UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza

Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

VULNERABILIDAD DEL PEJERREY DE MAR (*Odontesthes regia)* FRENTE A *Piscirickettsia salmonis* EN LA DÉCIMA REGÍON, CHILE

Proyecto de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza.

LORENA PILAR VALDÉS OLMOS

Médico Veterinario

SANTIAGO - CHILE.

2016

Apéndice 4. HOJA DE APROBACIÓN DE PROYECTO DE GRADO

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

Profesor Guía

Nombre: Pedro Cattan Ayala

Nota: _____

Firma: _____

Profesor Co-Guía

Nombre: Julio Larenas Herrera

Nota: _____

Firma: _____

Profesor Consejero

Nombre: Alejandro Simeone Cabrera

Nota: _____

Firma: _____

Profesor Consejero

Nombre: Nelson Díaz P.

Nota: _____

Firma: _____

FINANCIAMIENTO

La parte experimental del presente Proyecto de grado, fue financiado a través de los fondos aportados por la empresa, Salmones Humboldt S.A al Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas, perteneciente a la Unidad de Anatomía Patológica, Departamento de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a mis profesores guías Dr. Julio Larenas y Dr. Pedro Cattan por sus importantes aportes en la materialización de este trabajo de investigación y en mi crecimiento profesional. Gracias a los profesores informantes Dr. Alejandro Simeone y Dr. Nelson Díaz por sus observaciones. Agradezco también al Dr. Patricio Retamal por la facilitación de equipamiento, a la Dra. Mariana Acuña por sus aportes en la parte experimental de esta tesis, al Dr. Ricardo Olivares por su colaboración en la identificación anatómica de especies y al Dr. J. Manuel Yañez por la información estadística entregada. Agradezco a Miguel Sepúlveda y Don Manuel Carreño por su buena voluntad y simpatía, a las empresas salmoniculturas que amablemente facilitaron parte del material biológico utilizado en esta tesis. Agradezco muy especialmente a mi amado por que sin su apoyo transversal hubiera sido muy difícil materializar todo lo recorrido para alcanzar el fin de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN IV

SUMMARY V

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Objetivos 3
1.1.1. Objetivo general 3
1.1.2. Objetivos específicos 3

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

2.1. Características de *Odontesthes regia*, Humboldt 1821 (Pejerrey de Mar) 5

2.2. Antecedentes del estado sanitario de *O. regia* 7

2.3. Características relevantes del patógeno en estudio 8

2.4. Las balsas jaulas como "unidades epidemiológicas" 9

3. MATERIALES Y MÉTODOS 10

3.1. Lugar de procesamiento de muestras 10

3.2. Obtención de muestras 10

3.3. Identificación taxonómica de la especie en estudio 13

3.4. Procesamiento de muestras para la realización de nPCR 13
3.4.1. Extracción 13
3.4.2. Cuantificación de ADN 14
3.4.3. Análisis de PCR anidado (nPCR) 14

3.5. Análisis electroforético del nPCR y determinación de presencia de *P. salmonis* 16

3.6. Análisis estadístico de resultados 16

4. RESULTADOS 17

4.1. Identificación taxonómica de los peces en estudio 17

4.2. Presencia de *P. salmonis* en *O. regia* mediante la técnica de nPCR 17

4.3. Asociación de positividad a *P. salmonis* y zonas de muestreo 20

4.4. Evaluación de riesgo de positividad a *P. salmonis* en zonas con centros de cultivo respecto a zonas no concesionadas 21

5. DISCUSIÓN 22

6. CONCLUSIONES 29

7. BIBLIOGRAFÍA 30

8. ANEXOS 40

8.1. Anexo 1. Protocolo de necropsia de pejerreyes de mar para evitar la contaminación cruzada entre órganos al momento de su obtención (modificado de Peirano, 2015) 40

8.2. Anexo 2. Clave de identificación de especies de pejerreyes del sur de Sudamérica, tomada de: Systematic revisión of the South América silversides (Teleostei, Atheriniformes), Dyer B. 2006. 41

8.3. Anexo 3. Reactivos utilizados en la preparación de "master mix" para el 1° y 2° amplificado 45

8.4. Anexo 4. Protocolo estandarizado para el cálculo del total de cada reactivo a utilizar, 1º y 2º amplificación 46

8.5. Anexo 5. Bandas en gel de agarosa que indican positividad a *P. salmonis,* Región del Maule (peces 1, 2, 3, 4, 6) 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de *O. regia* desde Pirua-Perú hasta la región de Aysén – Chile. Fuente: modificado de Dyer (2006). 6

Figura 2. Ubicación referencial de zonas de muestreo. Fuente: elaboración propia. 11

Figura 3. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 1 (Interior balsas jaulas). 19

Figura 4. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 2 (Interior balsas jaulas). 19

Figura 5. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 3 (Inmediaciones centros de cultivo). 19

Figura 6. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 4 (Inmediaciones centros de cultivo). 19

Figura 7. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 5 (Sin concesiones de acuicultura). 20

LISTA DE TABLAS

TABLA N° 1. Zonas de muestreo y número de muestras. 12

Tabla Nº 2: Protocolo estandarizado de ciclos con sus respectivas temperaturas y tiempos utilizados en la primera y segunda amplificación. 15

Tabla Nº 3: Positividad a *P. salmonis* en pejerreyes de mar obtenidos en cinco zonas de muestreo. 18

Tabla Nº 4. Asociación de positividad a *P. salmonis* y zona de muestreo. 20

Tabla Nº 5: Evaluación de riesgo (Odds ratio) de positividad a *P. salmonis* en zonas con centros de cultivo respecto a zonas no concesionadas. 21

RESUMEN

Piscirickettsia salmonis es una bacteria patógena que fue aislada por primera vez en el año 1989 y es el agente etiológico de la enfermedad denominada piscirickettsiosis, considerada como endémica en poblaciones de salmónidos de centros de cultivo en Chile. Sin embargo, existen suficientes antecedentes que dan cuenta de su inespecificidad, encontrándose también en especies acuáticas silvestres, pudiendo generar efectos sobre ellas. En el presente estudio se buscó generar antecedentes que permitan establecer el estado sanitario de pejerreyes de mar (*Odontesthes regia*) respecto a la presencia de *P. salmonis* y así entender mejor la dinámica de la enfermedad en esta población silvestre. Se realizaron muestreos en un total de cinco zonas, considerando cuatro de ellas en la Región de Los Lagos y una en la Región del Maule, esta última sin concesiones de acuicultura. En la zona de concesiones, los peces se obtuvieron desde balsas jaula y áreas cercanas a centros de cultivo de salmones con y sin brotes de piscirickettsiosis respectivamente. Las muestras fueron procesadas mediante la técnica de nPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada), considerando en el análisis hígado, riñón, bazo y heces, para la detección de *P. salmonis*. Los resultados generados mostraron una positividad a *P. salmonis* en el total de las zonas (72%), encontrándose a la bacteria en las heces en la mayor parte de los casos. Para la zona sin concesiones se presentó una positividad del agente de un 83%. Cabe destacar, que en este estudio fue importante la inclusión del análisis en heces para el diagnóstico de *P. salmonis*, dada la probabilidad de ser excretado el agente por esta vía. A partir del análisis estadístico se obtuvo que no existiría una asociación significativa respecto a la positividad presentada a *P. salmonis* en *O. regia* para las zonas con centros de cultivo de salmónidos, no pudiendo atribuir en este estudio como factor de riesgo la interacción de esta especie nativa con los centros de cultivo.

Palabras clave*:* Piscirickettsiosis, Pejerrey silvestre*, Odontesthes regia, Piscirickettsia salmonis*, PCR anidado.

SUMMARY

Piscirickettsia salmonis bacterium, first isolated in 1989, is the causative agent of the Piscirickettsiosis disease, endemic in populations of salmon farms in Chile. However, there is enough evidence to debate its specificity, being also found to affect wild aquatic species. The present study is aimed at providing data that allows to establish the sanitary condition of sea silversides (*Odontesthes regia*) for the presence of *P. salmonis* and thus better understand the dynamics of the disease in this wild population. Sampling took place on five zones, four in the Los Lagos Region and one in the Maule Region, lacking aquaculture concessions. In the four areas with farming license, fish were obtained from cages and areas nearby salmon farming centers with and without Piscirickettsiosis outbreaks respectively. The samples were processed using nPCR technique (nested polymerase chain reaction), where liver, kidney, spleen and faeces were explored to detect *P. salmonis*. The results reported positive to *P. Salmonis* in the total of the areas (72%), and the bacteria was found in the faeces in most cases. Positive samples accounted for 83% in areas without salmon farms. This study was important to include fecal analysis for the diagnosis of *P. salmonis*, given the likelihood of the agent being excreted by this route. From the statistical analysis it was found that there would not be significant association regarding to the positivity presented in *P. salmonis* in *O. regia* for areas with salmon farms, so this can not be attributed in this study as a risk factor generated by interaction between native species and farming centers.

Keywords: Piscirickettsiosis, wild silverside, *Odontesthes regia*, Piscirickettsia salmonis, nestedPCR.

1. INTRODUCCIÓN

La introducción de especies exóticas en un ecosistema puede tener serias implicancias sobre las especies nativas, en especial si se encuentran bajo amenaza de extinción. Al respecto, durante las últimas décadas una serie de epidemias se han producido por la introducción de nuevas especies que han provocado la declinación a gran escala de muchas especies silvestres (Cattau *et al.* 2010; Dobson y Foufopoulos, 2001).

Se ha comprobado que la interacción entre especies domésticas exóticas y silvestres favorece el contagio de enfermedades, existiendo numerosos antecedentes que evidencian las consecuencias de este fenómeno (Dobson y Foufopoulos, 2001; Cleaveland *et al.* 2002; Riley *et al.* 2004; Lobos *et al.* 2005; Millan y Casanova 2007). En este mismo contexto, especies utilizadas con fines científicos, comerciales o para el control biológico han provocado la emergencia de enfermedades infecciosas en nuevas regiones (Medina-Vogel, 2010).

En el caso de las especies acuáticas, los cultivos de peces están ejerciendo un importante rol en el ciclo de vida de algunos patógenos, al concentrar grandes poblaciones de peces en reducidas áreas geográficas o debido al escape de éstos desde los centros de cultivo. Al respecto, en Noruega se ha descrito que el parásito *Lepeophtheirus salmonis* (conocido también como piojo de mar), ha infestado salmónidos silvestres a partir de centros de cultivo (Whelan, 2010; Costello, 2009a; Finstad *et al.* 2000). Otro ejemplo lo constituyen investigaciones realizadas posterior a brotes de la enfermedad Anemia Infecciosa del Salmón en Escocia, identificando la presencia del virus causal en salmónidos silvestres (Raynard *et al.* 2001).

Frente a este panorama, países con sectores acuícolas desarrollados, han tratado de establecer el riesgo de transmisión horizontal de agentes etiológicos entre peces cultivados, peces de cultivo escapados y peces silvestres (IFOP, 2012). En el caso de Chile, Miranda *et al.* (2012) han evaluado el estado sanitario de las especies ícticas silvestres en agua dulce y de mar en la zona sur, donde existen concesiones de acuicultura destinadas al cultivo de salmónidos, pudiendo observar la presencia de patógenos asociados a éstos en especies

silvestres. En relación a lo anterior, existen antecedentes empíricos que evidencian que el pejerrey de mar (*Odontesthes regia*), especie nativa marina de Chile, ingresa al interior de balsas jaulas atraídos por la disponibilidad de alimento presente en forma permanente y egresa posteriormente de las mismas en centros de cultivo de salmónidos, pudiendo constituirse este fenómeno en un factor de riesgo en relación a la propagación de enfermedades infecciosas, ya que dichos centros presentarían brotes de una enfermedad altamente contagiosa e inespecífica denominada Piscirickettsiosis. Esta enfermedad, cuyo agente causal es la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, la cual fue aislada por primera vez en el año 1989 (Fryer *et al.* 1992; Cvitanich *et al.* 1991), es considerada endémica en poblaciones de salmónidos (Campalans *et al.* 1995).

Experimentalmente, se ha demostrado en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) que *P. salmonis* puede ser transmitida vertical y horizontalmente, excretándose por medio de las heces, orina, bilis, fluido seminal y celómico (Almendras y Fuentealba, 1997; Salinas *et al.* 1997; Smith *et al.* 1999; Larenas *et al.* 2003; Larenas *et al.* 2005; Larenas *et al.* 2012). Sumado a lo anterior, estudios a nivel nacional se refieren a la inespecificidad de este agente, ya que se ha encontrado positividad en peces de vida libre asociados a balsas jaulas en centros de cultivo (Correal, 1995; Venegas, 1996; Rozas *et al.* 2009; Miranda *et al.* 2012), lo cual representaría un riesgo para peces silvestres y de cultivo con una probabilidad de mantención del ciclo.

En este entendido, el presente estudio se centró en establecer la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en especímenes de pejerrey de mar en cohabitación con salmónidos al interior de balsas jaulas en centros de cultivo con brotes de Piscirickettsiosis y de pejerreyes en áreas asociadas a éstos, con el fin de generar antecedentes que permitan establecer el estado sanitario de pejerreyes de mar (*Odontesthes regia*) respecto a la presencia de *P. salmonis* y así entender mejor la dinámica de la enfermedad en esta población silvestre.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Establecer la vulnerabilidad de *Odontesthes regia* frente a *Piscirickettsia salmonis* y entender mejor la dinámica de la enfermedad en el ciclo silvestre.

1.1.2. Objetivos específicos

- Pesquisar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces en pejerreyes de mar (*O. regia*) de zonas con y sin concesiones de salmónidos.
- Evaluar una posible asociación entre la presencia de *P. salmonis* en *O. regia* y zonas con centros de cultivo de salmónidos.
- Evaluar la vulnerabilidad de *Odontesthes regia* como especie nativa frente a patógenos que afectan a salmónidos en sistemas de cultivo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las especies introducidas por el hombre son un importante elemento asociado al surgimiento de enfermedades infecciosas en especies silvestres y en el caso de las especies acuáticas los cultivos de peces están ejerciendo un importante rol en el ciclo de vida de algunos patógenos al concentrar grandes poblaciones de peces en reducidas áreas geográficas o debido al escape de éstos desde centros de cultivo. Al respecto en Chile se describe que el pez *Acipenser transmontanus* (Esturión) originario de Estados Unidos ha sido observado en la desembocadura del Río Maipo a partir del año 1999, lo cual sería consecuencia de escapes desde centros de cultivo de esta especie, constatándose que producen depredación de peces silvestres, además de competir con éstas (Brito 1999; Brito 2002).

Respecto a la transmisión de enfermedades en sistema acuáticos, se ha descrito que el parásito *Lepeophtheirus salmonis* (piojo de mar) puede infestar salmónidos silvestres a partir de centros de cultivo (Whelan, 2010; Costello, 2009a; Finstad *et al.* 2000). Otro ejemplo lo constituyen estudios realizados en Escocia (Raynard *et al.* 2001), posterior a brotes de ISA (Anemia Infecciosa del Salmón), que identificaron la presencia del virus causal en salmónidos silvestres. En este escenario, las balsas jaulas permiten una libre circulación de patógenos entre los peces de cultivo y peces silvestres, debido a las altas densidades poblacionales y la permanencia por largos periodos de tiempo en una misma ubicación (Costello, 2009a; Bergh, 2007), lo que implica que un determinado patógeno en estas unidades aumentará de forma exponencial y se liberará en el mismo entorno (Murray, 2008). De esta manera se ve facilitada la transmisión de agentes etiológicos (Murray y Peeler, 2005).

La probabilidad que los agentes patógenos de salmónidos de cultivo interactúen con peces silvestres debe ser evaluada a través del tiempo, además de definir su importancia en las dinámicas poblacionales en el medio acuático (Intesal, 2000). Frente a este panorama, países con sectores acuícolas desarrollados, han tratado de establecer el riesgo de transmisión horizontal de agentes etiológicos entre peces cultivados, de cultivo escapados y silvestres (IFOP, 2012). En el caso de Chile, Miranda *et al.* (2012) realizaron investigaciones

que tuvieron como objetivo establecer una vigilancia de las enfermedades de alto riesgo (EAR) en peces silvestres de cuerpos de agua lacustre, estuarina y marina donde se han establecido las producciones de salmónidos a nivel industrial, correspondientes a las regiones de La Araucanía, Los Ríos, Los Lagos, Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo, Magallanes y Antártica Chilena. De los resultados obtenidos por dichos autores, cabe destacar que de las distintas especies de peces analizados tanto silvestres como asilvestrados (Cabrilla, Chanchorro, Merluza austral, Pejerrey de mar, Robalo, Rollizo, Salmón del Atlántico, Trucha arcoíris y Trucha fario), se evidenció que las zonas de Chiloé Centro, Chiloé Sur y Hornopirén, presentaron una alta prevalencia (45% en promedio) para *P. salmonis*, agente etiológico de piscirickettsiosis. Además, antecedentes previos evidencian la inespecificidad de este agente, ya que se encontró positividad en peces de vida libre asociados a balsas jaulas en centros de cultivo, así como también en moluscos, crustáceos, ectoparásitos y anélidos (Correal, 1995; Venegas, 1996). Sumado a lo anterior, existen antecedentes empíricos que evidencian que pejerreyes de mar (*Odontesthes regia*), atraídos por la disponibilidad constante de alimento presente, ingresan al interior de balsas jaulas y egresan de las mismas en centros de cultivo de salmónidos con brotes de esta enfermedad (Yáñez R., comunicación personal, 13 de marzo, 2013). Al respecto los resultados obtenidos por Sepúlveda *et al.* (2003) sugieren que el cultivo del salmón afecta la distribución, hábitos de alimentación y tipo de alimentos ingeridos por especies nativas, y pueden explicar la gran riqueza de especie de las comunidades de peces nativos que rodean los centros de cultivo de salmónidos. Este fenómeno se puede constituir en un factor de riesgo en relación con la propagación de enfermedades infecciosas como la mencionada, ya que se han encontrado pejerreyes en centros de cultivo (moribundos y/o muertos) que han presentado signología compatible con piscirickettsiosis, signología que ha sido descrita previamente por Larenas *et al.* (1995) en salmónidos.

2.1. Características de *Odontesthes regia*, Humboldt 1821 (Pejerrey de Mar)

El pejerrey de mar pertenece al género *Odontesthes,* el cual está compuesto por unas 20 especies, con a lo menos siete especies nativas en Chile y una introducida. Su distribución es desde el norte de Perú (Piura) hasta el sur de Chile (Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo), siendo la especie de pejerrey sudamericano con mayor extensión latitudinal (Dyer, 2006) (fig. 1). Posee hábitos pelágicos desplazándose en pequeños

cardúmenes cercanos a la costa entre 0 y 50 m de profundidad (Pavez *et al.* 2008). Estudios sobre la alimentación del pejerrey señalan que la dieta de *O. regia* es de tipo omnívora (Lorenzen *et al.* 1979), consumiendo alimento tanto en la columna de agua como en el fondo. Consume especies tanto del bentos (anfípodos y poliquetos) como del plancton (copépodos calanoideos y larvas zoeas), además de plantas (Brintrup *et al.* 2012). En relación a lo anterior, Barría (2007) indica que existen diferencias en sus preferencias alimenticias durante las distintas épocas del año (ej. verano: bivalvos; otoño: gasterópodos; invierno: poliquetos y gasterópodos), siendo los crustáceos consumidos en los tres periodos estacionales.

Figura 1. Distribución de *O. regia* desde Piura-Perú hasta la Región de Aysén – Chile. Fuente: Modificado de Dyer (2006).

El pejerrey de mar desova en la boca de estuarios, donde posteriormente se desarrollarán los juveniles (Campos y Moreno 1985; Fischer, 1963; Ruiz, 1991). Esta especie realiza varias tandas de desove durante todo el año, especialmente entre octubre y noviembre (Gómez *et al.* 2006). Sus ovas se distinguen por ser de gran tamaño presentando abundantes filamentos coriónicos (Parenti, 2004; Parenti y Grier, 2004) que le dan la consistencia de un racimo, pudiendo ser fácilmente adheridas a algún sustrato, como macrófitas, presentes en ambientes estuarinos (Chirinos y Chuman, 1964). En el caso de *O. regia,* lo mencionado sería una estrategia reproductiva para reducir la dispersión larval de su progenie y favorecer su retención en aguas someras y a su vez para compensar su relativamente baja fecundidad (Pavez *et al.* 2008).

Respecto al estado de conservación del pejerrey de mar a nivel global, la UICN (Reis *et al.* 2013) lo cataloga como de preocupación menor (LC), con una población de tendencia estable. No obstante, a nivel nacional los datos oficiales informados por SERNAPESCA (2013) respecto al desembarque artesanal de este pejerrey como recurso en la Región de Los Lagos, desde el año 1998 al 2012, presentan una marcada variabilidad con tendencia a la disminución. Cabe señalar, que esta región aportó el 50% del desembarque total del país hasta el año 2005 (Brintrup *et al.* 2012). Esta disminución en los desembarques, impulsó la instauración de dos iniciativas que permitiesen un ordenamiento sustentable de esta pesquería. La primera se trató del establecimiento de una cuota global anual de 800 toneladas (SUBPESCA N° 43, 2008) y posteriormente una veda extractiva durante tres años (2009 al 2011), (SUBPESCA N° 79, 2009).

2.2. Antecedentes del estado sanitario de *O. regia*

Como se ha mencionado con anterioridad, se presentan escasos estudios que establezcan el estado sanitario del pejerrey de mar, remitiéndose sólo a estudios parasitológicos que reportan la presencia de endoparásitos tales como *C. rudolphii, Microspora sp., Corynosoma sp.,* con prevalencias del 92%, 20% y 12% respectivamente, entre otros taxones (Barría, 2007); además de estudios que han descrito la presencia del ectoparásito *Caligus rogercresseyi* (Carvajal *et al.* 1998), el cual afecta marcadamente a salmones cultivados en el mar en Chile (Bronchuer, 2010). Respecto a la ocurrencia de enfermedades infecciosas en el pejerrey de mar, Miranda *et al.* (2012) han reportado una positividad del 27,18% de la

bacteria *P. salmonis* en las regiones de la Araucanía, Los Ríos, Los Lagos, Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo y Magallanes. Mientras que para el caso particular de la Región de Los Lagos se reportó una positividad del 16,4%, considerando seis zonas de muestreo (Chiloé norte, Chiloé sur, Chiloé centro, Estuario del Estero Reloncaví, Seno de Reloncaví y Hornopirén). Además, Vargas (2014) obtuvo una positividad del 78,5% en un total de 14 pejerreyes muestreados en tres zonas de la Región de los Lagos (Estuario del Estero Reloncaví, Hornopirén y Castro).

2.3. Características relevantes del patógeno en estudio

La bacteria *P. salmonis* fue aislada por primera vez en el año 1989 (Fryer *et al.* 1992; Cvitanich *et al.* 1991) y es el agente causal de la Piscirickettsiosis considerada como endémica en poblaciones de salmónidos (Campalans *et al.* 1995). Dicha enfermedad fue descrita por primera vez en el sur de nuestro país en la comuna de Calbuco, Provincia de Llanquihue de la Región de Los Lagos (Bravo y Campos, 1989; Larenas *et al.* 1995) y ha provocado cuantiosas pérdidas económicas en sistemas de cultivo de salmónidos debido a las altas tasas de mortalidad y costos de tratamiento (Larenas *et al.* 2012). Las vías de transmisión de la piscirickettsiosis aún no están claramente definidas (Larenas *et al.* 2012) y se desconoce su forma de diseminación en ambientes naturales. Sin embargo, se puede afirmar que todas las especies de salmónidos mantenidas en cultivo son susceptibles al contagio horizontal producto de la cohabitación de peces sanos con peces infectados, lo que se incrementa con altas densidades poblacionales (Salinas *et al.* 1997).

Experimentalmente se ha demostrado que *P. salmonis* puede ser transmitida vertical y horizontalmente, excretándose por medio de las heces, orina, bilis, fluido seminal y celómico (Almendras y Fuentealba, 1997; Salinas *et al.* 1997; Smith *et al.* 1999; Larenas *et al.* 2003; Larenas *et al.* 2005; Larenas *et al.* 2012). Por otro lado, estudios a nivel nacional se refieren a la inespecificidad de este agente, ya que se ha encontrado positividad en peces de vida libre asociados a balsas jaulas en centros de cultivo, tal como la cabrilla (*Paralabrax humeralis*) y el jurel (*Trachurus murphyi*), así como también en otras especies silvestres asociadas como choritos (*Mytilus chilensis*), picorocos (*Balanus psittacus*), copépodos de vida libre y poliquetos (Venegas, 1996; Correal, 1995). Del mismo modo Miranda *et al.* (2012) demostraron positividad al agente en peces silvestres asociados a sistemas de cultivo

de salmónidos. Además, Vargas (2014) incluyó también en sus análisis a *Caligus rogercresseyi* encontrando que este ectoparásito presenta positividad a *P. salmonis*.

2.4. Las balsas jaulas como "unidades epidemiológicas"

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2013) ha definido a las balsas jaulas como "unidades epidemiológicas" capaces de mantener, dadas las condiciones, a un patógeno como residente y ser una fuente de los mismos. En este contexto, el hecho que las balsas jaulas sean un elemento de atracción permanente para las especies de peces silvestres debido a la disposición constante de alimento, hace que se genere una interacción estrecha entre especies silvestres y alóctonas, y en el caso específico de centros con brotes de Piscirickettsiosis, esta interacción reviste gran importancia dada la inespecificidad demostrada del agente causal de la enfermedad, como se mencionó en el punto 2.3.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de procesamiento de muestras

El presente estudio se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas, perteneciente a la Unidad de Anatomía Patológica, Departamento de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

3.2. Obtención de muestras

Se obtuvo un total de 52 pejerreyes (*Odontesthes regia*) desde dos centros de cultivo con brotes de Piscirickettsiosis en el interior de sus balsas jaulas y en las proximidades de otros dos centros de cultivo de la Décima Región de Los Lagos. Además se obtuvieron especímenes desde una zona sin concesiones de cultivo de especies salmónidas como grupo control, en la Región del Maule. El número de individuos se estableció en base a una prevalencia del 20% considerando un intervalo de confianza del 95% mediante el software Win-Epi 2.0 y basado en los resultados obtenidos por IFOP (2012), donde obtuvieron un 27,18% de prevalencia a *P. salmonis* en el pejerrey de mar.

Los individuos obtenidos del interior de balsas jaulas fueron escogidos sin criterio establecido (pues no presentaban signología externa compatible con Piscirickettsiosis) y se sacaron desde la mortalidad fresca de salmónidos que se extrae diariamente en los centros de cultivo. Los pejerreyes obtenidos en las inmediaciones de centros de cultivo, se capturaron mediante pesca directa con caña de pescar y anzuelo Nº 2/0 o con red de enmalle de 2 pulgadas. Los especímenes para el grupo control se obtuvieron también a partir de pesca con caña y anzuelo Nº 2/0. Todos los pejerreyes utilizados en este estudio correspondieron a adultos con un longitud promedio de 25 cm (Anexo 2, figura A1(a)). En la figura 2 se representa la ubicación referencial de las zonas de muestreo.

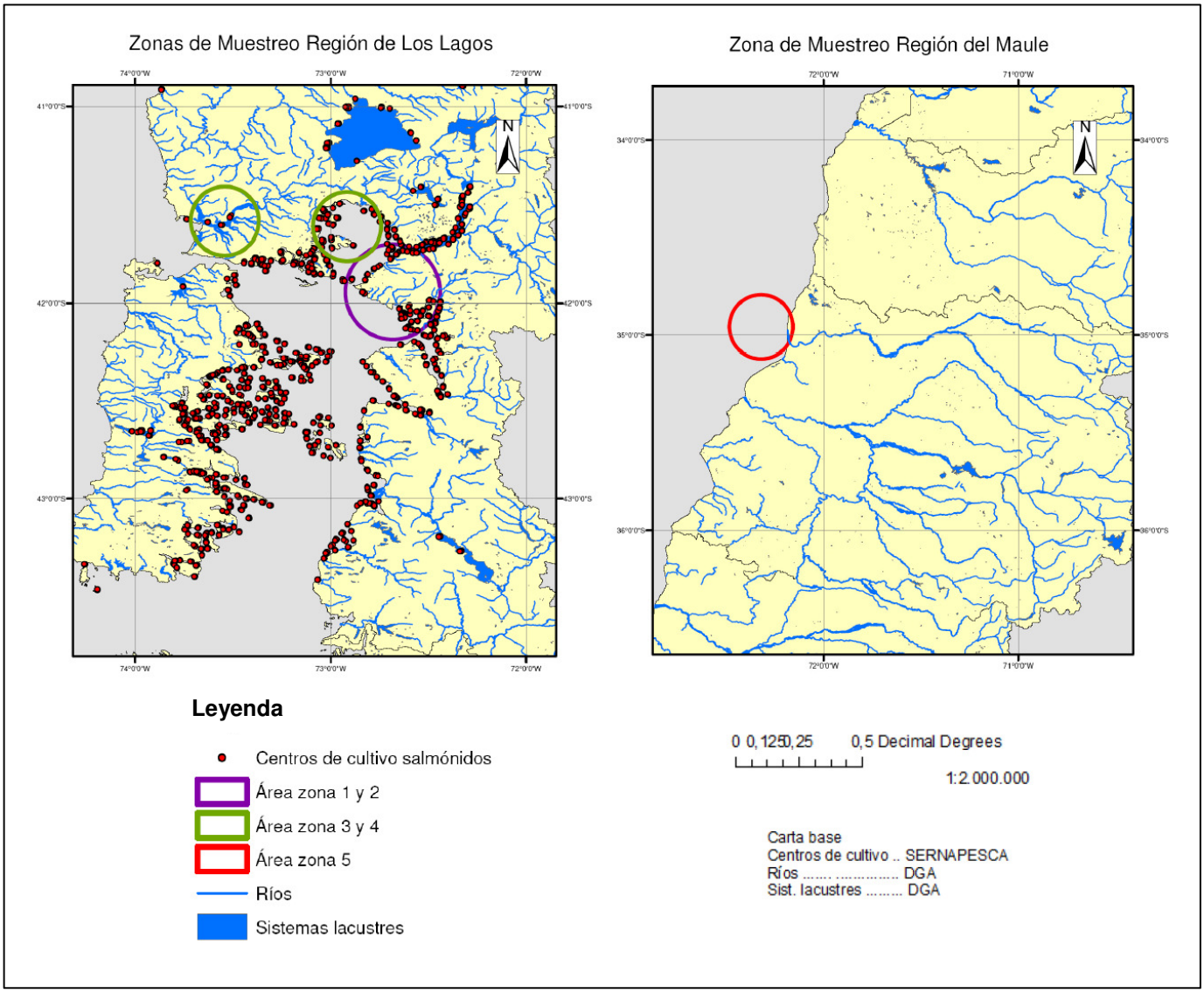

Figura 2. Ubicación referencial de zonas de muestreo, el círculo morado incluye a las zonas 1 y 2 (Interior balsas jaulas), círculos verdes corresponde a las zonas de muestreo 3 y 4 (inmediaciones a centros de cultivo) y el círculo rojo indica la zona de muestreo 5 (sin concesiones). Fuente: Elaboración propia.

El número de individuos obtenidos se presenta en la tabla N°1, donde se indica las zonas muestreadas las cuales fueron denominadas y numeradas de forma arbitraria como Z1 (n=8), Z2 (n=14), Z3 (n=14), Z4 (n=10) y Z5 (n=6). Además se hace una breve descripción de éstas.

Tabla N° 1. Zonas de muestreo y número de muestras.

Zonas de muestreo	Descripción	Región	Nº de peces muestreados
Z1	Interior balsas jaula	De los Lagos	8
Z2	Interior balsas jaula	De los Lagos	14
Z3	Inmediación centro de cultivo	De los Lagos	14
Z4	Inmediación centro de cultivo	De los Lagos	10
Z5	Zona sin concesiones	Del Maule	6
		Total	**52**

Los peces muestreados se trasladaron al laboratorio, preservados en etanol al 70% para lo cual se les realizó una incisión por la zona ventral desde las aletas pectorales hasta antes del poro anal, de tal forma que el alcohol penetrara y así se fijaran todos los órganos de los peces. Posteriormente, se realizó la necropsia de cada individuo de acuerdo con un protocolo diseñado y utilizado previamente por Peirano (2015) con el fin de evitar la contaminación cruzada entre órganos al momento de su obtención (Anexo 1). Para el procedimiento de necropsia se siguieron los lineamientos establecidos para salmónidos según Acuña *et al*. (2014) incorporando leves modificaciones respecto a diferencias anatómicas propias de la especie en estudio. De esta manera, y para evitar una contaminación cruzada en el proceso se obtuvieron las muestras de interés en el siguiente orden: hígado, bazo, riñón y heces. Las heces fueron obtenidas mediante compresión mecánica del intestino posterior. Las muestras de 1 cm^3 aproximadamente de cada órgano y las muestras de heces se colocaron en tubos de muestreo de una capacidad máxima de 5 mL y que contenían 2 mL de etanol al 70%. Los tubos se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento.

Al finalizar las necropsias de todos los pejerreyes, en cada una de las zonas de muestreo, se incorporó un control negativo utilizando hamburguesa de vacuno para verificar que no hubo contaminación cruzada entre los órganos muestreados.

3.3. Identificación taxonómica de la especie en estudio

La identificación taxonómica se realizó con la clave de Dyer (2006), para la identificación de especies de pejerreyes del sur de Sudamérica, digitalizándose las observaciones anatómicas y osteológicas más características de la especie (Anexo 2). En este proceso se destaca la medición de la longitud total (LT) de los individuos, identificación de estructuras óseas tales como: hueso urohial y embudo hemal de tipo cuatro, lo cual se logró a partir de la debridación de la musculatura hasta acceder a las estructuras óseas. Además se identificó la presencia de dientes vomerinos y dientes faríngeos no molariformes mediante observación directa de la cavidad bucal. También se observaron las escamas mediante microscopía óptica, correspondiendo éstas al tipo cicloide con imbricación normal y extremo posterior libre; se observó además 4 hileras de escamas suborbitales mediante observación directa. Respecto a las aletas se estableció la presencia de 2 aletas dorsales, presencia de aletas pectorales, pélvica y anal, con una aleta caudal amarilla con márgenes más oscuros.

3.4. Procesamiento de muestras para la realización de nPCR

3.4.1. Extracción

Las muestras de hígado, riñón, bazo, heces sumado a la incorporación de controles de extracción (hamburguesa de vacuno) fueron sometidas a un proceso de extracción de ADN mediante la utilización de un "kit" Wizard® (Promega®), de acuerdo a un protocolo previamente estandarizado en el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Especies Hidrobiológicas y siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante. En forma resumida el procedimiento consistió en lisis celular, precipitación proteica y purificación del ADN. Para ello se utilizó 20 mg de cada órgano. Para la lisis celular se empleó 600 µL de la solución "Nuclei Lysis Solution" y se homogeneizó el tejido de forma manual mediante pistilos dentro de tubos eppendorf de 1,5 mL. El lisado obtenido se incubó a 65 ºC por 20 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min. Luego se incorporó 3 µL de la solución "RNAse Solution", se incubó la mezcla a 37 ºC por 20 min y luego se enfrió por 5 min en hielo. Se añadió 200 µL de la solución "Protein Precipitation Solution", se agitó en vórtex a alta velocidad por 20 seg., luego se centrifugó por 5 min a 14.000 x *g* en la Super Mini Centrífuga Mini (Lab- tec®) formándose un "pellet" blanco correspondiendo a la

proteína precipitada, seguidamente se removió con cuidado el sobrenadante que contenía el ADN y fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 mL donde se agregó 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. El tubo fue mezclado suavemente por inversión hasta que se formarán estructuras fibrilares de ADN, luego se centrifugó por 5 min a 14.000 x *g* a temperatura ambiente, obteniéndose al final de la centrifugación un pequeño "pellet" de color blanco. Se procedió a eliminar suavemente el sobrenadante invirtiendo el tubo y se añadió 600 µL de etanol 70% a temperatura ambiente, se invirtieron suavemente los tubos varias veces para lavar el ADN, se centrifugó por 5 min a 14.000 x g a temperatura ambiente y se eliminó el etanol cuidadosamente invirtiendo los tubos. Posteriormente se pusieron los tubos sobre papel absorbente por 15 min, se les agregó 100 µL de "ADN Rehydration Solution", se incubó durante toda la noche a 4°C período después del cual los extractos fueron mantenidos a -20 °C.

3.4.2. Cuantificación de ADN

Una vez realizada la extracción del ADN de las muestras, se procedió a realizar su cuantificación mediante fluorometría empleando el equipo Quantus™ Fluorometer, utilizando un "kit" exclusivo para éste (Quantifluor ® ds ADN System, Promega®).

3.4.3. Análisis de PCR anidado (nPCR)

Para la determinación de la presencia de *P. salmonis* se realizó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (nPCR), basándose en el Manual de Pruebas Diagnósticas para Animales Acuáticos de la OIE (2006), Mauel *et al*. (1996) y de acuerdo a modificaciones realizadas en el laboratorio (Peirano, 2015). El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el interior de una campana de bioseguridad clase II con un sistema de flujo laminar horizontal (BIOBASE; mod.11231 BBC86).

El nPCR se realizó mediante la constitución de un "master mix" de trabajo para lo cual se utilizó: Gotaq® Colorless master mix (constituido por Taq polimerasa, dNTPs, MgCl y "buffer" de reacción), agua libre de Nucleasas, 2 primers generales para el primer amplificado: EubA $_{(1518R)}$ y EubB $_{(27F)}$ (partidores universales de ADNr 16S bacteriano) y dos primers específicos para el segundo amplificado: PS2S$_{(223F)}$ y PS2AS$_{(690R)}$ (diseñados a partir de la secuencia del ADNr 16S de cinco cepas de *P. salmonis*: LF-89, EM-90, ATL-4-91, NOR-92, SLGO-94).

Las cantidades estandarizadas de cada reactivo utilizado y la secuencia de los primers se presentan en Anexo 3.

La constitución del "master mix" para el procesamiento de las muestras, se realizó en un tubo Eppendorf de 1,6 mL libre de ADNsas, en todo momento los reactivos se mantuvieron en frío en un "rack" (IsoFreeze®) para conservar la estabilidad de la enzima Taq polimerasa. El cálculo del total de cada reactivo utilizado se realizó mediante un protocolo estandarizado (Anexo 4). La cantidad total del "master mix" de trabajo utilizado por muestra fue de 24 µL y la cantidad de cada muestra sometida a análisis fue de 1 µL. Tanto el "master mix" de trabajo como el ADN de cada muestra fueron colocados dentro de tubos de 0,2 mL. Posteriormente, se procedió a centrifugar los tubos en una microcentrífuga (Capp rondo® modelo CR68X) por 20 seg a 30 rpm. Cabe mencionar que en el segundo amplificado se utilizó 1 µL de los productos del primer amplificado. En el nPCR se incluyó un control negativo (agua libre de nucleasas) y uno positivo (extracto de ADN de *P. salmonis* de la cepa LF-89, proveniente de un cultivo en la línea CHSE-214). Tanto la primera como la segunda amplificación se realizó en un termociclador PCR Touch 960 (Zhejiang Scientific Instruments & Materials Import & Export Co., Ltd. ®), empleando un protocolo estandarizado de ciclos con sus respectivas temperaturas (Tabla Nº 2).

Tabla Nº 2: Protocolo estandarizado de ciclos con sus respectivas temperaturas y tiempos utilizados en la primera y segunda amplificación.

1 º amplificación		Temperatura (ºC)	Tiempo (min)	Nº de ciclos
1	Denaturación	94	2	1
2	Denaturación	94	1	35
3	Hibridación	60	2	
4	Extensión	72	3	
2 º amplificación		**temperatura (ºC)**	**tiempo (min)**	**Nº de ciclos**
1	Denaturación	94	2	1
2	Denaturación	94	1	35
3	Hibridación	65	2	
4	Extensión	72	3	

Una vez obtenidos los productos del nPCR fueron almacenados a -20 ℃ hasta el momento de la electroforesis.

3.5. Análisis electroforético del nPCR y determinación de presencia de *P. salmonis*

Para el análisis de los productos de nPCR se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, al cual se le incorporó 5 µL de una tinción fluorescente de ADN (GelRed®, Biotium). Para la carga de las muestras, se utilizó 5 µL de ADN amplificado (diluido previamente en la siguiente proporción: 1 µL de ADN en 10 µL de TBE 1x) y 2 µL del "buffer de carga" Orange/Blue Loading Dye 6X (Promega®). Además, en todas las electroforesis se utilizó 2 µL de un marcador de peso molecular con un rango entre 100 pb a 3.000 pb (AccuRuler 100 pb ADN RTU Ladder, Maestrogen®) utilizado como referencia en el primer y último bolsillo de cada gel, más 2 µL del "buffer de carga". Todas las corridas de los geles se realizaron en una cámara de electroforesis (Fermelo®) con una fuente de poder modelo Voltronyk reactor-37 (Nyx Technik®) a 80 V por 45 minutos. Para la visualización de las bandas se utilizó un equipo de fotodocumentación BioTop® modelo Biosens SC750 (Lab-tec®) que induce fluorescencia a una longitud de onda de 312 nm. Las muestras analizadas se consideraron positivas a *P. salmonis* cuando se visualizó una banda de 467 pares de base (467 pb).

3.6. Análisis estadístico de resultados

La posible asociación entre la positividad presentada y la zona de muestreo se evaluó con el Test Exacto de Fisher (Gómez-Biedma 2001, Yañez J.M, comunicación personal, 15 de agosto 2015), comparando las áreas con concesiones (al interior de centros y cercanas a éstos) respecto de la zona no concesionada (área de control) con un nivel de significancia $p<0,05$. Igualmente, la evaluación de riesgo de presentar positividad a *P. salmonis* en zonas donde se emplazan centros de cultivo, se llevó a cabo considerando los muestreos en las áreas que presentan concesiones y comparándolos respecto a la zona de control. Para lo anterior, se empleó el estadístico Odds ratio (Cerda *et al.* 2013) considerando un nivel de significancia $p< 0,05$ y usando el software estadístico SPSS 23. Un riesgo alto se presenta cuando el OR es >1, un riesgo bajo se asocia a un OR <1 y cuando la exposición no afecta las probabilidades de los resultados el OR es =1. Lo mencionado se cumple siempre y cuando en el intervalo de confianza entregado en el análisis no esté contenido el número uno.

4. RESULTADOS

4.1. Identificación taxonómica de los peces en estudio

Mediante el proceso de identificación taxonómica se pudo confirmar que los individuos muestreados se correspondían con la especie de interés *O. regia*, de acuerdo a la clave de identificación de especies de pejerreyes del sur de Sudamérica aportada por Dyer (2006) (Anexo 2). Al respecto, se identificaron estructuras óseas y anatómicas características de la especie, como es el embudo hemal de tipo cuatro (Anexo 2, fig. A1:b), el hueso urohial con la placa ventral expandida en forma ovalada (Anexo 2, fig. A1:f), presencia de dientes faríngeos no molariformes (Anexo 2, fig. A1:e), además de dientes vomerinos (Anexo 2, fig. A1:d). La imbricación de las escamas en la zona craneal por dorsal, correspondió al tipo normal y mediante microscopía óptica se evidenció que correspondían a escamas de tipo cicloideas con un margen posterior libre (Anexo 2, fig. A3), también se observó la presencia de cuatro hileras de escamas suborbitales (Anexo 2, fig. A4).

4.2. Presencia de *P. salmonis* en *O. regia* mediante la técnica de nPCR

De los 52 pejerreyes de mar muestreados, 46 se obtuvieron en zonas concesionadas (Z1, Z2, Z3, Z4) y seis desde zonas sin concesiones de acuicultura (Z5). En la tabla Nº 3 se presenta el porcentaje de positividad a *P. salmonis* por zona de muestreo. Al respecto, se consideró positivo a un individuo si al menos en una de las muestras analizadas (hígado, riñón, bazo y/o heces) se visualizaba una banda de 467 pb.

Tabla Nº 3: Positividad a *P. salmonis* en pejerreyes de mar obtenidos en cinco zonas de muestreo.

Zona de muestreo	Nº individuos muestreados Por zona	Porcentaje de positividad a *P. salmonis* por zona
Z1	8	38%
Z2	14	64%
Z3	14	93%
Z4	10	80%
Z5	6	83%

(Z1=Zona 1 y Z2= Zona 2 (Interior balsas jaula); Z3= Zona 3 y Z4=Zona 4(Inmediación centro de cultivo); Z5 =Zona 5 (Zona sin concesiones).

Como se puede apreciar, para Z3 se obtuvo el mayor porcentaje de positividad a *P. salmonis* con un 93% seguido de Z4 con 80% de positividad, ambas zona localizadas en las inmediaciones de centros de cultivo. En las zonas donde se obtuvieron los individuos al interior de balsas jaulas en centros de cultivo se obtuvo un 64% de positividad para Z2 y 38% para Z1, dando un promedio de positividad de 68,8% en las cuatro zonas. Por otra parte en Z5, donde nunca han existido concesiones para la acuicultura, se obtuvo un 83% de positividad a *P. salmonis.*

Respecto de la positividad a *P. salmonis* detectada en hígado, riñón, bazo y heces en los pejerreyes de las cinco zonas de muestreo (figuras 3 al 7) la mayor positividad se presentó en riñón con un 47,6% e hígado con un 38,7%, el bazo presentó un menor porcentaje de positividad con un 23,9%. En relación a las heces se detectó una importante positividad de un 31,3% promedio para las cinco zonas, destacando Z3, Z4 y Z5 con un porcentaje de positividad del 40%, 42,9% y 66,7% respectivamente.

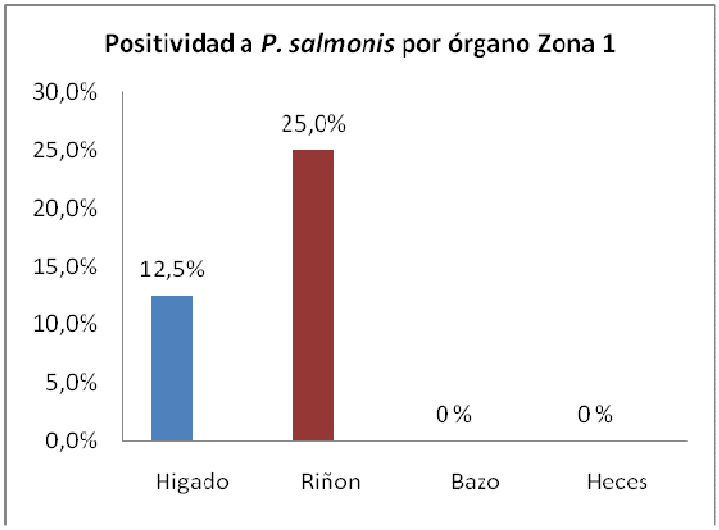

Figura 3. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 1 (Interior balsas jaulas).

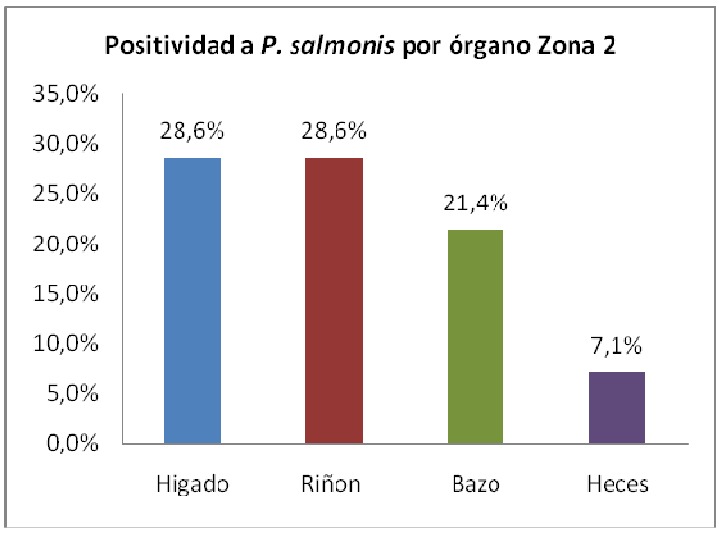

Figura 4. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 2 (Interior balsas jaulas).

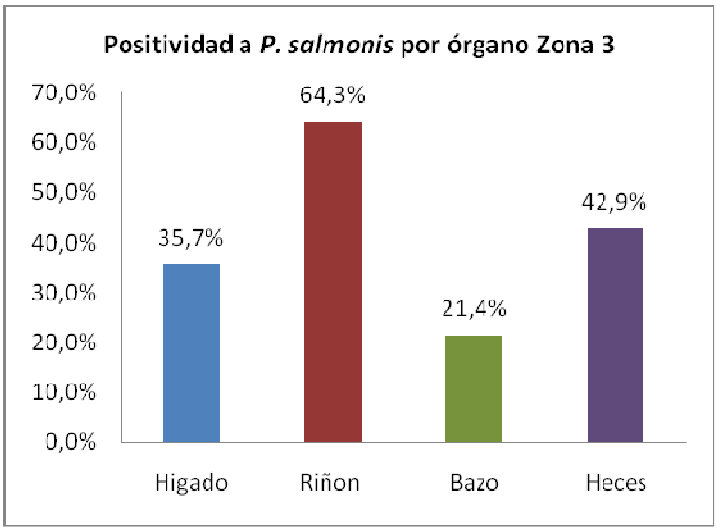

Figura 5. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 3 (Inmediaciones centros de cultivo).

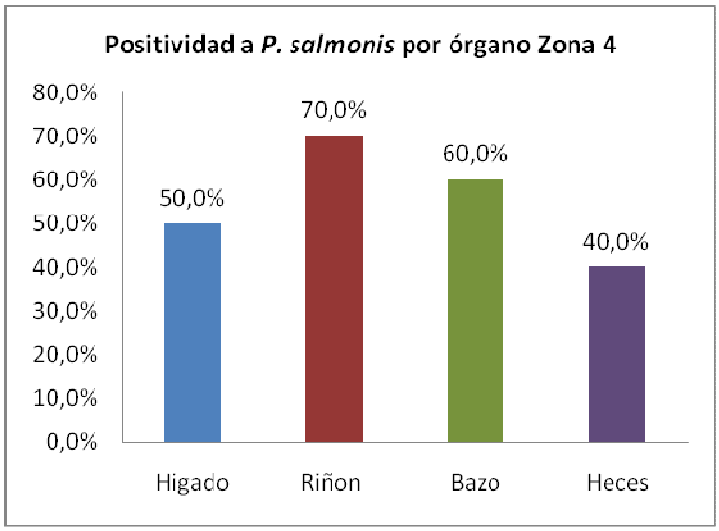

Figura 6. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 4 (Inmediaciones centros de cultivo).

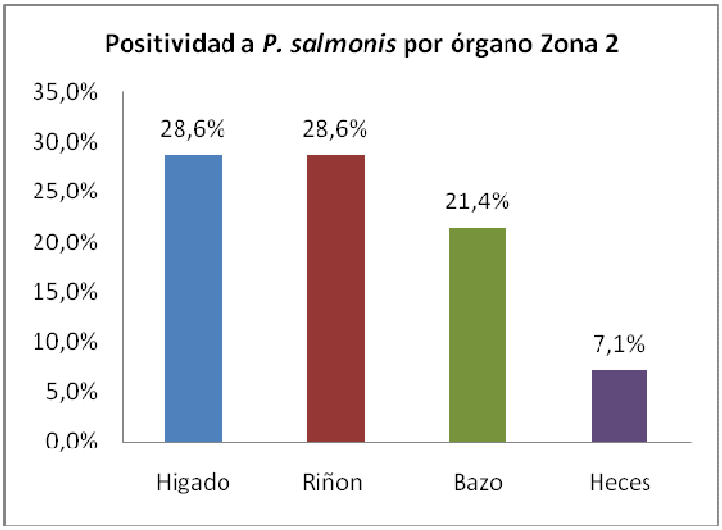

Figura 7. Positividad a *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces de *O. regia* muestreados en Zona 5 (Sin concesiones de acuicultura).

4.3. Asociación de positividad a *P. salmonis* y zonas de muestreo

Como se puede apreciar en la tabla Nº 4, no se encontró asociación significativa entre los pejerreyes de mar que fueron positivos a *P. salmonis* y la zona de muestreo.

Tabla Nº 4. Asociación de positividad a *P. salmonis* y zona de muestreo*.

Zona de muestreo	Zona control	Nivel de significancia	Valor "p" obtenido
Z1	Z5	p<0,05	0,13753
Z2			0,61262
Z3			0,52105
Z4			1,00000

*Análisis mediante Test Exacto de Fisher

4.4. Evaluación de riesgo de positividad a *P. salmonis* en zonas con centros de cultivo respecto a zonas no concesionadas

Los resultados obtenidos con la prueba de evaluación de riesgo, indican que la probabilidad de presentación de *P. salmonis* en *O. regia* no depende de la presencia de centros de cultivo de salmónidos (Tabla Nº 5).

Tabla Nº 5: Evaluación de riesgo (Odds ratio) de positividad a *P. salmonis* en zonas con centros de cultivo respecto a zonas no concesionadas.

Zona de muestreo	Zona control	Valor de OR	Intervalo de confianza	Nivel de significancia	Valor "p" obtenido
Z1	Z5	0,1200	0,0091 – 1,5844	p<0,05	0,1073
Z2		2,6000	0,1351 – 50,0513		0,5266
Z3		0,3600	0,0324 – 4,0057		0,4059
Z4		0,4667	0,0369 – 5,9028		0,5561

5. DISCUSIÓN

La salmonicutura en Chile se inicia con la primera importación de ovas de salmón en el año 1905 provenientes desde Alemania de las especies *Salmo salar*, *Salmo trutta fario, Salvelinus alpinus* y *Oncorhynchus mykiss.* En dicho periodo se llegó a incorporar un total de 750.000 ovas, obteniéndose una primera producción de 200.000 peces (de 5 cm aprox.) a partir de 350.000 ovas, estos salmones fueron distribuidos a lo largo del país en diferentes ríos, tales como Aconcagua (Región de Valparaíso), Paine (Región Metropolitana), Tinguiririca y Ligüemo (ambos de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins), Maule (Región del Maule), Cautín y Toltén (ambos de la Región de la Araucanía). Posteriormente, una nueva producción de 170.000 peces se distribuyó entre los ríos mencionados, además de los ríos Angostura (Región Metropolitana), Calle-Calle y Bueno (ambos de la Región de Los Ríos) (Golusda, 1907). Desde sus inicios la industria ha evolucionado de forma creciente, llegando Chile a ser en el año 2004 el segundo productor de salmón a nivel mundial después de Noruega (Salgado, 2005). No obstante, diversos son los patógenos que han afectado a la industria y a medida que ésta crece y se diversifica, aumentan los potenciales efectos de la propagación de patógenos desde los peces en cultivo hacia las poblaciones silvestres (Johansen *et al.* 2011). Al respecto las altas densidades poblacionales y la permanencia por largos periodos de tiempo de los salmónidos en una misma ubicación, mantenidos en estos sistemas de producción intensiva, hace que un determinado patógeno aumente de forma exponencial y de esta manera sea liberado al entorno (Costello, 2009a), viéndose favorecida la transmisión de agentes etiológicos (Murray y Peeler, 2005) y la propagación de enfermedades hacia la biota local (Goldburg *et al.*, 2002; Sepúlveda *et al.* 2009; León *et al.*2007).

Uno de los patógenos que afecta marcadamente a la industria es *P. salmonis,* existiendo bastantes evidencias respecto a su inespecificidad, ya que diversos estudios demuestran que el agente es detectable en peces silvestres, así como en otros organismos silvestres asociados a los sistemas de cultivo. En este entendido, en el presente estudio se buscó determinar la presencia de *P. salmonis* en pejerreyes de mar (*O. regia*) capturados en o cerca de concesiones para cría de salmones en la Región de Los Lagos y en una localidad lejana sin presencia de tales concesiones en la séptima Región del Maule, de modo de contar con una zona comparativa respecto a la influencia de los centros de cultivo sobre la

presencia del agente. Los resultados aquí obtenidos muestran que la bacteria está presente tanto en zonas concesionadas como no concesionadas.

Cabe señalar, que a nivel mundial se ha evidenciado la presencia de un agente similar a *P. salmonis* en especies de peces no salmónidas, tales como lubina negra (*Dicentrarchus labrax*), fokaka (*Tetrodon fahaka*), dragonet (*Callionymus lyra*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) y el plecostomus de ojos azules (*Panaque suttoni*) (Davies 1986, Chern y Chao 1994, Chen *et al.* 1994, Khoo *et al.* 1995, Comps *et al.*1996). A nivel experimental se logró demostrar que dicho agente aislado desde la lubina blanca (*Atractoscion nobilis*) causa una enfermedad muy similar a la piscirickettsiosis en salmónidos (Chen *et al.* 2000). No obstante, en ninguno de estos trabajos se hace mención respecto a la posible repercusión que podría tener el patógeno en las poblaciones de peces silvestres afectadas.

En relación a los casos documentados en Chile, los primeros estudios que evidencian la presencia de *P. salmonis* en especies silvestres asociadas a sistemas de cultivo de salmónidos corresponden a los trabajos realizados por Correal (1995) y Venegas (1996), quienes detectaron la presencia del agente mediante inmunoflorescencia indirecta en peces silvestres (*Paralabrax humeralis, Trachurus murphyi, Basilichthys australis*), moluscos (*Mytilus chilensis*), crustáceos (*Balanus psittacus* y otros sin determinar especie), ectoparásitos (*Ceratothoa gaudichaudii*, *Caligus sp.*) y anélidos (sin determinar especie). En esta misma línea, Campalans (2011) realizó estudios en la Región de Los Lagos que dieron como resultado la presencia de esta bacteria en piojo de mar (*C. rogercresseyi*) y en Choritos (*Mytilus chilensis*), obtenidos desde “fouling” existente en estructuras flotantes (cabos, flotadores, boyas, etc.) de centros de cultivo de salmónidos y de moluscos bivalvos. En este contexto, Miranda *et al*. (2012) determinaron una positividad al agente mediante PCR en tiempo real (qPCR) en distintas especies de peces silvestres (*Paralabrax humeralis, Helicolenus lengerichi, Merluccius australis, Odontesthes regia, Eleginops maclovinus y Pinguipes chilensis*) asociadas a centro de cultivo de salmónidos, abarcando cinco regiones del país (Araucanía, Los Ríos, Los Lagos, Aysén y Magallanes), obteniendo una positividad a *P. salmonis* promedio de 26,34%. En los trabajos citados no se incluye dentro de su metodología la identificación de especies, la cual tiende a ser mayoritariamente arbitraria, sin la utilización de claves de identificación desarrolladas para estos fines, por lo cual en el presente proyecto se empleó una clave de identificación especifica (Dyer, 2006), siendo posible establecer fehacientemente que los individuos analizados correspondían a *O. regia*

(Anexo 2). Lo anterior, se considera necesario de realizar para estudios futuros que tengan como objetivo el diagnóstico de determinados patógenos en especies silvestres, de modo tal que con los resultados obtenidos no se generen sobre o sub estimaciones de un patógeno en una población determinada.

En el presente estudio se evidenció una alta positividad a *P. salmonis* en las cuatro zonas de muestreo analizadas (Z1, Z2, Z3 y Z4) (Tabla 3), relacionadas con el cultivo de salmónidos en la Región de Los Lagos (fig. 2), además de la zona control correspondiente a la zona cinco (Z5) en la Región del Maule (Tabla 3), donde no existen concesiones para la acuicultura (fig. 2), obteniéndose una positividad promedio del 51% para los individuos obtenidos desde el interior de balsas jaulas (Z1 y Z2) , de un 86,5% respecto a los obtenidos desde las inmediaciones de centros de cultivo (Z3 y Z4) y de un 83% para Z5. Dichos resultados tienen similitud con los señalados por Vargas (2014), el cual obtuvo una positividad del 78,5% promedio mediante nPCR en 14 pejerreyes de mar categorizados como sospechosos al agente, provenientes de un estudio previo desarrollado por el IFOP (2012) en la Región de Los Lagos. Sin embargo, Miranda *et al.* (2012) obtuvieron en pejerreyes una positividad del 27,18% en cinco regiones analizadas (Araucanía, Los Ríos, Los Lagos, Aysén y Magallanes) y un 16,4% en la Región de Los Lagos.

Tal diferencia pudiera tener relación con el N muestreal, ya que estos autores utilizaron 791 pejerreyes capturados en las inmediaciones de centros de cultivo en las cinco regiones donde se realizó el muestreo, versus 52 pejerreyes utilizados en el presente estudio. Además, las diferencias en los resultados pudieran deberse al método diagnóstico empelado, ya que estos autores utilizaron la técnica de PCR en tiempo real, que según Fonseca *et al.* (2010) presenta ventajas en relación a su sensibilidad versus lo que se puede obtener mediante el PCR convencional. Para efecto de este estudio se utilizó PCR anidado el cual es una modificación del tipo convencional y proporciona, según Rodríguez y Berrios (2011), una mayor sensibilidad y especificidad en la reacción y es utilizada cuando las cantidades de ADN a analizar son muy bajas (Gómez *et al.* 2009), como en este caso donde se busca evidenciar la presencia de una bacteria intracelular facultativa como *P. salmonis*.

La positividad a *P. salmonis* en los pejerreyes de mar se evidenció mediante el análisis por separado de los siguientes órganos provenientes de cada pez: hígado, riñón, bazo además de las heces, a diferencia de lo que indica la OIE (2006), la cual recomienda que los órganos más adecuados para el diagnostico *P. salmonis* mediante PCR son el riñón y el hígado, además de la sangre. En este entendido, la incorporación del bazo y las heces en particular, permitió constatar en este trabajo que el patógeno está presente en una gran proporción de los peces analizados, tanto los provenientes de zonas concesionadas como no concesionadas (fig. 4, 5, 6 y 7). Por lo tanto, la incorporación del bazo y las heces, además del análisis de los órganos por separado en el diagnostico de *P. salmonis,* implicaría una ventaja respecto a poder constatar en cuáles órganos existe mayor propensión de encontrar el patógeno de interés en esta especie de pez silvestre, ya que se pudo evidenciar que existe una mayor positividad en riñón con un 47,6% e hígado con un 38,7%, seguido de las heces con un 31,34% de positividad (fig. 3 a la 7). Al respecto, la incorporación de las heces en el diagnostico de *P. salmonis* en este trabajo implica un importante antecedente, ya que no han sido incluidas en estudios previos en el diagnostico de este patógeno en especies de peces silvestres, siendo el único reporte hasta la fecha.

Respecto a la zona cinco donde no se emplazan concesiones de acuicultura, es importante destacar la positividad detectada a *P. salmonis* en todos los órganos analizados, además de las heces donde se obtuvo la más alta positividad con un 66,7% (fig.7 y Anexo 5). Por lo cual los resultados obtenidos en este estudio, por primera vez estarían demostrando la posibilidad de diseminación de *P. salmonis* a través de las heces en esta especie de pez silvestre, que posee una amplia distribución latitudinal (Dyer, 2006). Este hecho debiera ser considerado en la epidemiología de la enfermedad, debido a que esta especie realiza migraciones entre sistemas acuáticos, colocando sus ovas en la boca de estuarios donde posteriormente se desarrollarán los juveniles (Campos y Moreno, 1985), produciéndose probablemente un flujo del patógeno entre sistemas acuáticos (Rosenfeld, 2009). Lo señalado, tendría importancia debido a la capacidad del agua para actuar como medio de dilución y de transporte de patógenos vertidos en ella, considerando además, que la bacteria se puede mantener por mucho tiempo viable en condiciones de agua de mar (Lannan y Fryer, 1994). Por otro lado, el destino de éste patógeno podría estar condicionado por factores físico-químicos que influyen directa e indirectamente en las masas de agua (Wilhelm *et al.* 2003; Sinton *et al.* 2002; Noble y Fuhrman 1997).

No obstante, si bien se encontró positividad a *P. salmonis* a través de esta vía de excreción en las diferentes áreas en estudio, hay que considerar que la técnica de PCR sólo detecta ADN de la bacteria y no su viabilidad, abriéndose una nueva área de estudio. Por lo tanto, se hace necesario desarrollar estudios más profundos que permitan realizar el diagnóstico de este patógeno en otras especies de peces silvestres en distintos puntos geográficos del país y en especial aumentar el número de muestras en la Región del Maule, considerando los antecedentes generados en el presente estudio, incluyendo además peces provenientes de zonas concesionadas.

Un aspecto importante a considerar, a partir de los resultados del presente estudio, consistiría en la extrapolación de su desarrollo para el análisis del patógeno en especies de peces en alguna categoría de conservación, constatando los posibles efectos de la bacteria en éstos, de tal manera de estudiar por ejemplo si los especímenes son capaces de desarrollar la enfermedad o sólo llegar a ser portadores. En el caso particular de pejerreyes de mar sólo se poseen antecedentes empíricos que darían cuenta que individuos de esta especie en la Decima Región de Los Lagos, presentarían signología compatible a la descrita en salmónidos para Piscirickettsiosis (Larenas J., comunicación personal 14 de agosto 2015; Yáñez R., comunicación personal, 13 de marzo, 2013).

En relación estudios que permitirían dar cuenta más concretamente de la distribución de este patógeno en el territorio nacional, correspondería a la inclusión de una caracterización genética de *P. salmonis* en los pejerreyes que sean positivos al agente en la Región del Maule, considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, y en distintos puntos del país. Para lo anterior, se puede tomar como base lo realizado por Contreras *et al.* (2015), quienes para distintas especies de peces silvestres asociados a sistemas de cultivo en la Región de Los Lagos, a partir de un estudio filogenético, pudieron establecer el tipo de cepa de *P. salmonis* en el pejerrey de mar, indicando que estaría estrechamente relacionada con la cepa EM-90 descrita previamente en salmón coho. De este modo, se podrían contar con resultados que permitan realizar comparaciones con la cepa caracterizada previamente por dichos autores y poder establecer si la distribución actualmente conocida del patógeno se ha expandido en el territorio nacional o ha estado presente previamente sin que haya sido antes determinado en distintas zonas geográficas del país. Para lo mencionado, debieran ser considerados los antecedentes al comienzo expuestos respecto a la introducción de

especies exóticas como los salmónidos provenientes como ovas desde Alemania (Golusda 1907), los cuales fueron distribuidos en gran parte del país incluyendo también la Región del Maule sin existir antecedentes previos del estado sanitario de dichos especímenes. En este contexto, existen diversos estudios que dan cuenta de las repercusiones de la introducción de especies exóticas a un determinado territorio, las cuales presentan patógenos para los que durante su evolución han desarrollado inmunidad para hacerles frente, mientras que la población receptora no cuenta con dicha inmunidad (Rovid *et al*. 2010). Algunos trabajos que demuestran lo mencionado se refieren a la transmisión del calicivirus felino, además de parásitos dañinos para el lince (*Lynx pardinus*) a partir del gato doméstico (*Felis silvestris catus*), (Millan y Casanova 2007; Riley *et al.* 2004), Por otro lado, los perros domésticos (*Canis familiaris*) que deambulan libremente actúan alterando la ecología de varias enfermedades infecciosas como la rabia y el distemper canino, lo cual ha afectado a varias especies de felinos y caninos silvestres (*Panthera leo, Lycaon pictus*), (Cleaveland *et al.* 2002). Otro ejemplo emblemático es la quitridiomicosis que ha sido identificada como la causa de la muerte en masa, disminución poblacional y extinción de especies de anfibios (*ej. Rheobatrachus sp., Bufo periglenes*) en todo el mundo por la introducción de la rana africana (*Xenopus laevis*), (Daszak *et al.* 1999).

Para el caso de las especies acuáticas algunos ejemplos están relacionados con epizootias ocurridas en casi todos los países con un importante desarrollo de la industria acuícola, que más tarde también han afectado a salmónidos silvestres, como lo ocurrido durante epidemias de piojos de mar *(Lepeophtheirus salmonis*) en peces de cultivo (*Salvelinus alpinus*) que luego han afectado a salmónidos silvestres. Lo anterior ha sido ampliamente estudiado, evidenciándose que ha llegado a alterar el ciclo biológico de éstas especies (Whelan 2010; Costello, 2009a; Bjùrn *et al.* 2001; Birkeland 1996; Birkeland y Jakobsen 1997), además de ser este motivo una causa importante de mortalidad en las poblaciones de peces silvestres cercanos a dichos centros (Costello 2009a). Otro caso está representado por la presencia de virus muy prevalentes en el cultivo intensivo del camarón, como el WSSV (virus de la mancha blanca) y el IHHNV (virus de la necrosis infecciosa hipodermal y hematopoyética), detectados mediante PCR anidado múltiple en diversas especies silvestres asociadas a éste sistema de cultivo, tales como camarones silvestres (*Penaeus stylirostris, Penaeus californiensis, Penaeus vannamei*), peces (*Achirus mazatlanus, Mugil curema, Gerres cinereus, Oreochromis spp., Lile stolifera, Centopomus médium*) y una especie de jaiba (*Callinectes arcuatus*) (Macías-Rodríguez *et al.* 2014). Al respecto la introducción de

especies exóticas acuáticas ha sido identificada como uno de los riesgos ambientales más críticos a los que actualmente se enfrentan las especies silvestres, los hábitats acuáticos y la biodiversidad en general (Hopkins, 2001), llevando consigo la amenaza de nuevas enfermedades que pueden destruir especies o poblaciones nativas vulnerables (Stewart, 1991). Lo mencionado, se puede ver favorecido por el diseño abierto de la mayoría de los sistemas acuícolas, diseño que estaría potencialmente permitiendo la transmisión de patógenos al ambiente o de los peces silvestres a los peces en cultivo (Johansen *et al.* 2011), además considerando que la inclusión de especies nuevas en ecosistemas ya alterados implica un factor que afecta la conservación de éstos (Cattan P., comunicación personal, 19 octubre 2015). Sin embargo, los resultados generados en el presente estudio para las cinco zonas estudiadas, indican que no existiría una asociación significativa respecto a la positividad presentada a *P. salmonis* en *O. regia* respecto a las zonas con centros de cultivo de salmónidos, no pudiendo atribuir en este trabajo de investigación como factor de riesgo la interacción de esta especie nativa con los centros de cultivo.

6. CONCLUSIONES

A través de la técnica nPCR fue posible detectar la presencia de *P. salmonis* en hígado, riñón, bazo y heces en pejerreyes de mar (*O. regia*), indicando una alta positividad al agente.

Mediante la utilización de una clave de identificación específica fue posible establecer que la especie analizada correspondió a *O. regia.*

El diagnóstico de *P. salmonis* en pejerreyes de mar provenientes del interior de balsas jaulas así como de las inmediaciones de centros de cultivo, como también desde zonas no concesionadas permitió en este estudio determinar que el agente se presenta en *O. regia* en áreas que hasta la fecha no habían sido analizadas, lo cual resulta relevante considerando que el pejerrey de mar posee una amplia distribución latitudinal en nuestro país.

Referente al análisis en heces, se puede indicar que fue importante su inclusión, dada la probabilidad de ser excretado el agente por esta vía. Al respecto su incorporación en el diagnostico de *P. salmonis* en este trabajo implica un importante antecedente, ya que no han sido incluidas las heces en estudios previos en el diagnóstico de este patógeno en especies de peces silvestres, generando así resultados que permitan entender mejor el ciclo silvestre de la enfermedad Piscirickettsiosis.

A partir del análisis estadístico se obtuvo que no existiría una asociación significativa respecto a la positividad presentada a *P. salmonis* en *O. regia* para las zonas con centros de cultivo de salmónidos, no pudiendo atribuir en este estudio como factor de riesgo la interacción de esta especie nativa con los centros de cultivo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña M., J. Larenas, R. Olivares 2014. Manual de anatomía y procedimientos diagnósticos en salmónidos. Edición 2013-2014 [en línea]. En: http://es.calameo.com/read/00081361607494ca4a527, [consulta: 10 Mayo 2014].

2. Almendras F.E. y C. Fuentealba 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review". Dis. Aquat. Org. 29: 137–144pp.

3. Barría Y., 2007. Prevalencia e intensidad de infección por endoparásitos en Odontesthes (Austromenidia) regia (Pisces: Atherinidae) y su relación con períodos estacionales, sexo y alimentación del huésped, en el Estuario del Río Valdivia, Chile.

4. Bravo S. y M. Campos 1989. Síndrome del Salmón Coho. Chile Pesquero 54: 47-48pp.

5. Brintrup E., R. Castro, P. Román, F. Contreras 2012. Alimento micro encapsulado aumenta la supervivencia larval en *Odontesthes regia* (Humboldt 1821) Revista AquaTIC, 36, 11-20pp.

6. Bjùrn P.A., B. Finstad y R. Kristoffersen 2001. Salmon lice infection of wild sea trout and Arctic char in marine and freshwaters: the effects of salmon farms, Aquaculture Research, 32: 947-962pp.

7. Birkeland K. 1996 Consequences of premature return by sea trout (Salmo trutta L.) infested with the salmon louse (Lepeophtheirus salmonis Krùyer), migration, growth and mortality. Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences 53 (12), 2808-2813pp.

8. Birkeland K. y P. Jakobsen 1997. Salmon lice, Lepeophtheirus salmonis, infestation as a causal agent of premature return to rivers and estuaries by sea trout, Salmo trutta L., post smolts. Environmental Biology of Fishes 49: 129-137pp.

9. Brito J.L 1999. Listado Preliminar de vertebrados de la quebrada de Córdoba, El Tabo-Quisco, provincia de San Antonio. Informe Museo Municipal de Ciencias Naturales Y Arqueología de San Antonio: 1-6pp.

10. Brito J. 2002. Primer registro de *Acipenser transmontanus* Richardson, 1863, asilvestrado en la desembocadura del Río Maipo, San Antonio, Chile Central. Noticiario Mensual, Museo Nacional de Historia Natural 347: 9-11pp.

11. Bronchuer K. 2010. Evaluación epidemiológica de *Caligus rogercresseyi* en seis zonas de la Decima Región". Tesis: Uach., Esc. Acuic. Pesq., Puerto Montt 64pp.

12. Campalans B., P. Rojas, J.L. Sepúlveda, R. Castro, I. Guerrero y J. Pascual 1995. Programa de Vigilancia de salmónidos cultivados en la zona sur austral. Informe Final FIP Nº 1993-29, Universidad Católica de Valparaíso 235pp.

13. Campalans M. 2011. Determinación de patógenos de importancia en la salmonicultura en *caligus* y moluscos bivalvos. Informe final, Escuela de Ciencias del Mar, Facultad de recursos naturales, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 238 pp.

14. Campos, H. y C. Moreno. 1985. Asociaciones de peces en estuarios chilenos, Pacífico Sur Americano. En: Fish community ecology in estuaries and coastal lagoons: towards an ecosystem integration (En. L.A. Yánez-Arancibia), UNAM Press, México. 407-414 pp.

15. Carvajal J., L. Gonzáles, M. George-Nascimento 1998. Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. Aquaculture. 166: 241-246pp.

16. Cattau C., J. Martin, W. Kitchens 2010. Effects of an exotic prey species on a native specialist: Example of the snail kite. Biol. Cons. 143(2):513-520pp.

17. Cerda J., C. Vera y G. Rada 2013. Odds ratio: aspectos teóricos y prácticos. *Rev. méd. Chile* vol.141, 10:1329-1335 pp.

18. Contreras-Lynch S., P. Olmos, A. Vargas, J. Figueroa, R., González-Stegmaier, R., Enríquez, y A. Romero 2015. Identification and genetic characterization of Piscirickettsia salmonis in native fish from southern Chile. *Diseases of aquatic organisms*, *115*(3), 233-244pp.

19. Comps M., M.J. Raymond, y G.N. Plassiart. 1996. Rickettsia-like organism infecting juvenile sea bass Dicentrarchus labrax. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 16: 30-33pp.

20. Cleaveland S., G.R. Hess, A.P. Dobson, M.K. Laurenson, H.I. McCallum, M.G. Roberts, R. Woodroffe 2002. The role of pathogens in biological conservation. The Ecology of Wildlife Diseases 139-150pp.

21. Correal P.D.1995. Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos. Tesis: U. Chile, Dto. de Patología Animal, Fac. Cs. Vet y Pecuerias, Reg nº 2234

22. Costello M.J., 2009a. How sea lice from salmon farms may cause wild salmonid declines in Europe and North America and be a threat to fishes elsewhere. Proceedings of the Royal Society, 276: 3385-3394pp.

23. Cvitanich J, O. Garate, C. Smith. 1991. The Isolation of Rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. J. Fish Dis. 14: 121-145pp.

24. Chen S. C., M.C. Tung, J.F. Chen, J.F. Tsai, P.C. Wang, R.S. Chen, S.C. Lin, y A., Adams 1994. Systematic granuloma caused by a rickettsial-like organism 101 in Nile tilapia, Oreochromus nilotica (L.) from southern Taiwan. J. Fish Dis., 17: 591-599.

25. Chen M., S. Yun, G. Marty, T. McDowell, M. Hous, J. Appersen, T. Guenther, K. Arkush 2000. Ases of aquatic organisms. Dis Aquat Org. Vol. 43: 117–126.

26. Chern, R.S. y Chao, C.B., 1994. Outbreaks of a disease caused by a rickettsialike organism in cultured tilapias in Taiwan. Fish Pathol, 29: 61-71.

27. Chirinos de Vildoso A., E. Chuman 1964. Notas sobre el desarrollo de huevos y larvas del Pejerrey *Odontesthes (Austromenidia) regia regia* (Humboldt). Bol. Inst. Mar. Perú, Callao 1 (1): 1-31pp.

28. Daszak P., L. Berger, A.A. Cunningham, A.D. Hyatt, D.E. Green, R. Speare 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. Emerg. Infect. Dis. 5: 735-748.

29. Davies, A.J.,1986 . A rickettsia-like organism from dragonets, Callionymus lyra L. (Teleostei: Callionymidae) in Wales. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol, 6: 103-104pp.

30. Dobson A., J. Foufopoulos 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Phil Trans* R. Soc. Lond. 356, 1001-1012pp.

31. Dyer B. 2006. Revisión sistemática de los pejerreyes de Chile (Teleostei, Atheriniformes). Estudios Oceanológicos, Chile 19: 99-127pp.

32. Fischer W. 1963. Die fische des brackwasser gebeites Lenga bei Concepción (Chile).Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie 48(3): 419-511pp.

33. Finstad B, P.A. Bjørn, A. Grimnes 2000. Laboratory and field investigations of salmon lice (Lepeophtheirus salmonis, Krøyer) infestation on Atlantic salmon (Salmo salar L.) post-smolts. Aquaculture Research, 31: 795-803pp.

34. Fonseca D., H. Mateus, N. Contreras 2010. Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su aplicación en Genética Básica. Bogotá: Ed. Universidad del Rosario, 69 pp.

35. Fryer J., C. Lannan, S. Giovannoni, N. Wood 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonis fishes. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 120-126pp.

36. Garcés L., J. Larenas, P. Smith, C .Lannan, J. Fryer 1991. Infectivity of a rickettsia isolated from Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Diseases of Aquatic Organism*s* 11(2): 93-97pp.

37. Gómez C., A. Perea de la Mata, M. Williams de Castro 2006. Aspectos reproductivos del pejerrey *Odontesthes regia regia* (Humbolt 1821) en la zona de Pisco durante el periodo 1996-97 y mayo-julio del 2002, relacionados con su conservación. Rev.Ecología Aplicada 5: 140-147pp

38. Gómez F., V. Henríquez, S.H. Marshall 2009. Evidencia adicional de la naturaleza intracelular facultativa del patógeno bacteriano de peces *Piscirickettsia salmonis*, Fac. de Cs. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Arch. Med. Vet. 41: 261-267pp.

39. Gómez-Biedma S., M. Vivo y E. Soria 2001. Pruebas de significación en Bioestadística. *Rev.Diagn.Biol,*vol.50,4:207-218pp

40. Golusda P. 1907. La introducción del salmón en Chile. Anales Agronómicos, Sección de Aguas y Bosques del Ministerio de Industria. Santiago de Chile. 31 pp.

41. Goldburg R., M. Elliot, R. Naylor 2001. Marine aquaculture in the United States, prepared for the pew Oceans Commission. [en línea] En: http://www.iatp.org/files/Marine_Aquaculture_in_the_United_States_Enviro.htm [consulta: 3 abril 2014].

42. Hopkins C.C.E. 2001. Actual and potential effects of introduced marine organisms in Norwegian waters, including Svalbard. Research report 2001-1. Directorate for Nature Management, Oslo

43. INTESAL, Aquatic Health y Universidad Austral de Chile 2000. Catastro de enfermedades de peces nativos circundantes a centros de cultivo de salmónidos. Informe final FIP Nº 1997- 38. Instituto Tecnológico del Salmón, 75pp.

44. Johansen L.H., I. Jensen, H. Mikkelsen, P. A. Bjørn, P.A. Jansen, Ø. Bergh 2011. Disease interaction and pathogens exchange between wild and farmed fish populations with special reference to Norway, J. Aquaculture 315:167-186pp.

45. Khoo L., P.M. Dennis, y G.A., Lewbart, 1995. Rickettsia-like organism in the blue-eyed plecostomus Panaque suttoni (Eigenmann & Eigenmann). J. Fish Dis., 18: 157–164pp.

46. Lannan C. N., y J. L. Fryer 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis,* J. of Fish Diseases, 545–548pp

47. Larenas J., L. Hidalgo, H. Garcés, J.L. Fryer y P. Smith 1995. Piscirickettsiosis: Lesiones en salmón del atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis.* Av. Cs. Veter. 26: 189 – 195pp.

48. Larenas J., J. Bartholomew, J. Troncoso, O. Fernández, H. Ledesma, N. Sandoval, P. Vera, J. Contreras, y P. Smith 2003**.** Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into fish ovum. Dis. Aquat.Org. 56: 25-30pp**.**

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

50. Larenas J., C. Gatica, M. Galleguillos, H. Adármes, P. Smith 2012. Comparación de la cinética de la infección de ovas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* detectada mediante dot-blot. Av. en Cs. Vet. 27: 2

51. León j, D Tecklin, A Farías y S Díaz 2007. Salmonicultura en los lagos del sur de Chile Ecorregión Valdiviana. Report of the Technical Working Group on Salmón Farming in lakes of the World Wildlife Fund Salmón Aquaculture Dialogue. World Wildlife Fund, Washington, Estados Unidos. [en línea] En:http://www.wwf.cl/archivos_publicaciones/informe%20 salmones%20lagos%20sur%20de%20Chile-restriccion.pdf [consulta 26 Julio 2013].

52. Lobos G., M. Ferres, R Palma 2005. Presencia de los géneros invasores Mus y Rattus en áreas naturales de Chile: un riesgo ambiental y epidemiológico. Rev Chilena de Hist Nat 78, 113-124pp.

53. Lorenzen, C., C. Gallardo, C. Jara, E. Classing, G. Pequeño, C. Moreno 1979. Mariscos y peces de importancia comercial en el sur de Chile. Universidad Austral de Chile, Valdivia. 131pp.

54. Macías N., N. Mañón , J. Romero, E. Camacho , M. Magallanes, N. Leyva, J. Hernández , F. Magallón, R. Perez , S. Sanchez , J. Méndez. 2014. Prevalence of viral pathogens WSSV and IHHNV in wild organisms at the Pacific Coast of Mexico. J. Invertebr. Pathol. 116:8-12pp.

55. Millan L., J.C. Casanova 2007. Helminth parasites of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and sympatric carnivores. J. Helminthol, 81(4):377-80

56. Miranda P., V. Cifuentes, P. Olmos, F. Shulze 2012. Evaluación y seguimiento sanitario de especies ícticas silvestres en agua dulce y de mar. Informe Final Subpesca, IFOP(Instituto de Fomento Pesquero) 1-257pp.

57. Medina-Vogel G., 2010. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres, Arch. Med. Vet 42: 11-24.

58. Murray A. G. y E. J. Peeler 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. Prevent. Vet. Med. 67: 223–235pp.

59. Noble R.T. y J. A. Fuhrman 1997. Virus decay and its causes in coastal waters. Aquat. Microb. Ecol., 63: 77–83pp.

60. Oficina Internacional de Epizootias OIE. 2006. Manual Of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2006. [en línea] En: http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/2.1.13_Piscirickettsiosis.pdf ,[consulta: 20 Junio 2014].

61. Oficina Internacional de Epizootias OIE. 2013. Código Sanitario para los Animales Acuáticos [en línea]. En:http://web.oie.int/esp/normes/mcode/es_glossaire.htm[consulta: 3 Mayo 2014].

62. Parenti L.R. 2004. The phylogeny of atherinomorphs: Evolution of a novel fish reproductive system. In Grier HJ, M del C Uribe (eds), Viviparous fishes. Proceeding of the I and II International Symposia. New Life Publications, Homestead, Florida.

63. Parenti L.R., H.J. Grier 2004. Evolution y Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes. Interg. Comp. Biol. 44: 333-348 pp.

64. Pavez P. 2008. Estudio Biológico-Pesquero del pejerrey de mar X Región Proyecto FIP Nº 2006-58 Escuela de Ciencias del Mar Pontificia Universidad Católica.

65. Peirano P. 2015. Determinación de la presencia y asociación de *P. salmonis*, en heces, hígado y riñón de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss)* en condiciones de cultivo en mar. Tesis, Fac. de Cs. Veterinarias y pecuarias, Universidad de Chile 29pp

66. Raynard RS, AG Murray, A Gregory 2001. Infectious salmon anaemia virus in wild fish from Scotland. Diseases of Aquatic Organisms, 46, 93–100pp.

67. Riley S., J. Foley, B. Chomel 2004. Exposure to feline and canine pathogens in bobcats and gray foxes in urban and rural zones of a national park in California. J .Wildl Dis. 40:11-22.81, 377-380.

68. Rodríguez N., M. A. Berrios. 2011. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas, Capitulo 85, Laboratorio de Ingeniería Genética, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela.

69. Rovid A., J. Roth, J. Galyon, J. Lofstedt, M. Lenardon 2010. Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales, ed 1º Lowa state university, USA, 336 pp.

70. Reis R y F Lima, 2009. *Odontesthes regia*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2013.2. [en línea] En: <www.iucnredlist.org>. [consulta: 4 Marzo 2014].

71. Rosenfeld C., 2009. Determinación de prevalencia de los virus de la Anemia infecciosa del Salmón (ISA) y de la Enfermedad Pancreática (PD), en la población de peces silvestres y asilvestrados de la Región de La Araucanía, De Los Ríos, De Los Lagos, Aysén y Magallanes con concesiones de salmonicultura, Ins. Med. Prev. Vet. UACh, 1-54pp.

72. Rozas M., A. Sandoval, A. Navarrete 2009. Detección del virus de la anemia infecciosa del Salmón (ISAV) y de la enfermedad pancreática (PDV) en peces silvestres y asilvestrados de lagos de la región de los lagos con concesiones de acuicultura MINECON Chile 1-45pp.

73. Ruiz VH 1991. Ictiofauna del Río Andalién (Concepción, Chile). Gayana, Zoología 57(2):109-278pp.

74. Salinas G., J. Contreras, P. Smith, J. Larenas 1997. Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water condition. En: *VIII International Conference Diseases of Fish and Shellfish*. Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh, European Association of Fish Pathologists. P-057.

75. Salgado R. 2005. Análisis del desarrollo de la salmonicultura Chilena Fac. de agronomía e ing. forestal, Pont. Univ. Católica de Chile, 69pp

76. Sepúlveda F., S. Marín, J. Carvajal 2003. Metazoan parasites in wild fish and farmed salmon from aquaculture sites in southern Chile , J. Aquaculture 235: 89 -100pp.

77. Sinton L., W., Hall, C. H., Lynch, P. A. 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. Appl. Environ. Microbiol., 68, 1122–1131pp.

78. SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca) Anuario estadístico 2013. Chile Desembarque total por especie y región. [en línea] En: http:// www. Sernapesca.cl [consulta: 14 marzo 2014].

79. SUBPESCA (Subsecretaría de pesca) 2008. Informe técnico (R.PESQ.) N° 43 Establece cuota global anual de pejerrey de mar (*Odontesthes regia*) en aguas interiores de la Décima región.

80. SUBPESCA (Subsecretaría de pesca) 2009. Informe técnico (R.PESQ.) N° 79 Veda extractiva para el recurso pejerrey de mar (*Odontesthes regia*) (2009-2011) en la Décima región de los Lagos.

81. Smith P., P. Pizarro, P. Ojeda, J. Contreras, S. Oyanedel, y J. Larenas 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org. 37:165-172pp.

82. Stewart J.E. 1991. Introductions as factors in diseases of fish and aquatic invertebrates. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48 (Suppl. 1): 110-117pp.

83. Vargas N., 2014. Detección de *Piscirickettsia Salmonis* en peces silvestres del Sur de Chile y en *Caligus Rogercresseyi*. Tesis, Fac. de Cs Veterinarias Uach. Valdivia, Chile, 158pp.

84. Venegas C. A. 1996. *Piscirickettsia salmonis*: prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Período invierno - primavera U. Chile. Dto. de Patología Animal, Fac. Cs. Vet y pecuarias.

85. Whelan K. 2010. A Review of the Impacts of the Salmon Louse, Lepeophtheirus salmonis (Krøyer, 1837) on Wild Salmonids. Atlantic Salmon Trust, 27pp

86. Wilhelm, S. W., Jeffrey, W. H., Dean, A. L., 2003. UV radiation induced ADN damage in marine viruses along a latitudinal gradient in the southeastern Pacific Ocean. Aquat. Microb. Ecol.31, 1–8pp.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Protocolo de necropsia de pejerreyes de mar para evitar la contaminación cruzada entre órganos al momento de su obtención (modificado de Peirano, 2015)

Procedimiento

Los pejerreyes fueron puestos sobre una bolsa de basura dispuesta sobre un mesón de acero inoxidable la que fue descartada entre cada pez, el mesón de trabajo se desinfectó entre cada necropsia y se realizó según lo descrito por Acuña y *et al.* (2014) mas unas leves modificaciones, producto de las diferencias en la distribución de los órganos de interés en esta especie, los órganos fueron obtenidos en el siguiente orden: hígado, riñón bazo y al final las heces mediante compresión mecánica del intestino posterior. La obtención de cada órgano se realizó con pinzas y tijeras iris previamente embebidas y desinfectadas en cloro al 0,5% en el contenedor que contenía esta solución. Previo al proceso de necropsia se roció cloro al 0,5% sobre cada pez y entre cada muestra obtenida se realizó cambio de guantes. Todos los órganos (de 1 cm^3) fueron dispuestos por separados en tubos de 5ml con 2ml de etanol al 70%, los cuales se rotularon con la fecha de muestreo de órganos, número de pez y tipo de órgano, todo fue almacenado en refrigeración hasta su procesamiento. Al final de las necropsias de los peces, por cada una de las 5 zonas de muestreo (Z1, Z2, Z3, Z4, Z5) se tomó un trozo de hamburguesa de vacuno como control negativo de muestreo el que se dispuso de igual manera en un tubo de 5ml con 2ml de etanol, con el fin de validad las medidas de asepsia mantenidas en proceso, dicho control fue procesado igual que las muestras de interés mediante nPCR.

8.2. Anexo 2. Clave de identificación de especies de pejerreyes del sur de Sudamérica, tomada de: Systematic revisión of the South América silversides (Teleostei, Atheriniformes), Dyer B. 2006.

- **Claves de identificación**

Artificial identification key for South American silverside species of the southern cone (*based only characters present in adult specimens*)

1a. Presence of first dorsal fin (with the exception of some specimens of the *Basilichthys semotilus* species group); body scales cycloid, rounded, without spines; maximum body height posterior to pectoral fin; base of pectoral fin does not surpass the dorsal margin of the lateral band..... Family Atherinopsidae..... 2

1b. Absence of the first dorsal fin; body scales elongated dorsoventrally with 3 to 5 spines; maximum body height at pectoral fin level; base of pectoral fin dorsal to lateral band..... ..... Family Notocheiridae ..... *Notocheirus hubbsi*

2a. Presence of postemporal bone only; preopercular sensory canal open, without a bony tube; presence of a series of canals and concavities in the skin anterior to the frontal bones and between the nasals (Rostral sensory system); anal fin with 24 or more rays .... Subfamily Menidiinae 3

2b. Presence of extrascapular and postemporal bones; horizontal branch of the preopercular sensory canal in a bony tube (except *Odontesthes mirinensis*); absence of a rostral sensory system; anal fin with 15 to 21 rays .... Subfamily Atherinopsinae 4

3a. Rostral sensory system enclosed forming membrane tubes with pores; 53 to 57 scales on lateral line above lateral band ..... *Atherinella (Eurystole) nocturna*

3b. Rostral sensory system with 4 anterior and 2 posterior fosas; 35 to 40 scales on lateral line over lateral band ..... *Atherinella (Xenomelaniris) brasiliensis*

4a. Presence of a frenum on the upper jaw (restricted premaxillary protrusion); dorsal scales on the head with inverted imbrication (anterior margin free, Fig. 5); four rows of suborbital scales (Fig. 6); labial ligament reduced .... *Basilichthys* 5

4b. Absence of a frenum on the upper jaw (premaxillary freely protractile); dorsal scales of the head with normal imbrication (posterior margin free); two or three rows of suborbital scales; labial ligament expanded (Fig. 6A) .... *Odontesthes* 6

5a. All dorsal head scales with inverted imbrication (Fig. 5A); horizontal branch of the preopercular sensory canal with five pores .... *Basilichthys semotilus* species group

5b. Dorsal head scales of interorbital region only with inverted imbrication (Fig. 5B); horizontal branch of preopercular sensory canal with four pores .... *Basilichthys microlepidotus* species group

6a. First dorsal fin over or posterior to anus (Fig. 7); scales large with less than 11 rows of dorsal scales between lateral bands[6] (except *O. platensis*) 7

6b. First dorsal fin over the pelvic fins; scales small, with more than 12 rows of dorsal scales between lateral bands 13

7a. Origin of first dorsal fin over or posterior to anus (Fig. 7A) 8

7b. Origin of first dorsal fin anterior to anus and posterior to pelvic fin (Fig. 7B) 11

8a. Scales absent along shaft of cleithrum; two rows of suborbital scales (Fig. 6A); two rows of teeth on jaws; origin of first dorsal fin closer to the anal fin origin than to the anus (Fig. 7A); scales smooth (Fig. 8A) 9

8b. Scales present along shaft of cleithrum; three or four rows of suborbital scales (Fig. 6B); one or three rows of teeth on jaws; origin of first dorsal fin closer to anus than to origin of anal fin (Fig. 7B); presence of crenate scales (Fig. 8B) 10

[6] The dorsal scales were counted at the level of the pectoral fin's distal half, from side to side over the dorsum, beginning and ending on the row of scales that form half-part of the lateral band. This meristic is considered to represent scale size.

9a. Teeth on jaws of normal size and with inner row of same size or larger than outer row (Fig. 6A); vomer with three tooth patches or none; less than 40 gill rakers on lower branch (22-24 *orientalis & perugiae*; 26-30 *mirinensis, bicudo, ledae, piquava*) ..... Subgenus *Odontesthes*

9b. Teeth on jaws small with inner row of teeth shorter than outer row; vomer without teeth; more than 45 gill rakers on lower branch (12-14 + 46-50) ..... *O. retropinnis*

10a. Predorsal scales crenulate (Fig. 8B); presence of pelvic membrane between inner rays; jaw teeth approximately of same size, those of outer row larger than inner row; haemal funnel well developed (Fig. 7B); 26 to 28 gill rakers on lower branch ..... *O. argentinensis*

10b. Predorsal scales and of lateral band crenate (Fig. 8C); pelvic membrane absent between inner rays; jaw teeth of different sizes, some canine-type, without differences between inner and outer rows; absence of haemal funnel; 22 to 26 gill rakers on lower branch ..... *O. incisa*

11a. Less than 20 gill rakers (13-19) on lower branch; vomerine teeth absent or in three patches; lower jaw never prognathous 12

11b. More than 30 gill rakers (32-38) on lower branch; vomerine teeth present as a single median patch; lower jaw prognathous in large specimens ..... *O. bonariensis*

12a. Scales absent along shaft of cleithrum; scales present only on posterior half of interoperculum; presence of rows of scales between rays of anal fin; upper jaw prognathous and premaxillary protrusion directed ventrally; pharyngeal teeth molariform; vomerine teeth absent; absence of teeth on endopterygoid; scales large, with less than 10 rows of dorsal scales between lateral bands ..... *O. humensis*

12b. Scales present along shaft of cleithrum; scales present along entire interoperculum; absence of rows of scales between rays of anal fin; jaws equal; pharyngeal jaws without molariform teeth; vomer with 3 patches of teeth; presence of teeth on the endopterygoids; scales small, with more than 12 rows of dorsal scales between lateral bands ..... *O. platensis*

13a. Origin of first dorsal fin over anterior half of pelvic fin; absence of a haemal funnel; less than 20 gill rakers on lower branch; final-ray origin of second dorsal fin notably anterior to final-ray origin of anal fin; scales crenate ..... *O. nigricans*

13b. Origin of first dorsal fin over posterior half of pelvic fin; presence of haemal funnel; more than 21 gill rakers on lower branch (except the subgenus *Cauque*); final-ray origin of second dorsal fin over the final-ray origin of anal fin; scales crenate or smooth 14

14a. Jaws equal and protrusion directed anteriorly; absence of scale rows between anal-fin rays; pharyngeal teeth not molariform; teeth present on endopterygoid; haemal funnel type 4 (Fig. 7C) ..... Subgenus *Austromenidia* 15

14b. Upper jaw prognathous and upper jaw protrusion directed ventrally; presence of scale rows between anal-fin rays; presence of molariform pharyngeal teeth; endopterygoid teeth absent; haemal funnel of type 1 or 3 (Fig. 7A,B) 17

15a. Urohyal ventral plate reduced (Fig. 9B) ..... *O. smitti*

15b. Urohyal ventral plate expanded in an oval shape (Fig. 9A) 16

16a. Four rows of suborbital scales; presence of vomerine teeth ..... *O. regia*

16b. Three rows of suborbital scales; absence of vomerine teeth ..... *O. gracilis*

17a. Scales with posterior margin smooth (Fig. 8A); more than 21 gill rakers on lower branch (21-27); haemal funnel without modified haemal arches (type 1, Fig. 7A) ..... *O. hatcheri*

17b. Scales crenate (Fig. 8C); less than 20 gill rakers on lower branch (12-19); haemal funnel with expansions of haemal arches of type 3 (Fig. 7B) ..... Subgenus *Cauque* 18

18a. Scales noticeably crenate along side of body ..... *O. mauleanum*

18b. Scales noticeably crenate only on caudal peduncle ..... *O. brevianalis*

- **<u>Imágenes de la anatomía y osteología más características *O. regia*</u>**

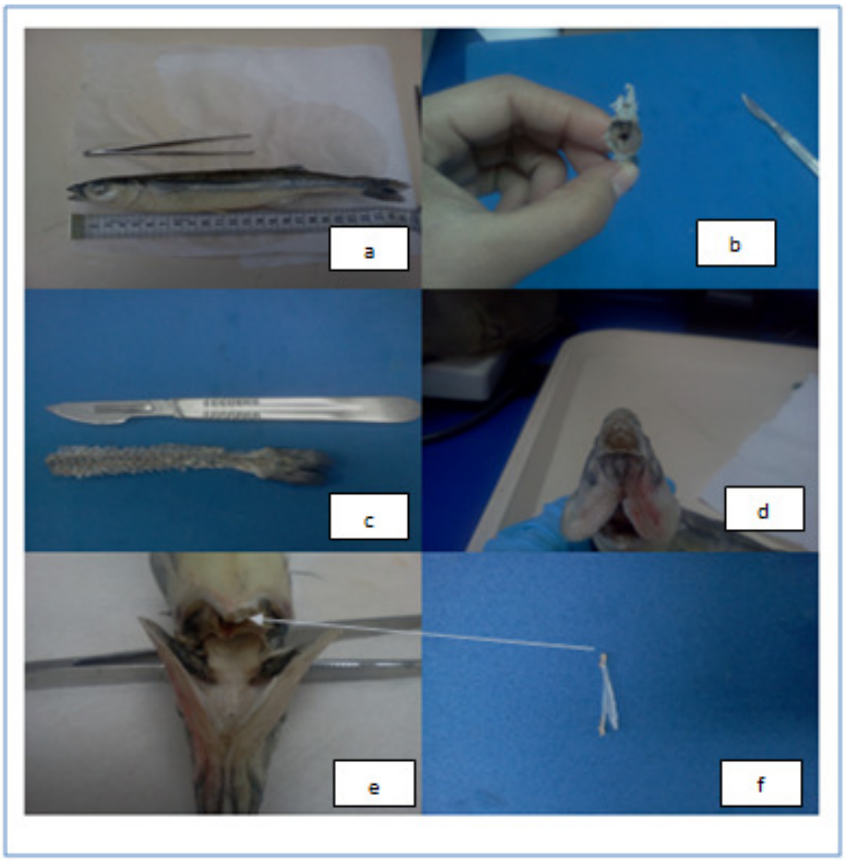

Figura A1. a: ejemplar de *O. regia* completo; b: vista frontal del embudo hemal, tipo 4; c: vista lateral del embudo hemal, tipo 4; d: dientes vomerinos; e: dientes faríngeos; f: vista lateral hueso urohial.

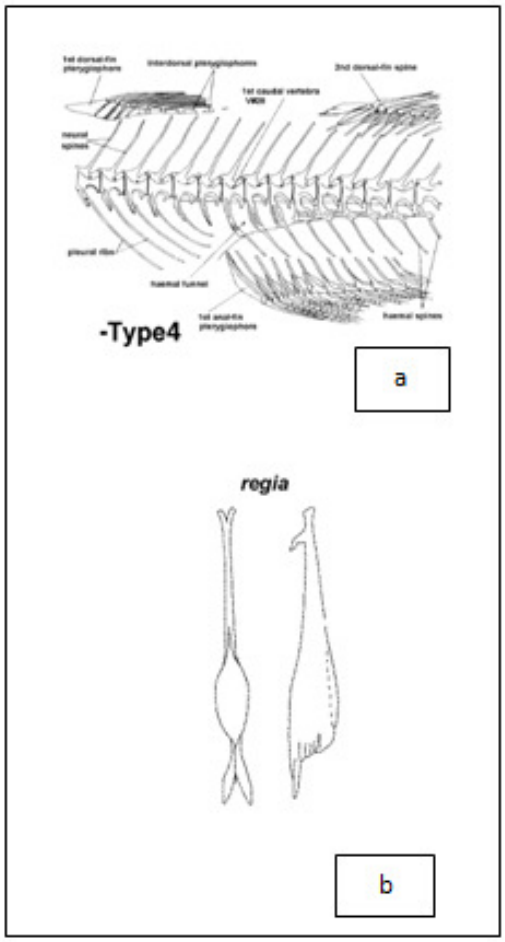

Figura A2. a: embudo hemal, tipo 4; b: vista lateral y ventral del hueso urohial . Ambas estructuras de *O. regia*. Fuente: modificado de Dyer 2006.

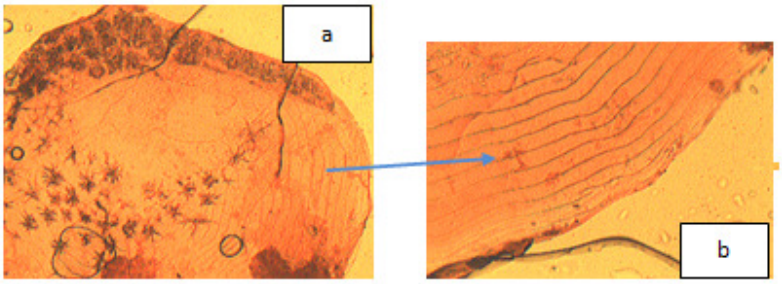

Figura A3. a: escama de *O. regia* teñida con hematoxilina (10x); b: vista aumentada borde anterior misma escama.

Fig A4. Escamas suborbitales, 4 hileras.

8.3. Anexo 3. Reactivos utilizados en la preparación de "master mix" para el 1° y 2° amplificado

Reactivo	Uso del reactivo	Cantidad de reactivo por muestra (µL)	Secuencia Primers	Fabricante
Gotaq® Colorless master mix	1º y 2º amplificado	12,5	---	Promega®
Agua libre de Nucleasas	1º y 2º amplificado	6,5	---	Promega®
Eub A (1518R)	1º amplificado	2,5	5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAN-CCR-CA-3'	IDT®
EubB (27F)	1º amplificado	2,5	5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3'	IDT®
PS2S(223F)	2º amplificado	2,5	5'-CTA-GGA-GAT-GAG-CCC-GCG-TTG-3'	IDT®
PS2AS(690R)	2º amplificado	2,5	5'-GCT-ACA-CCT-GAA-ATT-CCA-CTT-3'	IDT®

8.4. Anexo 4. Protocolo estandarizado para el cálculo del total de cada reactivo a utilizar, 1º y 2º amplificación

27-may-15 **SRS PCR PROTOCOL** Name: LV

	Sample	Code	Loc	Tissue
1	*muestra 1*			**higado**
2	*muestra 2*			**riñon**
3	*muestra 3*			**bazo**
4	*muestra 4*			**heces**
5	*muestra 5*			**higado**
6	*muestra 6*			**riñon**
7	*muestra 7*			**bazo**
8	*muestra 8*			**heces**
9	*muestra 9*			**higado**
10	*muestra 10*			**riñon**
11	*muestra 11*			**bazo**
12	*muestra 12*			**heces**
13	*Negative control (water free DNAse)*			
14	*P.salmonis control positivo*			

	1st	Degree (ºC)	Time	Cycles
1	Denaturation	94	2min	1
2	Denaturation	94	1min	
3	Annealing	60	2min	35
4	Extension	72	3min	

	2nd	Degree (ºC)	Time	Cycles
1	Denaturation	94	2min	1
2	Denaturation	94	1min	
3	Annealing	65	2min	35
4	Extension	72	3min	
	476pb			

GoTaq Promega	#Samples	
MaterMix(ul)	**1**	**1**
RNAse-free H2O	6,5	6,5
Go Taq Master Mix	12,5	12,5
PrimerF [10uM] EubB	2,5	2,5
PrimerR [10uM] EubA	2,5	2,5
Total Vol (ul)	24	24
Vol by sample		**24**
DNA vol (ul)	**1**	**1**
Total Rx vol (ul)		25

Picture

NESTING CONDITIONS	#Samples	
MaterMix(ul)	**1**	**1**
RNAse-free H2O	6,5	6,5
Go Taq Master Mix	12,5	12,5
PrimerF [10uM] PS2S	2,5	2,5
PrimerR [10uM] PS2AS	2,5	2,5
Total Vol (ul)	24	24
Vol by sample		**24**
DNA vol (ul)	**1**	**1**
Total Rx vol (ul)		25

Obs:

8.5. Anexo 5. Bandas en gel de agarosa que indican positividad a *P. salmonis,* Región del Maule (peces 1, 2, 3, 4, 6)

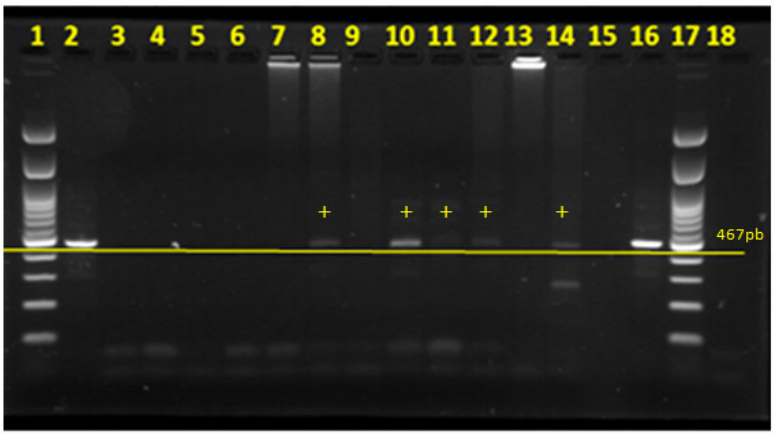

Fig. A.5. Carril 7al 10: pez uno; carril 11 al 14 pez dos, Talca.

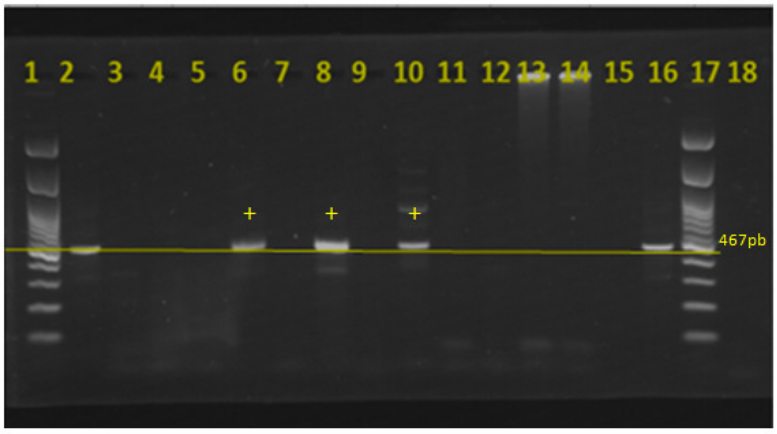

Fig. A.6. Carril 3 al 6: pez tres; 7 al 10: pez cuatro, Talca.

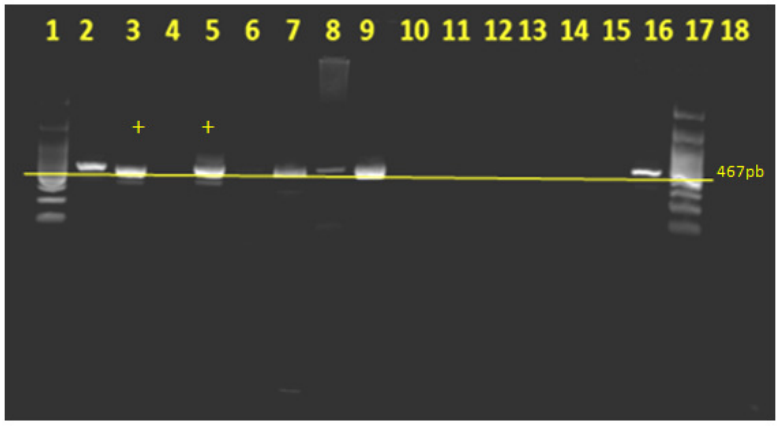

Fig. A.7. Carril 3 al 6: pez seis, Talca.

Posición muestras por carril:
1: Marcador peso molecular 100pb
2: control positivo *P. salmonis*
3 al 6: Hígado, riñón, bazo y heces
7 al 10: Hígado, riñón, bazo y heces
11 al 14: Hígado, riñón, bazo y heces
16: control positivo *P. salmonis*
17: Marcador peso molecular 100pb
18: Control negativo Agua libre de nucleasas

+: Indica positividad a *P. salmonis* en las muestras de los individuos obtenidos en la Región del Maule