

DetECCIÓN Y ASOCIACIÓN DE *Piscirickettsia salmonis* EN ÓRGANOS Y HECE DE SALMÓN COHO (*Oncorhynchus kisutch*) CULTIVADO EN EL MAR

DETECTION AND ASSOCIATION OF *Piscirickettsia salmonis* IN ORGAN AND FAECES OF COHO SALMON (*Oncorhynchus kisutch*) FARMED IN THE SEA

Ederson Juan Montalico Pongo^{1,4}, Héctor Rodríguez Papuico¹, Julio Larenas Herrera², Fernando Ardito Saenz³

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue diagnosticar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) provenientes de centros de cultivo de la Región de los Lagos, Chile, que presentaban brotes de piscirickettsiosis. Se emplearon 19 peces con signos clínicos de piscirickettsiosis. Se hicieron frotis de tejido renal, hepático, esplénico y de contenido intestinal que se procesaron mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de *P. salmonis* a través de un kit comercial. Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de Q de Cochran y de McNemar en la distribución de Chi cuadrado. Se encontró mayor positividad en el hígado (68.4%) y riñón (52.6%). Además, se encontró la bacteria en las heces (47.4%), indicando que la eliminación vía fecal del agente es posible en condiciones de cultivo. Asociando los resultados de riñón e hígado solo se logra detectar el 78.9% de los peces positivos a la bacteria, en tanto que asociando los resultados de hígado, bazo y heces se logra detectar el 100% de los peces positivos a *P. salmonis*.

Palabras clave: inmunofluorescencia indirecta, Piscirickettsiaceae, Salmonidae

¹ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú

² Universidad de Chile, Santiago, Chile

³ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

⁴ E-mail: ejmontalico@gmail.com

Recibido: 18 de junio de 2020

Aceptado para publicación: 15 de enero de 2021

Publicado: xxx

ABSTRACT

The aim of this study was to diagnose the presence of *Piscirickettsia salmonis* in samples of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) from fish farms in the Los Lagos Region, Chile, which presented outbreaks of piscirickettsiosis. In total, 19 fish with clinical signs of piscirickettsiosis were used. Smears of kidney, liver and splenic tissue and intestinal content were made, and processed using the indirect immunofluorescence test (IFAT) for the detection of *P. salmonis* through a commercial kit. The data obtained were subjected to the Cochran and McNemar Q test in the Chi square distribution. Higher positivity was found in the liver (68.4%) and kidney (52.6%). In addition, the bacterium was found in the faeces (47.4%), indicating that the elimination via the faeces of the agent is possible under farming conditions. By associating the kidney and liver results, only 78.9% of the fish positive for the bacteria could be detected, while by associating the liver, spleen and faeces results, 100% of the fish positive to *P. salmonis* can be detected.

Key words: indirect immunofluorescence, piscirickettsiosis, Salmonidae

INTRODUCCIÓN

En Chile, la salmonicultura se ha convertido en uno de los sectores más exitosos de la economía nacional (Bravo y Midtlyng, 2007; SalmonChile, 2017), siendo el segundo productor mundial de salmónidos de cultivo después de Noruega (Buschmann *et al.*, 2009; SERNAPESCA, 2016). No obstante, las enfermedades infecciosas constituyen un serio problema para esta industria, siendo el mayor impacto en la fase de engorde, efectuada en el agua de mar, generando pérdidas que exceden los 100 millones de dólares anuales (Bravo y Midtlyng, 2007; Ramírez *et al.*, 2015). Los patógenos de mayor importancia son la bacteria *Piscirickettsia salmonis* y el ectoparásito *Caligus* spp. Según Cortés (2015), infecciones con *P. salmonis* son la principal causa de muerte de salmónidos en Chile, generando grandes mortalidades al final del ciclo del cultivo del salmón que dura prácticamente dos años (Rozas y Enríquez, 2014).

La piscirickettsiosis no se ha podido controlar debido a la escasa información acerca de varios aspectos del ciclo de vida de la

bacteria como la virulencia y los mecanismos reguladores de patogenia (Segovia *et al.*, 2018), así como los medios de transmisión y excreción del agente. Este patógeno también afecta diversos salmónidos como trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón coho (*O. kisutch*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón chinook (*O. tshawytscha*), salmón japonés (*O. masou*) y salmón rosado (*O. gorbuscha*) (Leal y Woywood, 2007). Se sospecha que el salmón coho es la especie más vulnerable (OIE, 2019). *P. salmonis* es una bacteria intracelular facultativa, aeróbica, gram negativa, inmóvil, acapsulada, pleomórfica y difícil de cultivar (OIE, 2019; Gómez *et al.*, 2009). Vera *et al.*, (2012) desarrollaron un nuevo medio de cultivo líquido para *P. salmonis*. La temperatura óptima de multiplicación se encuentra entre 15 y 18 °C, disminuyendo significativamente su replicación bajo los 10 °C y sobre los 20 °C (Fryer *et al.*, 1992).

La bacteria infecta y sobrevive en su célula huésped mediante un proceso de virulencia regulado por una respuesta adaptativa durante la infección del huésped (Zúñiga *et al.*, 2020). Asimismo, se describe la presen-

cia de genes relacionados con la adquisición de hierro que codificarían posibles factores de virulencia (Pulgar *et al.*, 2015; Yáñez *et al.*, 2019). La piscirickettsiosis, denominada también como «Síndrome de Huito», «Síndrome del salmón coho», «Septicemia rickettsial del salmón (SRS)» (Leal y Woywood, 2007) es una enfermedad que se desarrolla en ambientes con agua de mar, aunque se han reportado casos en agua dulce (Bravo, 1994; Gaggero *et al.*, 1995).

La enfermedad se presenta entre abril y agosto, 6 a 12 semanas después que los «smolts» son transferidos a la fase marina del ciclo productivo (Cvitanich *et al.*, 1990; SERNAPESCA, 2015), y se presenta en peces de todas las edades, incluyendo tamaños comerciales (Corbeil y Crane, 2009). El agente se elimina por heces, orina y bilis de individuos afectados, pudiendo penetrar piel y branquias intactas (Smith *et al.*, 1999). Se desconoce si existen vectores marinos en la transmisión, pero la bacteria ha sido reportada en parásitos (Correal, 1995), moluscos, crustáceos, además de una diversidad de peces (Arkush *et al.* (2006).

Los peces infectados presentan desplazamiento errático, lento y en tirabuzón (Larenas *et al.*, 1995, 2000; Rozas y Enriquez, 2014), letargia y anorexia (Larenas *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2011). La piel presenta úlceras hemorrágicas de diverso tamaño (Figura 1) (Branson y Nieto, 1991), con hemorragias perioculares (Larenas *et al.*, 2000). El hematocrito se encuentra disminuido (Fryer y Hedrick, 2003). Internamente hay inflamación y necrosis en riñón, hígado, bazo, intestino, tejido hematopoyético, vejiga natatoria y musculatura esquelética (Alvarado *et al.*, 1990; Almendras *et al.*, 2000; Fryer y Hedrick, 2003; Monasterio, 2008).

La confirmación del patógeno en los tejidos es por aislamiento de líneas celulares (Mauel *et al.*, 2008). *P. salmonis* en cultivo celular puede hacerse por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) o la prue-



Figura 1. Pez con numerosas úlceras en piel causadas por piscirickettsiosis

ba de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (SERNAPESCA, 2019). La prueba de inmunofluorescencia indirecta IFI desarrollada por Lannan y Fryer (1991) es la más utilizada por ser simple, de bajo costo, rápida y de adecuada sensibilidad para detectar la bacteria. En el microscopio de fluorescencia se le observa de color verde manzana y morfología cocoide, destacándose su contorno de forma de anillo (Larenas *et al.*, 1996). La prueba IFI incorpora como primer anticuerpo inmunoglobulina IgG de ratón anti *P. salmonis* y como segundo anticuerpo un IgG comercial anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), aunque esta técnica fue modificada por Larenas *et al.* (1996) mediante el uso de microondas, lo cual disminuye el tiempo para la incubación del primer y segundo anticuerpo.

El objetivo de la presente investigación fue diagnosticar la presencia, así como la asociación de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de frotis renal, hígado, bazo y contenido intestinal de salmones coho provenientes de centros de cultivo, que presentaban brotes de piscirickettsiosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Estudio y Animales

El trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en 2015 con 19 salmo-

Cuadro 1. Tabla de contingencia 2x2 para determinar la concordancia entre dos tratamientos en un mismo grupo de individuos

		Órgano – Heces		Total
		Infectado	No infectado	
Órgano – Heces	Infectado	a	b	a+b
	No infectado	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

nes coho (*Oncorhynchus kisutch*), adultos moribundos o muertos, con signos clínicos de piscirickettsiosis. Los especímenes provinieron de jaulas de crianza de salmones de la Región de los Lagos, Chile, zona endémica, cuyo diagnóstico fue realizado por la empresa salmonera, según protocolos y normativa del SERNAPESCA (2018).

Necropsia y Frotis

Se procedió a la eutanasia de los peces con un golpe en la cabeza. La necropsia se realizó según Acuña *et al.* (2014). Se hizo un corte abdominal ventral con bisturí, del opérculo hasta el ano, un segundo corte de la zona anal hasta el extremo superior del opérculo y un tercer corte uniendo los dos cortes previos a finde facilitar la toma de muestras y evitar la contaminación cruzada. Se hicieron frotis de tejido renal, hígado, bazo y contenido fecal. En el caso de órganos, se hizo un corte y se introdujo un hisopo en la zona de la incisión, mientras que para las heces, se hizo el corte longitudinal en el intestino. El transporte de las muestras desde el centro de cultivo al laboratorio se hizo en un contenedor con bolsas de hielo.

Análisis de las Muestras

Para el análisis de las muestras se empleó la técnica IFI establecido por Lannan *et al.* (1991). Se utilizó el kit comercial SRS-

Fluoro Test Indirecto del laboratorio BiosChile para detectar *P. salmonis*. El procesamiento de las muestras se realizó utilizando el protocolo del kit.

Como controles positivos se usaron frotis de una alícuota de cultivo celular CHSE-214 infectada con *P. salmonis* (100% de efecto citopático). Para confirmar la presencia del agente se realizaron pruebas de tinción Giemsa, Gram, además de las pruebas de diagnóstico IFI y PCR. Los controles negativos utilizados fueron frotis de tejidos de riñón, hígado, bazo y contenido intestinal de truchas arcoíris, clínicamente sanas, de la Región de Valparaíso, Chile, lugar donde nunca hubo se ha registrado brotes de piscirickettsiosis. Se comprobó el estatus de estos controles mediante pruebas de Gram, IFI y PCR. Asimismo, como control negativo se utilizó frotis de cultivos celulares libres de la bacteria. Tanto los controles positivos como los negativos procedieron del laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile.

Para observar al patógeno se usó el microscopio de epifluorescencia Nikon, Optiphot-2, Tokio Japón, con longitud de onda de 494 nm. En cada muestra se observaron 10 campos con un aumento de 1000X, según lo descrito por Smith *et al.* (1999). Las muestras se clasificaron como negativas (-) o po-

Cuadro 2. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de riñón, hígado, bazo y heces de 19 individuos salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), procedentes de la Región de los Lagos, Chile

Pez	Órganos				Órganos positivos (n)
	Riñón	Hígado	Bazo	Heces	
1	-	-	+	-	1
2	+	-	+	+	3
3	+	+	-	-	2
4	-	+	-	-	1
5	+	+	-	+	3
6	-	-	-	+	1
7	-	-	-	+	1
8	+	+	-	-	2
9	+	+	-	-	2
10	+	+	-	-	2
11	-	+	-	+	2
12	-	+	-	-	1
13	-	+	+	-	2
14	-	-	-	+	1
15	+	+	-	-	2
16	-	+	+	+	3
17	+	+	-	+	3
18	+	+	-	-	2
19	+	-	-	+	2
Total positivos	10	13	4	9	
Total negativos	9	6	15	10	
Positivos (%)	52.6	68.4	21.1	47.4	

sitivas (+) si se detectó al menos una bacteria dentro de los 10 campos visuales.

Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba Q de Cochran y y de McNemar en la distribución de Chi cuadrado para comparar la presencia de *P. salmonis* en órganos y heces. Los resultados se ordenaron en filas y columnas, donde los resultados (+) se asignó el 1 y a los (-) el

0. La hipótesis nula (Ho) indicó la probabilidad de respuesta (+) para cada una de las cuatro muestras y la hipótesis alterna (Ha) indicó la probabilidad de registrar una respuesta (+) para cada una de las cuatro muestras es diferente. Se utilizó la fórmula de Siegel (1956): $\chi^2_Q = ((K-1) [K \llcorner Gn^2 - (\llcorner Gn)^2]) / K \llcorner Lc - \llcorner Lc^2$, donde χ^2_Q : Estadígrafo Chi cuadrado de la prueba Q de Cochran; K: N° de tratamientos; Gn: N° de respuestas de cambio (+) de cada tratamiento en la columna;

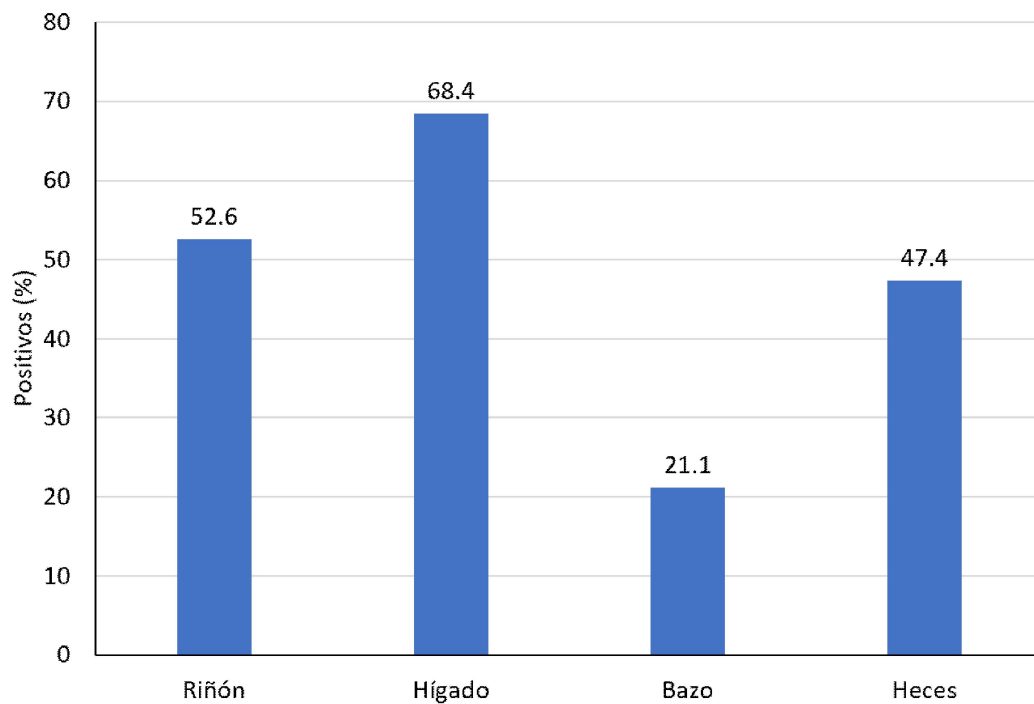


Figura 2. Porcentaje de positividad de *Piscirickettsia salmonis* en frotis de órganos y heces observados al microscopio de epifluorescencia de 19 especímenes de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), procedentes de la Región de los Lagos, Chile

Lc: N° de respuestas de cambio (+) por individuo de la muestra.

Para determinar la asociación estadística de *P. salmonis* en órganos y heces, se utilizó el método McNemar (X^2) (Dawson-Saunders y Trapp, 1997; Martín *et al.*, 1997), permitiendo evaluar con $\alpha = 0.05$ la concordancia entre dos tratamientos en un mismo grupo de individuos. Se usó una tabla de contingencia agrupados en pares, según lo señalado por Martín *et al.* (1997) (Cuadro 1). La fórmula empleada fue $\chi_1^2 = (|b-c| - 1)^2 / b+c$, donde **a**: Los órganos detectados como (+) por la prueba IFI y que son verdaderamente positivos; **b**: Los órganos de individuos falsos (+). IFI los define como (+), pero en realidad son (-); **c**: Los órganos de individuos falsos (-). IFI los define como (-), pero en realidad son (+); **d**: Órganos de individuos detectados

como (-) por IFI y que son verdaderamente (-); **a+c**: Total de órganos verdaderamente positivos; **b+d**: Total de órganos verdaderamente negativos.

RESULTADOS

Se confirmó la presencia de lesiones macroscópicas correspondientes a piscirickettsiosis en todos los especímenes. Se observaron úlceras prominentes en la piel, palidez hepática y hemorragias en órganos abdominales. Los resultados de la prueba de IFI se muestran en el Cuadro 2 y la Figura 2). En el cuadro 2 se puede observar que todos los peces resultaron positivo a la presencia de *P. salmonis*, pues se logró detectar la presencia del agente en al menos una muestra de órganos o en heces.

Cuadro 3. Resumen de la asociación encontrada entre órganos y heces de 19 especímenes de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), procedentes de la Región de los Lagos, Chile salmón coho, afectados positivos a *Piscirickettsia salmonis*

	Hígado	Bazo	Heces
Riñón	Existe asociación significativa ($X^2= 0.333$)	Existe asociación significativa ($X^2= 2.083$)	Existe asociación significativa ($X^2= 0.307$)
Hígado		No existe asociación significativa ($X^2= 4.923$)	Existe asociación significativa ($X^2= 0.642$)
Bazo			Existe asociación significativa ($X^2= 1.777$)

Grado de asociación entre órganos y heces en forma conjunta

Empleando la tabla de contingencia del Cuadro 1 y la prueba Q de Cochran con un $\alpha=5\%$ con la distribución de Chi cuadrado y grados de libertad $K-1=3$ se obtiene la sumatoria de calores positivos por cada órgano y heces; es decir, 10, 13, 4 y 9 respectivamente, lo que resulta en un valor de $Q=7.636$, el cual indica que los datos obtenidos difieren significativamente al ser analizados en forma conjunta.

Asociación entre órganos y heces

El Cuadro 3 muestra el resultado de las asociaciones estadísticas entre órganos y heces de salmón coho usando la ecuación de McNemar (X^2).

patógeno en las muestras de hígado (68.4%), seguido de riñón (52.6%), heces (47.4%) y bazo (21.1%) (Figura 2), demostrando que ningún órgano en forma independiente es capaz de detectar el 100% de los animales con piscirickettsiosis. Al asociar los resultados de los órganos en pares y de a tres se pudo establecer la mejor asociación capaz de detectar el 100% de los animales infectados (Figura 3).

Según la Figura 3, la asociación de riñón solo detecta el 78.9% de peces positivos a *P. salmonis*, mientras que la asociación de hígado, bazo y heces detectó el 100% de infectados. Esto no concuerda con el OIE, que indica que los mejores órganos para diagnosticar la piscirickettsiosis son el riñón e hígado (Evensen, 2016).

Según la OIE (2006) se menciona que los órganos de diagnóstico para piscirickettsiosis son solo el riñón y el hígado. No obstante, en el presente trabajo se incluyeron muestras de bazo, debido a que Cvitanich *et al.* (1990) describe que rickettsias como *P. salmonis* afectan princi-

DISCUSIÓN

Se analizaron muestras de 19 salmónes coho con la prueba IFI para detectar *P. salmonis*, comprobando mayor positividad al

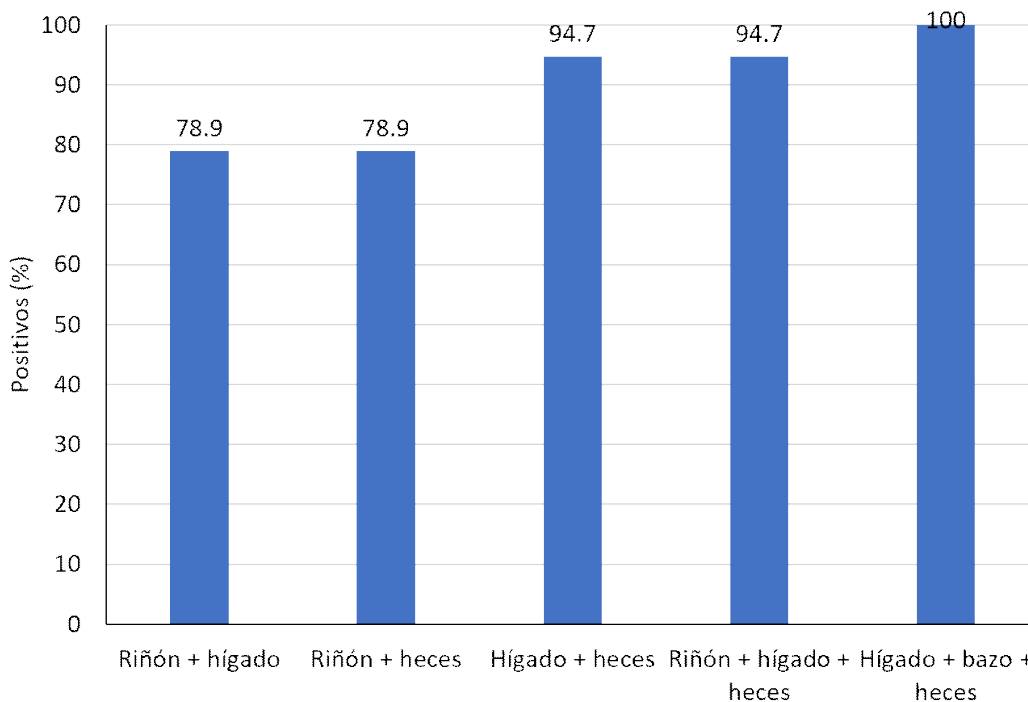


Figura 3. Porcentaje de detección de piscirickettsiosis (*Piscirickettsia salmonis*) por asociación de +órganos-heces de 19 especímenes de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), procedentes de la Región de los Lagos, Chile

palmente al bazo y riñón. De otra parte, se decidió incluir muestras de heces porque Smith *et al.* (1999) describieron que el agente es eliminado por vía fecal.

En el presente estudio se encontró que la lesión macroscópica más prominente eran las úlceras, aunque hasta la fecha no se ha demostrado que las úlceras sea otra vía de eliminación del agente. Salinas *et al.* (1998) demostró que las vías de eliminación de *P. salmonis* en peces con signología de piscirickettsiosis era la orina y la bilis. Asimismo, se ha demostrado la eliminación de *P. salmonis* por vía fecal al medio marino (Salinas *et al.*, 1998; Larenas *et al.*, 2005; Peirano, 2015), pero se debe establecer si el patógeno es viable y logra afectar a otras especies susceptibles. En el presente estudio se demostró que los peces excretan *P. salmonis* vía fecal en condiciones de cultivo en agua de mar.

Según Allen y Hopeb (2014), hay bacterias que afectan a salmónidos y no salmónidos, capaces de sobrevivir en el estómago para luego crecer y multiplicarse en el intestino, como el *Vibrio anguillarum*, agente causal de la vibriosis en salmónidos. Este soporta el pH y las enzimas del estómago, luego se desarrolla en el intestino y se elimina vía fecal; no obstante, no hay estudios que indiquen que *P. salmonis* sea capaz de infectar por esta vía a otros peces. Salinas *et al.* (1998) y Larenas *et al.* (2005) demostraron la presencia de la bacteria en riñón, heces, orina y bilis en truchas arcoíris, previamente infectadas y cultivadas en agua dulce. Según esto, la bacteria podría ingresar al intestino y ser eliminada vía fecal por medio de la bilis. En el presente estudio se halló positividad al agente en el riñón, estimándose que la bacteria podría ser eliminada en la orina, vía riñón, tal y como fue reportado por Henríquez *et*

al. (2016), por lo que sería oportuno estudiar el riñón y orina de salmónidos cultivados en agua de mar y hallar la asociación del agente y la posible eliminación vía renal y establecer si los salmónes clínicamente sanos logran eliminar *P. salmonis* vía fecal.

Los resultados sobre presencia del *P. salmonis* en hígado, bazo y heces aquí hallados, muestran importante avance y ayuda, dando mayor precisión diagnóstica de la infección. Los resultados confirman la eliminación de *P. salmonis* por las heces en salmónes coho cultivado en agua de mar, lo cual solo se había observado de forma experimental (Larenas *et al.*, 2005). Se podría considerar que la bacteria es viable y, por lo tanto, existiría el riesgo de transmisión horizontal hacia otras especies susceptibles. Además, la excreción del agente vía fecal puede representar un medio de detección temprana, antes que aparezca un brote de piscirickettsiosis que afecte a los centros de cultivo en Chile.

CONCLUSIONES

- Se detectó *Piscirickettsia salmonis* mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en hígado, riñón bazo y heces del salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), cultivados en agua de mar.
- Se encontró mayor frecuencia del agente en el hígado (68.4%) seguido del riñón (52.6%), indicando que ninguno de los dos órganos fue suficiente para detectar el total de peces positivos a *P. salmonis*.
- La asociación de los resultados de frotis de muestras de hígado, bazo y heces permite detectar el 100% de los peces infectados con la bacteria.
- *P. salmonis* se encontró por primera vez en heces de salmón coho provenientes de un cultivo en agua de mar.

LITERATURA CITADA

1. **Acuña M, Larenas J, Olivares R. 2014.** Manual de anatomía y procedimientos diagnósticos en salmónidos. Santiago, Chile: Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 17 p.
2. **Allen SA, Hopeb TJ. 2014.** Mechanisms of immunoglobulin-mediated mucus entrapment of pathogens at various mucosal surfaces. *Antibody Fc 1*: 351-357. doi: 10.1016/B978-0-12-394802-1.00020-0
3. **Almendras FE, Fuentealba IC, Frederick Markham RF, Speare DJ. 2000.** Pathogenesis of liver lesions caused by experimental infection with *Piscirickettsia salmonis* in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Vet Diagn Invest* 12: 552-557. doi: 10.1177/104063870001200610
4. **Alvarado V, Schafer W, Enriquez R, Monrás M, Cubillos V, Farías C, Alberdi A. 1990.** Síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de salmonídeos cultivados en fase de agua de mar en Chile. *Situación actual. Pat Anim* 4: 10-13.
5. **Arkush KD, Edes HL, McBride AM, Adkison MA, Hedrick RP. 2006.** Persistence of *Piscirickettsia salmonis* and detection of serum antibodies to the bacterium in white seabass *Atractoscion nobilis* following experimental exposure. *Dis Aquat Org* 73: 131-139. doi: 10.3354/dao073131
6. **Branson EJ, Diaz-Muñoz DN. 1991.** Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in South America. *J Fish Dis* 14:147-156. doi: 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00585.x
7. **Bravo S. 1994.** Piscirickettsiosis in freshwater. *Bull Eur Assn Fish P* 14:137-138.
8. **Bravo S, Midtlyng PJ. 2007.** The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999- 2003. *Aquaculture* 270: 36-42. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2007.06.017

9. **Buschmann AH, Cabello F, Young K, Carvajal J, Varela DA, Henríquez L. 2009.** Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean Coast Manage* 52: 243-249. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2009.03.002
10. **Corbeil S, Crane M. 2009.** *Piscirickettsia salmonis*. [Internet]. Available in: <https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/animal/ah1/ANZSDP-Piscirickettsia-salmonis.pdf>
11. **Correal P. 1995.** Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo en salmónidos. Tesis de Médico Veterinario. Santiago, Chile: Univ. de Chile. 62 p.
12. **Cortés M. 2015.** Study of the type 4b protein secretion system (dot/icm) and the effector protein SdhA in *Piscirickettsia salmonis*. Tesis Doctoral. Puerto Montt, Chile: Univ. Austral de Chile. 72 p.
13. **Cvitanich J, Gárate O, Smith C. 1990.** Etiological agent in a Chilean coho disease isolated and confirmed by Koch's postulates. *AFS/FHS Newsletter* 18: 1-2.
14. **Dawson-Saunders B, Trapp R. 1997.** Bioestadística médica. Mexico: El Manual Moderno. 435 p.
15. **Fryer JL, Hedrick RP. 2003.** *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *J Fish Dis* 26: 251-262. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00460.x
16. **Fryer J, Lannan C, Giovannoni S, Wood N. 1992.** *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int J Syst Bacteriol* 42: 120-126. doi: 10.1099/00207713-42-1-120
17. **Gaggero A, Castro H, Sandino A. 1995.** First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. *J Fish Dis* 18: 277-279. doi: 10.1111/j.1365-2761.1995.tb00303.x
18. **Gómez F, Henríquez V, Marshall SH. 2009.** Additional evidence of the facultative intracellular nature of the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Arch Med Vet* 41: 261-267. doi: 10.4067/S0301-732X20090003-00011.
19. **Henríquez P, Kaiser M, Bohle H, Bustos P, Mancilla M. 2016.** Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *J Fish Dis* 39: 441-448. doi: 10.1111/jfd.12427
20. **Lannan CN, Fryer J. 1991.** Recommended methods for inspection of fish for the salmonis rickettsia. *Bull Eur Assn Fish P* 11: 135-136.
21. **Larenas J, Contreras J, Smith P. 2000.** Piscirickettsiosis: uno de los principales problemas en cultivos de salmónes en Chile. *Tecnovet* 6: 28-30.
22. **Larenas J, Hidalgo L, Garcés H, Fryer J, Smith P. 1995.** Piscirickettsiosis: lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Av Cs Vet* 10: 53-58. doi: 10.5354/0716-260X.1995-10440
23. **Larenas J, Astorga C, Contreras J, Garcés H, Fryer JL, Smith P. 1996.** Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. *Fish Pathol* 31: 231-232. doi: <https://doi.org/10.3147/jsfp.31.231>
24. **Larenas J, Zamorano E, Smith P. 2005.** Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. *Mon Electr Patol Vet* 2: 59-67.

25. **Leal J, Woywood D. 2007.** Piscirickettsia en Chile: avances y perspectivas para su control. *Salmociencia* 2: 34-42.
26. **Martin ER, Kaplan NL, Weir BS. 1997.** Tests for linkage and association in nuclear families. *Am J Hum Genet* 61: 439-448. doi: 10.1086/514860
27. **Mauel M, Ware C, Smith P. 2008.** Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *J Vet Diagn Invest* 20: 213-214. doi: 10.1177/104063870802000211
28. **Monasterio M. 2008.** Descripción patológica en salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) coinfectados para reproducir experimentalmente piscirickettsiosis y anemia hemolítica del salmón. Tesis de Médico Veterinario. Santiago, Chile: Univ. de Chile. 98 p.
29. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2019.** Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Paris: OIE. [Internet]. Disponible en: <https://www.oie.int/es/normas/manual-acuatico/acceso-en-linea/>
30. **Peirano P. 2015.** Determinación de la presencia y asociación de *Piscirickettsia salmonis* en heces, hígado y riñón de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en condiciones de cultivo en mar. Tesis de Médico Veterinario. Santiago, Chile: Univ. de Chile. 28 p.
31. **Pulgar R, Travisany D, Zuñiga A, Maass A, Cambiazo V. 2015.** Complete genome sequence of *Piscirickettsia salmonis* LF-89 (ATCC VR-1361) a major pathogen of farmed salmonid fish. *J Biotechnol* 212: 30-31. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.07.017
32. **Ramirez R, Gomez F, Marshall SH. 2015.** The infection process of *Piscirickettsia salmonis* in fish macrophages is dependent upon interaction with host-cell clathrin and actin. *FEMS Microbiol Lett* 362: 1-8. doi: 10.1093/femsle/fnu012
33. **Rozas M, Enríquez R. 2013.** Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J Fish Dis* 37: 163-188. doi: 10.1111/jfd.12211
34. **Salinas G, Contreras J, Smith P, Larenas J. 1998.** Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water condition. In: VIII International Conference «Diseases of Fish and Shellfish». Edinburgh, UK.
35. **SalmonChile. 2017.** Producción. Santiago de Chile: SalmonChile. [Internet]. Disponible en: <https://www.salmonchile.cl/produccion-salmonchile/>
36. **Segovia C, Arias-Carrasco R, Yañez AJ, Maracaja-Coutinho V, Santander J. 2018.** Core non-coding RNAs of *Piscirickettsia salmonis*. *Plos One* 13: e0197206. doi: 10.1371/journal.pone.0197206
37. **[SERNAPESCA] Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. 2015.** Anuario estadístico de pesca 2014: Subsector Acuicultura. Valparaíso, Chile: Servicio Nacional de Pesca y acuicultura.
38. **[SERNAPESCA] Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. 2016.** Informe sanitario de salmonicultura en Centro Marinos año 2015. Santiago, Chile: Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. [Internet]. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sanitario_2015.pdf
39. **[SERNAPESCA] Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. 2019.** Informe sanitario de salmonicultura en Centro Marinos año 2018. Santiago, Chile: Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. [Internet]. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sanitario_salmonicultura_en centros_marinos_2018_final.pdf
40. **[SERNAPESCA] Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2018.** Manual de inocuidad y certificación. Valparaíso, Chile: Servicio Nacional de Pesca y acuicultura. [Internet]. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/parte_i_introduccion_version_10.07.18.pdf

41. **Siegel S. 1956.** Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York, USA: McGraw Hill. 312 p.
42. **Smith P, Pizarro P, Ojeda P, Contreras J, Oyanedel S, Larenas J. 1999.** Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dis Aquat Org* 37: 165-172. doi: 10.3354/dao037165
43. **Vera T, Isla A, Cuevas A, Figueroa J. 2012.** Un nuevo medio de cultivo líquido para el patógeno *Piscirickettsia salmonis*. *Arch Med Vet* 44: 273-277. doi: 10.4067/S0301-732X2012000300010
44. **Yáñez JM, Yoshida GM, Parra A, Correa K, Barria A, Bassini LN, Christensen K, et al. 2019.** Comparative genomic analysis of three salmonid species identifies functional candidate genes involved in resistance to the intracellular bacterium *Piscirickettsia salmonis*. *Front Genet* 10: 665. doi: 10.3389/fgene.2019.00665
45. **Zúñiga A, Aravena P, Pulgar R, Travisany D, Ortiz-Severín J, Chávez F, Maas A. 2020.** Transcriptomic changes of *Piscirickettsia salmonis* during intracellular growth in a salmon macrophage-like cell line. *Front Cell Infect Mi* 9: 426. doi: 10.3389/fcimb.2019.00426