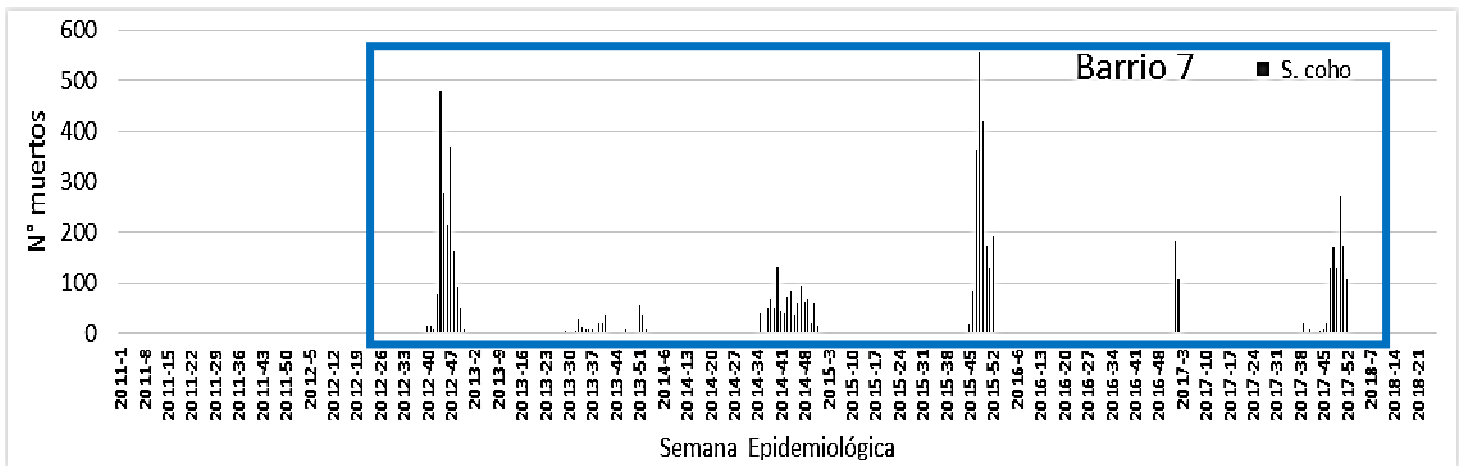
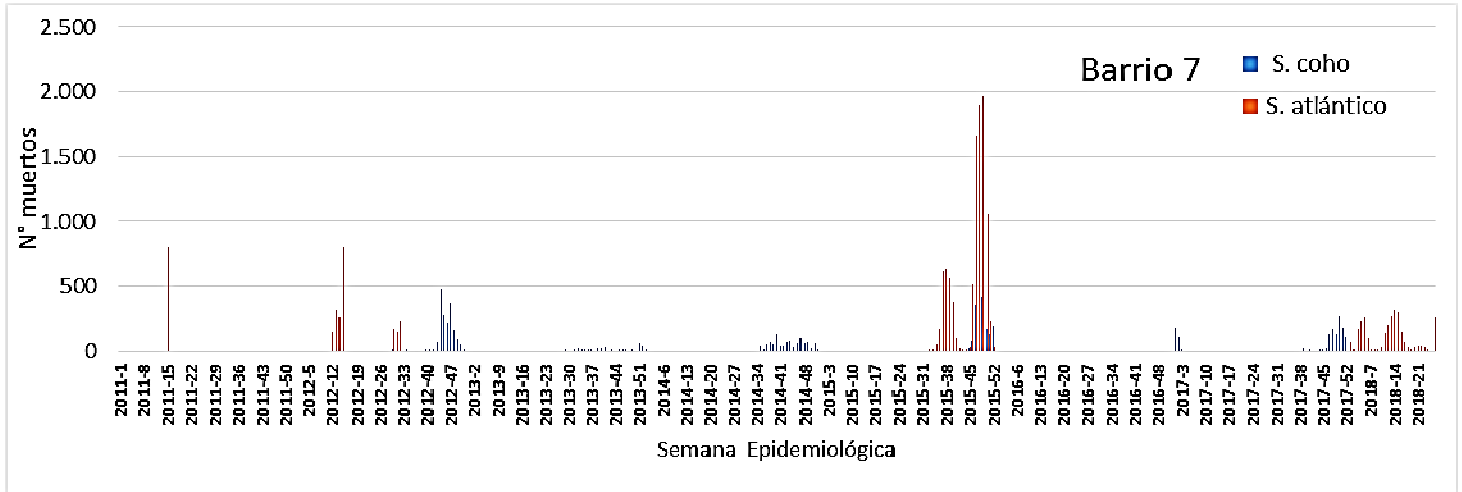




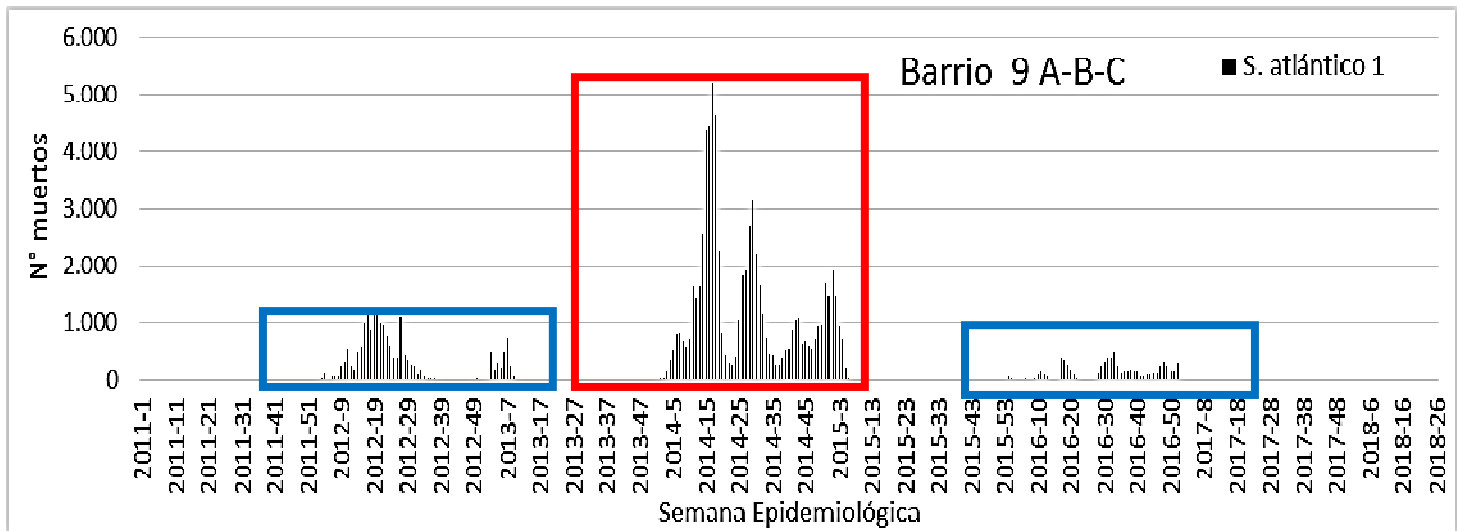
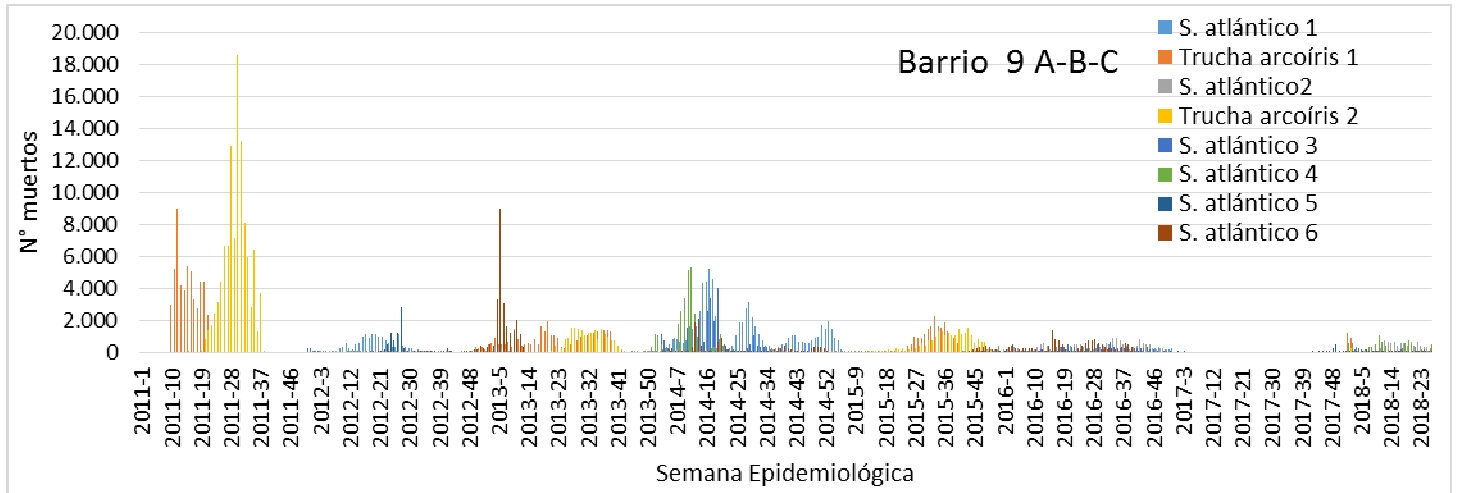
BARRIO 6

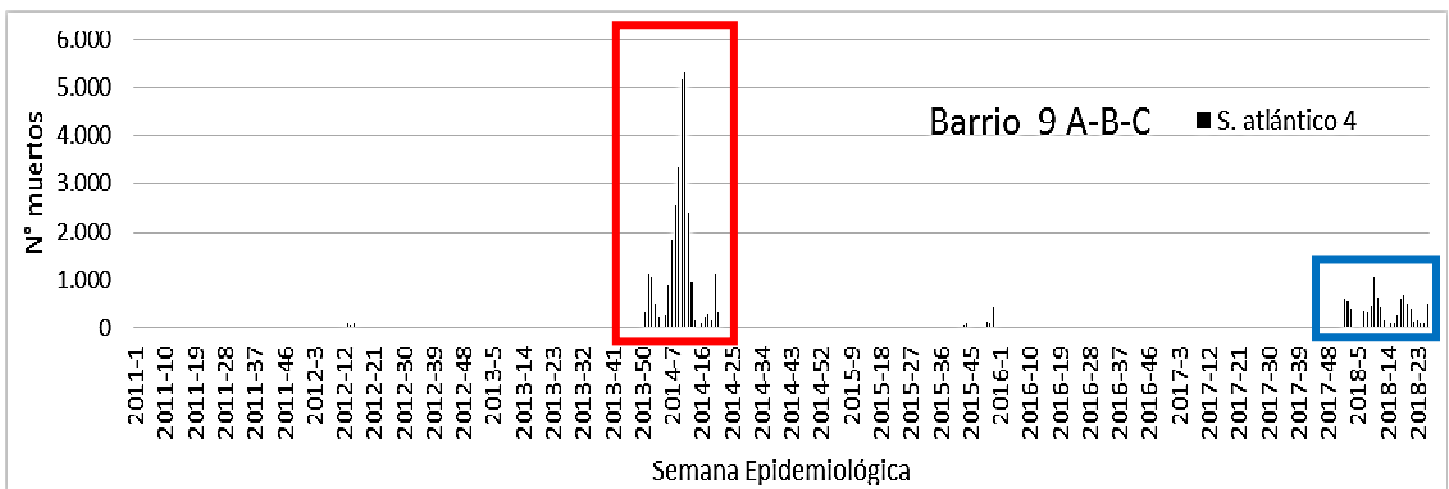
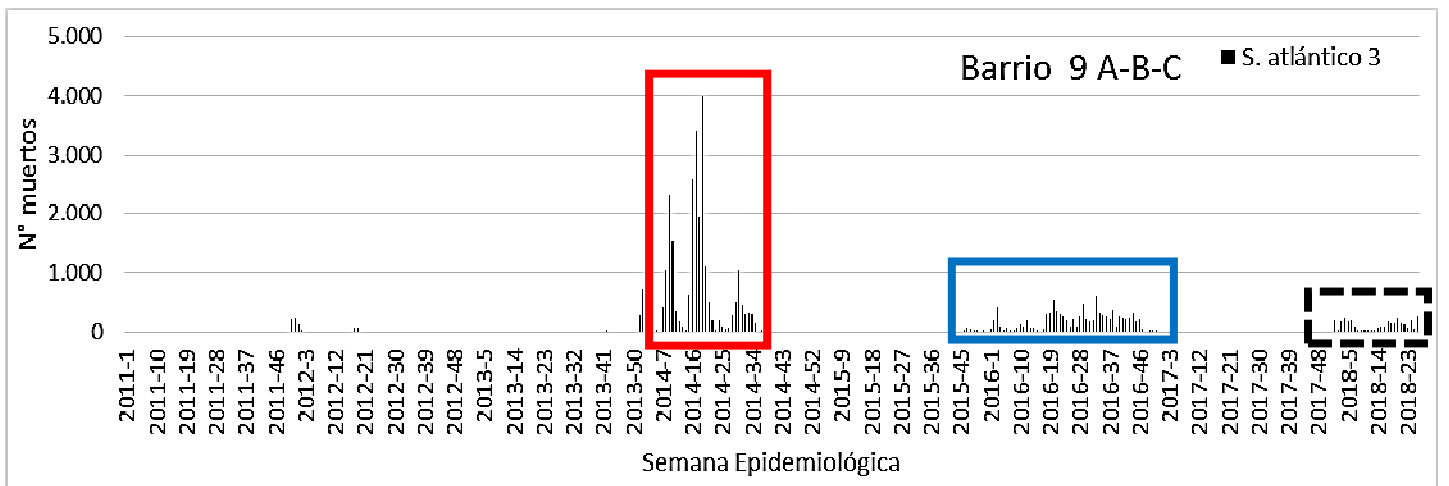
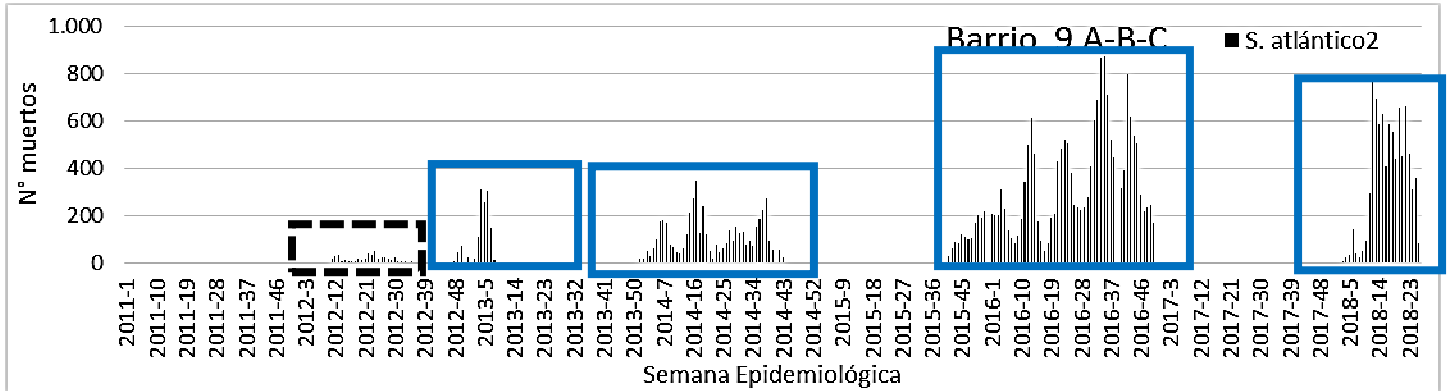


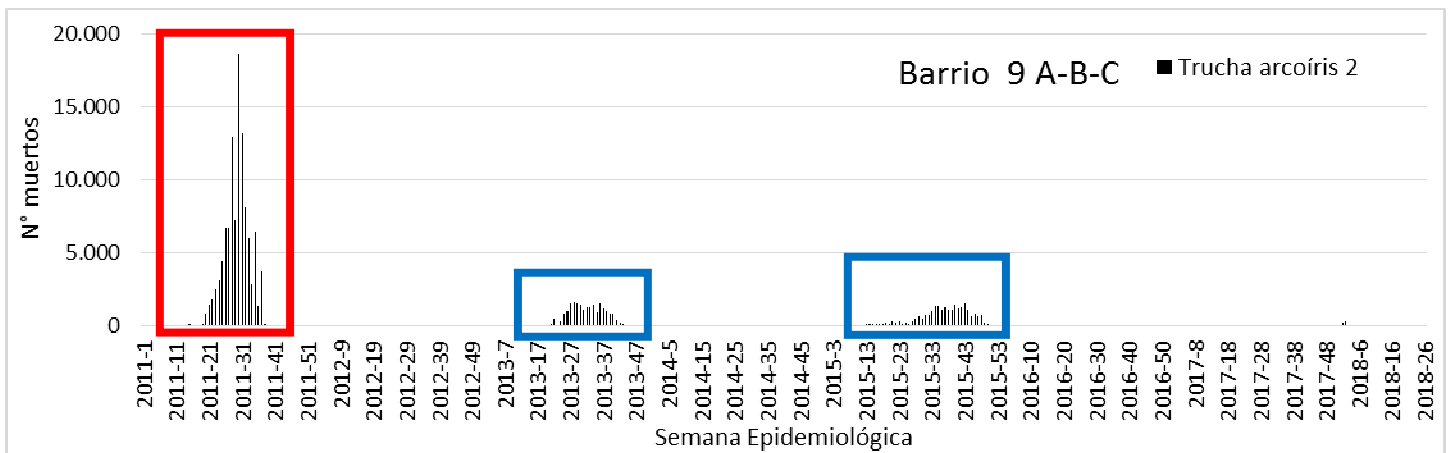
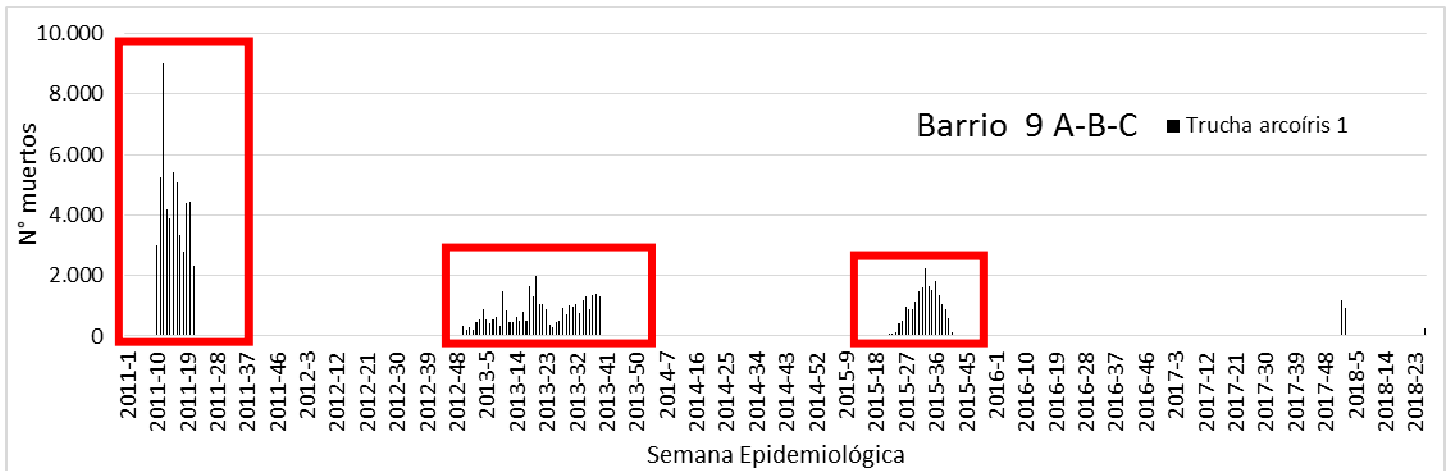
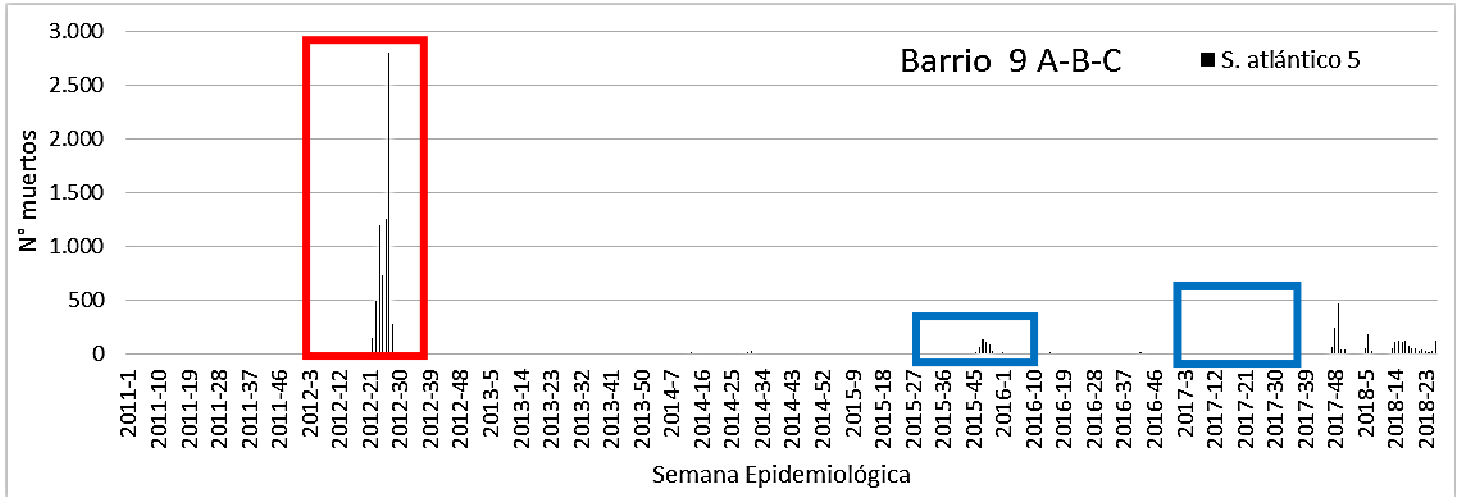
BARRIO 7



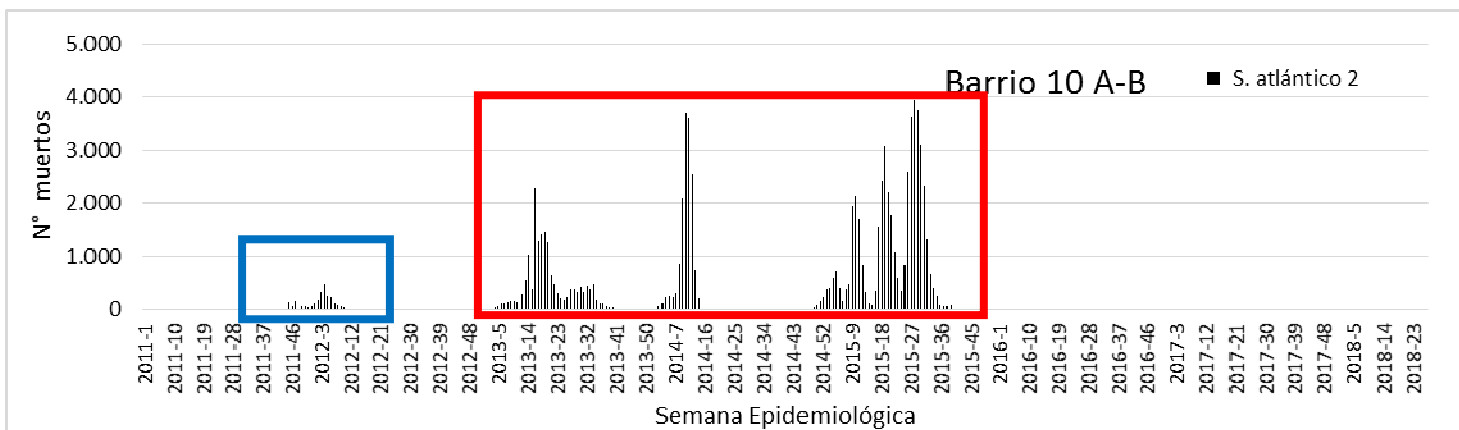
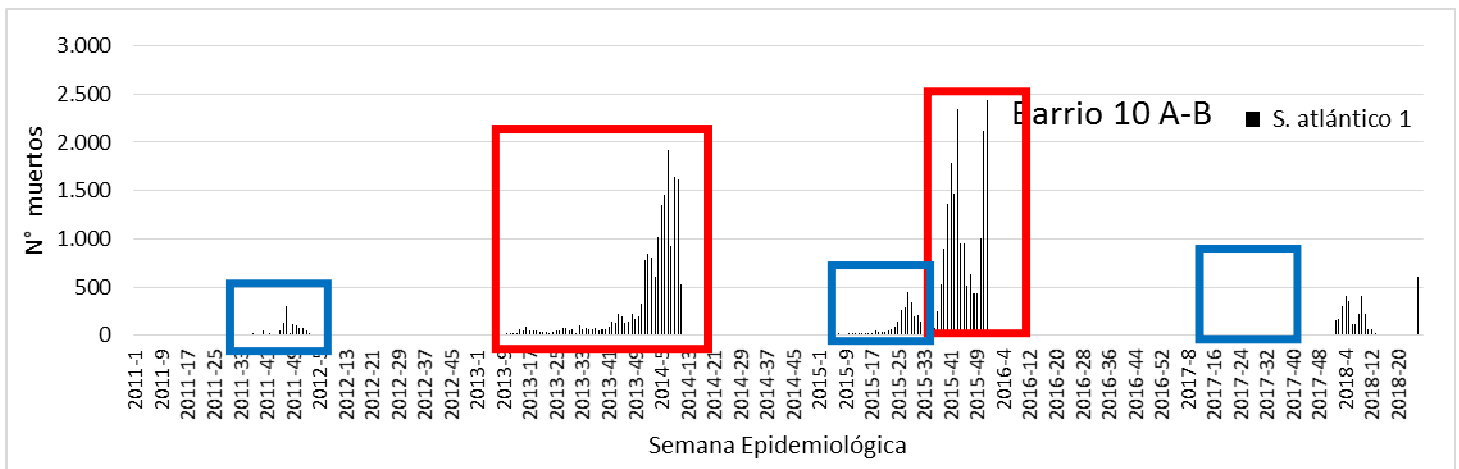
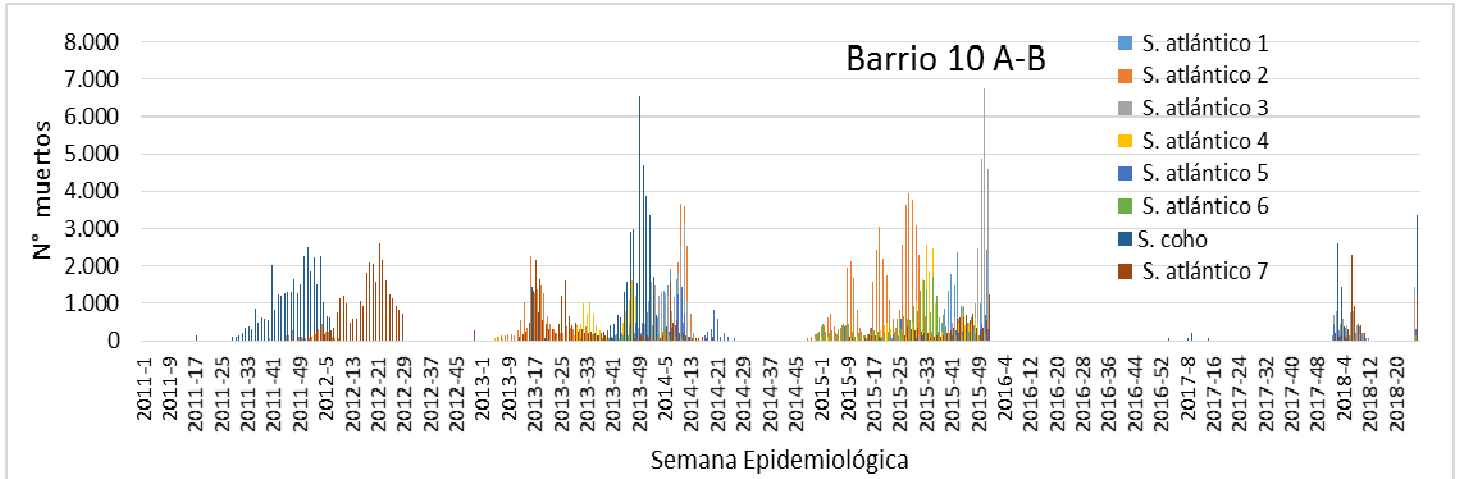
BARRIO 9

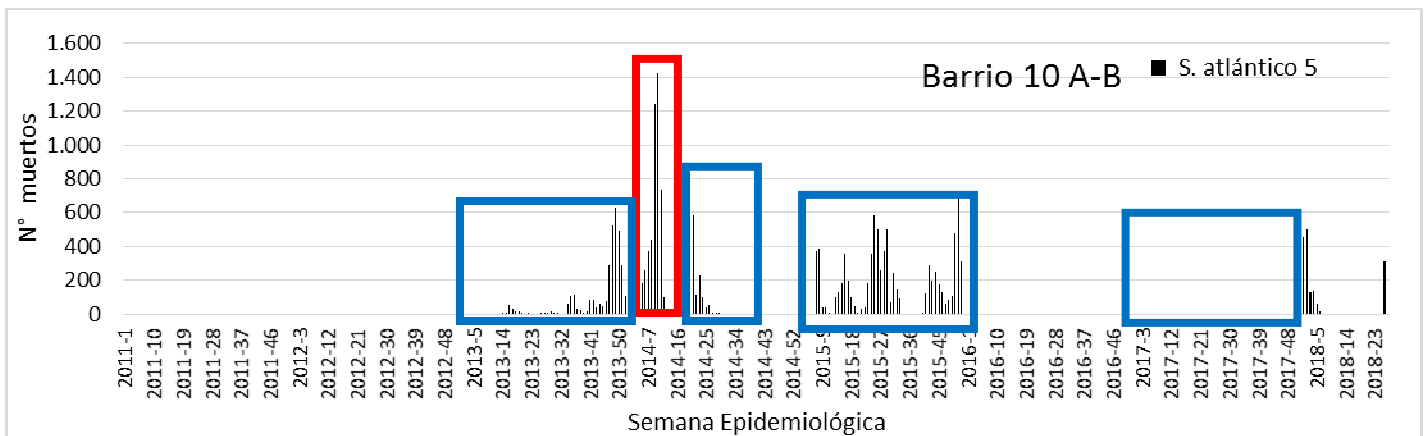
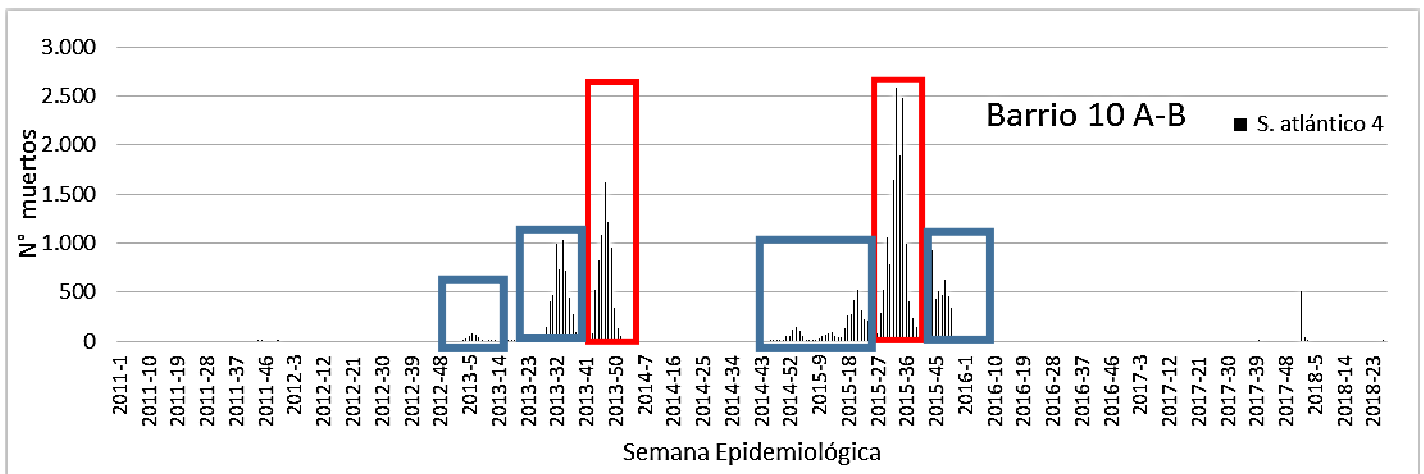
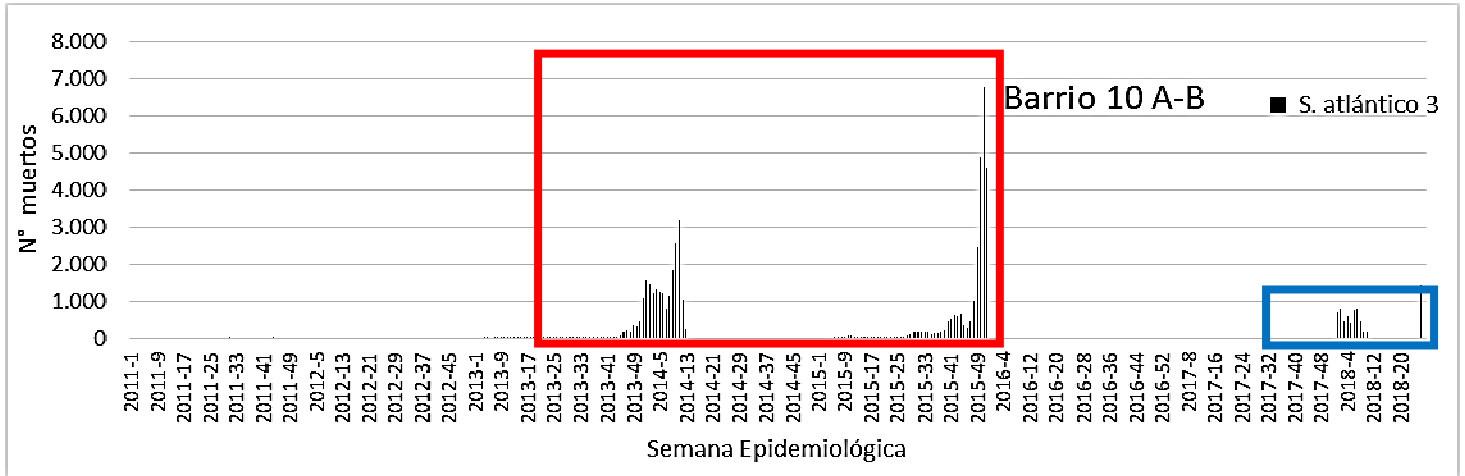


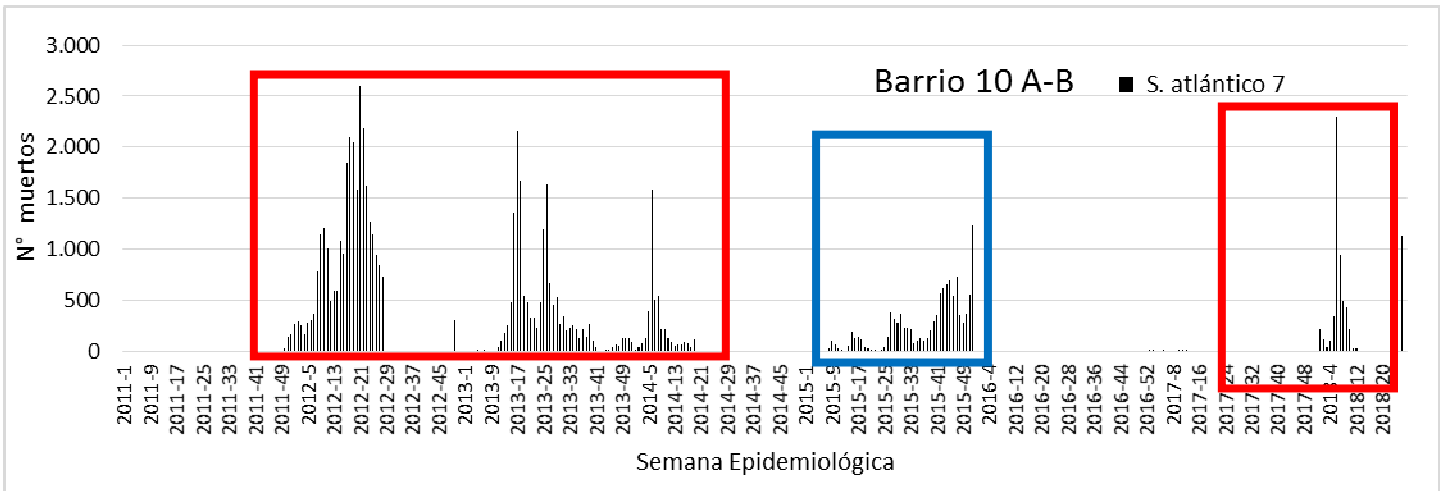
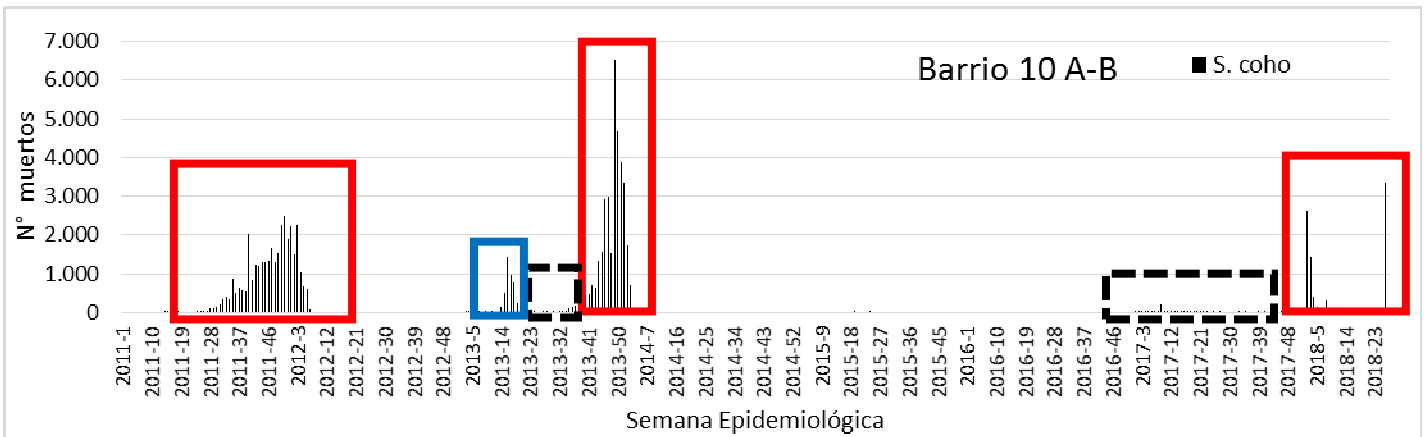
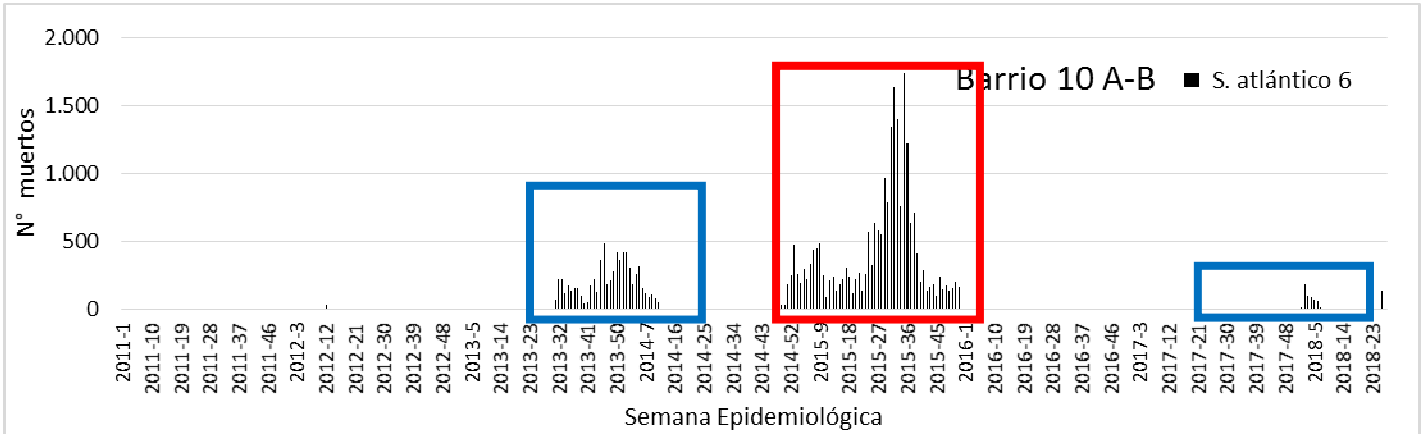




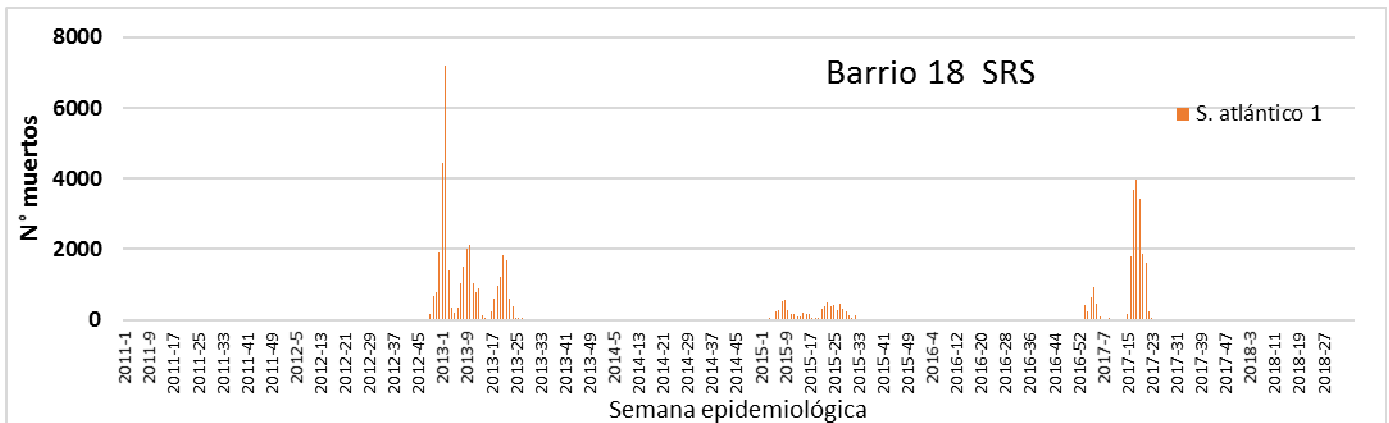
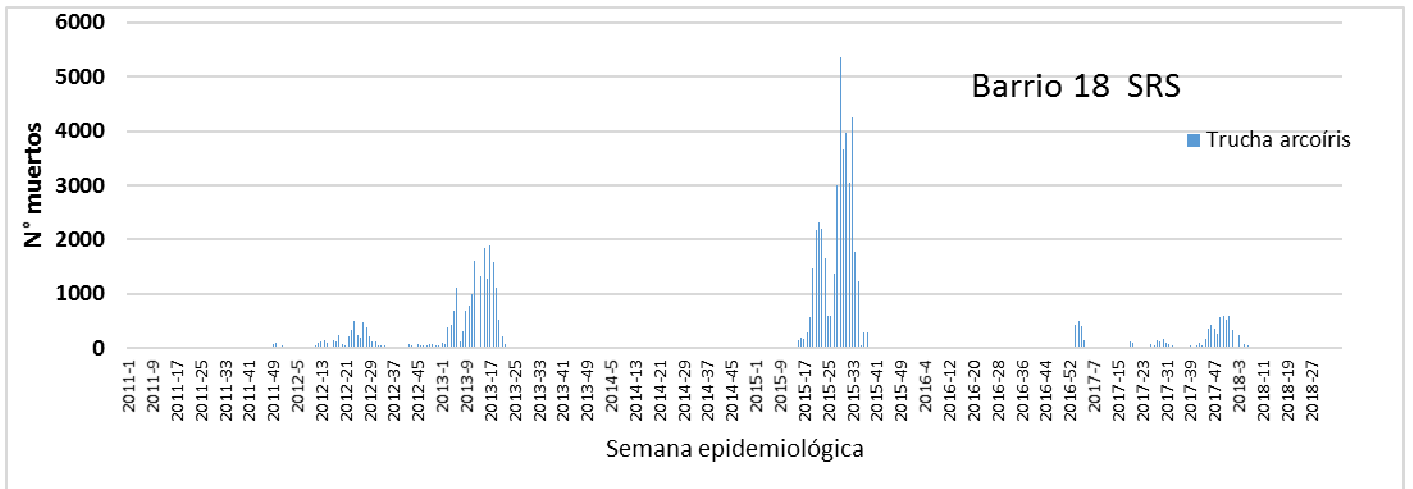
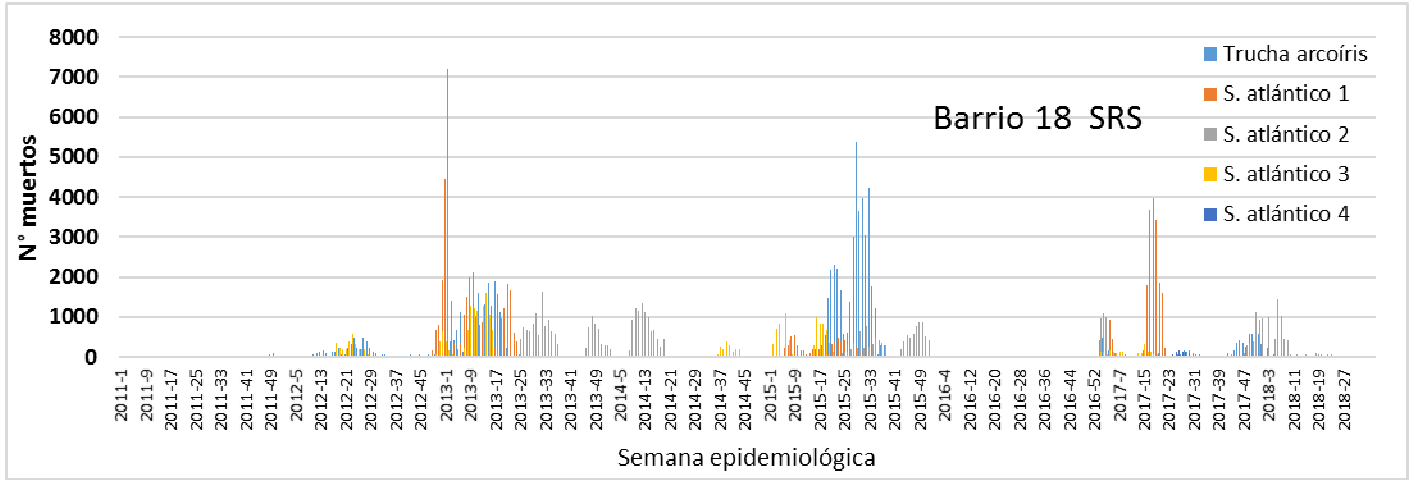
BARRIO 10

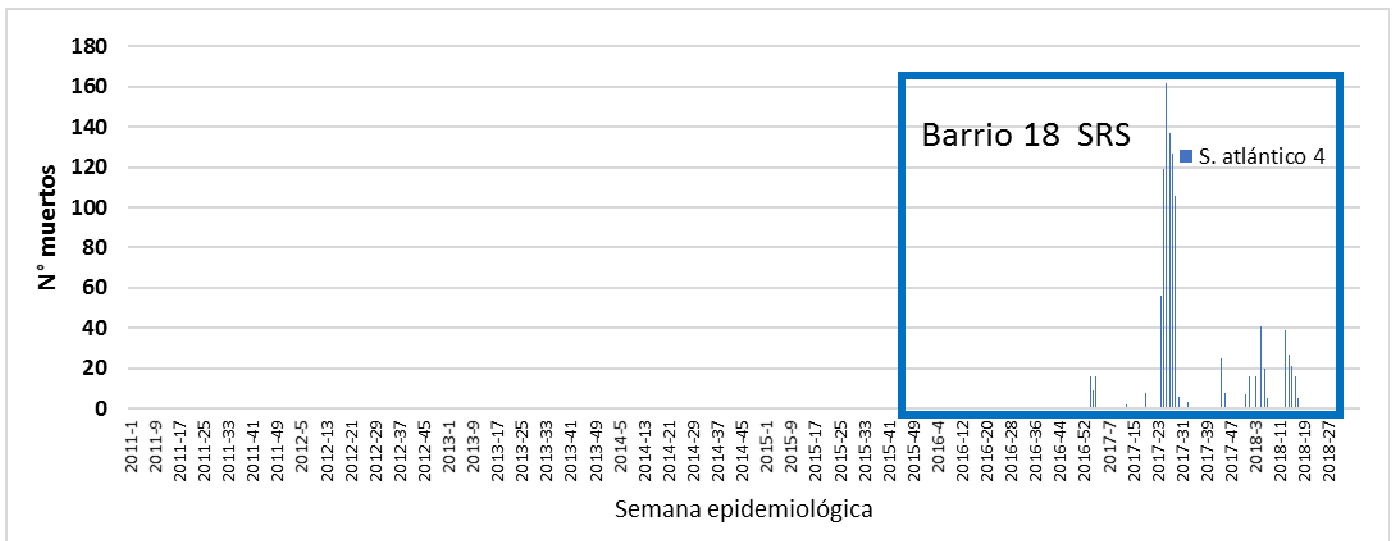
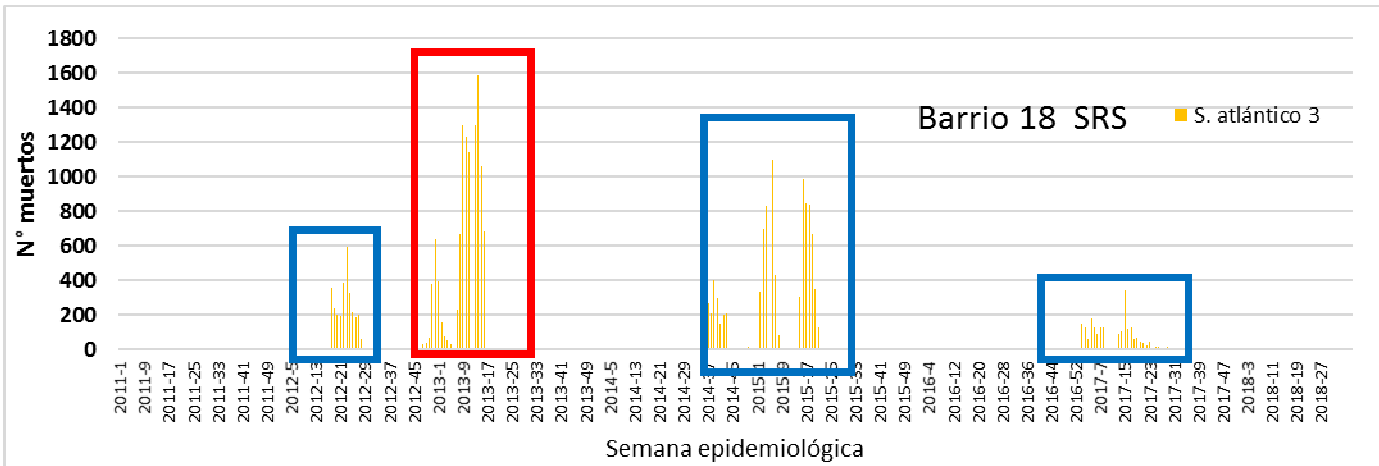
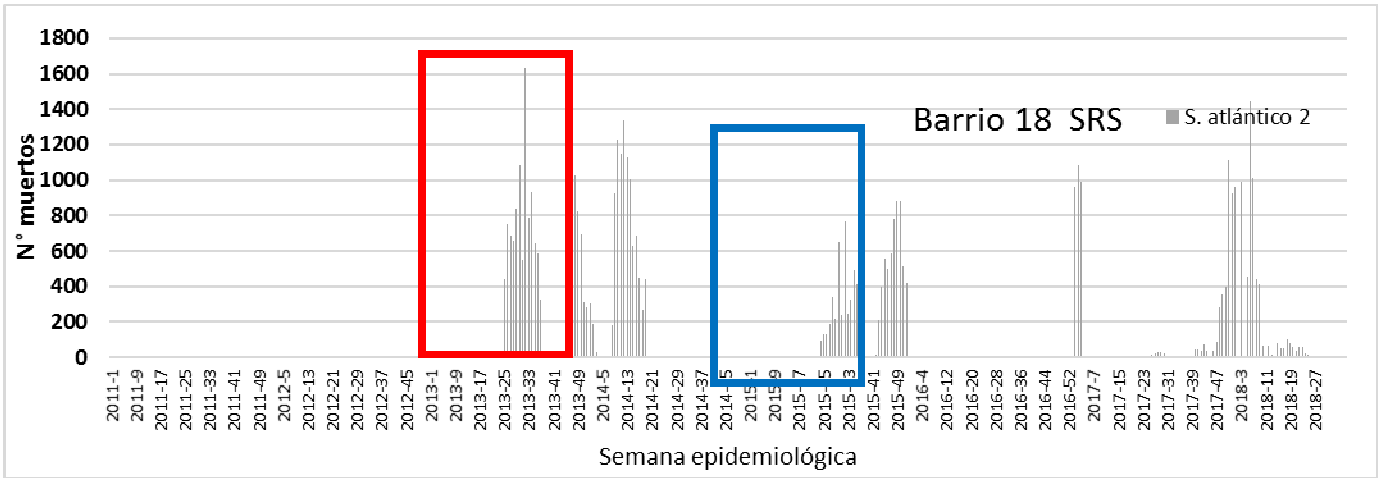




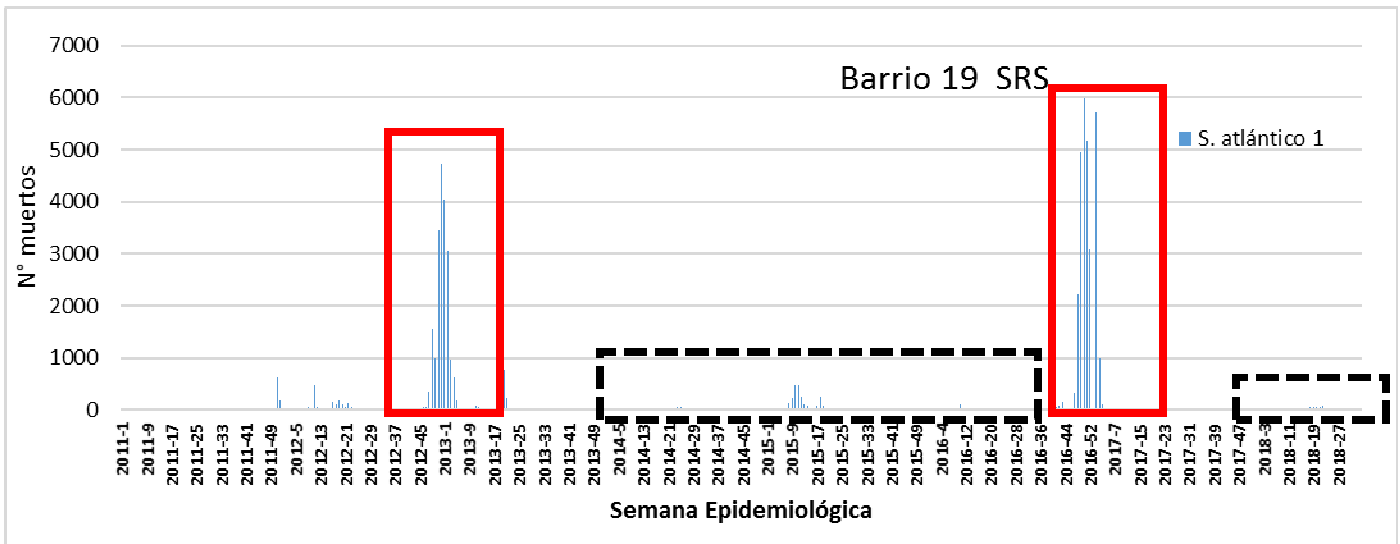
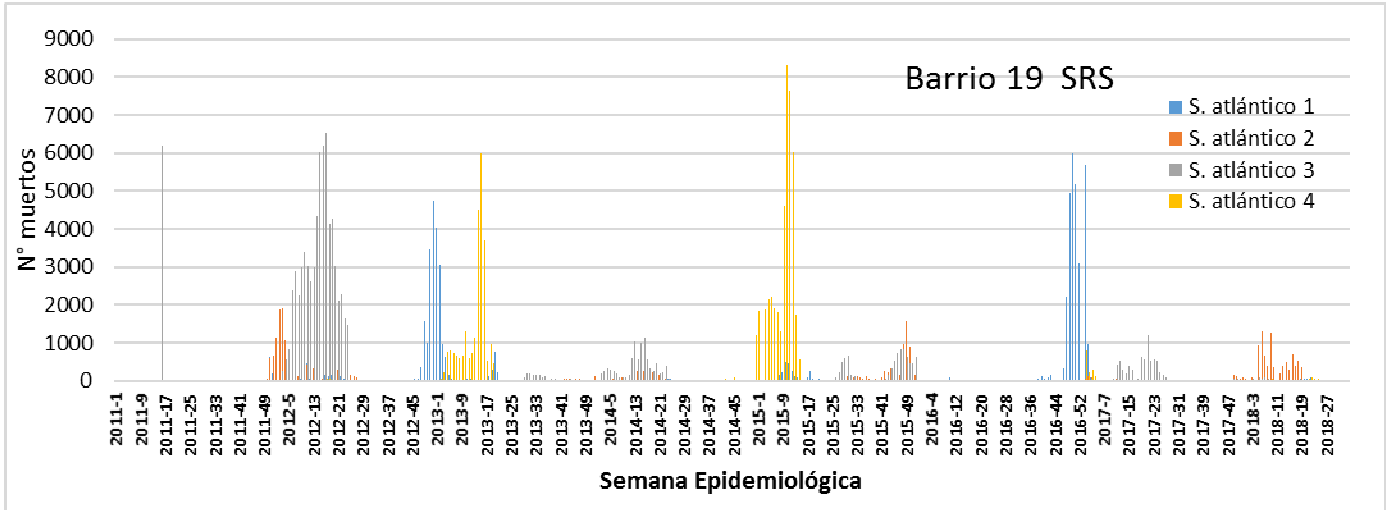


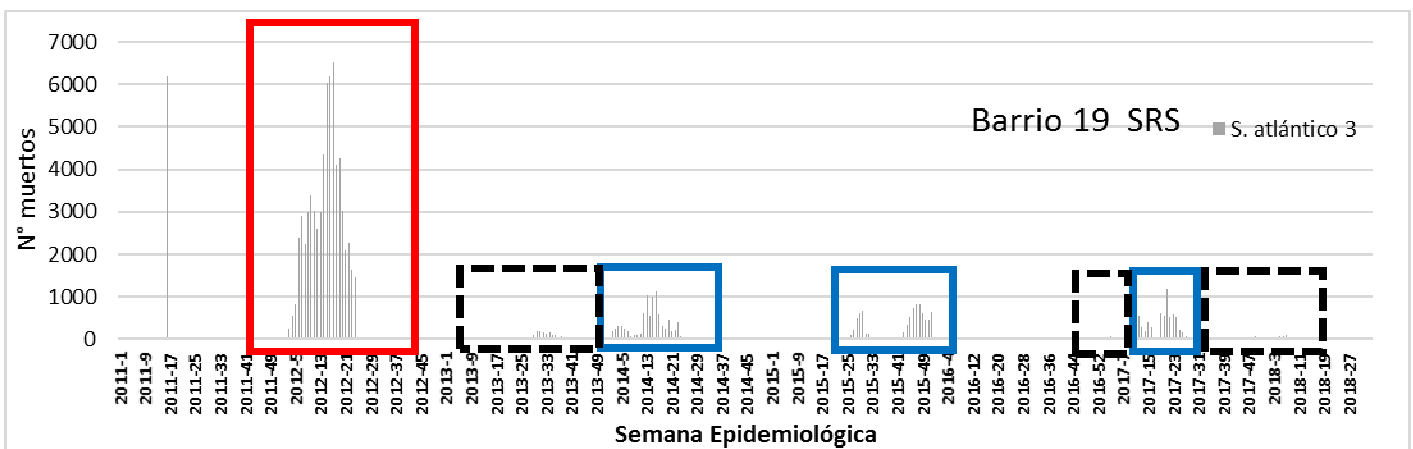
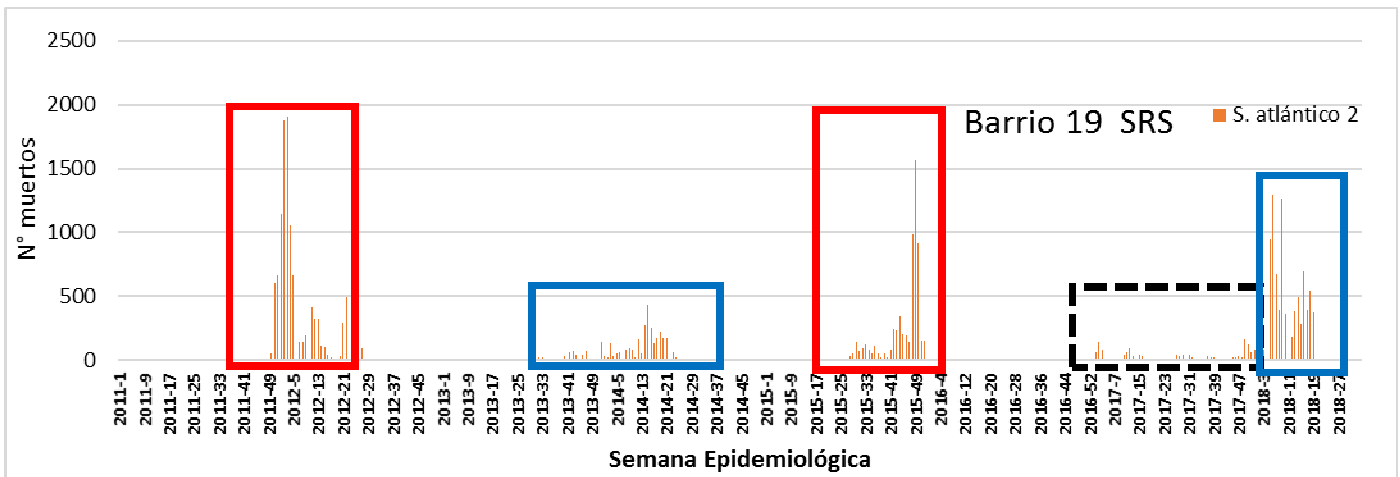
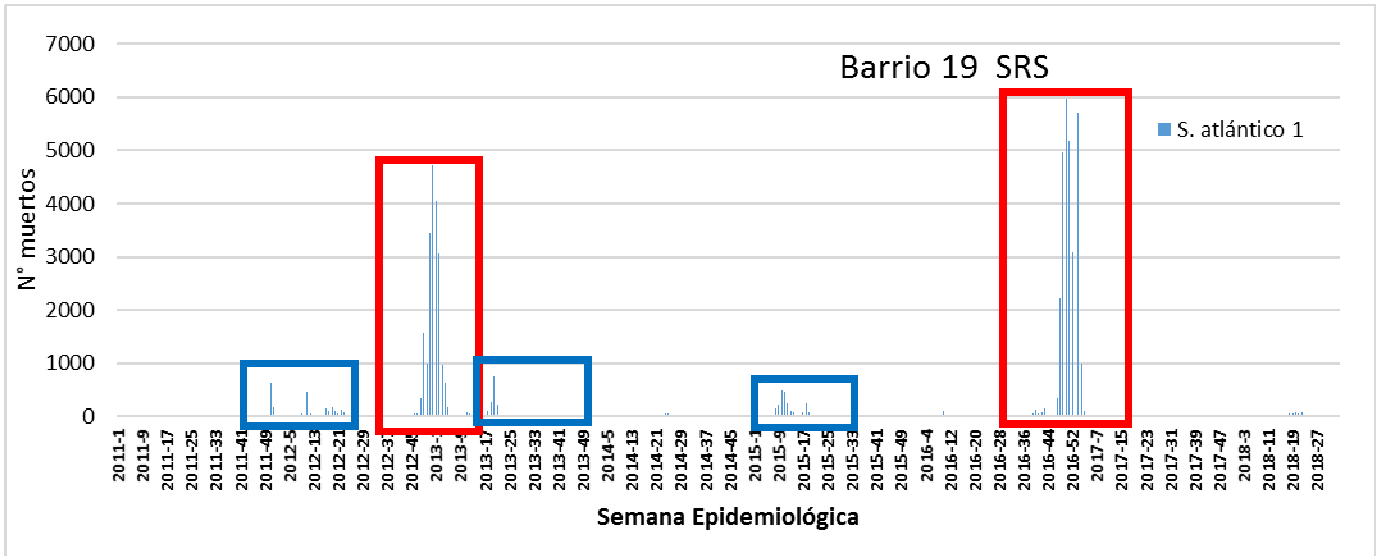
REGIÓN DE AYSÉN: BARRIO 18

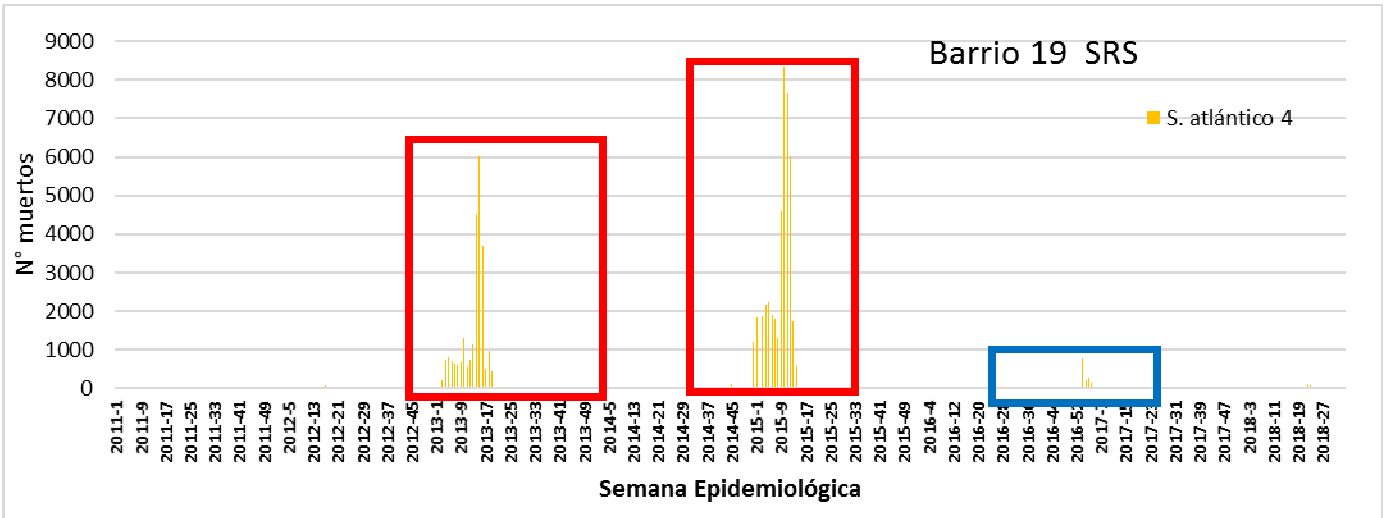




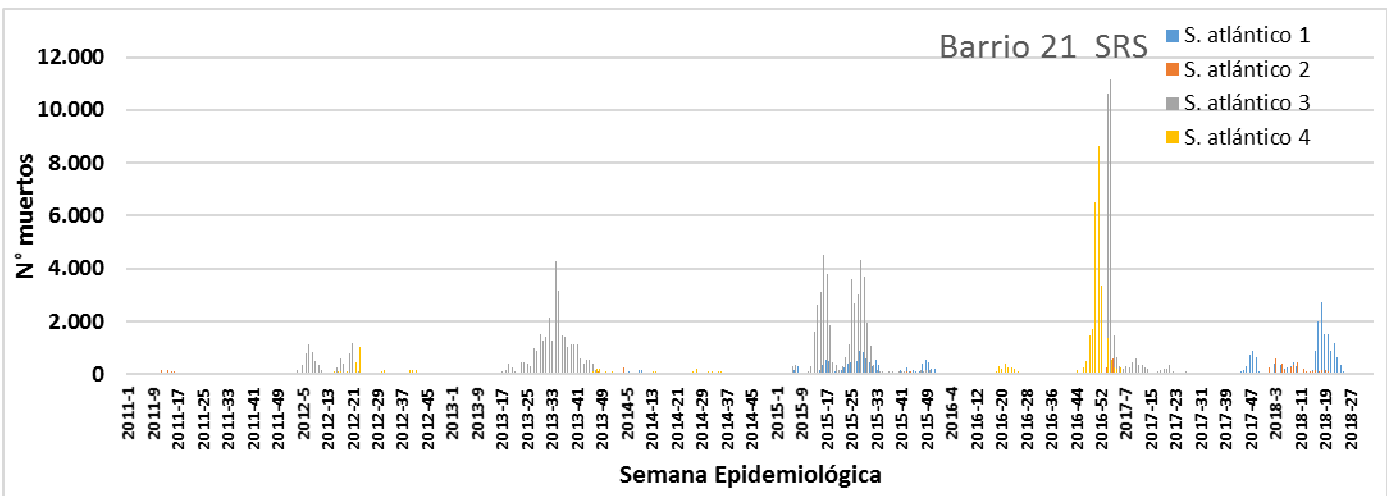
BARRIO 19

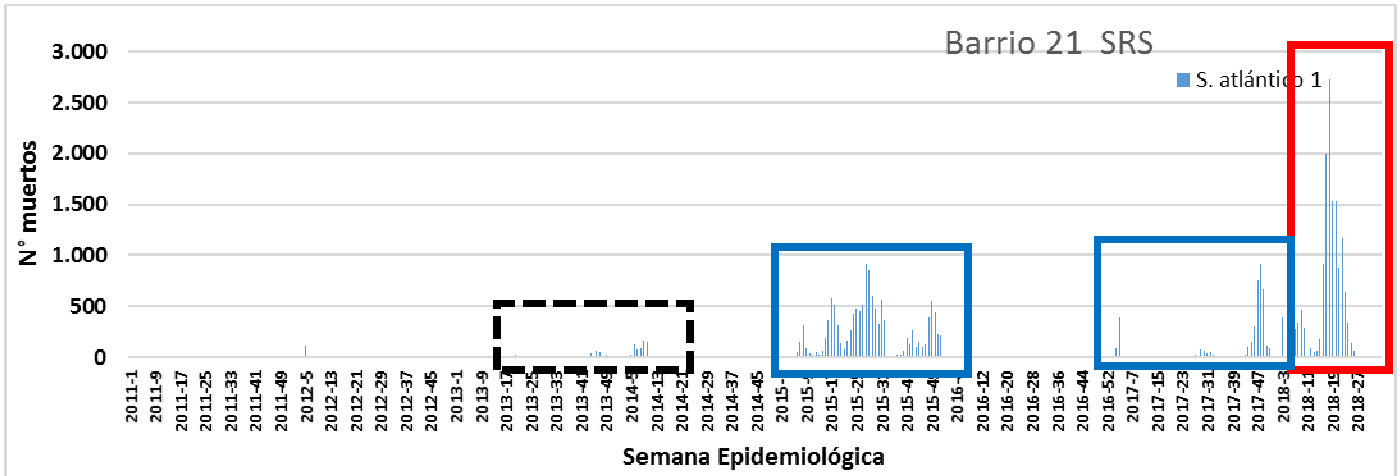


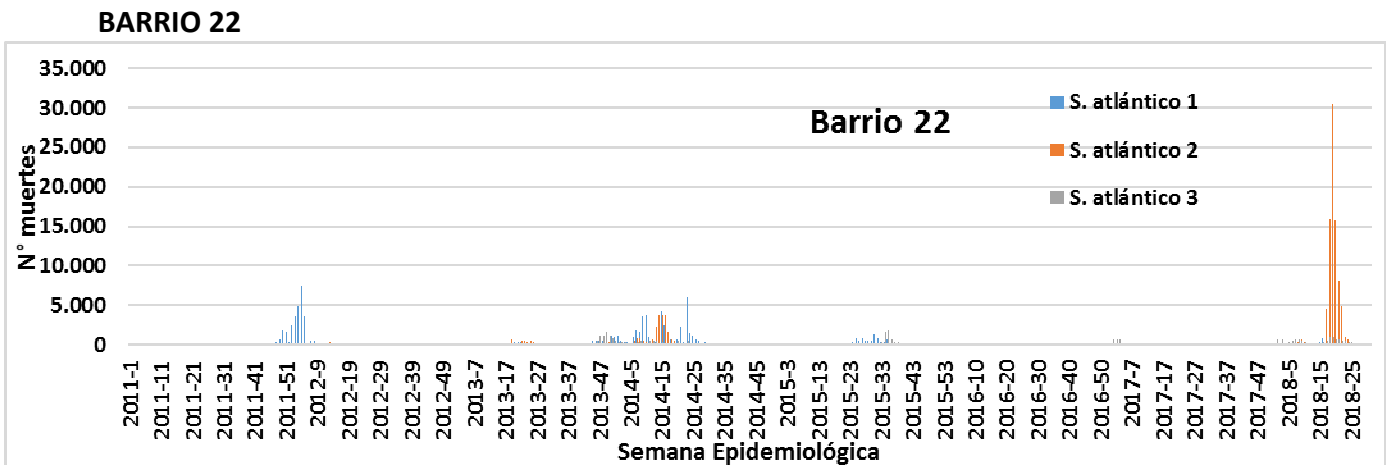
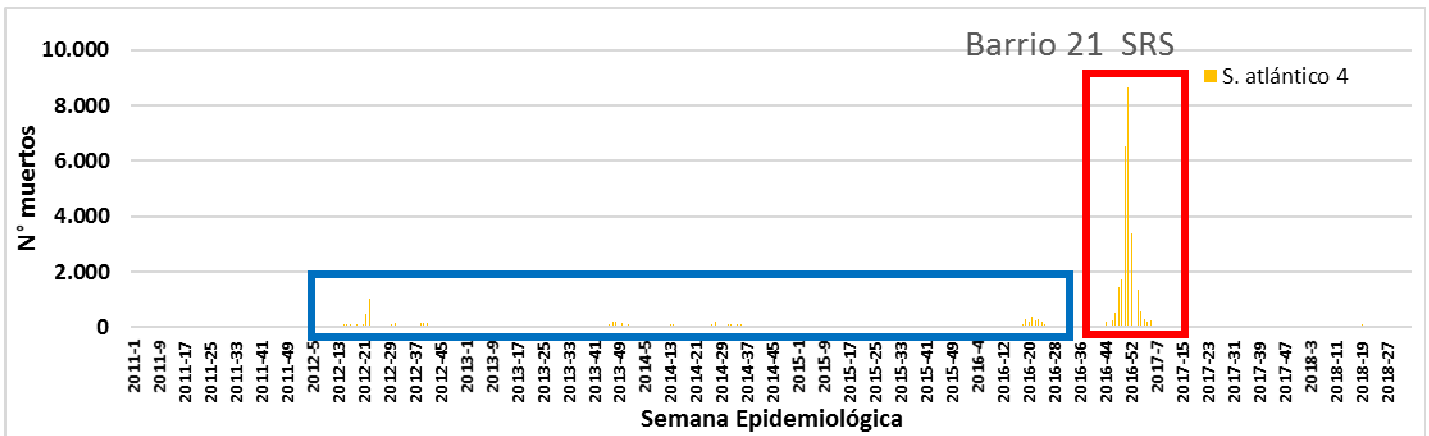
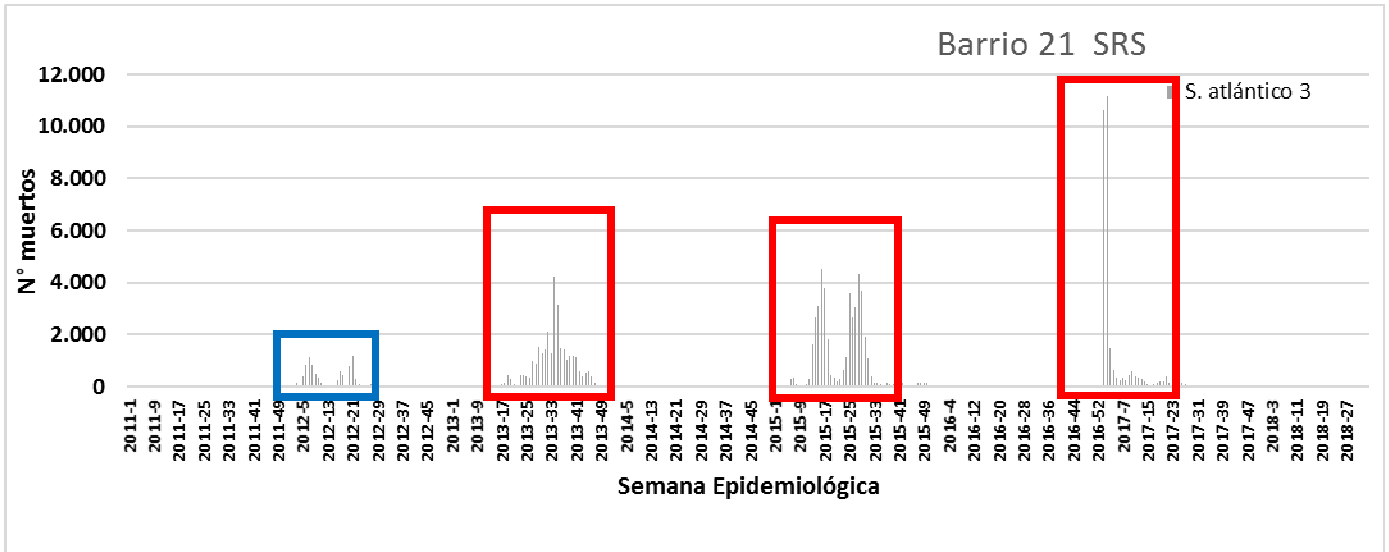


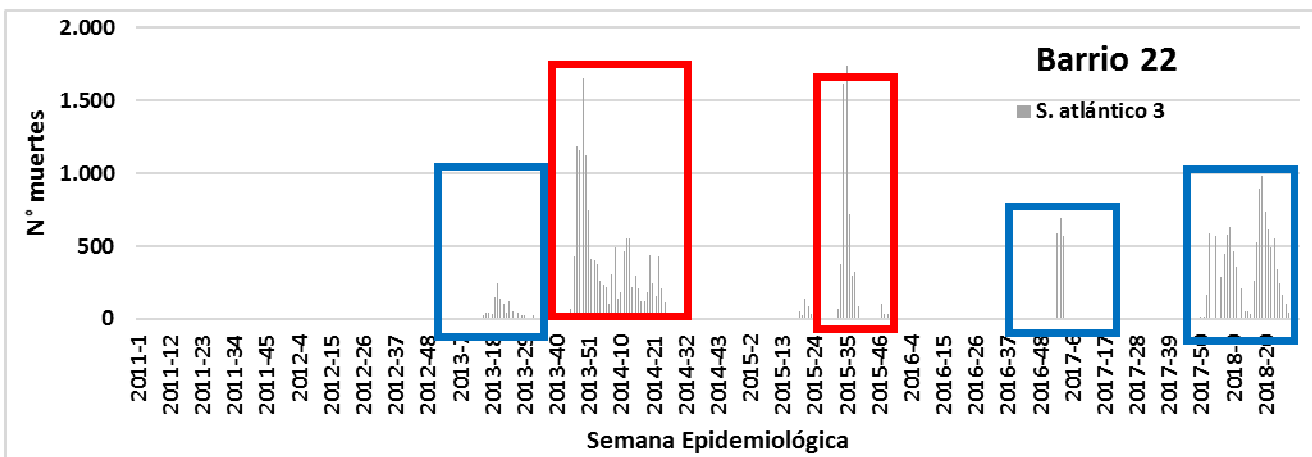
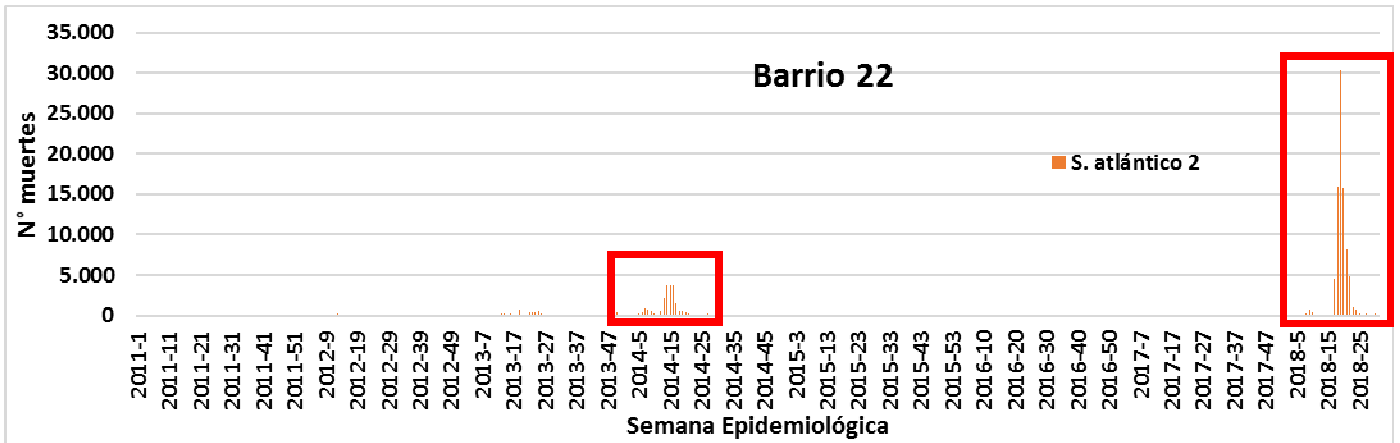
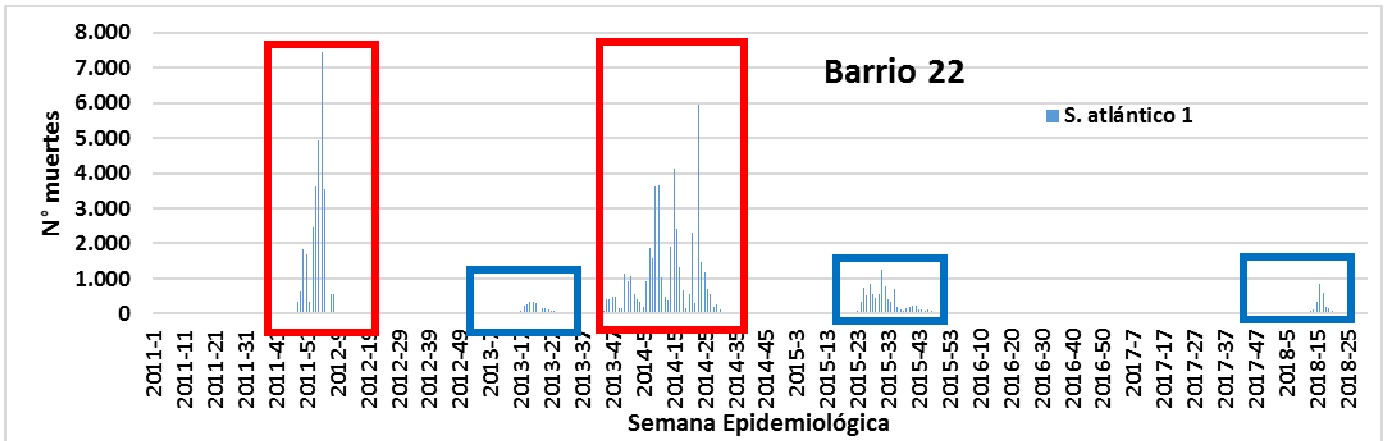


BARRIO 21

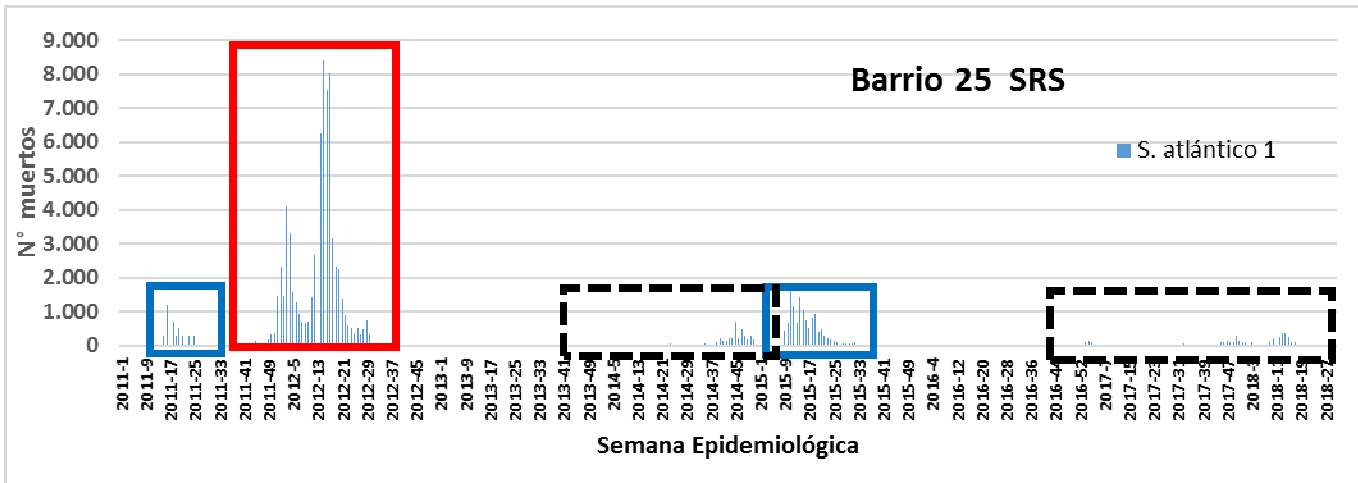
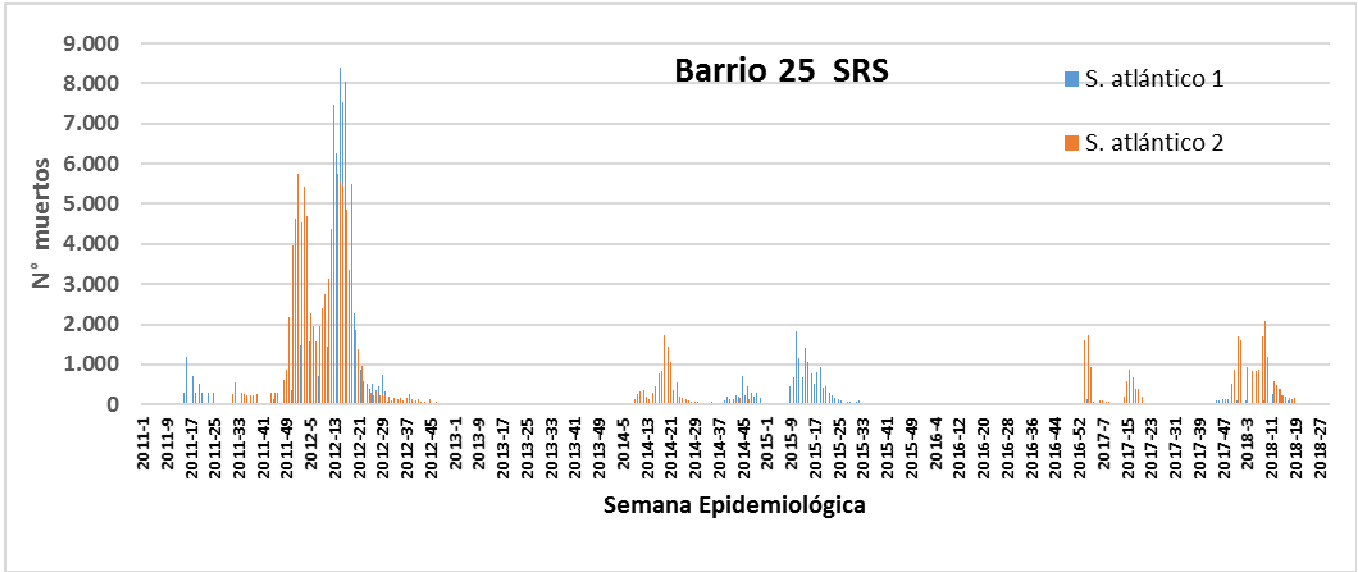


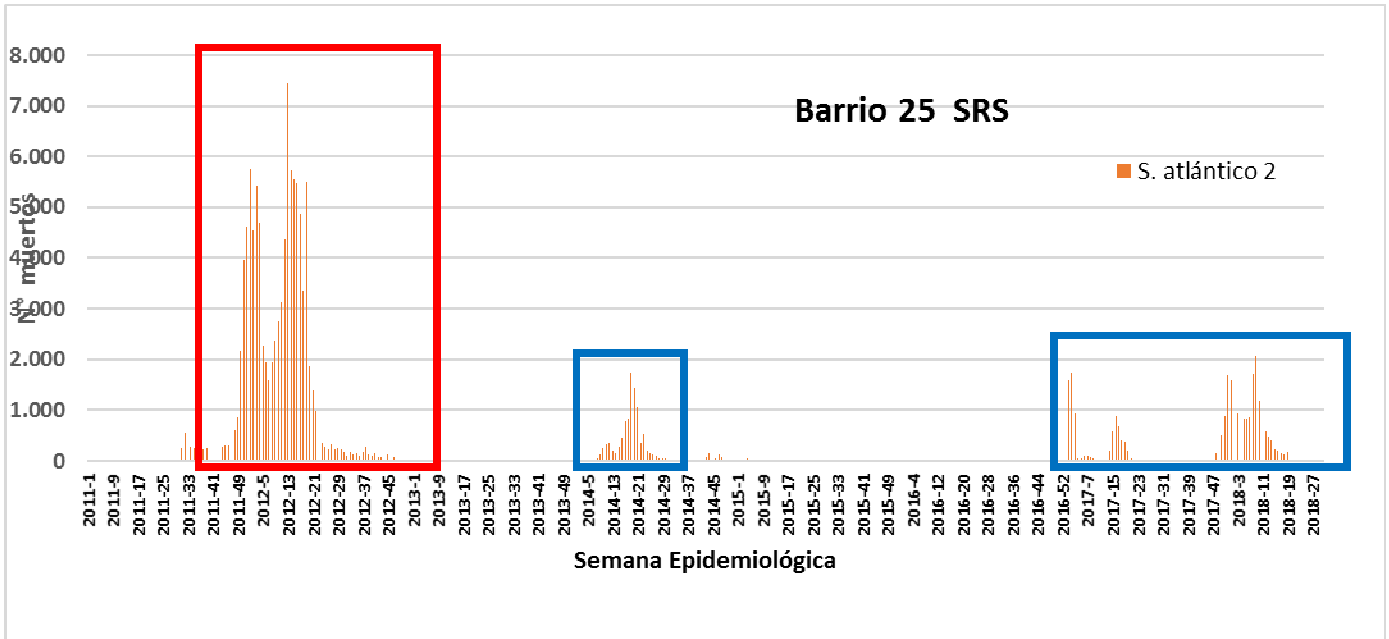




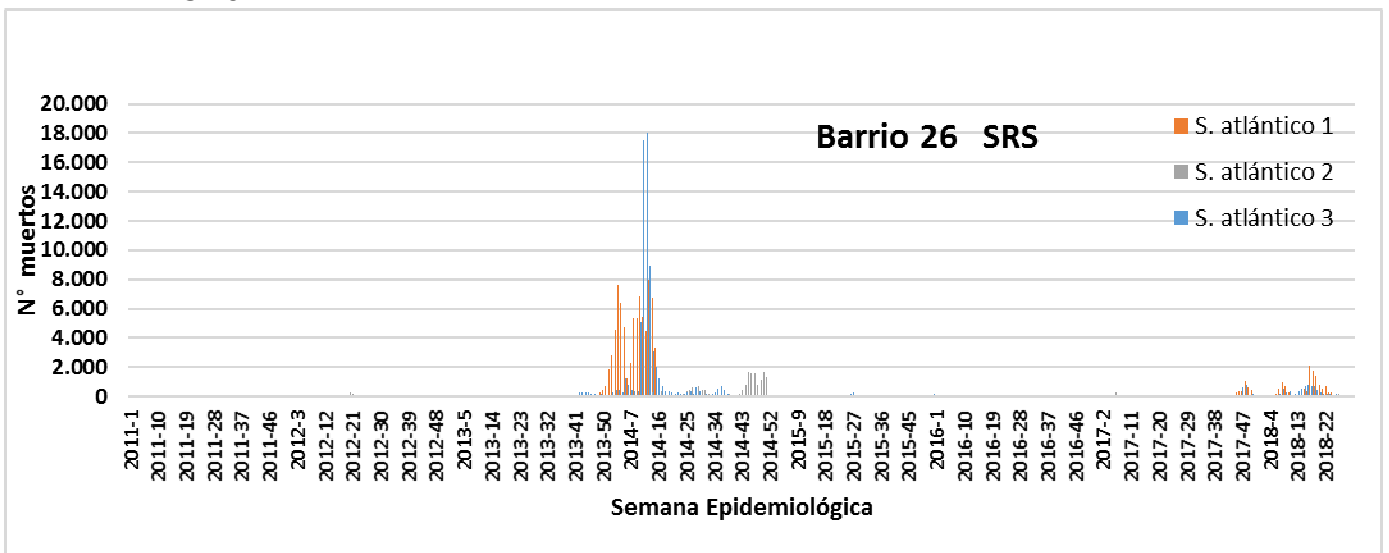


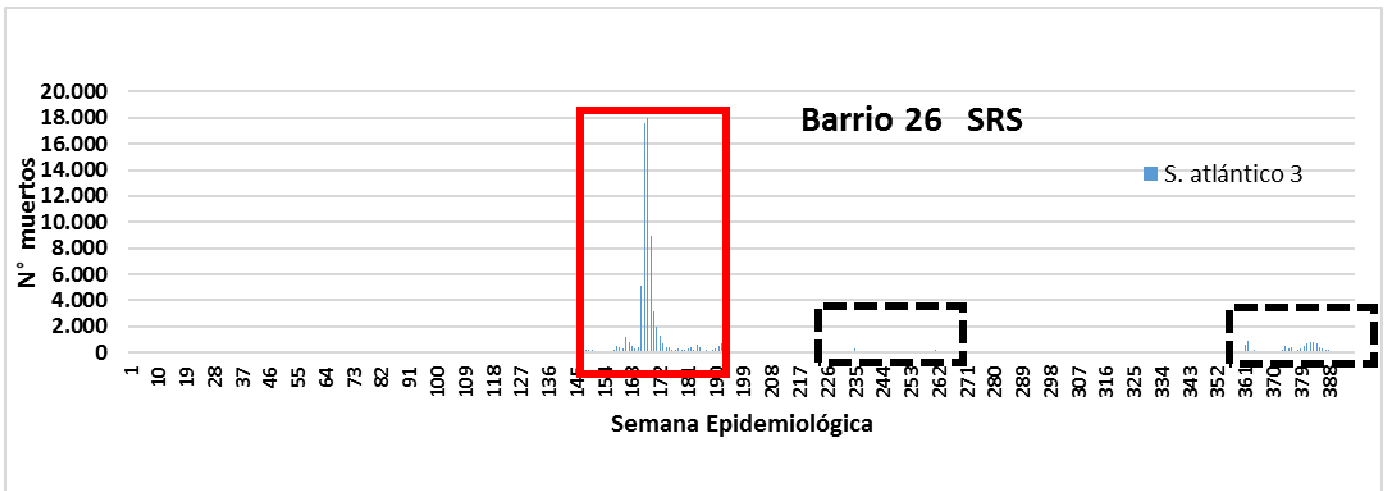
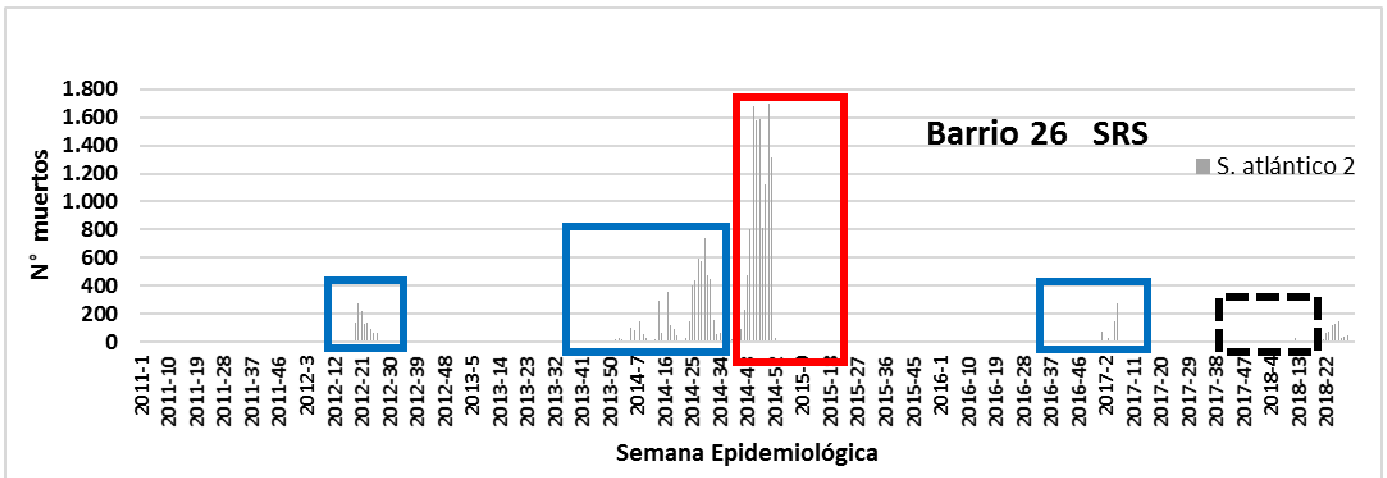
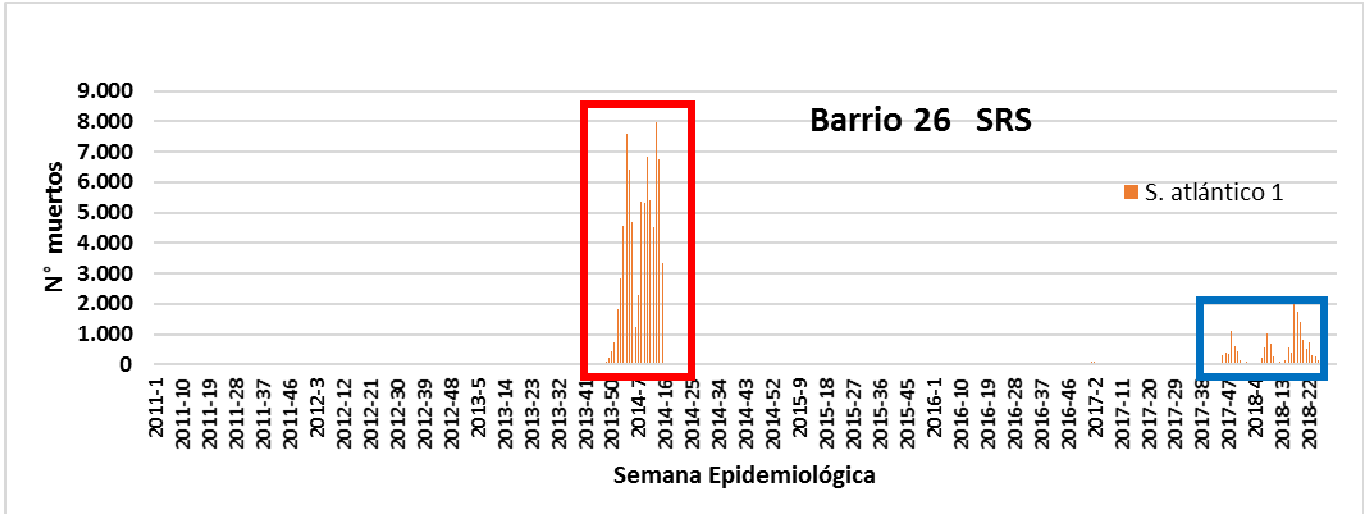
BARRIO 25



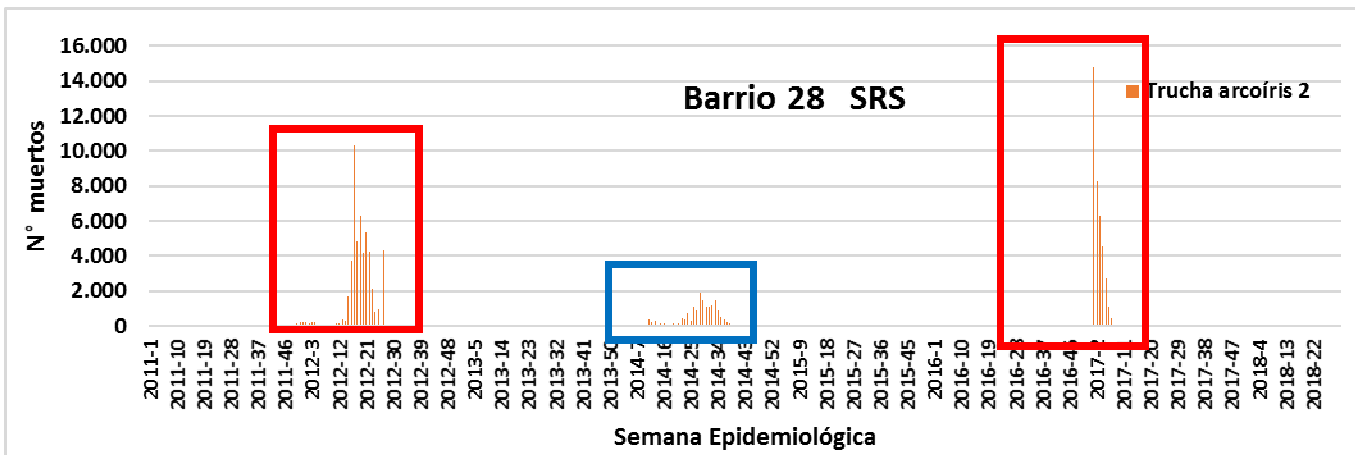
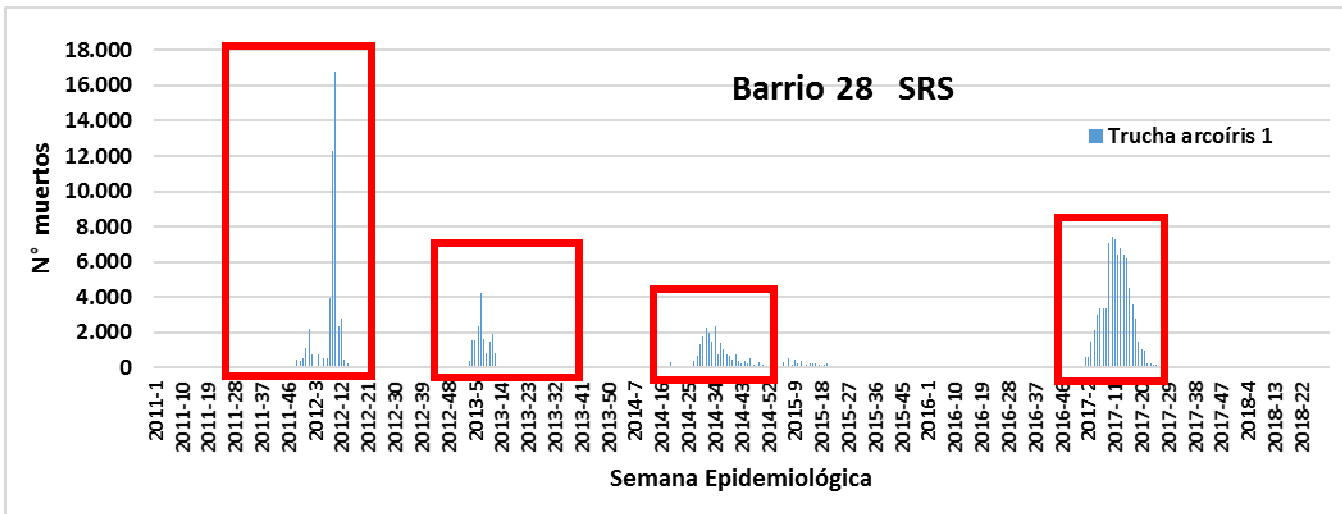
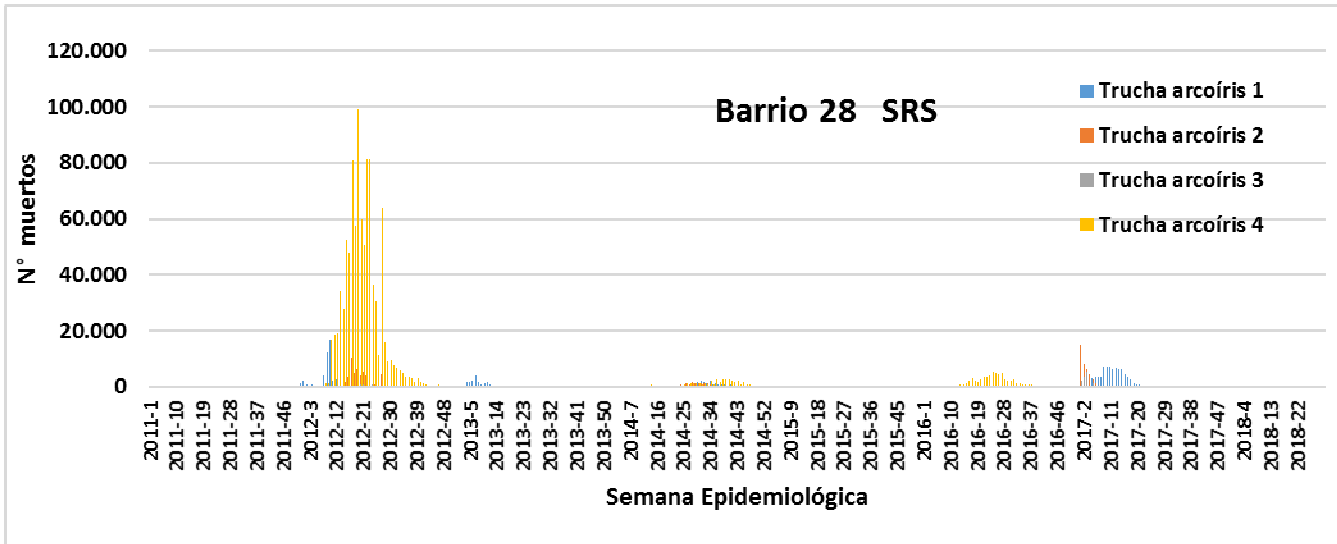


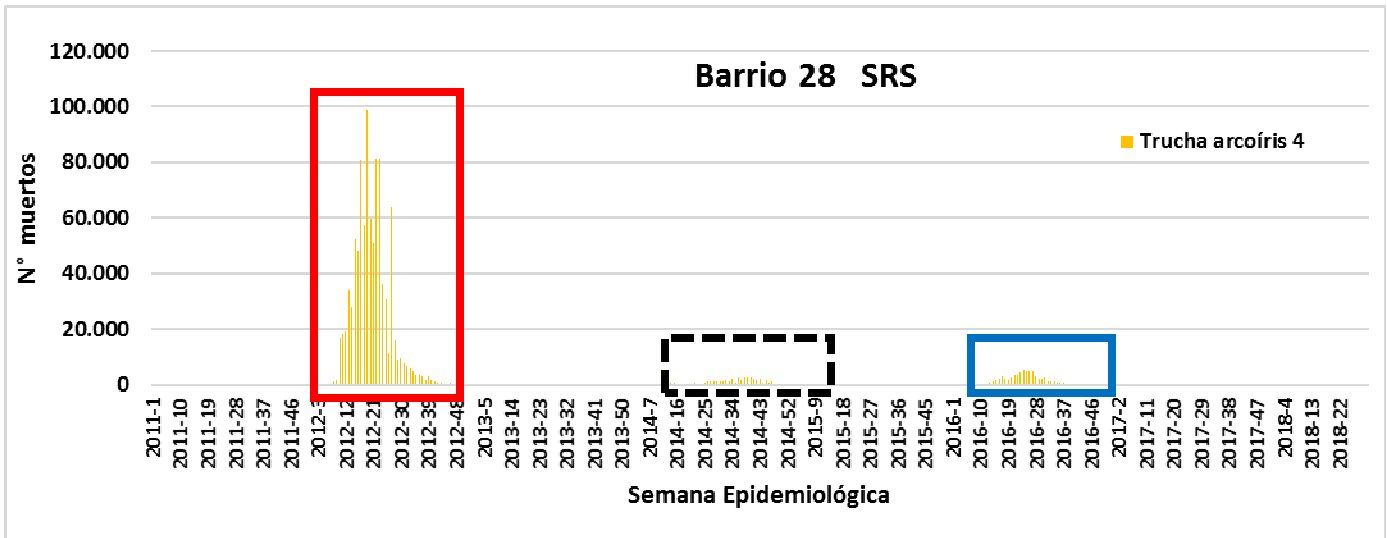
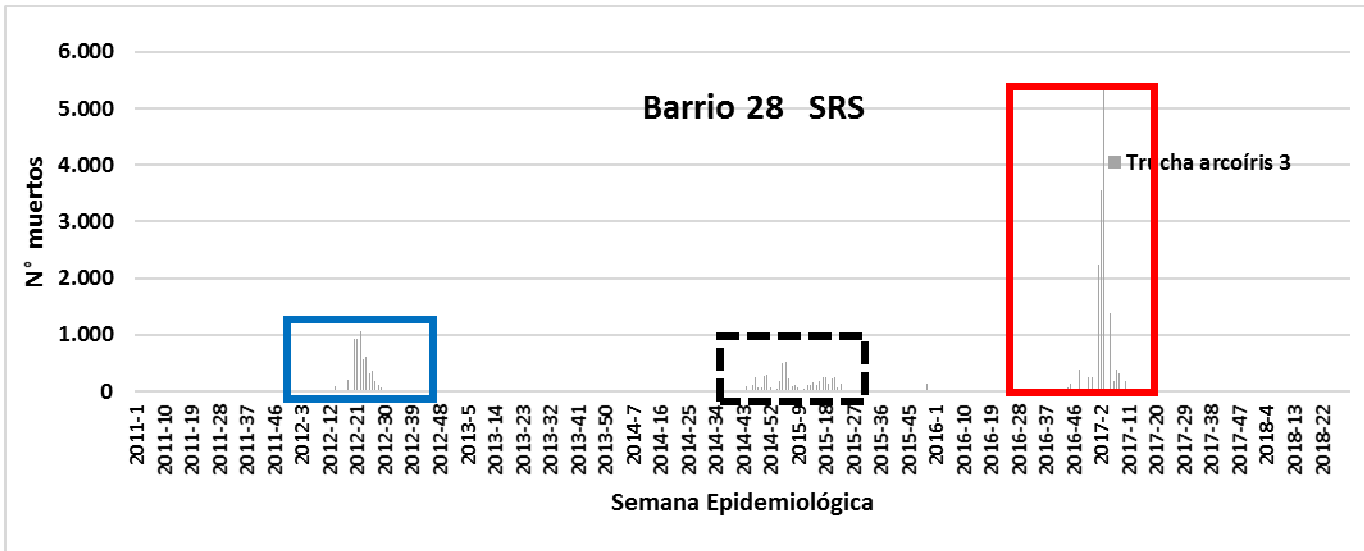
BARRIO 26



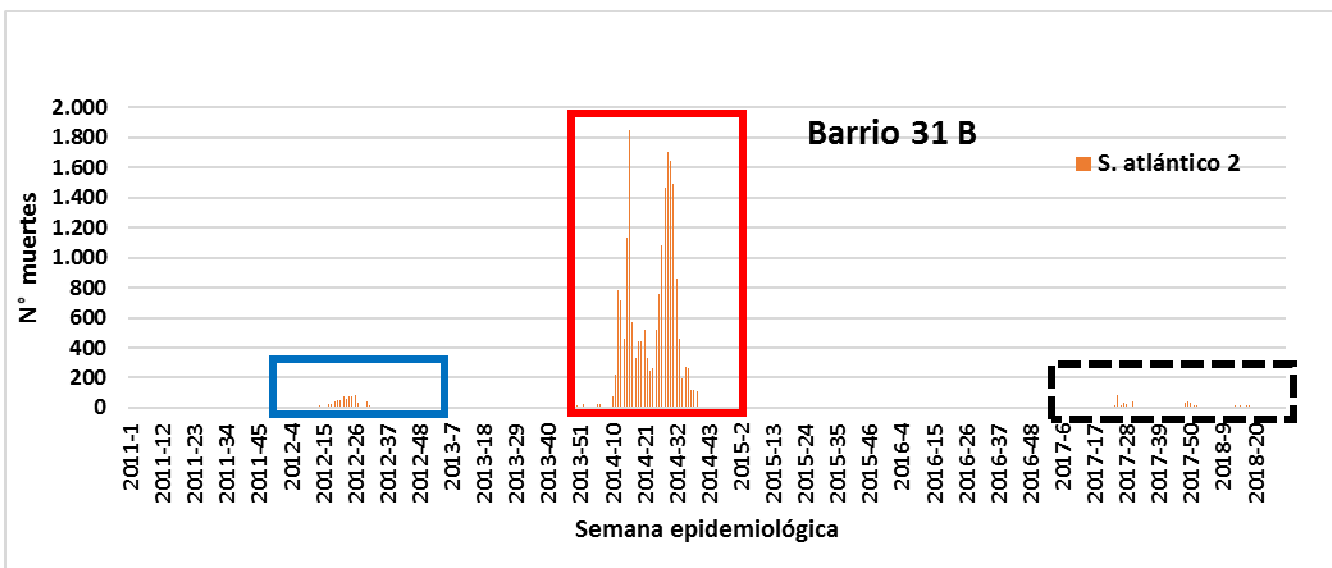
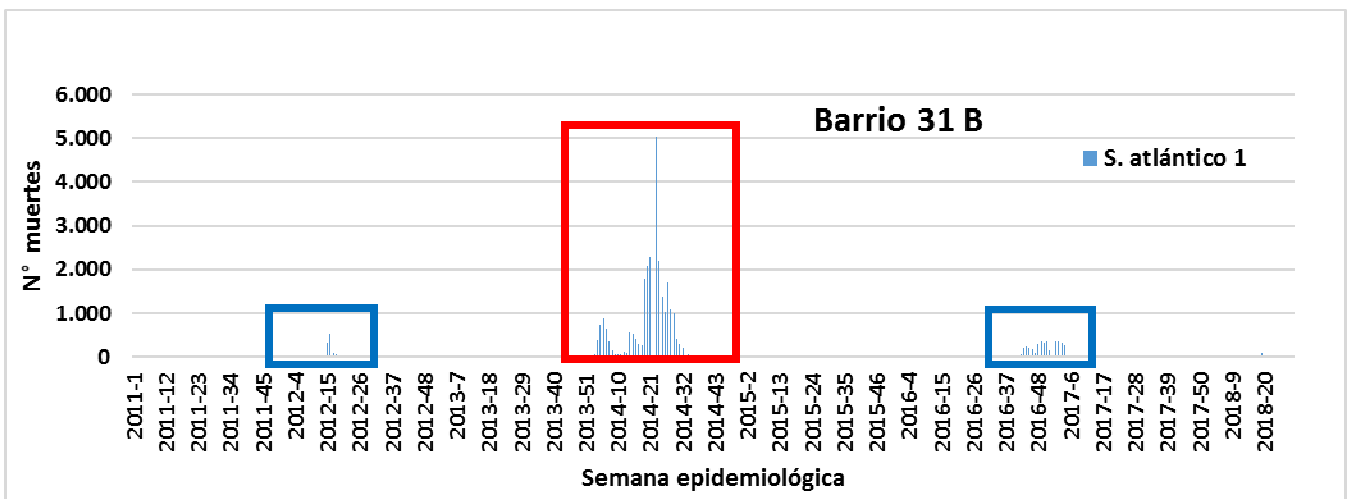
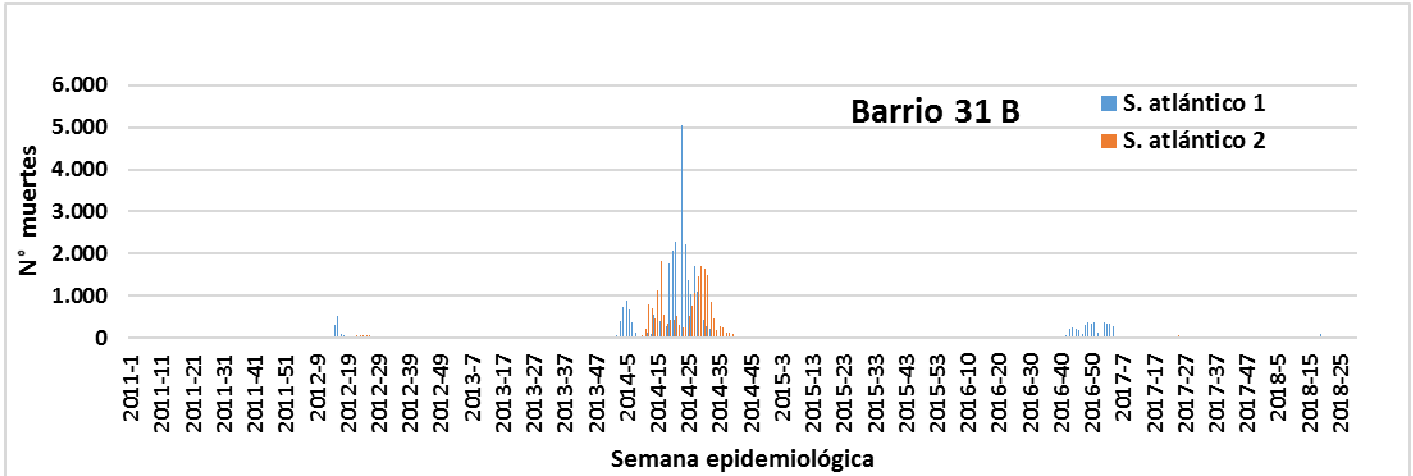


BARRIO 28

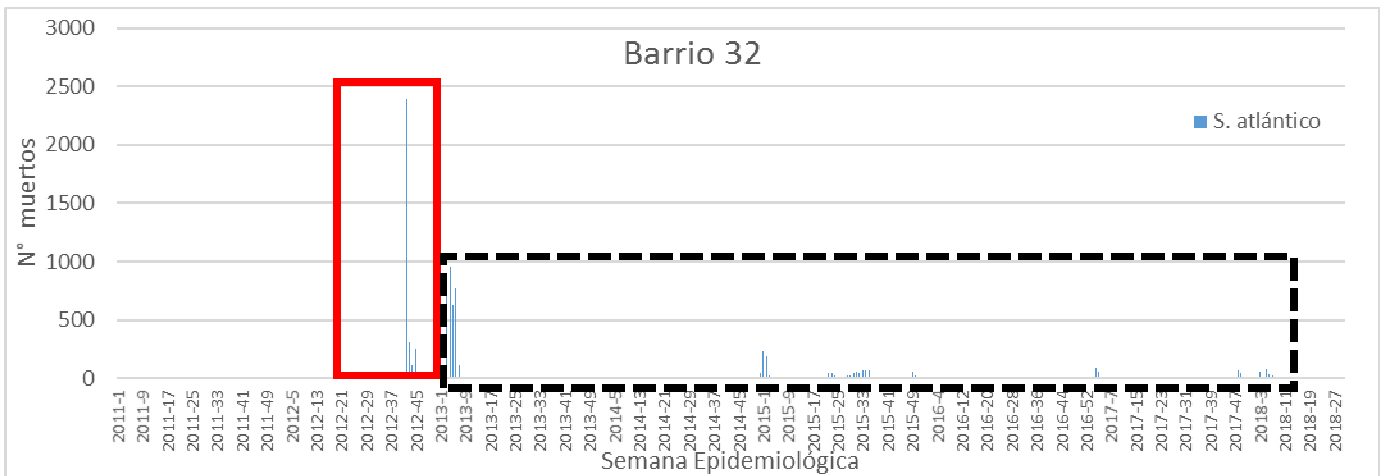
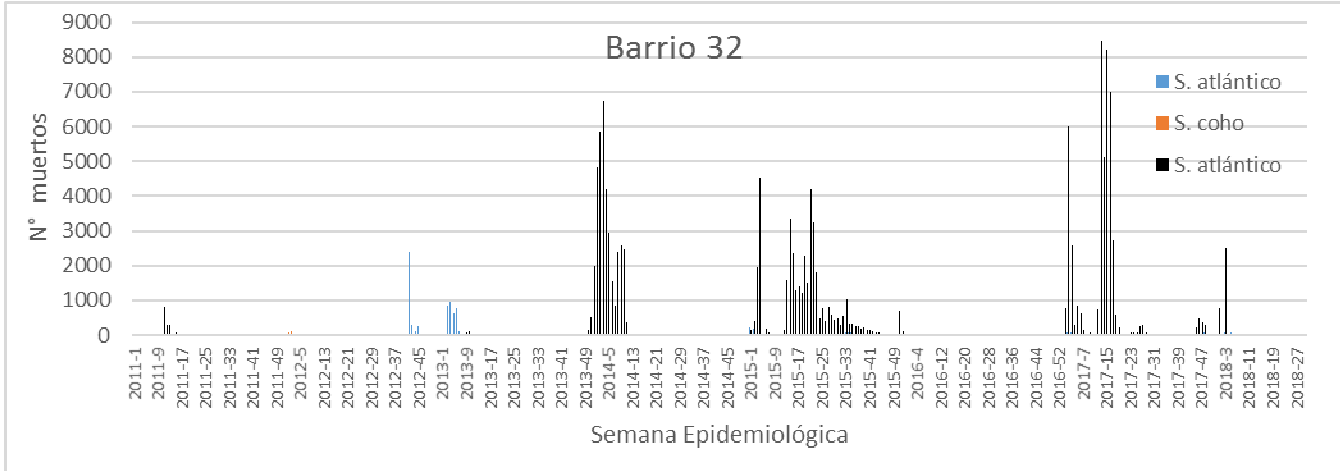


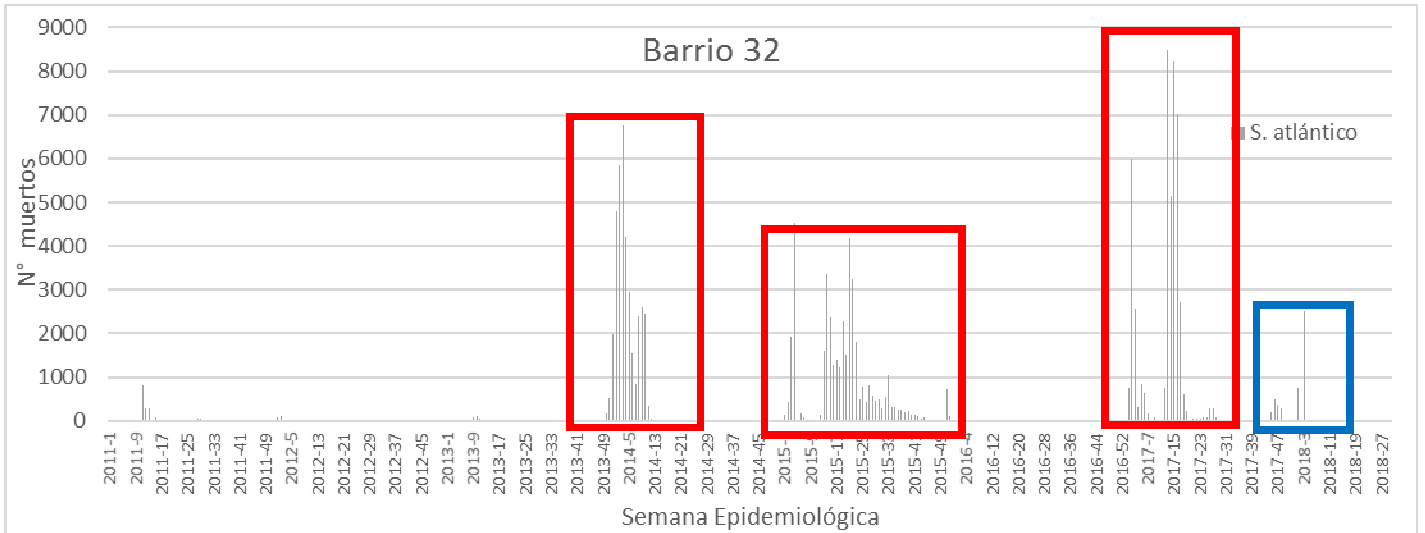


BARRIO 31



BARRIO 32





BARRIO 33

