



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**

TESIS DOCTORAL

**Patogenia de piscirickettsiosis: estudio sobre la infectividad de
Piscirickettsia salmonis y el efecto de sus productos
extracelulares**

Pedro Alejandro Smith Schuster

Director de tesis: Alfonso Carbonero Martínez

Córdoba, España,

2015

TITULO: *Patogenia de la piscirickettsiosis: estudio sobre la infectividad de Piscirickettsia salmonis y efecto de sus productos extracelulares*

AUTOR: *Pedro Alejandro Smith Schuster*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Patogenia de piscirickettsiosis: estudio sobre la infectividad de *Piscirickettsia salmonis* y el efecto de sus productos extracelulares

DOCTORANDO/A: Pedro Alejandro Smith Schuster

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis presentada por el doctorando previamente mencionado se ha realizado en el período comprendido entre 2011 y 2015, tratando sobre la patogenia de la infección de *Piscirickettsia salmonis*, probablemente el agente infeccioso con mayor impacto económico en la producción animal de Chile (se han estimado pérdidas superiores a cuatro mil millones de dólares sólo en este país). A lo largo del estudio se han ido desvelando importantes incógnitas de los mecanismos de la infección por este agente, como sus rutas de acceso a sus hospedadores, tanto desde un punto de vista orgánico como celular, o la capacidad de este agente para secretar exotoxinas que tendrían un papel fundamental en la virulencia de este patógeno. Adicionalmente, se ha demostrado que *P. salmonis* replica bien en la línea celular ASK, hecho de especial relevancia de cara al diagnóstico e investigación ulteriores con este agente.

El doctorado se ha realizado en el marco de un programa de colaboración entre la Universidad de Córdoba y la Universidad de Concepción en Chile, accediendo el alumno al doctorado tras obtener el diploma de estudios avanzados (DEA) por la Universidad de Córdoba. El doctorando ha demostrado en todo momento gran entusiasmo y una gran capacidad para trabajar a unas cotas elevadísimas de calidad, algo no tan sorprendente conociendo la enorme experiencia investigadora previa a la realización de este doctorado. A pesar de la distancia, el trabajo se ha llevado con facilidad, debido fundamentalmente a que su gran autonomía para trabajar ha sido una constante.

La tesis doctoral ha dado lugar a la siguiente publicación en revistas indexadas en el JCR:

- Rojas, M.E., Galleguillos, M., Díaz, S., Machuca, A., Carbonero, A. & Smith, P.A. (2013) Evidence of exotoxin secretion of *Piscirickettsia salmonis*, the causative agent of piscirickettsiosis. *J Fish Dis*, 36, 703-709.
- Smith, P.A., Contreras, J.R., Rojas, M.E., Guajardo, A., Díaz, S. & Carbonero, A. (2015) Infectivity of *Piscirickettsia salmonis* in immersion-bath exposed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fry. *J Fish Dis*, 38, 765-770.

- Smith, P.A., Díaz, F.E., Rojas, M.E., Díaz, S., Galleguillos, M. & Carbonero, A. (2015) Effect of *Piscirickettsia salmonis* inoculation on the ASK continuous cell line. J Fish Dis, 38, 321-324.

Por todo ello, se autoriza la presentación y defensa de la tesis doctoral titulada "Patogenia de piscirickettsiosis: estudio sobre la infectividad de *Piscirickettsia salmonis* y el efecto de sus productos extracelulares" elaborada por D. Alejandro Smith Schuster para la obtención del título de doctor.

Córdoba, 1 de diciembre de 2015

Firma del director

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carbonero", is written over two horizontal lines. The signature is stylized and somewhat cursive.

Fdo.: Alfonso Carbonero Martínez

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
Introducción.....	10
Agente etiológico.....	11
Epidemiología.....	14
Aspectos clínico-patológicos.....	18
Patogénesis de la piscirickettsiosis y mecanismos de virulencia de <i>Piscirickettsia salmonis</i> ..	20
Diagnóstico	25
Tratamiento y control.....	26
Bibliografía.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y LOS ARTÍCULOS RESPECTIVOS DONDE ÉSTOS FUERON ABORDADOS.....	51
ARTÍCULOS.....	52
Artículo 1.1. "Infectivity study of <i>Piscirickettsia salmonis</i> in CHSE-214 cells by confocal and transmission electron microscopy".....	52
Artículo 1.2. "Effect of <i>Piscirickettsia salmonis</i> inoculation on the ASK continuous cell line".....	68
Artículo 2.1. "Infectivity of <i>Piscirickettsia salmonis</i> in immersion-bath exposed rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum) fry".....	79
Artículo 3.1. "Evidence of exotoxin secretion of <i>Piscirickettsia salmonis</i> , the causative agent of piscirickettsiosis".....	95
CONCLUSIONES.....	114

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

RESUMEN

La piscirickettsiosis es una enfermedad contagiosa sistémica de los peces teleósteos cuyo agente causal es *Piscirickettsia salmonis*, una bacteria gram negativa intracelular facultativa. Esta enfermedad se ha descrito esporádicamente en distintas áreas geográficas y especies de peces en el mundo, pero es endémica y particularmente severa en salmónidos criados en agua de mar en Chile. En esta tesis se investigaron algunos aspectos de la patogénesis de esta enfermedad, estudiándose la infectividad de *P. salmonis*, tanto *in vitro* como *in vivo*, y buscándose además evidencias de la capacidad de secretar exotoxinas por parte de esta bacteria. Los ensayos de infectividad en células CHSE-214, procedentes de embrión de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), mostraron que existe una rápida adherencia de la bacteria a la superficie de la membrana plasmática (≤ 5 min posinoculación) seguida de su incorporación al citoplasma de estas células, proceso que ocurre entre las 3 y las 6 h posinoculación. Por su parte, el estudio de infectividad *in vivo*, que se realizó en trucha arcoiris (*O. mykiss*), reveló que este proceso comprende tres etapas principales: (i) una fase de rápida adhesión a células epiteliales principalmente de piel y branquias, pero también del canal alimentario; (ii) una invasión progresiva desde los sitios de entrada hacia tejidos más profundos hasta alcanzar el torrente sanguíneo y; (iii) una rápida diseminación vía hematogena para alcanzar virtualmente todos los tejidos corporales. Finalmente, se demostró que *P. salmonis* puede secretar exotoxinas termolábiles que tienen un efecto citotóxico selectivo según la célula blanco expuesta y que, probablemente, son parte de los factores de virulencia involucrados en la patogénesis de la piscirickettsiosis.

SUMMARY

Piscirickettsiosis is a contagious systemic disease of teleost fish caused by *Piscirickettsia salmonis*, a gram negative facultative intracellular bacterium. This condition has been reported sporadically in different geographical areas of the world, but it is endemic and particularly severe in maricultured salmonid fish in Chile. In this research some aspects of the piscirickettsiosis pathogenesis were studied including the infectivity of *P. salmonis*, by means of *in vitro* and *in vivo* time-course assays, and the searching for evidence of exotoxin secretion of this bacterium. The *in vitro* infectivity assays conducted in CHSE-214 cells, which are derived from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) embryo cells, showed that there is a fast attachment step of this bacterium to the cell surface (≤ 5 min post-inoculation) followed by a plasma membrane penetration to reach cell cytoplasm, which occurs mainly between 3 and 6 h post-inoculation. In turn, the *in vivo* infectivity study, which was carried out in rainbow trout (*O. mykiss*), revealed that this process would comprise three major stages: (i) a rapid attachment to epithelial cells mainly of skin and gills, but also of the alimentary canal; (ii) a progressive invasion from the sites of entry to deeper underlying tissues until reaching the bloodstream and; (iii) a rapid haematogenous spread to virtually all body tissues. Finally, it was shown that *P. salmonis* can secrete heat-labile exotoxins, that produce a selective cytotoxicity depending on the type of targeted cell, which may be some of the virulence factors of this bacterium and probably play a role in the piscirickettsiosis pathogenesis.

JUSTIFICACIÓN

La población humana requiere productos alimenticios en cantidad, calidad y variedad suficiente para satisfacer en primer término sus necesidades nutricionales (United Nations, 2013), pero también, entre otras importantes, aquellas de tipo gastronómicas y sociales (Connor y Armitage, 2002; Fox, 2014). A pesar de las notables mejorías en la producción y distribución de alimentos que han existido en el último siglo, aún hoy a nivel global hay alrededor de 800 millones de personas que sufren desnutrición (Wu *et al.*, 2014). Además, y según indican las proyecciones demográficas, habrá en las próximas décadas un aumento de la población humana, con expectativas de que existan en total cerca de diez mil millones de personas el año 2050, por lo cual se espera que el requerimiento de alimentos se incremente significativamente en el futuro venidero (United Nations, 2015). En cuanto a la composición de la futura demanda, ésta debería aumentar en mayor proporción para los alimentos de origen animal que la de aquellos de fuente vegetal debido a que se espera un cambio en tal sentido empujado por un, también supuesto, aumento de los ingresos económicos promedios de la población, especialmente en los países en vías de desarrollo (Alexandratos y Bruinsma, 2012; Wu *et al.*, 2014).

Los animales acuáticos, principalmente peces, moluscos y crustáceos, representan un componente fundamental del total de alimentos de origen animal en la actualidad, y se prevé que jugarán un papel aún más relevante en el futuro para contribuir a la seguridad alimentaria del ser humano (Tacon y Metian, 2013; TWB, 2013). La producción mundial de animales acuáticos, en cifras del año 2012, alcanzó un total de 158 millones de toneladas (MMT). De éstas, aproximadamente un 58% (91,3 MMT) provino de la pesca de captura y un 42 % (66,3 MMT) de la acuicultura (FAO, 2014b). Aunque los desembarcos pesqueros del año 2012 tuvieron un leve incremento respecto de períodos anteriores, los volúmenes de

peces capturados a nivel mundial se han mantenido relativamente constantes ya desde finales de la década de 1980 alcanzando las cantidades que, según se estima, están cercanas a su máximo sustentable (FAO, 2014b). En contraste, la acuicultura se ha incrementado significativamente durante las últimas décadas expandiéndose progresivamente el número de especies cultivadas, las áreas geográficas dedicadas a esta actividad, su valor económico y su volumen de producción (Naylor *et al.*, 2000), proporcionando actualmente casi la mitad de todo el pescado usado para consumo humano (FAO, 2014a). Así, en el año 1982, globalmente se generaron 5,7 MMT de productos derivados de la acuicultura de animales acuáticos, cifra que creció progresivamente de tal manera que tras sólo tres décadas, en 2012, alcanzó un valor 10 veces superior respecto al mencionado inicialmente (FAO, 2015). Uno de los grupos de especies de mayor importancia en la acuicultura mundial, por su relativamente elevado valor económico y vigorosa demanda en distintos mercados, es el de los peces teleósteos de la subfamilia Salmoninae, que comprende las distintas especies de truchas y salmones, también denominados genéricamente como salmónidos (Asche y Bjørndal, 2011). A nivel mundial, entre los grupos de especies de peces, los salmónidos sólo son superados por aquellos de la familia Ciprinidae (carpas), aunque por gran diferencia, en tamaño de producción por acuicultura (Naylor *et al.*, 2000; FAO, 2015). Chile tiene una serie de ventajas comparativas para la acuicultura de salmónidos (Heen *et al.*, 1993; Asche y Bjørndal, 2011) y es el segundo productor mundial de estas especies, después de Noruega, cosechando el año 2014 un total bruto aproximado de 955 mil toneladas (SERNAPESCA, 2015a) con un valor *free on board* de las exportaciones de este rubro superior a los cuatro mil millones de dólares (González, 2015). La industria salmonicultora es de gran importancia económica para Chile, especialmente en las regiones donde ésta se desarrolla, siendo el segundo producto más exportado después del cobre y

estimándose que genera más de 70 mil puestos de trabajo entre empleos directos e indirectos (SALMONCHILE, 2015).

Los peces salmónidos no son nativos del hemisferio sur y cuando su cultivo en jaulas flotantes se inició en Chile, a inicios de la década de 1980, los problemas ocasionados por enfermedades estaban prácticamente ausentes en estos peces (Heen *et al.*, 1993). Sin embargo, con el incremento de la biomasa de peces, numerosas enfermedades infecciosas han afectado progresivamente estas poblaciones de salmónidos mantenidos en cautiverio. En términos de impacto económico, la anemia infecciosa del salmón (ISA) y la piscirickettsiosis (también denominada “septicemia rickettsial salmonídea” o por su sigla “SRS”) han sido las condiciones sanitarias más severas de la acuicultura en Chile (Smith *et al.*, 2011). Aunque ISA causó un enorme daño económico durante los años 2007 y 2009 (Asche *et al.*, 2009), esta afección ha sido controlada, manifestándose con muy pocos brotes subsecuentes hasta la fecha. Contrariamente, la piscirickettsiosis es una enfermedad endémica en el ambiente marino y estuarino de la zona sur de Chile (Rees *et al.*, 2014; Rozas y Enríquez, 2014). A pesar de que hay numerosas vacunas comerciales contra *P. salmonis* que se aplican en Chile (SAG, 2015) no se ha logrado controlar la enfermedad, cuya incidencia incluso ha tendido a aumentar en los últimos años (Rees *et al.*, 2014), generando elevadas mortalidades en los peces que a su vez derivan en pérdidas cuantiosas que regularmente han excedido los 100 millones de dólares anuales (Bustos, 2006; Bravo y Midtlyng, 2007; Almendras, 2015). Un problema adicional es el alto uso de antibióticos administrados en intentos terapéuticos contra la piscirickettsiosis, lo que conlleva una mala percepción de los consumidores y un eventual riesgo de salud pública. Al respecto, el año 2014 se usaron aproximadamente 563 toneladas de antibióticos en salmonicultura en Chile de los cuales el 86% se usó para el tratamiento de piscirickettsiosis (SERNAPESCA,

2015c). Debido a la importancia de esta enfermedad en Chile, se instauró un programa oficial gubernamental destinado a su control a partir del año 2013 (SERNAPESCA, 2012).

Por las razones expuestas es indudable que el desarrollo de conocimientos y herramientas que contribuyan efectivamente a prevenir y/o controlar esta enfermedad es actualmente un desafío de real importancia para Chile.

Piscirickettsia salmonis es una bacteria gram negativa intracelular facultativa (Gómez *et al.*, 2009), agente causal de la piscirickettsiosis (Fryer *et al.*, 1992). Esta última es una enfermedad infecto-contagiosa muy severa de los salmónidos criados en jaulas marinas en Chile (Venegas *et al.*, 2004), lugar donde esta entidad fue por primera vez descrita a nivel mundial (Bravo y Campos, 1989; Cubillos *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991). La presencia de piscirickettsiosis en salmónidos ha sido también documentada en Noruega (Olsen *et al.*, 1997; Karatas *et al.*, 2008), en las costas del océano Pacífico y del Atlántico de Canadá (Brocklebank *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1998), Irlanda (Rodger y Drinan, 1993) y Escocia (Grant *et al.*, 1996; Birrel *et al.*, 2003). Aunque los hospedadores principales de *P. salmonis* son los salmónidos, esta bacteria ha sido detectada, por aislamiento o reacción en cadena de la polimerasa, en otras especies de peces teleósteos enfermos tales como *Atractoscion nobilis* (Arkush *et al.*, 2006) y *Dicentrarchus labrax* (McCarthy *et al.*, 2005; Zrnčić *et al.*, 2015).

En las últimas dos décadas, numerosas bacterias fastidiosas gram negativas y que se replican intracelularmente en sus células hospedadoras, ya sea de modo obligado o facultativo, han sido reconocidas como agentes causales de enfermedades importantes en animales acuáticos incluidos moluscos, crustáceos y peces teleósteos (Mauel *et al.*, 2008; Galeotti *et al.*, 2015). Este grupo emergente de patógenos por sus similitudes fenotípicas han sido denominados laxamente como “rickettsia-like organisms” y/o “*Piscirickettsia*-like

organisms” (Mauel y Miller, 2002). Dentro de este grupo de microorganismos, *P. salmonis* fue el primer caso en que se demostró que era un patógeno de alta virulencia y que ocasionaba una enfermedad devastadora en animales acuáticos, particularmente en salmónidos (Fryer y Hedrick, 2003).

Se han realizado numerosos estudios sobre *P. salmonis* y varios de ellos han permitido obtener importantes avances como, por ejemplo, obtener una clasificación taxonómica más precisa, comprender, al menos en parte, la respuesta inmune contra esta enfermedad y recientemente conocer la secuencia del genoma de algunas cepas de esta especie bacteriana (Fryer *et al.*, 1992; Marshall *et al.*, 2007; Rozas y Enríquez, 2014; Yañez *et al.*, 2014; Pulgar *et al.*, 2015). No obstante lo anterior, el conocimiento sobre la patogénesis de la piscirickettsiosis en general y, en forma más específica, acerca de la relación patógeno-hospedador y de los mecanismos de virulencia de esta bacteria es aún muy limitado y fueron estos aspectos el foco de estudio de la presente tesis.

Aunque esta investigación fue fundamentalmente descriptiva, en congruencia con cada uno de los tres objetivos específicos se plantearon las siguientes hipótesis: 1) “*P. salmonis* se adhiere rápidamente (en minutos postexposición) a la membrana de células hospedadoras y luego en las siguientes horas es endocitada e incorporada al citoplasma dentro de vacuolas donde procede a multiplicarse por fisión binaria”; 2) “*P. salmonis* tras ingresar por piel y mucosas en sus hospedadores, invade progresivamente tejidos subyacentes hasta alcanzar el torrente sanguíneo para distribuirse entonces a todo el organismo” y 3) “*P. salmonis* secreta productos extracelulares como parte de sus factores de virulencia los cuales contienen exotoxinas que generan un efecto citotóxico en células hospedadoras”.

En cuanto a los antecedentes que respaldan la primera hipótesis se debe señalar que *P. salmonis* es un patógeno intracelular facultativo que es capaz de crecer en varias líneas celulares continuas derivadas de tejidos de peces (Rozas y Enríquez, 2014). Entre ellas, la principal es la línea CHSE-214, de tipo epitelioide y originada de embrión de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), según lo descrito por Lannan *et al.* (1984). Debido a que se sabe que las células CHSE-214 son susceptibles a la bacteria, ellas fueron las que se usaron en esta investigación como modelo biológico para describir la secuencia de invasión y la estructura o compartimento de la célula hospedera donde se encuentra *P. salmonis* en un tiempo determinado posexposición. Se esperaba que la adhesión fuese rápida debido a que estudios anteriores habían demostrado que la bacteria se une a la superficie de las ovas en un tiempo muy breve (Larenas *et al.*, 2003). Respecto a la segunda hipótesis, se había descrito previamente que *P. salmonis* podría utilizar como rutas de ingreso a sus hospedadores tanto piel como epitelio branquial ya que se generaron mortalidades, tanto en trucha arcoíris (*O. mykiss*) como en salmón coho (*O. kisutch*), luego de usar parches de contacto embebidos en el patógeno para exponer dichas localizaciones (Smith *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2004). Como consecuencia, se conjeturó que si los peces fuesen expuestos en forma completa, mediante baños con una suspensión que contuviese el patógeno, en la forma en que se llevó a cabo en este estudio, la bacteria usaría estos epitelios a modo de puerta de ingreso y posteriormente invadiría progresivamente los tejidos subyacentes, como fue planteado en la hipótesis, generando finalmente una infección sistémica usando la vía hematológica en los peces infectados. En cuanto a la tercera hipótesis, se sabe que muchas bacterias gram negativas del ser humano y de animales mamíferos secretan factores y exotoxinas como factores de virulencia (Wilson, 2006; Ye y Blanke, 2006), lo que igualmente podría ocurrir en *P. salmonis*. Esta posibilidad se veía adicionalmente apoyada

por cuanto también la secreción de productos extracelulares (PECs) con función de exotoxinas se había descrito en otras bacterias gram negativas específicamente patógenas de peces, como es el caso de *Aeromonas salmonicida* y de *Yersinia ruckeri* (Tobback *et al.*, 2007), y además debido al descubrimiento de genes que codifican exotoxinas en *Francisella novicida* (Siddaramappa *et al.*, 2011), una bacteria que está taxonómica y genéticamente relacionada con *P. salmonis*.

El fracaso de las acciones hasta ahora emprendidas para el control de la piscirickettsiosis indica que el estudio científico de esta enfermedad y su agente causal es necesario, ya que permitirá tener las bases para el eventual descubrimiento de las medidas terapéuticas y de control adecuadas para mitigar el efecto de esta patología. El conocimiento de la patogenia de una enfermedad resulta fundamental, ya que, según se deduce de numerosos ejemplos en medicina humana y veterinaria, esta información puede permitir detener o intervenir este proceso en favor del hospedador, ya sea mediante medidas terapéuticas o profilácticas (Mims *et al.*, 2001; Gyles y Prescott, 2010). En esta tesis se hicieron investigaciones dirigidas a comprender la patogenia de la piscirickettsiosis en salmónidos; avanzándose concretamente en la descripción de la cinética de infección de *P. salmonis* en células y tejidos de sus hospedadores y en identificar la capacidad de secretar exotoxinas con efecto citotóxico que serían parte de los mecanismos de virulencia usados por este importante patógeno acuático para generar el daño patológico en los peces afectados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Introducción

La piscirickettsiosis es una enfermedad septicémica infecto-contagiosa que puede tener un curso agudo o crónico y sus hospedadores principales corresponden a especies salmónidas. Su agente causal es una bacteria intracelular facultativa gram negativa aeróbica perteneciente al orden *Thiotrichales* denominada *Piscirickettsia salmonis* (Fryer y Hedrick, 2003; Rozas y Enríquez, 2014). Esta patología se evidencia normalmente en peces durante su etapa de engorda en ambiente marino y, en cierto grado, en estuarios, donde puede causar mortalidades muy significativas (Rozas y Enríquez, 2014). Debe destacarse que antes de su observación en Chile no había registros de la existencia de esta enfermedad en ningún otro lugar del mundo (Cvitanich *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990). Esta entidad ictiopatólogica ha causado daños económicos muy importantes en la acuicultura chilena. Así, desde el surgimiento de los primeros brotes de piscirickettsiosis -los cuales ocurrieron a finales de la década de 1980- hasta la actualidad, se estima que las pérdidas para la salmonicultura en Chile superarían con creces los dos mil millones de dólares (Almendras, 2015). La piscirickettsiosis, a pesar de la enorme gravitación de la anemia infecciosa del salmón (ISA) ocurrida entre los años 2007 y 2009 (Asche *et al.*, 2009; Mardones *et al.*, 2009), a largo plazo, ha sido la enfermedad con mayor impacto económico en el cultivo de salmónidos en Chile y actualmente sigue siendo la causa primordial de mortalidad por enfermedades de los peces en fase marina (SERNAPESCA 2015b) que es la etapa donde el precio de cada ejemplar tiene un valor superior. Junto con un elevado impacto económico directo, esta afección ha obligado a un alto uso de antimicrobianos para su tratamiento (SERNAPESCA 2015c), con implicación añadida de riesgo de daño ambiental y de

percepción negativa de los consumidores. Adicionalmente, supone un problema de bienestar animal en los peces que enferman (Smith *et al.*, 2011). Todo lo anterior señala que la piscirickettsiosis es una entidad patológica relevante en acuicultura y los estudios conducentes a aumentar el conocimiento sobre esta enfermedad (y su agente causal) son de importancia, ya que deberían contribuir a encontrar adecuados métodos de tratamiento e idealmente de prevención de la misma.

Agente etiológico

Como ya se ha mencionado, el agente causal de la piscirickettsiosis es el microorganismo denominado actualmente como *Piscirickettsia salmonis*. Esta relación causal quedó demostrada en forma conclusiva mediante el aislamiento de esta bacteria como agente único desde peces que cursaban la enfermedad en forma natural y a través de ensayos posteriores en que se completaron los postulados clásicos de Koch, reproduciéndose la enfermedad y reaislándose el agente en peces inoculados experimentalmente (Cvitanich *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990; Garcés *et al.*, 1991).

El primer aislamiento de *P. salmonis* se realizó desde un salmón coho con signos clínicos de la enfermedad (Fryer *et al.*, 1990) en cultivos celulares de la línea CHSE-214. Este microorganismo fue denominado con la sigla LF-89 y corresponde a la cepa tipo de *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1992). Esta cepa es la que se encuentra mejor caracterizada (Mauel y Miller, 2002) y está depositada en la “American Type Culture Collection” como ATCC VR 1361 (Fryer *et al.*, 1992; Lannan y Fryer, 1993).

El agente aislado fue clasificado inicialmente en el orden Rickettsiales y en la familia Rickettsiaceae (Fryer *et al.*, 1990) y más tarde ubicado en un nuevo género, *Piscirickettsia*, proponiéndose el nombre de la especie como *Piscirickettsia salmonis* (Fryer

et al., 1992). El análisis comparativo de las secuencias de los genes que codifican el ácido ribonucleico ribosómico (rRNA, por su sigla en inglés) de la subunidad 16S reveló que este microorganismo debía ser clasificado como miembro del subgrupo gamma de las *Proteobacterias* (Mauel *et al.*, 1999). Se demostró además que *P. salmonis* estaba filogenéticamente relacionada, aunque distantemente, con los géneros *Francisella* (Mauel *et al.*, 1999; Titball *et al.*, 2003) y *Coxiella* (Mauel *et al.*, 1999). Subsecuentemente, el género *Piscirickettsia* fue ubicado en un nuevo orden, Thiotrichales, y en una nueva familia, Piscirickettsiaceae, claramente separado de las bacterias de la familia Rickettsiaceae (Fryer y Hedrick, 2003; Garrity *et al.*, 2005).

Las bacterias de la familia Piscirickettsiaceae se caracterizan por ser gram negativas, aeróbicas, con forma cocoide, de bacilo o de espiral, ocasionalmente pleomórficas y por ser comúnmente aisladas desde ambientes acuáticos marinos. Esta familia está formada por seis géneros; *Piscirickettsia*, *Cycloclasticus*, *Hydrogenovibrio*, *Methylophaga*, *Thioalkalimicrobium* y *Thiomicrospira*, que están relacionados filogenéticamente, pero que poseen pocas características fenotípicas en común (Fryer y Hedrick, 2003; Fryer y Lannan, 2005).

P. salmonis es la única especie descrita en el género *Piscirickettsia* (Fryer y Hedrick, 2003) y corresponde a una bacteria inmóvil, no capsulada, pleomórfica, generalmente cocoide, pero que también se encuentra en pares o en forma de anillo (Fryer *et al.*, 1990). Normalmente se divide por fisión binaria (Cvitanich *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990), pero en ocasiones puede replicar por gemación (McCarthy *et al.*, 2008). La bacteria tiene un tamaño aproximado 0,5-1,5 μm de diámetro (Fryer y Hedrick, 2003), aunque se describe que puede generar variantes pequeñas con tamaños inferiores a 0,2 μm (Rojas *et al.*, 2008).

Este patógeno se multiplica dentro de vacuolas intracitoplasmáticas de sus células hospedadoras y genera efecto citopático (ECP) en varias líneas celulares provenientes de peces (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991; Fryer *et al.*, 1992) y también en una línea originada desde una especie de ranas (*Xenopus laevis*) y en otra proveniente del insecto *Spodoptera frugiperda* (Birkbeck *et al.*, 2004).

El rango de temperatura óptimo para el crecimiento de *P. salmonis* está entre los 15 y 18 °C, disminuyendo significativamente su replicación bajo los 10 °C y sobre los 20 °C y no visualizándose sobre los 25 °C (Fryer *et al.*, 1992). Los cultivos de células CHSE-214 que presentan ECP completo alcanzan títulos del orden de 10^6 a 10^7 dosis infectantes de cultivo de tejidos 50% por mL (DICT₅₀/mL) (Fryer *et al.*, 1990). Es interesante señalar que se consiguen títulos más elevados que en las células CHSE-214 cuando esta bacteria es multiplicada en una línea celular de insecto (Birkbeck *et al.*, 2004). La multiplicación bacteriana en la línea CHSE-214 se evidencia por la presentación gradual de un ECP típico, que comienza entre los días 5 a 6 posinfección y que se caracteriza por la aparición de grupos de células globosas que aumentan en número, para posteriormente desprenderse progresivamente hasta que la monocapa celular es destruida completamente a los 14 días posinfección (Fryer *et al.*, 1990; Garcés *et al.*, 1991). Cabe indicar que si bien se estimaba tradicionalmente que *P. salmonis* era un patógeno intracelular estricto, informaciones más recientes sugieren que en realidad se trataría de un organismo intracelular facultativo (Gómez *et al.*, 2009). La afirmación anterior es congruente con lo descrito en cuanto a que *P. salmonis* puede desarrollarse, aunque en forma limitada, en medios de cultivo enriquecidos pero libres de células eucariotas (Mauel *et al.*, 2008; Mikalsen *et al.*, 2008; Yañez *et al.*, 2012; Henríquez *et al.*, 2013). Sin embargo, resulta probable que en la naturaleza esta bacteria sólo se multiplique intracelularmente debido a que en

observaciones microscópicas de tejidos de peces infectados siempre se le ha encontrado dividiéndose dentro de vacuolas intracitoplasmáticas y no extracelularmente (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1990; Garcés *et al.*, 1991; McCarthy *et al.*, 2008). Esta situación podría ser análoga a lo observado con *F. tularensis*, en que luego de conocerse e interpretarse su genoma se concluyó que en la naturaleza actúa como un patógeno intracelular obligado a pesar de que puede ser cultivado en medios de cultivo bacteriológicos acelulares apropiados (Larsson *et al.*, 2005; Birkbeck, 2011).

Epidemiología

Históricamente, los primeros brotes de piscirickettsiosis que registra la literatura se presentaron en Chile en el año 1989 (Bravo y Campos, 1989; Cvitanich *et al.*, 1990), en canales marinos de la localidad de Calbuco en la X Región (Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990), lugares que tenían una gran densidad de sitios de cultivo con salmón coho. A pesar de ello, existen antecedentes de que los brotes ya habían comenzado a finales del año 1988 y mediante análisis retrospectivos de muestras de tejidos de salmón coho se ha concluido que la bacteria se encontraba al menos desde 1987. En los meses que siguieron a los brotes detectados en Calbuco (Bravo y Campos, 1989; Alvarado *et al.*, 1990), esta condición se extendió a los centros costeros ubicados en otras áreas de la X Región para posteriormente alcanzar también los sitios con cultivos marinos de la XI Región. En los últimos años se ha registrado la presencia de piscirickettsiosis entre las Regiones IX y la XIII pero con mayor incidencia y prevalencia en las Regiones X y XI que son las zonas de mayor concentración de centros marinos de cultivo de salmónidos (Mancilla y Bustos, 2015; SERNAPESCA, 2015b)

Normalmente, en un lote de peces determinado, la enfermedad se comienza a manifestar una vez transcurridas seis a doce semanas después de la transferencia de los “smolts” al agua de mar (Alvarado *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990). Al respecto, se ha propuesto que el proceso de esmoltificación puede incrementar la susceptibilidad de los peces infectados (Graumann *et al.*, 1997). Originalmente, las epizootias surgían en el otoño y la primavera de cada año (Lannan y Fryer, 1994), cuando las temperaturas del agua fluctuaban entre los 9 y los 16 °C (Cvitanich *et al.*, 1991; Lannan y Fryer, 1994). Posteriormente su presentación cambió sin tener la marcada estacionalidad anteriormente señalada, puesto que esta enfermedad se comenzó a presentar en cualquier época del año (Monasterio, 2008). En los últimos años la piscirickettsiosis, si bien ocurre durante todo el año, tiene con una mayor severidad durante los meses de verano y en las fases finales del ciclo de engorde en el mar (SERNAPESCA, 2015b).

La piscirickettsiosis se considera básicamente una enfermedad marina. Esta aseveración se sustenta sobre la base de que la vasta mayoría de los brotes ocurre en peces criados en jaulas localizadas en el mar y en menor medida en aquellos ubicados en aguas estuarinas que tienen influencia marina. No obstante lo anterior, excepcionalmente la enfermedad se ha reportado en agua dulce y la literatura describe dos hallazgos en este tipo de ambiente acuático, uno de ellos comunicado por Bravo (1994) y el otro por Gaggero *et al.* (1995).

Si bien esta enfermedad se describió originalmente sólo en el salmón coho (Bravo y Campos, 1989; Cubillos *et al.*, 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991), en los años que siguieron afectó a todas las especies de salmónidos producidas en Chile, describiéndose en salmón del Atlántico, salmón chinook, trucha arcoíris (Garcés *et al.*, 1991; Fryer *et al.*, 1992; Fryer y Mauel, 1997) y salmón cereza (*O. masou*) según lo

descrito por Bravo (1994). El salmón coho resultó más susceptible que la trucha arcoíris en una infección experimental (Smith *et al.*, 1996a). No obstante lo anterior, un estudio epidemiológico de la situación de campo reciente en Chile mostró que al comparar los brotes de piscirickettsiosis entre el salmón del Atlántico y la trucha arcoíris, en esta última especie se registraron las mayores mortalidades y además los brotes de esta enfermedad se iniciaban antes (Jakob *et al.*, 2014).

Aunque los hospedadores principales de *P. salmonis* son peces de los géneros *Oncorhynchus* y *Salmo* de la subfamilia Salmoninae, existen reportes de la presencia de esta bacteria en otras especies de peces como *D. labrax* (McCarthy *et al.*, 2005; Zrnčić *et al.*, 2015) y *A. nobilis* (Arkush *et al.*, 2006). Ambos brotes de piscirickettsiosis en *D. labrax* han ocurrido en peces cultivados en el mar Mediterráneo cursando con cuadros de encefalitis severa. El primero de ellos tuvo lugar en las costas de Grecia y en muestras de tejidos de estos peces se reconoció por criterios serológicos, histológicos y de análisis genómico la presencia de *P. salmonis* (McCarthy *et al.*, 2005); el segundo caso es más reciente, ocurrió en la costa de Croacia y la bacteria fue detectada en tejidos de los peces mediante hibridación *in situ* y secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S (Zrnčić *et al.*, 2015). Por su parte, la identificación de *P. salmonis* en *A. nobilis* ocurrió desde peces juveniles, cultivados en estanques con agua de mar en California (EE.UU.), que cursaban con mortalidades y lesiones hepáticas similares a las que se presentan en peces salmonídeos con piscirickettsiosis. En este caso, la bacteria fue aislada y se demostró también su patogenicidad para salmón coho mediante inoculaciones experimentales (Chen *et al.*, 2000). Finalmente, aún cuando no serían hospedadores naturales, se ha logrado generar mortalidades de un 10% en embriones de peces zebra (*Danio rerio*) inyectados con *P.*

salmonis, lo que serviría de modelo experimental para el estudio de esta enfermedad (Berger, 2014).

Posteriormente al aislamiento de *P. salmonis* en Chile, esta bacteria se ha encontrado en salmónidos cultivados en diferentes zonas geográficas del mundo, registrándose casos de piscirickettsiosis en Canadá, en sus costas este (Cusack *et al.*, 2002) y oeste (Brocklebank *et al.*, 1992), Irlanda (Palmer *et al.*, 1997), Escocia (Birrell *et al.*, 2003), y Noruega (Olsen *et al.*, 1997). En el hemisferio sur, la identificación específica e inequívoca de la presencia de *P. salmonis* sólo ha ocurrido en Chile, aún cuando una bacteria con características fenotípicas similares fue aislada desde salmónes del Atlántico cultivados en la isla de Tasmania en el sur de Australia (Corbeil *et al.*, 2005). Aunque ya existía la descripción de algunos hallazgos microscópicos de organismos similares a *P. salmonis*, el descubrimiento de la piscirickettsiosis aumentó el interés de la comunidad científica para investigar la presencia de este tipo de agentes causales y su papel en enfermedades de otros animales acuáticos. Así, se han detectado bacterias denominadas como “organismos similares a rickettsias” (“Rickettsia like organisms” o “RLO”) y/o “organismos similares a *Piscirickettsia*” (“*Piscirickettsia* like organisms” o “PLO”) en una amplia variedad de especies acuáticas, incluidos moluscos, crustáceos y peces, y en algunos casos son agentes causales de enfermedades de importancia por su alta prevalencia y/o tasa de mortalidad (Correal, 1995; Venegas, 1996; Mauel y Miller, 2002). Cabe señalar, sin embargo, que a pesar de la similitud fenotípica de los RLO y los PLO con *P. salmonis*, el conocimiento sobre las relaciones taxonómicas y filogenéticas entre estos microorganismos es aún incompleto.

En cuanto a la transmisión de *P. salmonis* en el ambiente acuático, en función de un estudio epidemiológico en Chile, se concluyó que este patógeno puede diseminarse a través

del agua a distancias bastantes considerables (hasta 10 km) desde un centro de cultivo marino afectado a otro con peces sanos (Rees *et al.*, 2014) lo cual sería uno de los factores que dificultaría el control de esta enfermedad. Estos mismos autores determinaron que otros factores de riesgo que condicionan el inicio y la severidad de los brotes de piscirickettsiosis, además de la distancia con un centro de cultivo afectado, son la cantidad de otros centros de cultivo de salmónidos vecinos y la temperatura del agua, en el sentido de que un aumento de ésta incrementa el riesgo (Rees *et al.*, 2014).

Aspectos clínico-patológicos

Como ya se ha mencionado, los cuadros clínicos se presentan en los salmónidos cultivados casi exclusivamente cuando están en el mar o en aguas estuarinas (Smith *et al.*, 2011; Rozas y Enríquez, 2014). Los peces enfermos exhiben signos clínicos inespecíficos tales como un desplazamiento cerca de la superficie, errático, incoordinado, lento, y a veces en tirabuzón, lo que refleja alteraciones del sistema nervioso en estos individuos (Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995; Larenas *et al.*, 2000). Además, se ha descrito letargia, anorexia, choque contra las mallas de las balsas-jaulas y orillamiento (Olsen *et al.*, 1997; Larenas *et al.*, 2000).

Las alteraciones macroscópicas externas más relevantes incluyen oscurecimiento y descamación de la piel (Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995; Monasterio, 2008), además de lesiones en este tejido que comprenden desde pequeñas áreas de solevantamiento hasta úlceras hemorrágicas de hasta 2 cm de diámetro (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). También se describe la presencia de hemorragias petequiales y equimóticas en la piel de la base de las aletas, del vientre y de la zona perianal y en algunos casos, hemorragias perioculares, que generalmente son bilaterales (Alvarado *et al.*, 1990;

Cubillos *et al.*, 1990). Otro hallazgo importante es la aparición de palidez branquial, lo que refleja una anemia severa, corroborada por bajos niveles de hematocrito (Olsen *et al.*, 1997). Además, se ha observado neutrofilia, con niveles 10 a 20 veces más altos que los rangos normales (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991).

En el examen anátomo-patológico macroscópico de órganos internos, se aprecia que la mayoría de los peces afectados presenta diferentes grados de ascitis y de peritonitis (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). En relación al primer hallazgo, Larenas *et al.* (1995) señalan que la ascitis sólo se observa en peces moribundos y, por lo tanto, sugieren que podría considerarse más bien como una alteración de tipo terminal. Por otra parte, se aprecian frecuentemente hemorragias petequiales en estómago, intestino, ciegos pilóricos, vejiga natatoria, grasa visceral (Cvitanich *et al.*, 1991), musculatura abdominal (Larenas *et al.*, 1995) y peritoneo (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). En cuanto al hígado, éste exhibe un aumento de volumen (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991); y además puede mostrar un aspecto “moteado”, debido a la presencia de pequeños nódulos subcapsulares blanquecinos a amarillentos distribuidos difusamente en toda su superficie (Larenas *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1997). Al respecto, se señala que la presencia de estos nódulos puede ser señal de un grado más avanzado de cronicidad del cuadro clínico (Almendras *et al.*, 2000). Ocasionalmente, este órgano se ve pálido y hemorrágico (Cvitanich *et al.*, 1991). La vesícula biliar está generalmente pletórica (Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990), evidenciando que los peces no han comido por un tiempo prolongado (Alvarado *et al.*, 1990). En tanto, el riñón exhibe pérdida de su apariencia brillante, tornándose marrón-grisáceo opaco (Alvarado *et al.*, 1990) y con aumento de su tamaño (Fryer *et al.*, 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). A nivel del bazo, se presenta esplenomegalia en diferentes grados, observándose en reiteradas ocasiones las mismas lesiones blanquecinas

descritas en el hígado (Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990). En el estómago, se encuentra un líquido transparente seromucoso (Alvarado *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1990), lo cual confiere la impresión de que el pez ha tragado agua (Alvarado *et al.*, 1990). El intestino generalmente no posee alimento (Alvarado *et al.*, 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991), evidenciándose enteritis en el tercio distal (Alvarado *et al.*, 1990); adicionalmente, el lumen de esta víscera puede contener un gran volumen de mucus amarillento (Schäfer *et al.*, 1990). El corazón, en ocasiones, también presenta focos necróticos y hemorragias petequiales de tipo difuso (Cubillos *et al.*, 1990) y en un 2% de los peces moribundos se observa la presencia de una pseudomembrana que lo cubre, sugiriendo la presencia de pericarditis (Cvitanich *et al.*, 1991). Además, se aprecia un aumento en el volumen del líquido cefalorraquídeo, acompañado en muchos casos de congestión de las meninges (Larenas *et al.*, 1995). Por la gran variedad de órganos que presentan lesiones, se puede desprender que esta enfermedad tiene una naturaleza sistémica (Fryer y Hedrick, 2003) y, aunque ciertos tejidos tienen un daño más severo, como el inmunopoyético renal (Venegas *et al.*, 2004) y el cardíaco (Monasterio, 2008), la bacteria se multiplica en una variedad muy amplia de células, mostrando una escasa especificidad en este sentido.

Patogénesis de la piscirickettsiosis y mecanismos de virulencia de *Piscirickettsia*

salmonis

Para establecer y mantener una infección exitosamente, los microorganismos patógenos en general han desarrollado una variedad de estrategias para invadir el hospedador, evitando o resistiendo la respuesta inmune innata, el daño de las células y multiplicándose en regiones específicas y normalmente estériles (Tizard, 1992; Cossart y

Sansonetti, 2004). Al igual que en mamíferos, las bacterias patógenas de peces tienen mecanismos de infección que están directamente relacionados con los factores de virulencia de éstas mediante los cuales pueden colonizar y penetrar las barreras epiteliales de sus hospedadores para luego subsistir, multiplicarse en sus tejidos y producir las alteraciones patológicas características, superando las barreras inmunológicas de estos animales acuáticos (Evelyn, 1996). Conviene señalar que la relativa importancia de una enfermedad infecciosa para la salud de humanos y animales no siempre coincide con la profundidad en el entendimiento de su patogénesis (Peterson, 1996). La piscirickettsiosis se encuentra en esta situación, puesto que la patogénesis de ésta y los factores de virulencia de *P. salmonis* son, en general, pobremente conocidos. La nueva localización taxonómica de *P. salmonis* ha mostrado que tiene una relación filogenética con bacterias del género *Francisella* y no así con aquellas del género *Rickettsia* como se había pensado originalmente, debido a similitudes en las características fenotípicas (Fryer y Hedrick, 2003). Este hecho es interesante puesto que últimamente se ha descrito el aislamiento de bacterias del género *Francisella* en distintas especies de peces (Hsieh *et al.*, 2007; Mauel *et al.*, 2007; Mikalsen *et al.*, 2007; Ottem *et al.*, 2007 a y b), incluido en salmónidos cultivados en Chile (Birkbeck *et al.*, 2007). *F. tularensis*, la especie más conspicua de este género, es el agente causal de tularemia, enfermedad que afecta en forma severa a humanos y a una variedad de especies animales (Splettstoesser *et al.*, 2005). Al igual que *P. salmonis*, esta bacteria es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de macrófagos y su patogenicidad también es conocida en forma muy limitada (Carlson *et al.*, 2007). Al respecto, se ha descrito que, así como en el caso de muchas otras bacterias, *F. tularensis* también secreta un conjunto de proteínas que según Hager *et al.* (2006) actuarían como factores de virulencia. Así, mediante el uso de proteómica y bioinformática se identificaron siete proteínas exportadas por *F. tularensis*,

las cuales emplean el sistema secretor tipo IV. Dos de estas proteínas serían quitinasas y las otras, con funciones de proteína de unión a la quitina, proteasa y glucoxidasa, respectivamente (Hager *et al.*, 2006). Otros autores, comparando una cepa viva que se usa experimentalmente como vacuna contra *F. tularensis* denominada LCV y una variante de ésta, consignada como ACV que origina una mayor producción de factor de necrosis tumoral y de varias interleuquinas, por medio de electroforesis en dos dimensiones, demostraron que hay una expresión diferencial de varias proteínas las que actuarían como factores de virulencia (Carlson *et al.*, 2007). No obstante los hallazgos recién señalados, dado que no se ha logrado demostrar la presencia de genes que codifiquen exotoxinas en *F. tularensis* se ha puesto en duda que esta bacteria sea capaz de sintetizar este tipo específico de proteínas (Siddaramappa *et al.*, 2011).

En cuanto a la patogénesis de la piscirickettsiosis los principales aspectos en que se ha avanzado son en el conocimiento de algunas de sus rutas de ingreso a sus hospedadores, la detección de estructuras de adhesión a las ovas, las fuentes de excreción del agente causal desde los peces infectados y la capacidad de *P. salmonis* de persistir y multiplicarse en células macrofágicas. Respecto de los sitios de ingreso, hay tres trabajos en que se infectaron experimentalmente ciertos lugares anatómicos seleccionados en peces salmónidos para conocer los tejidos que usa como sitio de entrada *P. salmonis* en sus hospedadores. El primero de ellos se efectuó en salmones del Atlántico juveniles, exponiendo los peces a la bacteria mediante inyección intraperitoneal, intubación gástrica e instilación branquial. Las mortalidades acumuladas obtenidas fueron 57, 41 y 45%, respectivamente, sugiriendo que las rutas que usa *P. salmonis* son la branquial y la oral (Almendras *et al.*, 1997). En la segunda de estas investigaciones, truchas arcoíris juveniles fueron expuestas a *P. salmonis* mediante las siguientes seis diferentes vías: intraperitoneal,

subcutánea, piel, branquias (en ambos casos aplicando por 1 min parches de contacto embebidos con dosis conocidas de la bacteria), intrainestinal e intragástrica (las dos últimas mediante intubación). Las mortalidades acumuladas resultantes fueron 98, 100, 52, 24, 24 y 2%, respectivamente, concluyéndose que los principales sitios de entrada de esta bacteria son piel y branquias y que la ruta oral, contrariamente a lo sugerido por Almendras *et al.* (2007), no sería el método más eficiente para iniciar la infección en sus hospedadores, o al menos en esta especie de salmónidos, por parte de *P. salmonis* (Smith *et al.*, 1999). Finalmente, un tercer estudio sobre esta materia se llevó a cabo en salmónes coho juveniles, los cuales fueron expuestos, con dos dosis distintas, por inyección intraperitoneal, instilación de piel y branquias e intubación intestinal y gástrica. Las mortalidades acumuladas con la dosis más elevada fueron 82, 46, 28 y 20% y con la dosis menor 58, 32, 16 y 12%, respectivamente, indicando que las vías de ingreso más efectivas de *P. salmonis* en salmón coho son la piel seguida por las branquias, dado que si bien la intubación intestinal generó altas mortalidades, esa manera de administrar la bacteria no simula las condiciones de exposición natural de los hospedadores (Smith *et al.*, 2004). En relación a estructuras que permitan la adhesión de *P. salmonis*, se ha documentado por microscopía de barrido la presencia de unas prolongaciones de su superficie que permitirían su anclaje a las ovas, en este caso de trucha arcoíris, y por lo tanto favorecerían la eventual transmisión vertical de esta bacteria (Larenas *et al.*, 2003). No obstante lo anterior, es dudoso que la transmisión vertical ocurra realmente en condiciones de campo, ya que los brotes de piscirickettsiosis en agua dulce han sido muy excepcionales, habiéndose reportado sólo dos casos en la literatura científica (Bravo, 1994; Gaggero *et al.*, 1995). En cuanto a las vías de excreción de *P. salmonis* desde sus hospedadores, si bien éstas no están totalmente aclaradas, se ha documentado que alevines de truchas arcoíris, experimentalmente

infectados, excretan este patógeno a través de las heces y también, aunque en menor medida, desde la bilis y la orina (Salinas, 1998). La eliminación de esta bacteria a través de las heces ha sido también corroborada en la misma especie, pero en condiciones de cultivo (Peirano, 2015). Un aspecto de importancia en el conocimiento de la patogénesis de la piscirickettsiosis consistió en la verificación de que esta bacteria es capaz de sobrevivir y multiplicarse en macrófagos obtenidos de riñón anterior de trucha arcoíris (McCarthy *et al.*, 2005) lo que fue coherente con las numerosas observaciones histológicas ya existentes de peces infectados natural y experimentalmente con *P. salmonis* (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991, Venegas *et al.*, 2004). Es interesante mencionar que *P. salmonis* no usaría el método de otras bacterias intracelulares, de escapar al citoplasma antes de la fusión del fagolisosoma, como mecanismo para sobrevivir dentro de los macrófagos (McCarthy *et al.*, 2005).

Respecto a los factores de virulencia de *P. salmonis*, además de las estructuras de adhesión observadas cuando interactúan con ovas de trucha arcoíris, éstos son poco conocidos. Sin embargo, tras la reciente secuenciación del genoma de algunas cepas de *P. salmonis* se han detectado distintos genes que podrían codificar varios factores de virulencia de acuerdo a distintos análisis bioinformáticos. En ese contexto distintos autores describen la presencia de genes que codifican para el sistema de secreción tipo IV (SSTIV) y de flagelos bacterianos (Eppinger *et al.*, 2013; Yañez *et al.*, 2014). Es curioso que *P. salmonis* tenga la información genética para sintetizar flagelos puesto que hasta ahora se ha caracterizado como una bacteria inmóvil y tampoco se ha visto por microscopía electrónica la presencia de estas estructuras. Junto con el hallazgo de genes que codifican para SSTIV, tanto Yañez *et al.* (2014) como Pulgar *et al.* (2015) describen la presencia de genes relacionados con la adquisición de hierro que codificarían posibles factores de virulencia

(sideróforos) de importancia para esta bacteria. Finalmente, además del SSTIV, Yañez *et al.* (2014) descubrieron en una cepa de *P. salmonis* la presencia de genes de los sistemas de secreción tipo I y II, ampliando el repertorio de posibles factores de virulencia de este patógeno. No se había detectado la capacidad de producir ECPs con propiedades de exotoxinas en *P. salmonis* antes de las investigaciones que se presentan en uno de los artículos de la presente tesis. A pesar de que no es común que las bacterias intracelulares secreten exotoxinas, había dos antecedentes que nos indicaban que *P. salmonis* podía liberar este tipo de proteínas. El primero de ellos fue una evidencia indirecta, ya que en función del tipo de daño patológico se sospechó de la acción de la presencia de eventuales hepatotoxinas en casos clínicos de piscirickettsiosis en Noruega (Olsen *et al.*, 1997). El segundo antecedente es que se había observado desde el punto vista lesional microscópico que con ciertas cepas, como la SLGO-95, se produce un severo daño en algunos tejidos de los peces sin encontrarse la presencia de la bacteria en éstos o en niveles muy bajos no compatibles con la severidad de las alteraciones observadas (Rojas, 2000), sugiriendo que existe algún componente soluble que actuaría a distancia, probablemente PECs con efecto de exotoxinas. En consecuencia, algunas de las investigaciones de esta tesis se orientaron a intentar aclarar si *P. salmonis* tiene la capacidad de sintetizar algún tipo de exotoxinas que medie su acción patogénica.

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo se realiza sobre la base de los antecedentes epidemiológicos, la signología clínica y los hallazgos anatomopatológicos macroscópicos de acuerdo a lo descrito anteriormente (Fryer *et al.*, 1990; Fryer y Hedrick, 2003; Monasterio, 2008). Este diagnóstico presuntivo se puede acompañar de tinciones de frotis de tejidos como Gram,

Giemsa y azul de toluidina para observar la morfología bacteriana, y de análisis histológicos para corroborar las lesiones microscópicas consistentes con lo descrito para esta enfermedad (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995). La identificación definitiva de la presencia de *P. salmonis* en los peces afectados se hace a través de técnicas inmunológicas como inmunofluorescencia (Lannan *et al.*, 1991) e inmunohistoquímica (Alday *et al.*, 1994) o de reacción en cadena de la polimerasa (Mauel *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1998). No obstante sus dificultades técnicas, mayor tiempo y coste del procedimiento, el aislamiento y posterior identificación de la bacteria es el estándar de oro para el diagnóstico de la presencia de *P. salmonis* viable en peces sospechosos de estar cursando un cuadro de piscirickettsiosis (OIE, 2006).

Tratamiento y control

Una vez que la enfermedad se ha desencadenado, una de las principales medidas de control que se emplea es el tratamiento de los peces mediante el uso de distintos antimicrobianos administrados vía oral o por inyección intraperitoneal (Almendras y Fuentealba, 1997; Groff y LaPatra, 2000; Larenas *et al.*, 2000). Si bien inicialmente la aplicación de estos productos tenía un resultado positivo en cuanto a la reducción de las mortalidades, con el transcurrir de los años la efectividad fue disminuyendo y, en definitiva, la terapia con estas drogas ha tenido un éxito sólo parcial en el control de esta enfermedad (Smith *et al.*, 1995; OIE, 2006; Mancilla y Bustos, 2015). Se ha sugerido que la localización intracelular de esta bacteria puede hacer posible que un número considerable de microorganismos esté fuera del alcance de las concentraciones bactericidas y, de esta manera, la infección puede persistir (Lannan y Fryer, 1993). Más aún, las pérdidas debido a este agente patógeno se han incrementado progresivamente debido, aparentemente, a la

resistencia de las cepas actuantes a los antibióticos (Smith *et al.*, 1996b). Antimicrobianos como oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina, han sido utilizados ampliamente por varios años en Chile para el tratamiento de piscirickettsiosis y, por lo tanto, una selección genética de cepas resistentes puede ser la razón de la pérdida de la sensibilidad de *P. salmonis* a estas drogas. Por otro lado, debido a las marcadas variaciones en los patrones de sensibilidad de los diferentes aislados de *P. salmonis* estudiados, no se recomienda el uso de un régimen universal para el tratamiento de todos los brotes (Smith *et al.*, 1996b). Aunque históricamente se han usado varios antimicrobianos para el tratamiento de esta enfermedad tales como oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, enrofloxacin, sarafloxacin y florfenicol (Bravo *et al.*, 2005), en los últimos años estas terapias se encuentran restringidas casi exclusivamente al uso de florfenicol y de oxitetraciclina (SERNAPESCA, 2015c).

Debido a las limitaciones existentes en la eficacia de los antibióticos y a los problemas derivados de su uso excesivo, varios grupos de investigación han dirigido sus esfuerzos para intentar desarrollar una vacuna efectiva contra la piscirickettsiosis (House y Fryer, 2002; OIE, 2006; Bravo y Midtlyng, 2007; Olson y Criddle, 2008). Como sucede en el caso de varias enfermedades de peces, la vacunación ha demostrado ser una herramienta eficiente para ayudar a prevenir la presentación de brotes infecciosos en estos animales acuáticos (Bravo y Midtlyng, 2007; Gjedrem y Baranski, 2009), siendo además considerada por algunos autores como la principal causa de la notoria reducción en el uso de antimicrobianos que ha experimentado la salmonicultura en algunos países (Bravo y Midtlyng, 2007). Ensayos iniciales que utilizaron bacterinas producidas con la bacteria completa mostraron resultados variables e inconsistentes (Smith *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997; Fryer y Hedrick, 2003). Posteriormente, en un ensayo efectuado en salmones coho,

se incrementó el porcentaje de supervivencia relativa de éstos al ser inyectados con bacterinas acompañadas con adyuvantes acuosos u oleosos (Kuzyk *et al.*, 2001a).

Por otro lado, se han realizado varios estudios de la caracterización antigénica de *P. salmonis* (Kuzyk *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 1998; House y Fryer, 2002; Henríquez *et al.*, 2003; Yuksel *et al.*, 2006b). En este mismo ámbito, también se ha experimentado con vacunas de ADN (Miquel *et al.*, 2003) y de proteínas recombinantes (Kuzyk *et al.*, 2001a; Kuzyk *et al.*, 2001b; Sommerset *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2006). También se ha descrito que una vacuna desarrollada para prevenir la enfermedad bacteriana del riñón, compuesta por células vivas de una bacteria ambiental no patógena para peces, llamada *Arthrobacter davidanieli*, es efectiva para reducir la mortalidad en salmones coho infectados con *P. salmonis*, tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Salonius *et al.*, 2005). Esta vacuna ha sido autorizada para su uso en salmónidos cultivados en Canadá (Salonius *et al.*, 2005) y en Chile (Sommerset *et al.*, 2005), si bien ha tenido una aceptación limitada en el mercado chileno (Bravo y Midtlyng, 2007). La primera vacuna comercial contra *P. salmonis* fue lanzada al mercado chileno en 1999 y desde entonces han ido apareciendo nuevos productos de este tipo pero, a diferencia de los resultados logrados en otras enfermedades bacterianas, la vacunación contra este agente patógeno no ha reducido significativamente la necesidad de continuar tratando los cuadros de piscirickettsiosis con antibióticos, y el uso de éstos, en términos cuantitativos, se mantiene a niveles similares (Bravo y Midtlyng, 2007). Actualmente, hay ocho laboratorios comerciales que tienen vacunas registradas en Chile contra *P. salmonis*. Algunas de éstas están dirigidas sólo contra *P. salmonis* y otras son multivalentes, en diferentes combinaciones con otros antígenos bacterianos y/o virales, con un repertorio de 37 preparados antigénicos. Una de estas vacunas se aplica por inmersión, dos de ellas por vía oral y las 34 restantes se

administran por inyección intraperitoneal (SAG, 2015). Es interesante señalar que un estudio de carácter epidemiológico en Chile concluyó que no hay diferencias en los niveles de mortalidad acumulada atribuidas a *P. salmonis* entre peces inmunizados con vacunas comerciales contra piscirickettsiosis y aquellos no vacunados (Flores, 2012). En igual sentido, y más recientemente, Jakob *et al.* (2014) describen que estas vacunas no reducen la mortalidad acumulada ocasionada por la piscirickettsiosis y sólo retardarían la aparición de los brotes. Los antecedentes anteriores y la experiencia histórica de campo en general sugiere que estos productos son poco efectivos (Mancilla y Bustos, 2015).

Como sucede en la mayoría de las enfermedades infectocontagiosas que afectan a peces de cultivo, existe un conjunto de medidas de manejo que se recomienda poner en práctica, tanto para la prevención como para el control de la piscirickettsiosis (OIE, 2006; Yuksel *et al.*, 2006a; Olson y Criddle, 2008). En este sentido, se preconiza la formulación y aplicación de programas sanitarios así como la adopción de procedimientos generales de bioseguridad (Groff y LaPatra 2000; Fryer y Hedrick, 2003; OIE, 2006). Entre las medidas operacionales que se han recomendado para disminuir la incidencia de la piscirickettsiosis se encuentran: desinfectar la superficie de las ovas con yodóforos (Fryer y Hedrick, 2003), seleccionar “stocks” o familias de peces que hayan demostrado mayor resistencia a brotes y menor mortalidad (Cassigoli, 1994), disminuir las manipulaciones de los peces (vacunaciones, cambios de redes, tratamientos inyectables, etc.) para así aminorar el estrés (Bravo y Campos, 1989; Bravo y Gutiérrez, 1991; Larenas *et al.*, 2000; Leal y Woywood, 2007), evitar altas densidades de biomasa por jaula, centro y por área geográfica (Cassigoli, 1994; Olson y Criddle, 2008), ingresar los peces a los centros marinos a número final, es decir mantener el número de individuos que se destina a una jaula hasta la cosecha (Leal y Woywood, 2007), trasladar los “smolts” directamente desde agua dulce a salada, sin pasar

por estuarios (Leal y Woywood, 2007), extraer rápidamente los peces enfermos y muertos desde las balsas-jaulas (Cassigoli, 1994; Almendras y Fuentealba, 1997; Larenas, 1999), realizar pruebas diagnósticas para detectar la presencia temprana de la bacteria (Marshall *et al.*, 1998), evitar que la materia orgánica derivada de las cosechas llegue al mar (Cassigoli, 1994), fomentar el descanso sanitario de los centros previo al ingreso de nuevos peces (Cassigoli, 1994; Fryer y Hedrick, 2003), evitar la presentación de factores primarios que produzcan lesiones de la piel (erosiones y úlceras), ya sea de origen traumático (Larenas *et al.*, 2000) o por ectoparásitos (Smith *et al.*, 1999; Larenas *et al.*, 2000; Fryer y Hedrick, 2003) y mantener limpias las redes de las balsas-jaulas (Olson y Criddle, 2008).

Además de su relevancia histórica, la piscirickettsiosis sigue siendo una enfermedad de primera importancia para la salmonicultura chilena. Actualmente subsiste en forma endémica con brotes frecuentes en una amplia zona marina. A pesar de que la erradicación de *P. salmonis* del ambiente acuático es virtualmente imposible, ya que se ha detectado que poblaciones de salmónidos asilvestrados son portadores de esta bacteria (Pérez *et al.*, 1998), por diferentes razones debiera ser prioritario continuar los esfuerzos para disminuir la incidencia de piscirickettsiosis en nuestros cultivos marinos. Además del daño evidente derivado de la mortalidad de peces que ocasiona la enfermedad, otro efecto indeseable es el uso de altos niveles de antimicrobianos para su tratamiento. Por otra parte, un factor que normalmente no se considera, pero que es de importancia desde la óptica veterinaria, es que los salmones enfermos padecen de distintos grados de sufrimiento y que un nivel de morbilidad tan alta implica un problema de bienestar animal que se debe intentar disminuir al máximo posible. Los crecientes avances en la generación de conocimientos científicos, tanto básicos como aplicados, deberían contribuir a entregar mejores herramientas específicas para el control de esta enfermedad. Es un hecho constatable que con las actuales

medidas de tratamiento, control y prevención no se ha logrado mitigar el enorme daño que causa la piscirickettsiosis en Chile. Por lo anterior, es evidente que falta mayor investigación que provea las bases para elaborar productos biológicos que permitan una terapéutica y prevención eficaz de esta bacteria intracelular. Uno de los variados tópicos donde se requiere profundizar es acerca de la patogénesis *in vitro* e *in vivo* de la piscirickettsiosis así como de la posible producción de exotoxinas de *P. salmonis* como parte de sus factores de virulencia y son éstos los aspectos que fueron abordados en los artículos científicos que aquí se presentan.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDAY-SANZ, V.; RODGER, H.D.; TURNBULL, T.; ADAMS, A.; RICHARDS, R.** 1994. An immunohistochemical diagnostic test for rickettsial disease. *Fish Dis.* 17:189-191.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J.** 2012. World Agriculture Towards 2030/2050: the 2012 Revision. Global Perspective Studies Team. FAO Agricultural Development Economics Division Agricultural Development Economics (ESA). ESA Working Paper N° 12-03. The Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia, 147 pp.
- ALMENDRAS, F.E.; FUENTEALBA, I.C.** 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. *Dis. Aquat. Org.* 29:137-144.
- ALMENDRAS, F.E.; FUENTEALBA, I.; JONES, S.R.M.; MARKHAM, F.; SPANGLER, E.** 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 20:409-418.
- ALMENDRAS, F.E.; FUENTEALBA, I.C.; MARKHAM, R.F.F.; SPEARE, D.J.** 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.
- ALMENDRAS, F.** 2015. Disminuyendo costos: el aporte de las vacunas al control de SRS. *Revista Digital Aqua Acuicultura y Pesca.* 8:1 [en línea] <<http://www.aqua.cl/2015/08/11/farmaceuticas-entregan-claves-para-reducir-costos-de-produccion-por-srs/>> [Consulta 21.10.2015].
- ALVARADO, V.; SCHÄFER, W.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M.; CUBILLOS, V.; FARIÁS, 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. *Patología Animal* 4:10-13.

- ARKUSH, K.D.; EDES, H.L.; McBRIDE, A.M.; ADKISON, M.A.; HEDRICK, R.P.** 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.
- ASCHE, F.; HANSEN, H.; TVETERAS, R.; TVETERAS, S.** 2009. The salmon disease crisis in Chile. *Mar. Resour. Econ.* 24:405-411.
- ASCHE, F.; BJØRNDAL, T.** 2011. The Supply of Salmon. **In:** *The Economics of Salmon Aquaculture*. Second ed. Wiley-Blackwell. Chichester, Reino Unido, pp. 17-42.
- BARNES, M.N.; LANDOLT, M.L.; POWELL, D.B.; WINTON, J.R.** 1998. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and partial characterization of antigens. *Dis. Aquat. Org.* 33:33-41.
- BERGER, E.K.** 2014. *Piscirickettsia salmonis*; characterization and infection in the zebra fish model. Theses for the Master`s degree in Molecular Biosciences. The Faculty of Mathematics and Natural Sciences. University of Oslo. 74 pp.
- BIRKBECK, T.H.; GRIFFEN, A.A.; REID, H.I.; LAIDLER, L.A.; WADSWORTH, S.** 2004. Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infect. Immun.* 72:3693-3694.
- BIRKBECK, T.H.; BORDEVIK, M.; FROYSTAD, M.K.; BAKLIEN A.** 2007. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *J. Fish Dis.* 30:505-507.
- BIRKBECK, H.** 2011. Francisellosis. **In:** Avendaño-Herrera R (Ed.). *Enfermedades Infecciosas del Cultivo de Salmónidos en Chile y el Mundo*. Niva Chile S.A., Puerto Varas, Chile, pp. 105-128.
- BIRRELL, J.; MITCHELL, S.; BRUNO, D.W.** 2003. *Piscirickettsia salmonis* in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 23:213-218.

- BRANSON, E.J.; NIETO DÍAZ-MUÑOZ, D.** 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *J. Fish Dis.* 14:147-156.
- BRAVO, S.** 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14:137-138.
- BRAVO, S.; CAMPOS, M.** 1989. Coho salmon syndrome in Chile. *AFS/FHS Newsletter.* 17:3.
- BRAVO, S.; GUTIÉRREZ, S.** 1991. Avances en el estudio del síndrome del salmón coho. *Chile Pesquero* 64:39-42.
- BRAVO, S.; MIDTLING, P.** 2007. The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture* 270:36-42.
- BRAVO, S.; DÖLZ, H.; SILVA, M.T.; LAGOS, C.; MILLANAO, A.; URBINA, M.** 2005. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Informe final Proyecto N° 2003-28. Universidad Austral de Chile, Facultad de Pesquerías y Oceanografía, Instituto de Acuicultura. Puerto Montt, Chile. 256 pp.
- BROCKLEBANK, J.R.; SPEARE, D.J.; ARMSTRONG, R.D.; EVELYN, T.** 1992. Septicemia in farmed Atlantic and chinook salmon due to a rickettsia-like agent. *AFS/FHS Newsletter* 20:1.
- BROCKLEBANK, J.R.; EVELYN, T.P.T.; SPEARE, D.J.; ARMSTRONG, D.J.** 1993. Rickettsial septicemia in farmed Atlantic and chinook salmon in British Columbia: Clinical presentation and experimental transmission. *Can. Vet. J.* 34:745-748.
- BUSTOS, P.** 2006. Growing incidence of *Piscirickettsia* infection in fish worldwide: mechanisms for prevention and control. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries: Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium*, Lexington, Kentucky, pp. 397-401.

- CARLSON, P.E.; CARROLL, J.A.; O'DEE, D.M.; NAU, G.J.** 2007. Modulation of virulence factors in *Francisella tularensis* determines human macrophage responses. *Microb. Pathog.* 42:204-214.
- CASSIGOLI, J.** 1994. Patología y nutrición en el desarrollo de la acuicultura: factores de éxito. **In:** Patología y nutrición en el desarrollo de la acuicultura. Puerto Montt, Chile. 3-7 octubre. Fundación Chile. (sin número en la carpeta).
- CHEN, M.F.; YUN, S.; MARTY, G.D.; McDOWELL, T.S.; HOUSE, M.L.; APPERSEN, J.A.; GUENTHER, T.A.; ARKUSH, K.D.; HEDRICK, R.P.** 2000. A *Piscirickettsia salmonis*-like bacterium associated with mortality of white seabass *Atractoscion nobilis*. *Dis. Aquat. Org.* 43:117-126.
- CONNOR, M.; ARMITAGE, C.J.** 2002. Chapter 7. Conclusions. **In:** Sutton S. (Ed.). *The Social Psychology of Food. Applying Social Psychology Series.* Open University Press, Buckingham, Reino Unido, pp. 133-144.
- CORBEIL, S.; HYATT, A.D.; CRANE, M.St.J.** 2005. Characterisation of an emerging *rickettsia*-like organism in Tasmanian farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 64:37-44.
- CORREAL, P.** 1995. Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 52 p.
- COSSART, P.; SANSONETTI, J.** 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304:242-248.
- CUBILLOS, V.; FARIÁS, C.; ALBERDI, A.; ALVARADO, V.; SCHÄFER, W.; MONRÁS, M.** 1990. Características anatomopatológicas del “síndrome del salmón coho” (SSC), nueva enfermedad de los salmonídeos. *Patol. Animal* 4:14-17.
- CUSACK, R.R.; GROMAN, D.B.; JONES, S.R.M.** 2002. Rickettsial infection in farmed Atlantic salmon in eastern Canada. *Can. Vet. J.* 43:435-440.

- CVITANICH, J.D.; GÁRATE, O.; SMITH, C.E.** 1990. Etiological agent in a Chilean coho disease isolated and confirmed by Koch's postulates. *AFS/FHS Newsletter* 18:1-2.
- CVITANICH, J.D.; GÁRATE, O.; SMITH, C.E.** 1991. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish Dis.* 14:121-145.
- DEVOLD, M.; KROSSØY, B.; ASPEHAUG, V.; NYLUND, A.** 2000. Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Org.* 40:9-18.
- EPPINGER, M.; MCNAIR, K.; ZOGAJ, X.; DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.A.; KLOSE, K.E.** 2013. Draft genome sequence of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Genome Announc.* DOI: 10.1128/genomeA.00926-13.
- EVELYN, T.P.T.** 1996. Infection and Disease. **In:** *The Fish Immune System*. Academic Press. San Diego, California, EE.UU., pp. 339-366.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS).** 2014a. Foreword. **In:** *The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and Challenges*. FAO Department of Fisheries and Aquaculture. Roma, Italia, p. iii.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS).** 2014b. Part I. Review of Fisheries and Aquaculture. Status and Trends. **In:** *The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and Challenges*. FAO Department of Fisheries and Aquaculture. Roma, Italia, pp. 3-98.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS).** 2015. Fishery Statistical Collections. Global Aquaculture Production 1950-2013 [en línea] <<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>> [Consulta 12.10. 2015].
- FLORES, C.** 2012. Determinación de los factores de riesgo para mortalidad por septicemia rickettsial del salmón en las regiones de Los Lagos y de Aysén, Chile.

Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 70 p.

FOX, R. 2014. Food and Eating: An Anthropological Perspective. Robin Social Issues Research Centre Publications. Oxford, Reino Unido, 21 pp. [en línea] <<http://www.sirc.org/publik/foxfood.pdf>> [consulta: 15.10.2015]

FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.J.; SMITH, P.A. 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. Fish Pathol. 25:107-114.

FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.; GIOVANONNI, S.J.; WOOD, N.D. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:120-126.

FRYER, J.L.; MAUEL, M. 1997. The Rickettsia: an emerging group of pathogens in fish. Emerg. Infect. Dis. 3:137-144.

FRYER, J.L.; HEDRICK, R.P. 2003. *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. J. Fish Dis. 26:251-262.

FRYER, J.L.; LANNAN, C.N. 2005. Family II. *Piscirickettsiaceae* fam. nov. **In:** Garrity, G.M. (Ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2th ed., vol II The *Proteobacteria*, Part B The *Gammaproteobacteria*. Springer. New York, EE.UU., pp. 180-184.

GAGGERO, A.; CASTRO, H.; SANDINO, A.M. 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.

GALEOTTI, M.; MANZANO, M., CECCHINI, F.; VOOLPATTI, D.; BULFON, P.; BERALDO, G.; ROSSI, G.; MAGI, G. 2015. T.E.M. and biomolecular detection of Rickettsiales in tissues of rainbow trout and their potential role as red mark syndrome (RMS) etiological agents. 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. European Association of Fish Pathologists. Las

- Palmas de Gran Canaria, España, Septiembre 7 a 11. Abstract Book, O166, p. 174.
- GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.J.; SMITH, P.A.; SANDINO, S.; LANNAN, C.N.; FRYER, J.L.** 1991. Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Dis. Aquat. Org.* 11:93-97.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.** 2005. The Revised Road Map to the Manual. **In:** Garrity, G.M. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2th ed., vol II The *Proteobacteria*, Part A Introductory Essays. Springer. New York, EE.UU., pp. 159-220.
- GJEDREM, T.; BARANSKI, M.** 2009. Initiating Breeding Programs. **In:** *Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction*. Springer. Dordrecht, The Netherlands, pp. 3-85.
- GÓMEZ, F.; HENRÍQUEZ, V.; MARSHALL, S.H.** 2009. Additional evidence of the facultative intracellular nature of the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Arch. Med. Vet.* 41:261-267.
- GONZÁLEZ, J.** 2015. Sector en cifras: exportaciones de salmónidos. *Revista Aqua* 182:61.013
- GRANT, A.N.; BROWN, A.G.; COX, D.I.; BIRBECK, T.H.; GRIFFEN, A.A.** 1996. *Rickettsia*-like organism in farmed salmon. *Vet. Rec.* 138:423.
- GRAUMANN, R.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M.; BROWN, A.W.; ROSENTHAL, H.** 1997. Experimental challenge of *Piscirickettsia salmonis* in postsmolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **In:** 8th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Edinburgh, Scotland. September, 14-19. European Association of Fish Pathologists (EAFP), pp. P-056.
- GROFF, J.M.; LaPATRA, S.E.** 2000. Infectious diseases impacting the commercial culture of salmonids. *J. Appl. Aquacult.* 10:17-90.
- GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.** 2010. Themes in Bacterial Pathogenic Mechanisms. **In:** Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, G.; Thoen, C.O. (Eds.). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th ed. Wiley-Blackwell. Iowa, EE.UU., pp. 3-8.

- HAGER, A.J.; BOLTON, D.L.; PELLETIER, M.R.; BRITTNACHER, M.J.; GALLAGHER, L.A.; KAUL, R.; SKERRETT, S.J.; MILLER, S.I.; GUINA, T.** 2006. Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol. Microbiol.* 62:227-237.
- HEEN, K.; THORPE, J.; RIDLER, N.; MONAHAN, R.L.; MAHNKEN, C.; LINDBERG, J.** 1993. The Distribution of Salmon Aquaculture. **In:** K. Heen; R.L. Monahan; F. U. (Eds.). *Salmon Aquaculture*. Wiley Blackwell. Oxford, Reino Unido, pp. 10-58.
- HENRIQUEZ, M.; GONZALEZ, E.; MARSHALL, S.H.; HENRIQUEZ, V.; GOMEZ, F.A.; MARTINEZ, I.; ALTAMIRANO, C.** 2013. A novel liquid medium for the efficient growth of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* and optimization of culture conditions *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0071830.
- HENRÍQUEZ, V.; ROJAS, M.V.; MARSHALL, S.H.** 2003. An alternative efficient procedure for purification of the obligate intracellular fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6268-6271.
- HOUSE, M.L.; FRYER, J.L.** 2002. The Biology and Molecular Detection of *Piscirickettsia salmonis*. **In:** Cunningham, C.O. (Ed.). *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda, pp. 141-155.
- HSIEH, C.Y.; WU, Z.B.; TUNG, M.C.; TSAI, S.S.** 2007. PCR and *in situ* hybridization for the detection and localization of a new pathogen *Francisella*-like bacterium (FBL) in ornamental cichlids. *Dis. Aquat. Org.* 75:29-36.
- JAKOB, E.; STRYHN, H.; YU, J.; MEDINA, M.; REES, E.E.; SANCHEZ, J.; ST-HILAIRE, S.** 2014. Epidemiology of piscirickettsiosis on selected Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) saltwater aquaculture farms in Chile. *Aquaculture* 433:288-294.
- JONES, S.M.; MARKHAM, R.J.F.; GROMAN, D.B.; CUSACK, R.R.** 1998. Virulence and antigenic characteristics of a cultured rickettsiales-like organism

isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in eastern Canada. Dis. Aquat. Org. 33:25-31.

KARATAS, S.; MIKALSEN, J.; STEINUM, T.M.; TAKSDAL, T.; BORDEVIK, M.; COLQUHOUN, D.J. 2008. Real time PCR detection of *Piscirickettsia salmonis* from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. J. Fish Dis. 31:747-753.

KUZYK, M.A.; THORTON, J.C.; KAY, W.W. 1996. Antigenic characterization of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Infect. Immun. 64:5205-5210.

KUZYK, M.A.; BURIAN, J.; MACHANDER, D.; DOLHAINE, D.; CAMERON, S.; THORNTON, J.C.; KAY, W.W. 2001a. An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Vaccine 19:2337-2344.

KUZYK, M.A.; BURIAN, J.; THORNTON, J.C.; KAY, W.W. 2001b. OspA, a lipoprotein antigen of the obligate intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3:83-93.

LANNAN C.N.; WINTON J.R.; FRYER J.L. 1984. Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* 20:671-676.

LANNAN, C.N.; EWING, S.A.; FRYER, J.L. 1991. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. J. Aquat. Anim. Health 3:229-234.

LANNAN, C.N.; FRYER, J.L. 1993. *Piscirickettsia salmonis*, a major pathogen of salmonid fish in Chile. Fish Res. 17:115-121.

LANNAN, C.N.; FRYER, J.L. 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. J. Fish Dis. 17:545-548.

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.

LARENAS, J.J. 1999. Evaluación experimental clínico patológica del efecto de la densidad poblacional, temperatura e infección concomitante con *Renibacterium*

salmoninarum sobre la presentación de piscirickettsiosis. Memoria Grado Magister en Ciencias Animales y Veterinarias, Mención Patología Animal. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 149 p.

LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; SMITH, P. 2000. Piscirickettsiosis: uno de los principales problemas en cultivos de salmones en Chile. *Tecnovet* 6:28-30.

LARENAS, J.; BARTHOLOMEW, J.; TRONCOSO, O.; FERNÁNDEZ, S.; LEDEZMA, H.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS, J.; SMITH, P. 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Dis. Aquat. Org.* 56:25-30.

LARSSON, P.; OYSTON, P.C.F.; CHAIN, P.; CHU, M.C.; DUFFIELD, M. et al. (otros 22 co-autores). 2005. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.* 37:153-159.

LEAL, J.; WOYWOOD, D. 2007. Piscirickettsiosis en Chile: avances y perspectivas para su control [en línea] <<http://www.salmonchile.cl/salmociencia/002/Paper1.pdf>> [consulta: 14.12.2011]

MANCILLA, M.; BUSTOS, P. 2015. Desafíos para avanzar a un control efectivo de la piscirickettsiosis. ¿Por qué podríamos llegar a estar optimistas a mediano plazo?. *Research Gate*, 9 pp. [en línea] <<http://www.researchgate.net/publication/281377738>> [Consulta 2.11. 2015].

MARDONES, F.O.; PEREZ, A.M.; CARPENTER, T.E. 2009. Epidemiologic investigation of the re-emergence of infectious salmon anemia virus in Chile. *Dis. Aquat. Org.* 84:105-114.

MARSHALL, S.; HEATH, S.; HENRÍQUEZ, V.; ORREGO, C. 1998. Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonids via the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3066-3069.

- MARSHALL, S.H.; CONEJEROS, P.; ZAHR, M.; OLIVARES, J.; GÓMEZ, F.; CATALDO, P.; HENRÍQUEZ, V.** 2007. Immunological characterization of a bacterial protein isolated from salmonid fish naturally infected with *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine* 25:2095-2102.
- MAUEL, M.J.; GIOVANNONI, S.J.; FRYER, J.L.** 1996. Development of polymerase chain reaction assays for detection and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.* 26:189-195.
- MAUEL, M.J.; GIOVANNONI, S.J.; FRYER, J.L.** 1999. Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed space (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing. *Dis. Aquat. Org.* 35:115-123.
- MAUEL, M.J.; MILLER, D.L.** 2002. Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. *Vet. Microbiol.* 87:279-289.
- MAUEL, M.J.; SOTO, E.; MORALIS, J.A.; HAWKE, J.** 2007. A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *J. Aquat. Anim. Health* 19:27-34.
- MAUEL, M.J.; WARE, C.; SMITH, P.A.** 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:213-214.
- McCARTHY, Ú.; STEIROPOULOS, N.A.; THOMPSON, K.D.; ADAMS, A.; ELLIS, A.E.; FERGUSON, H.W.** 2005. Confirmation of *Piscirickettsia salmonis* as a pathogen in European sea bass *Dicentrarchus labrax* and phylogenetic comparison with salmonid strains. *Dis. Aquat. Org.* 64:107-119.
- McCARTHY, Ú.M.; BRON, J.E.; BROWN, L.; POURAHMAD, F.; BRICKNELL, I.R.; THOMPSON, K.D.; ADAMS, A.; ELLIS, A.E.** 2008. Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish Shellfish Immun.* 25:477-484.
- MIKALSEN, J.; OLSEN, A.B.; TENGS, T.; COLQUHOUN, D.J.** 2007. *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1960-1965.

- MIKALSEN, J.; SKJÆRVIK, O.; WIİK-NIELSEN, J.; WASMUTH, M.A. COLQUHOUN, D.J.** 2008. Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. FEMS Microbiol. Lett. 278:43-47.
- MIMS, C.A.; NASH, A.; STEPHEN, J.** 2001. Mim's Pathogenesis of Infectious Diseases. 5th ed. Academic Press Elsevier. San Diego, EE.UU., 474 pp.
- MIQUEL, A.; MÜLLER, I.; FERRER, P.; VALENZUELA, P.; BURZIO, L.** 2003. Immunoresponse of coho salmon immunized with a gene expression library from *Piscirickettsia salmonis*. Biol. Res. 36:313-323.
- MONASTERIO, M.** 2008. Descripción patológica en salmónes coho (*Oncorhynchus kisutch*) coinfectados para reproducir experimentalmente piscirickettsiosis y anemia hemolítica del salmón. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 98 pp.
- NAYLOR, R.L.; GOLDBURG, R.J.; PRIMAVERA, J.H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M.C.M.; CLAY, J.; FOLKE, C.; LUBCHENCO, J.; MOONEY, H.; TROELL, M.** 2000. Effect of aquaculture on world supplies. Nature 405:1017-1024.
- OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL).** 2006. Piscirickettsiosis (*Piscirickettsia salmonis*). **In:** Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos 2006. 5th ed. Organización Mundial de Sanidad Animal. París, Francia, pp. 250-256.
- OLSEN, A.B.; MELBY, H.P.; SPEILBERG, L.; EVENSEN, Ø.; HÅSTEIN, T.** 1997. *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway-epidemiological, pathological and microbiological findings. Dis. Aquat. Org. 31:35-48.
- OLSON, T.K.; CRIDDLE, K.R.** 2008. Industrial evolution: a case study of Chilean salmon aquaculture. Aquaculture Econ. Manage. 12:89-106.
- OTTEM, K.F.; NYLUND, A.; KARLSBAKK, E.; FRIIS-MOLLER, A.; KROSSØY, B.** 2007a. Characterization of *Francisella* sp., GM2212, the first *Francisella*

- isolate from marine fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*). Arch. Microbiol. 187:343-350.
- OTTEM, K.F.; NYLUND, A.; KARLSBAKK, E.; FRIIS-MOLLER, A.; KROSSØY, B.; KNAPPSKOG, D.** 2007b. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; *Francisellaceae*) *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). Arch. Microbiol. 188:547-550.
- PALMER, R.; RUTTLEDGE, M.; CALLANAN, K.; DRINAN, E.** 1997. A piscirickettsiosis-like disease in farmed Atlantic salmon in Ireland-isolation of the agent. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 17:68-72.
- 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 de mar. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 29 pp.
- PÉREZ, B.A.; ALERT, A.A.; CONTRERAS, J.R.; SMITH, P.A.** 1998. Detection of *Piscirickettsia salmonis* in up-stream- migrating coho salmon *Oncorhynchus kisutch*, in Chile. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 18:189-191.
- PETERSON, J.W.** 1996. Bacterial Pathogenesis. **In:** Baron S. (Ed.). Medical Microbiology. 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston. Galveston, Texas, EE.UU. [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>> [consulta 16.01.2012].
- 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.
- REES, E.E.; IBARRA, R.; MEDINA, M.; SANCHEZ, J.; JAKOB, E.; VANDERSTICHEL, R.; ST-HILAIRE, S.** 2014. Transmission of *Piscirickettsia salmonis* among salt water salmonid farms in Chile. Aquaculture 428-429:189-194.
- RODGER, H.D.; DRINAN, E.M.** 1993. Observation of a rickettsia-like organism in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. J. Fish Dis. 16:361-369.

- ROJAS, M.E.** 2000. Comparación de la virulencia entre tres aislados de *Piscirickettsia salmonis* en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 93 pp.
- ROJAS, M.V.; OLIVARES, J.; DEL RÍO, R.; MARSHALL, S.H.** 2008. Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*. Microb. Pathog. 44:370-378.
- ROZAS, M.; ENRÍQUEZ, R.** 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. J. Fish Dis. 37:163-188.
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO).** 2015. Productos Biológicos Inmunológicos con Registro Provisional Uso en Salmónidos. Última Modificación 17 de Agosto del 2015. **In:** Medicamentos de Uso Veterinario. Registros y Listas. 12 pp. [en línea] <http://www.sag.cl/sites/default/files/lista_salmonidos_registro_provisional_18-8-2015.pdf> [Consulta 21.10. 2015].
- SALINAS, G.** 1998. Efecto de la densidad poblacional sobre la presentación y transmisión horizontal de piscirickettsiosis en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas experimentalmente. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 65 pp.
- SALMONCHILE.** 2015. Reseña Histórica y Características Actuales de la Industria Salmonicultora en Chile [en línea] <<http://www.salmonchile.cl/es/quienes-somos.ph>> [Consulta 2.11. 2015].
- SALONIUS, K.; SIDERAKIS, C.; MACKINNON, A.M.; GRIFFITHS, S.G.** 2005. Use of *Arthrobacter davidanieli* as a live vaccine against *Renibacterium salmoninarum* and *Piscirickettsia salmonis* in salmonids. Dev. Biol. 121:189-197.
- SALUJA, R.; SAINI, R.; MITRA, K.; BAJPAI, V.K.; DIKSHIT, M.** 2010. Ultrastructural immunogold localization of nitric oxide synthasa isoforms in rat and humans-eosinophils. Cell Tissue Res. 340:381-389.

SCHÄFER, J.W.; ALVARADO, V.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M. 1990. The "coho salmon syndrome" (CSS): a new disease in Chilean salmon, reared in sea water. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 10:130-132.

SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA). 2012. Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVCPiscirickettsiosis). **In:** Informes Sanitarios y Ambientales. SERNAPESCA, Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Valparaíso, Chile, 16 pp. [en línea] <<file:///C:/Documents%20and%20Settings/Patologia/Mis%20documentos/Downloads/Res.Ex.3174-2012.pdf>> [Consulta 21.10.2015].

SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA). 2015a. Chile, Cosechas de Centros de Acuicultura por Especie y Región. **In:** Anuario Estadístico de Pesca 2014. Subsector Acuicultura. SERNAPESCA, Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Valparaíso, Chile, p.1 [en línea] <https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&task=view&id=2010&Itemid=889> [Consulta 17.10.2015].

SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA). 2015b. Informe Sanitario Salmonicultura en Centros Marinos año 2014. **In:** Informes Sanitarios y Ambientales Acuicultura. SERNAPESCA, Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Valparaíso, Chile, 34 pp. [en línea] <https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=11083> [Consulta 29.10. 2015].

SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA). 2015c. Informe sobre el Uso de Antimicrobianos 2014. **In:** Informes Sanitarios y Ambientales. SERNAPESCA, Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Valparaíso, Chile, 17 pp. [en línea] <https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=11465> [Consulta 21.10.2015].

SIDDARAMAPPA, S.; CHALLACOMBE, J.F.; PETERSEN, J.M.; PILLAI, S.; HOGG, G.; KUSKE, C.R. 2011. Common ancestry and novel genetic traits of

Francisella novicida-like isolates from North America and Australia as revealed by comparative genomic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5110-5122.

SMITH, P.A.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, L.H.; JARPA, M.; LARENAS, J.; CASWELL-RENO, P.; WHIPPLE, M.; FRYER, J.L. 1995. Piscirickettsiosis: a bacterin field trial in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 15:137-141.

SMITH, P.A.; CONTRERAS, J.R.; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.J.; OYANEDEL, S.; CASWELL-RENO, P.; FRYER, J.L. 1996a. Experimental challenge of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *Piscirickettsia salmonis*. *J. Aquat. Anim. Health* 8:130-134.

SMITH, P.A.; VECHIOLA, I.M.; OYANEDEL, S.; GARCÉS, L.H.; LARENAS, J.; CONTRERAS, J. 1996b. Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 16:164-168.

SMITH, P.A.; CONTRERAS, J.R.; LARENAS, J.J.; AGUILLÓN, J.C.; GARCÉS, L.H.; PÉREZ, B.; FRYER, J.L. 1997. Immunization with bacterial antigens: piscirickettsiosis. *Dev. Biol. Stand.* 90:161-166.

SMITH, P.A.; PIZARRO, P.; OJEDA, P.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; LARENAS, J. 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 37:165-172.

SMITH, P.A.; ROJAS, M.E.; GUAJARDO, A.; CONTRERAS, J.; MORALES, M.A.; LARENAS, J. 2004. Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.* 61:53-57.

SMITH, P.A.; ROJAS, M.E.; MANNESCHI, G. 2011. Piscirickettsiosis. **In:** Avendaño-Herrera R (Ed.). *Enfermedades Infecciosas del Cultivo de Salmónidos en Chile y el Mundo*. Niva Chile S.A., Puerto Varas., Chile, pp. 161-179.

SOMMERSET, I.; KROSSØY, B.; BIERING, E.; FROST, P. 2005. **Vaccines for fish in aquaculture.** *Expert Rev. Vaccines* 4:89-101.

- SPLETTSTOESSER, W.D.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; NEUBAUER, H.; SCHUFF-WERNER, P.** 2005. Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. *J. Vet. Med.* 52:249-261.
- TACON, A.G.J.; METIAN, M.** 2013. Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Rev. Fish. Sc.* 21:22-38.
- TITBALL, R.W.; JOHANSSON, A.; FORSMAN, M.** 2003. Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved?. *Trends Microbiol.* 11:118-123.
- TIZARD, I.** 1992. Resistance to Bacteria and Related Organisms. **In:** *Veterinary Immunology: An Introduction.* W.B. Saunders Company. Philadelphia, EE.UU., pp. 277-288.
- TOBBACK, E.; DECOSTERE, A.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F.; CHIERS, K.** 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 30:257-268.
- TWB (THE WORLD BANK).** 2013. Chapter 5. Discussion. **In:** *Fish to 2030. Prospects for Fisheries and Aquaculture.* Agriculture and Environmental Paper 03. World Bank Report Number 83177-GLB. The World Bank Publisher, Washington (D.C.), EE.UU., pp. 71-75.
- UNITED NATIONS.** 2013. *Global Food and Nutrition Scenarios Final Report.* Millennium Institute. Washington (D.C.), EE.UU., 23 pp. [en línea] <http://www.un.org/en/development/desa/policy/wess/wess_bg_papers/bp_wess_2013_millennium_inst.pdf> [Consulta 15.10.2015].
- UNITED NATIONS.** 2015. *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables.* Department of Economic and Social Affairs/Population Division of the United Nations. New York, EE.UU., 59 pp.
- VENEGAS, C.** 1996. *Piscirickettsia salmonis*: prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Período invierno-primavera. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 95 pp.

- VENEGAS, C.A.; CONTRERAS, J.R.; LARENAS, J.J.; SMITH, P.A.** 2004. DNA hybridization assays for the detection of *Piscirickettsia salmonis* in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 27:431-433.
- WILHELM, V.; MIQUEL, A.; BURZIO, L.O.; ROSEMBLATT, M.; ENGEL, E.; VALENZUELA, S.; PARADA, G.; VALENZUELA, P.D.T.** 2006. A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* based on recombinant proteins. *Vaccine* 24:5083-5091.
- WILSON, J.W.** 2006. Bacterial Protein Secretion Mechanisms. **In:** Nickerson, C.A.; Schurr, M.J. (Eds.). *Molecular Paradigms of Infectious Disease: A Bacterial Perspective*. Springer Science +Business Media. New York, EE.UU., pp. 274-320.
- WU, G.; FANZO, J.; MILLER, D.D.; PINGALI, P.; POST, M.; STEINER, J.L.; THALACKER-MERCER, A.E.** 2014. Production and supply of high-quality food protein for human consumption: sustainability, challenges, and innovations *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1321:1-19.
- YAÑEZ, A.J.; VALENZUELA, K.; SILVA, H.; RETAMALES, J.; ROMERO, A.; ENRIQUEZ, R.; FIGUEROA, J.; CLAUDE, A.; GONZALEZ, J.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; CARCAMO, J.G.** 2012. Broth medium for the successful culture of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Dis.Aquat. Org.* 97:197-205.
- YAÑEZ, A.J.; MOLINA, C.; HARO, R.E.; SANCHEZ, P.; ISLA, A.; MENDOZA, J.** *et al.* (otros 9 co-autores). 2014. Draft genome sequence of virulent strain AUSTRAL-005 of *Piscirickettsia salmonis*, the etiological agent of piscirickettsiosis. *Genome Announc.* DOI:10.1128/genomeA.00990-14
- YE, D.; BLANKE, S.R.** 2006. Toxins as Host Cell Modulators. **In:** Nickerson, C.A.; Schurr, M.J. (Eds.). *Molecular Paradigms of Infectious Disease: A Bacterial Perspective*. Springer Science +Business Media. New York, EE.UU., pp. 321-403.

- YUKSEL, S.A.; THOMPSON, K.D.; ADAMS, A.** 2006a. Rickettsial infections of fish. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 6:63-78.
- YUKSEL, S.A.; THOMPSON, K.D.; ELLIS, A.E.; ADAMS, A.** 2006b. Improved purification of *Piscirickettsia salmonis* using Percoll gradients. *J. Microbiol. Meth.* 66:251-262.
- ZRNČIĆ, S.; VENDRAMIN, N.; BOUTRUP, T.S.; BOYE, M.; BRUUN, M.S.; BRNIĆ, D.; ORAIĆ, D.** 2015. *Piscirickettsia salmonis* infection in European sea bass – An emerging disease in Mediterranean mariculture. 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. European Association of Fish Pathologists. Las Palmas de Gran Canaria, España, Septiembre 7 a 11. Abstract Book, O-45, p. 153.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y LOS ARTÍCULOS RESPECTIVOS DONDE
ÉSTOS FUERON ABORDADOS**

Objetivo 1. Describir la secuencia de infección de *P. salmonis* en cultivos de células CHSE-214 y establecer la permisividad de la línea celular ASK a este patógeno.

1.1. Smith, P.A., Reveco, F., Contreras, J., Rojas, M.E., Venegas, C., Guajardo, A. 2010. Infectivity study of *Piscirickettsia salmonis* in CHSE-214 cells by confocal and transmission electron microscopy. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists** 30:128-136.

1.2. Smith, P.A., Díaz, F.E., Rojas, M.E., Díaz, S., Galleguillos, M., Carbonero, A. 2015. Effect of *Piscirickettsia salmonis* inoculation on the ASK continuous cell line. **Journal of Fish Diseases** 38:321-324.

Objetivo 2. Determinar la secuencia de infección de *P. salmonis* en tejidos de trucha arcoíris (*O. mykiss*).

2.1. Smith, P.A., Contreras, J.R., Rojas, M.E., Guajardo A., Díaz, S., Carbonero, A. 2015. Infectivity of *Piscirickettsia salmonis* in immersion-bath exposed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases** 38:765-770.

Objetivo 3. Determinar el efecto de los productos extracelulares de *P. salmonis* en cultivos celulares.

3.1. Rojas, M.E., Galleguillos, M., Díaz, S., Machuca, A., Carbonero, A.; Smith, P.A. 2013. Evidence of exotoxin secretion of *Piscirickettsia salmonis*, the causative agent of piscirickettsiosis. **Journal of Fish Diseases** 36: 703-709.

ARTÍCULOS

Artículo 1.1. (Objetivo 1). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol 30:128-136. 2010.

“Infectivity study of *Piscirickettsia salmonis* in CHSE-214 cells by confocal and transmission electron microscopy”

P.A. Smith, F. Reveco, J. Contreras, M. E. Rojas, C. Venegas and A. Guajardo

Department of Animal Pathology

Faculty of Veterinary Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Casilla 2 Correo 15 Santiago, Chile

ABSTRACT

Piscirickettsia salmonis is the etiological agent of piscirickettsiosis, a fish disease described in different locations of the world but particularly severe in maricultured salmonids in Chile. A time-course study was performed in order to observe the infection process of *P. salmonis* on CHSE-214 cells by confocal laser microscopy (CLM) and transmission electron microscopy with both a standard procedure (TEM) and immunogold (IG-TEM). For the CLM examination, monolayers seeded on round coverslips were studied at the following post-inoculation (*pi*) times: 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h. *P. salmonis* was visualized using an indirect fluorescence antibody test. In TEM and IG-TEM, monolayers grown in 25 mL culture flasks were infected and later fixed at the following *pi* times: 15 min, 1 h, 4 h, 6 h, 24 h, 45 h and 8 days. Results showed that *P. salmonis* was found attached to the plasma membrane as early as 5 min *pi*. The microorganisms remained on the cell surface from 5 to 30 min *pi*. At 1 and 3 h *pi* the bacteria

were observed on the cell surface and/or embedded in the plasma membranes. Finally, from 4 h and longer *pi* times, *P. salmonis* was found inside the cell cytoplasm. According to the results it seems that the early infectivity events of *P. salmonis* in CHSE-214 cells involve a fast attachment step (≤ 5 min *pi*) and a further cell penetration through the plasma membrane which occurs mainly between 3 and 6 h *pi*.

INTRODUCTION

Piscirickettsia salmonis is a gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish (Fryer & Hedrick, 2003). This bacterium is the causative agent of piscirickettsiosis (Fryer *et al.*, 1992) which is a major infectious disease of salmonid fish cultured in sea cages in Chile (Venegas *et al.*, 2004) where the first worldwide isolation of this agent took place (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991). Piscirickettsiosis has also been reported in salmonid fish in Norway (Olsen *et al.*, 1997), Canada (Brocklebank *et al.*, 1993), Ireland (Rodger & Drinan, 1993) and Scotland (Grant *et al.*, 1996;). Although the principal hosts for *P. salmonis* are salmonid fish, there are reports of its isolation from diseased fish of other species such as *Dicentrarchus labrax* (McCarthy *et al.*, 2005) and *Atractoscion nobilis* (Arkush *et al.*, 2006). *P. salmonis* can be grown in cell lines of an insect, a frog (Birkbeck *et al.*, 2004) and of a number of fish (Fryer & Hedrick, 2003), the Chinook salmon embryo (CHSE-214) cells (Lannan *et al.*, 1984) being the most commonly used to culture this bacterium (Birkbeck *et al.*, 2004). Besides cell cultures, it has recently been reported that *P. salmonis* may also be grown in cell-free media (Mauel *et al.*, 2008; Mikalsen *et al.*, 2008). In this work, a time-course study of the infectivity of the CHSE-214 by *P. salmonis* was performed using confocal, standard (TEM) and immunogold (IG-TEM) electron microscopy.

MATERIAL AND METHODS

Cells. The CHSE-214 cell line, kindly provided by the late Prof. J.L. Fryer (Oregon State University, USA), was used. Cells were grown in Eagle's Minimum Essential Medium with Earle's salts (Automod, Sigma-Aldrich Inc., MO, USA), supplemented with 10% foetal calf serum (MEM-10) (Gibco BRL, NY, USA) without antibiotics and antimycotics.

Bacterium. The SLGO-95 strain of *P. salmonis* (Smith *et al.*, 1996) was used. Prior to being used as inoculum to infect the CHSE-214 cells, the bacterium was cultured in monolayers of the same cell line at 18 °C and harvested when cytopathic effect reached approximately 100%. The titre of this infectious supernatant, which was obtained by end-point dilution assay in 96-well plates with 6 wells per dilution (Reed & Muench, 1938), was $10^{6.5}$ TCID₅₀ mL⁻¹. This bacterial suspension was filtrated with 5 µm pore membrane (Millipore, Orange Scientific, Belgium) to remove debris aggregates and non-disrupted cells and then was used as inoculum.

Confocal microscopy. CHSE-214 cells were cultured as previously described to obtain monolayers on round coverslips of 15 mm in diameter placed in 24-well microplates (Nunc, NY, USA). These monolayers, were infected with 100 µL of the *P. salmonis* suspension described above. Then, coverslips were washed three times with phosphate buffer solution 0.1 M pH 7.2 (PBS) and fixed with pure methanol for 3 min at the following post-inoculation (*pi*) times: 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h. *P. salmonis* was labelled by means of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) according to the method of Lannan *et al.* (1991), but using monoclonal antibodies against *P. salmonis* (Bios Chile, Chile) and a rabbit anti-mouse Ig G (whole molecule)-FITC as a secondary antibody (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA). Working dilutions of the antibodies were 1:100 and 1:70, respectively. At each observation time, non-inoculated monolayers, which also

underwent the IFAT procedure, were included as negative controls. Two coverslips were used for each *pi* time and observations were made under a confocal microscope (Zeiss Axiovert 135M, Germany), using 488 nm as excitation wavelength and the LSM 3.9 program for image analysis.

Standard TEM. A pool of cells obtained by trypsinization of monolayers from two 150 cm² flasks (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) was seeded in eight 25 cm² flasks (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) which were incubated at 18 °C for three days. Seven of them were then infected with 3 mL of the inoculum each and the remaining flask was left without inoculation. The infected flasks were fixed at the following *pi* times: 15 min, 1 h, 4 h, 6 h, 24 h, 45 h and 8 days. The non-infected monolayer was used as negative control and it was fixed at 45 h *pi*. The monolayers of each flask were fixed with 3mL of PBS containing paraformaldehyde (2%) and glutaraldehyde (0.2%) for 20 min. After discarding the supernatant the cells were scarified and suspended in 3 mL of the same fixative solution. Cell suspension was divided in two aliquots of 1.5 mL and centrifuged (1500 g for 10 min); one of the pellets was processed for standard TEM and the other for IG-TEM. The cell pellets used for standard TEM were held for 18 h at room temperature (*rt*) with a fixative of paraformaldehyde (4%) and glutaraldehyde (2%) in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). The fixative was then discarded and the pellets were kept for 12 h at 4 °C with the 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) The pellets were post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 90 min at *rt*. They were washed three times with distilled water and stained with 1% uranyl acetate for 60 min at *rt*. Preparations were dehydrated with acetone (50, 70, 95 and 100%) for 20 min at each concentration with the last one (100% acetone) carried out three times. Then, they were infiltrated with epon: acetone (1:1) overnight and pre-included in pure epon resin (Pelco Medcast Resin, Ted Pella Inc, CA) for 24 h at *rt*. These samples were included in a flat mould (Ted Pella Inc, CA) with pure epon resin and polymerized at 60 °C for 48 h. The

blocks were first cut to obtain 1 μm thick sections (Sorvall Porter Blum MT-IIB) which were stained with 1% toluidine blue and 1% sodium borate to be observed under a light microscope. After selecting the appropriate areas, 60 to 80 nm ultrathin sections were obtained with a diamond knife, and placed on 200 mesh Cu grids (Ted Pella Inc, CA). Preparations were contrasted with 4% uranyl acetate in pure methanol for 2 min and with lead citrate (Reynolds, 1963) for 5 min. Finally, the sections were observed and photographed in a transmission electron microscope (Philips, Tecnai 12 Bio-Twin, Holland) at 80 kV.

IG-TEM. The cell pellets used for this procedure were first held in PBS containing 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde for 3 h at 4 °C. They were then washed with PBS for 12 h at 4 °C. Preparations were dehydrated for 20 min with acetone once at 50 and 70% and thrice at 95% concentration. After dehydration, samples were infiltrated with LR White (London Resin Company, England) 1:1 (v/v) with ethanol and held under agitation at 4 °C overnight and next included in pure LR White for 24 h at *rt* changing the resin three times during the latter procedure. Preparations were placed in size 2 gel capsules (Ted Pella Inc, CA) and resins polymerized at 50 °C for 24 h. The blocks were treated with the same method as that described for the standard TEM but the ultrathin sections were placed in 200 mesh nickel grids (Polysciences, Inc. PA). Grids with the sections were placed upside-down on calibrated drops (30 μL) with 1% of bovine serum albumin (BSA) diluted in Tris buffer 0.5 M pH 7.5 with 0.02% triton (TBS), for 30 min at *rt*. After a gentle touch with a filter paper, grids were placed on 30 μL drop containing rabbit polyclonal antibodies against *P. salmonis* (1:50) (Lannan *et al.*, 1991) and incubated in a humid chamber 12 h at 4 °C. They were then washed four times with TBS (30 μL) for five min each time. After the washing step, the secondary antibody, which was a goat anti rabbit IgG conjugated with 10 nm gold spheres (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA) diluted 1:50 in 0.1% BSA/TBS, was applied for 1 h at *rt*. Afterwards, grids were washed four times for 5 min

each at *rt*, the first two times with 40 μ L of TBS and the last ones with 40 μ L of double distilled water. After this washing step grids were dried with a filter paper. Samples were counterstained for 5 min first with 2% uranyl acetate and then with 2% lead citrate (Reynolds, 1963) and observed in the same microscope described above for the standard TEM at 80 kV. Two kinds of negative control of the immunogold technique were used. One of them consisted in performing the immunogold technique as previously described from infected and non-infected monolayers with *P. salmonis*, but substituting TBS for the first antibody. The other negative control was performed using the whole immunogold procedure in samples derived from non-infected cell monolayers.

RESULTS

Confocal microscopy: Results showed that *P. salmonis* was found attached to the plasma membrane as early as 5 min *pi*. The microorganisms remained on the cell surface from 5 to 30 min *pi*. At 1 and 3 h *pi* the bacteria were observed on the cell surface and/or embedded in the plasma membranes. Finally, from 6 h and longer *pi* times (12 and 24 h) *P. salmonis* was found inside the cytoplasm of the cells. Figures 1 and 2 illustrate some of the results obtained with the confocal microscopy, showing different orthogonal sections of the selected preparations.

Standard TEM: At 15 min *pi* a number of rounded empty structures, made up of a single or double membrane and similar in size to *P. salmonis*, were found outside but close to the plasma membrane of the eukaryotic cells. At 1h and 4 h *pi* *P. salmonis* was observed close to or attached to the plasma membrane. At 6 h, 24 h, 45 h and 8 days *pi*, *P. salmonis* was found in membrane-bound vacuoles inside the cytoplasm of the CHSE-214 cells.

IG-TEM: At 15 min *pi* neither the bacteria nor the empty structures observed in standard TEM were detected. At 1 h *pi* the bacteria were observed either close to or attached to the cell surface. At 4 h and 6 h *pi* *P. salmonis* was detected close to, attached to

the cell surface, or in vacuoles inside the cytoplasm located near the plasma membrane. Finally, as in the standard TEM, from 24 h and longer *pi* times (45 h and 8 days) *P. salmonis* was found in vacuoles within the cytoplasm of the CHSE-214 cells. Figures 3, 4, 5 and 6 show photomicrographs of the standard TEM and IG-TEM results.

DISCUSSION

Results in the present work showed that the use of different methods to visualize the infection process by *P. salmonis* is valuable because they give complementary information helping to have a more accurate idea of the phenomenon under study.

Although resolution with confocal microscopy was lower than with standard and IG-TEM, the bacteria were readily located in all observations, which did not happen with the other techniques. Thus, among the methods used, confocal microscopy appeared as the most appropriate one for a screening procedure for having a faster picture of the invasion process.

In IG-TEM samples, some non-specific randomly distributed gold spheres appeared as a background, but their concentration was clearly higher when associated to the bacteria. It should be noted that the bacteria appeared gold-labelled in both their outer membranes and inner structures. IG-TEM allowed one to observe *P. salmonis* earlier in the cell cytoplasm than the standard TEM, showing a higher sensitivity in detecting the bacterium but, as expected, morphological details were more distinctly seen with the standard TEM.

As to the attachment of *P. salmonis* to the eukaryotic plasma membrane, it was detected as soon as 5 min *pi*. Hence this is a rather fast process. For the success of *in vivo* infection, a short attachment time would be necessary to prevent the water flow from restraining the pathogen-host interaction. The fact that horizontal transmission of *P. salmonis* may occur in fresh water (Almendras *et al.*, 1997) even though the bacterium is

inactivated quite rapidly in this environment (Lannan & Fryer, 1994; Chen *et al.*, 2000) also suggests that the pathogen should have a fast attachment step for surviving and infecting its target cells.

The invasion sequence of *P. salmonis* in cell cultures appeared to be rather similar to that of other gram-negative fish pathogenic bacteria such as *Edwardsiella tarda*, and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* but faster relative to *Listonella anguillarum* and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

In studies of infectivity of *E. tarda*, Ling *et al.* (2000) reported that both virulent and avirulent strains were detected at 30 min *pi* already attached and inside the cytoplasm in epithelioma papillosum of carp (EPC) cells. Similar results were obtained by Rao *et al.* (2001) with blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) phagocytes. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, in EPC showed adherence at 15 min *pi* and internalization at 1 h *pi* reaching a plateau at 3 h *pi* (López-Doriga, 2000). In turn, and also in EPC cell cultures, a number of *Vibrio anguillarum* (at present *L. anguillarum*) strains showed some bacterial adherence but minimum internalization at 24 h *pi*. At the same *pi* time *Vibrio damsela* (at present *P. damsela* subsp. *damsela*) showed a lower level of adhesion and invasion was negligible (Wang *et al.*, 1998). Although the adherence times were 15 and 30 min for *P. damsela* subsp. *piscicida* and *E. tarda*, respectively, it is not possible to state that *P. salmonis* is faster in attaching to cells (5 min) because shorter times were not considered for those bacteria.

It is interesting to notice that no surface projections and/or attachment structures were seen in *P. salmonis*, not even when observed very close or when attached to the surface of the plasma membrane of the CHSE-214 cells (Fig. 3). This is different to the findings described by Larenas *et al.*, (2003) where filament structures described as attachment factors were reported. This difference could be explained by the fact that the

study of Larenas *et al.* (2003) was performed using scanning electron microscopy and the bacteria in their study were attached to ova experimentally infected with this pathogen and not to *in vitro* cultured cells.

The pathogenesis of piscirickettsiosis is very likely a complex interplay between the bacteria and different types of cell and other tissue components of the hosts. Although tissue culture models are useful in providing information about this disease pathogenesis, it is essential to examine the invasion pathway in a natural host to fully understand the infection process of *P. salmonis*.

REFERENCES

- Almendras FE, Fuentealba IC, Jones SRM, Markham F and Spangler E (1997). Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **20**, 409-418.
- Arkush K, Edes HL, McBride AM, Adkison MA and Hedrick RP (2006). Persistence of *Piscirickettsia salmonis* and detection of serum antibodies to the bacterium in white sea bass *Atractoscion nobilis* following experimental exposure. *Diseases of Aquatic Organisms* **73**, 131-139.
- Birkbeck TH, Griffen AA, Reid HI, Laidler LA and Wadsworth S (2004). Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infection and Immunity* **72**, 3693-3694.
- Brocklebank JR, Evelyn TPT, Speare DJ and Armstrong DJ (1993). Rickettsial septicemia in farmed Atlantic and chinook salmon in British Columbia: Clinical presentation and experimental transmission. *Canadian Veterinary Journal* **34**, 745-748.
- Chen MF, Yun S, Marty GD, McDowell TS, House ML, Appersen JA, Guenther TA, Arkush KD and Hedrick RP (2000). A *Piscirickettsia salmonis*-like bacterium associated with mortality of white seabass *Atractoscion nobilis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **43**, 117-126.
- Cvitanich JD, Gárate O and Smith CE (1991). The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *Journal of Fish Diseases* **14**, 121-145.
- Fryer JL and Hedrick RP (2003). *Piscirickettsia salmonis*: a gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases* **26**, 251-262.

Fryer JL, Lannan CN, Garcés LH, Larenas JJ and Smith PA (1990). Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathology* **25**, 107-114.

Fryer JL, Lannan CN, Giovanonni SJ and Wood ND (1992). *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 120-126.

Grant AN, Brown AG, Cox DI, Birkbeck TH and Griffen AA (1996). Rickettsia-like organism in farmed salmon. *Veterinary Record* **138**, 423-424.

Lannan CN and Fryer JL (1994). Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of Fish Diseases* **17**, 545-548.

Lannan CN, Ewing SA and Fryer JL (1991). Fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. *Journal of Aquatic Animal Health* **3**, 229-234.

Lannan CN, Winton JR and Fryer JL (1984). Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* **20**, 671-676.

Larenas JJ, Bartholomew J, Troncoso O, Fernández S, Ledezma H, Sandoval N, Vera P, Contreras J and Smith P (2003). Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**, 25-30.

Ling SHM, Wang XH, Xie L, Lim TM and Leung KY (2000). Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology* **146**, 7-19.

López-Dóriga MV, Barnes AC, dos Santos NMS and Ellis AE (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology* **146**, 21-30.

Mauel MJ, Ware C and PA Smith (2008). Culture of *Piscirickettsia salmonis* en enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**, 213-214.

McCarthy U, Steiropoulos NA, Thompson KD, Adams A, Ellis AE and Ferguson H (2005). Confirmation of *Piscirickettsia salmonis* as a pathogen in European seabass *Dicentrarchus labrax* and phylogenetic comparison with salmonid strains. *Diseases of Aquatic Organisms* **64**, 107-119.

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

Olsen AB, Melby HP, Speilberg L, Evensen O and Hastein T (1997). *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway - epidemiological, pathological and microbiological findings. *Diseases of Aquatic Organisms* **31**, 35-48.

Rao PSS, Lim TM and Leung KY (2001). Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. *Infection and Immunity* **69**, 5689-5697.

Reed LJ and Muench H (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**, 493-497.

Reynolds ES (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**, 208-212.

Rodger HD and Drinan EM (1993). Observation of a rickettsia-like organism in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *Journal of Fish Diseases* **16**, 361-369.

Smith PA, Vechiola IM, Oyanedel S, Garcés LH, Larenas J and Contreras J. (1996). Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **16**, 164-168.

Venegas CA, Contreras JR, Larenas JJ and Smith PA (2004). DNA hybridization assays for the detection of *Piscirickettsia salmonis* in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* **27**, 431-433.

Wang XH, Oon HL, Ho GWP, Wong WSF, Lim TM and Leung KY (1998). Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cells interactions. *Microbiology* **144**, 2987-3002.

Figure legends:

Fig. 1. Confocal microscopy. CHSE-214 cells 3 h post-inoculation with *Piscirickettsia salmonis*. Over the main picture, two orthogonal sections (*x* and *y* axis) of one coordinate are shown. *P. salmonis* is embedded in the plasma membrane.

Fig. 2. Confocal microscopy. CHSE-214 cells 6 h post-inoculation with *Piscirickettsia salmonis*. Over the main picture, two orthogonal sections (*x* and *y* axis) of one coordinate are shown. *P. salmonis* is in the cells cytoplasm.

Fig.3. Immunogold. Ultrathin section of CHSE-214 cells 4 h post inoculation with *P. salmonis*. A bacterium is closely attached to the cell surface.

Fig. 4. Immunogold. Ultrathin section of CHSE-214 cells 6 h post inoculation with *P. salmonis*. A bacterium is visible inside the cell cytoplasm.

Fig. 5. Immunogold. Ultrathin section of CHSE-214 cells 8 days post inoculation with *P. salmonis*. A bacterium is within a vacuole inside the cell cytoplasm.

Fig. 6. Standard transmission electron microscopy. Ultrathin section of CHSE-214 cells 8 days post inoculation with *P. salmonis*. A bacterium is within a membrane-bound vacuole inside the cell cytoplasm. Note the rippled cell wall and electron-lucent structures.

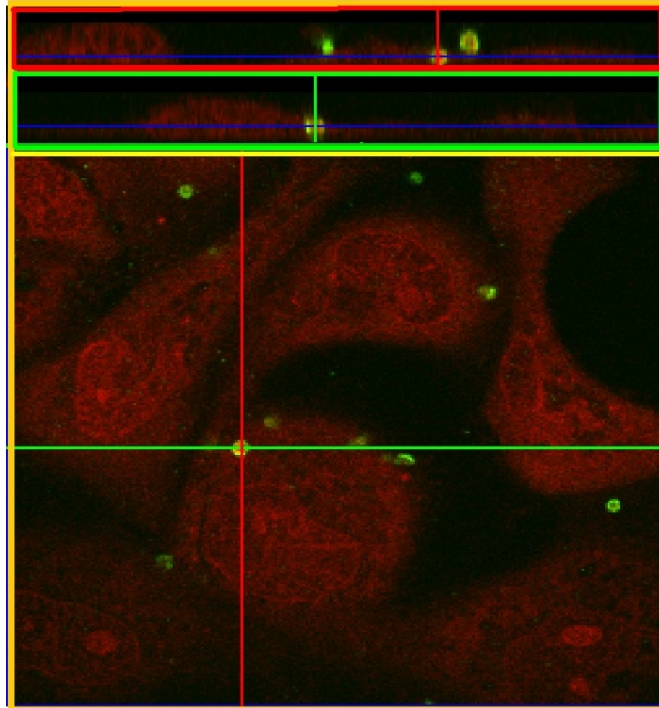


Fig. 1. Confocal microscopy. CHSE-214 cells 3 h post-inoculation with *Piscirickettsia salmonis*. Over the main picture, it is shown two orthogonal sections (x and y axis) of one coordinate. *P. salmonis* is embedded in the plasma membrane.

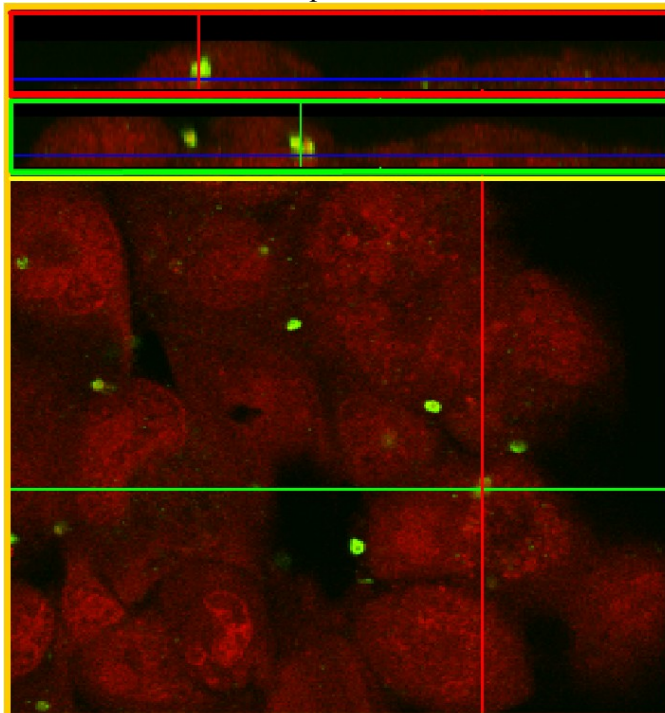


Fig. 2. Confocal microscopy. CHSE-214 cells 6 h post-inoculation with *Piscirickettsia salmonis*. Over the main picture, it is shown two orthogonal sections (x and y axis) of one coordinate. *P. salmonis* is in the cells cytoplasm.

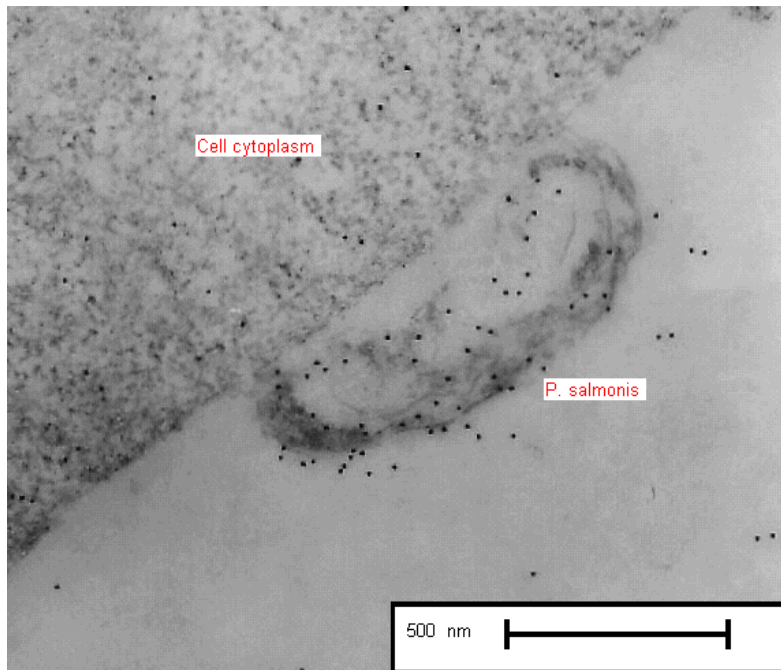


Fig.3.Immunogold. Ultrathin section of CHSE-214 cells 4 h post inoculation with *P. salmonis*. A bacterium is closely attached to the cell surface.

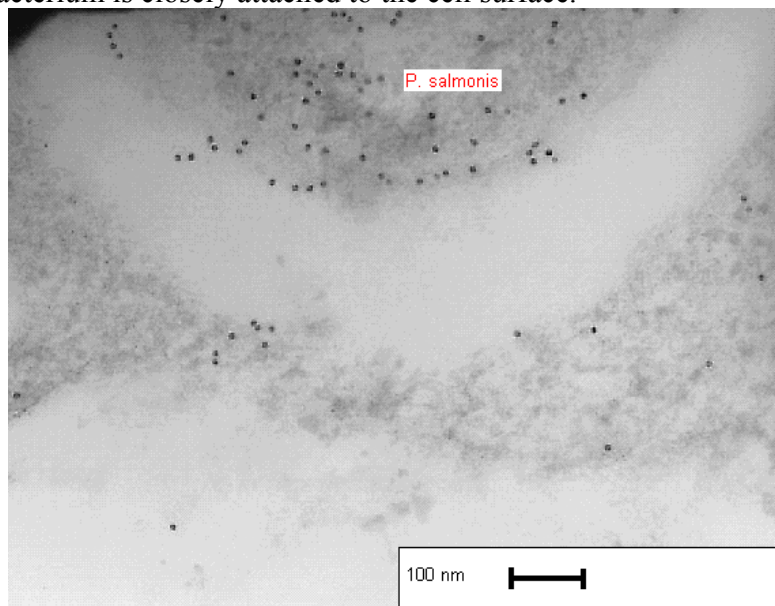


Fig. 4. Immunogold. Ultrathin section of CHSE-214 cells 6 h post inoculation with *P. salmonis*. A bacterium is inside a cell cytoplasm.

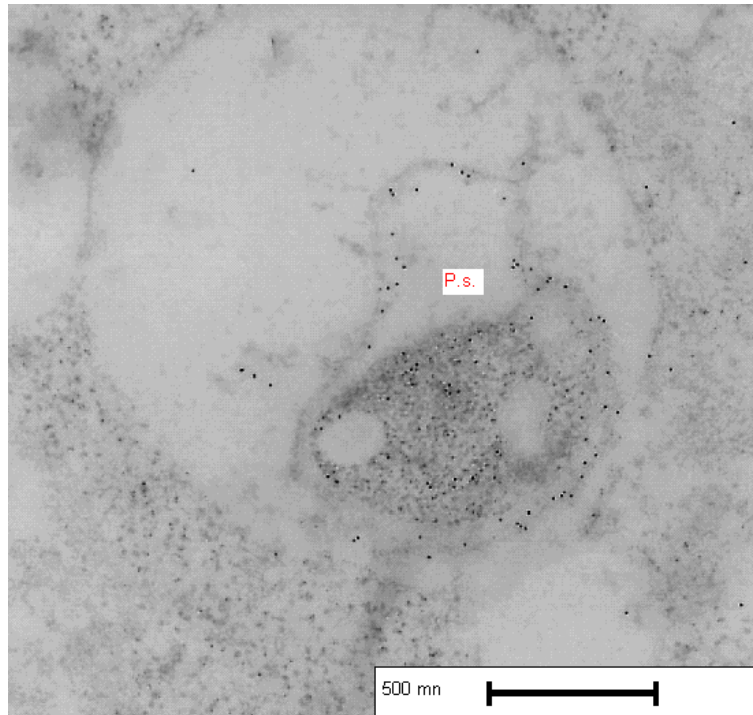


Fig. 5. Immunogold. Ultrathin section of CHSE-214 cells 8 days post inoculation with *P. salmonis*. A bacterium is within a vacuole inside the cell cytoplasm.

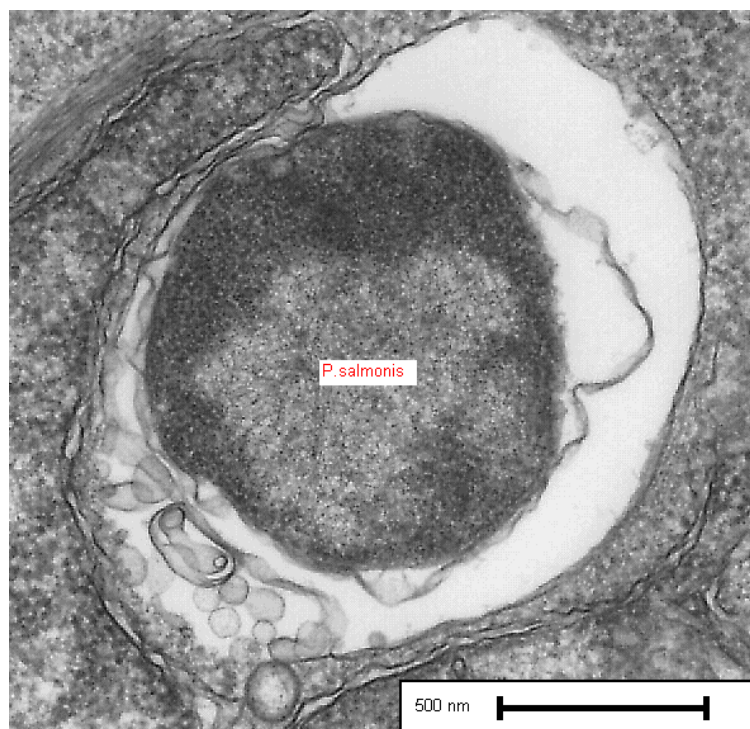


Fig. 6. Standard transmission electron microscopy. Ultrathin section of CHSE-214 cells 8 days post inoculation with *P. salmonis*. A bacterium is within a membrane-bound vacuole inside the cell cytoplasm. Note the rippled cell wall and electron-lucent structures.

Artículo 1.2. (Objetivo 1). J. Fish Diseases 38:321-324. 2015.

Title Page:

Full title: “Effect of *Piscirickettsia salmonis* inoculation on the ASK continuous cell line”

Correspondence: P. A. Smith, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, University of Chile, Santa Rosa 11735, Santiago, Chile

e-mail: psmith@uchile.cl

Short running title: “*Piscirickettsia salmonis* in the ASK cell line”

SHORT COMMUNICATION

Effect of *Piscirickettsia salmonis* inoculation on the ASK continuous cell line

P. A. Smith¹, F.E. Díaz¹, M.E. Rojas¹, S. Díaz¹, M. Galleguillos² and A. Carbonero³

¹ Department of Animal Pathology. Faculty of Veterinary Sciences. University of Chile, Santiago, Chile.

² Department of Animal Biological Sciences, Faculty of Veterinary Sciences. University of Chile, Santiago, Chile.

³ Department of Animal Health, University of Córdoba, Spain.

Keywords: *Piscirickettsia salmonis*, ASK cells, cytopathic effect, titre

Piscirickettsia salmonis (*P. salmonis*) is a Gram-negative aquatic pathogen that causes piscirickettsiosis, a contagious systemic disease which was first described in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) cultured in sea net pens (Fryer, Lannan, Garcés, Larenas & Smith 1990). Since then this condition has been detected in a variety of teleost fish from distant geographic regions in the world, but so far it has been consistently more severe in salmonid species reared in the South Pacific Ocean in Chile (Arkush & Bartholomew 2011; Rojas, Galleguillos, Díaz, Machuca, Carbonero & Smith 2013).

First isolation of *P. salmonis* was in the chinook salmon, *O. tshawytscha* (Walbaum), embryo (CHSE-214) cell line (Fryer *et al.* 1990), and these cells were since then the most extensively used substrate for this bacterium propagation (Arkush & Bartholomew 2011; Rojas *et al.* 2013). For some years it was thought that *P. salmonis* could replicate *in vitro* only in cell cultures, but rather recently it was found that it can also be grown in some enriched artificial media (Mauel, Ware & Smith 2008; Mikalsen, Skjærvik, Wiik-Nielsen,

Wasmuth & Colquhoun 2008) and, therefore, at present it is characterized as a facultative, instead of an obligated, intracellular organism. Although several fish cell lines in which *P. salmonis* replicates have been described, no attempts have been made to know if the Atlantic salmon, *Salmo salar* L., kidney (ASK) cell line developed by Devold, Krossøy, Aspehaug & Nylund (2000) is permissive to this bacterium. The objective of this work was to determine the effect of *P. salmonis* inoculation on ASK cells through the cytopathic effect (CPE) description and bacterial titration after cell exposure to this fish pathogen.

Monolayers of the ASK (ATCC CRL 2797) and the CHSE-214 (ATCC CRL 1681) cell lines, both cultured at 18 °C in absence of antimicrobials, were used. The ASK cells were cultured with L-15 Leivobitz medium with L-glutamine (2.05 mM) and supplemented with β mercaptoethanol (38.5 μ M) and foetal calf serum (FCS) at 10% (all from Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA). The CHSE-214 cells were grown in Eagle's minimal essential medium with Earle's salts (Automod Sigma-Aldrich, Lenexa, KS), L-glutamine (2 mM) and FCS (10%).

An isolate of *P. salmonis* obtained from an Atlantic salmon suffering clinical piscirickettsiosis, sampled at a sea-site of the south of Chile, was used. It was cultured in CHSE-214 cells. Infectious supernatant was harvested when CPE reached 100% and it was titered by end-point dilution assay using 96-well microplates containing monolayers of CHSE-214 cells, with 6 wells per dilution, employing the method of Reed & Muench (1938) to estimate the tissue culture infectious dose 50% per mL (TCID₅₀ mL⁻¹). Finally, the inoculum used to expose the cells in the infectivity assays explained below was a bacterial suspension having 10^{5.7} TCID₅₀ contained in 0.2 mL.

In the infectivity assays, which were replicated once, fresh monolayers of ASK cells cultured in 25 cm² flasks were exposed to the *P. salmonis* inoculum and observed daily under inverted microscope for 20 post-inoculation (*p.i.*) days. Concurrently, for comparison, CHSE-214 cells were infected and treated in the same way as the ASK cells. Non-infected ASK and CHSE-214 cells were also included as experimental controls. At the end of the assays methanol-fixed smears from supernatants of the infected and non-infected cell cultures were obtained. These smears were stained with Gram and Giemsa and also labelled to detect *P. salmonis* by indirect immunofluorescence test (IFAT) according to Lannan, Ewing & Fryer (1991).

Titration of ASK cell supernatants post *P. salmonis* infection was carried out once CPE approached 100% in these cells, which occurred at 20 *p.i.* days. Supernatants were titrated in microplates containing CHSE-214 cells as previously explained. Titration was also conducted after a second passage of *P. salmonis* in ASK cells which, in turn, were infected with 0.2 mL of supernatant of infected ASK cells with approximately 100% of CPE.

Monolayers of ASK cells exhibited a conspicuous and distinctive CPE after *P. salmonis* infection. First morphological changes were evident quite early, starting at day 3 *p.i.*, and were characterized by the presence of rounded intracytoplasmatic vacuoles in few cells. As time elapsed the number of affected cells and the vacuoles in them progressively increased in such a way that in some cells more than 50 vacuoles of different size and morphology could be counted. The smaller vacuoles were almost circular with a diameter starting from *ca.* 1 µm. Some of the larger vacuoles showed the same shape of the smaller ones, but others were more asymmetrical, some of them reaching *ca.* 5 µm in their longer axis, as shown in Fig. 1 (*B* and *C*). Some vacuoles contained structures consistent with *P. salmonis*

morphology while others looked empty. In time, a progressive ASK cell detachment occurred homogeneously without leaving the discrete large spaces observed in the CPE when *P. salmonis* infects CHSE-214 cells (Fryer *et al.* 1990). The CPE difference between ASK and CHSE-214 cells infected with *P. salmonis* can be seen in illustrations *C* and *D* (Fig. 1) at 5 *p.i.* days and in *E* and *F* (Fig. 1) at 11 *p.i.* days. At day 20 *p.i.*, detachment of the infected ASK cells approached 100%. Detachment was clearly higher in ASK than in CHSE-214 cells at a given time, as shown in pictures *G* and *H* (Fig. 1).

In advanced infection stages, *P. salmonis* compatible particles, extracellularly suspended, were seen with inverted microscope in a higher number and larger size in ASK compared to CHSE-214 cultures. Nevertheless, observation under standard optical microscopy of smears of ASK cells infected with *P. salmonis*, stained either with Gram or Giemsa or IFAT labelled, showed the typical morphological features widely described for this bacterium (Fryer *et al.* 1990; Lannan *et al.* 1991; Fryer & Hedrick 2003; Arkush & Bartholomew 2011).

The replication ability of *P. salmonis* in ASK cell monolayers shown here was expected for at least two reasons. The first one is that these cells originate from Atlantic salmon and it is widely known that salmonid fish are highly susceptible to *P. salmonis* infection in natural and under experimental conditions (Fryer *et al.* 1990; Garcés, Larenas, Smith, Sandino, Fryer & Lannan 1991; Fryer & Hedrick 2003; Arkush & Bartholomew 2011). The second reason is that the ASK line is derived from kidney cells (Devold *et al.* 2000) which are one of the main target tissues of *P. salmonis* (Branson & Nieto Díaz-Muñoz 1991; Venegas, Contreras, Larenas & Smith 2004; McCarthy, Bron, Brown, Pourahmad, Bricknell, Thompson, Adams & Ellis 2008). It is worth mentioning that there are 11 cell lines so far

reported as permissive to *P. salmonis*, nine of them from teleosts (salmonid and non-salmonid fish) and the remaining two, from an amphibian and an invertebrate species. Salmonid cell lines, besides CHSE-214, are CSE-119 (coho salmon embryo), RTG-2 (rainbow trout gonad), CHH-1 (chum salmon heart) (Fryer *et al.* 1990), RTS11 (rainbow trout spleen) (Rojas, Galanti, Bols & Marshall 2009) and SHK-1 (salmon head kidney) (Vera, Isla, Cuevas & Figueroa 2012). From non-salmonid fish are EPC (*epithelioma papulosum cyprini*), FHM (fathead minnow) (Fryer *et al.* 1990) and BB (brown bullhead) cells (Almendras, Jones, Fuentealba & Wright 1997). The cell lines of amphibian and insect origin are XTC-2 and Sf21 from *Xenopus laevis* (Daudin) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), respectively (Birkbeck, Griffen, Reid, Laidler & Wadsworth 2004).

The titre obtained from supernatants of infected ASK cells was $10^{5.5}$ TCID₅₀ mL⁻¹. Same results were achieved when *P. salmonis* inocula for infecting the ASK monolayers came from infected CHSE-214 or ASK cell supernatants. These titres are approximately ten times lower than the values reached in CHSE-214 cells in which normal titres range from 10^6 to 10^7 TCID₅₀ mL⁻¹ (Fryer *et al.* 1990; Cvitanich, Garate & Smith 1991). It should be noted that the highest yields described so far are reached in the Sf21 insect cell line in which 100 times more *P. salmonis* infecting units are obtained compared to those in CHSE-214 cells (Birkbeck *et al.* 2004). The relatively low titres obtained in ASK cells indicate that these cells would not be a good option for high production of viable *P. salmonis*.

In conclusion ASK cells are permissive to the *P. salmonis* infection and therefore they expand the cell line repertoire that can be used for primary isolation as a diagnostic tool and, most importantly, for a wide scope of research studies, such as those focussed to understand the host-parasite interactions.

Acknowledgements

Authors are grateful to Mrs. D. Vega, Dr. J. Palomino and Mrs. A.M. Espinoza for their valuable help in cell culture handling, microphotography and critical review of this manuscript, respectively. This work was supported by Grant Fondecyt (Chile) 1080692.

References

Almendras F.E., Jones S.R.M., Fuentealba C. & Wright G.M. (1997) *In vitro* infection of a cell line from *Ictalurus nebulosus* with *Piscirickettsia salmonis*. *Canadian Journal of Veterinary Research* **61**, 66-68.

Arkush K.D. & Bartholomew J.L. (2011) *Piscirickettsia*, *Francisella* and Epitheliocystis. In: Fish Diseases and Disorders. Volume 3 Viral, Bacterial and Fungal Infections (ed. by P.T.K Woo & D.W. Bruno). 2nd edn, pp. 302-337. CAB International. Wallingford, U.K.

Birkbeck T.H., Griffen A.A., Reid H.I., Laidler L.A. & Wadsworth S. (2004) Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infection & Immunity* **72**, 3693-3694.

Branson E.J. & Nieto Díaz-Muñoz D. (1991) Description for a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *Journal of Fish Diseases* **14**, 147-156.

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

Devold M., Krossøy B., Aspehaug V. & Nylund A. (2000) Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Diseases of Aquatic Organisms* **40**, 9-18.

Fryer J.L., Lannan C.N., Garcés L.H., Larenas J.J. & Smith P.A. (1990) Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathology* **25**, 107-114.

Fryer J.L. & Hedrick R.P. (2003) *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases* **26**, 251-262.

Garcés L.H., Larenas J.J., Smith P.A., Sandino S., Fryer J.L. & Lannan C.N. (1991) Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Diseases of Aquatic Organisms* **11**, 93-97.

Lannan C.N., Ewing S.A. & Fryer J.L. (1991) A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. *Journal of Aquatic Animal Health* **3**, 229-234.

Mauel M.J., Ware C. & Smith P.A. (2008) Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**, 213-214.

McCarthy Ú.M., Bron J.E., Brown L., Pourahmad F., Bricknell L.R., Thompson K.D., Adams A. & Ellis A.E. (2008) Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 477-484.

Mikalsen J., Skjærvik O., Wiik-Nielsen J., Wasmuth M.A. & Colquhoun D.J. (2008) Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiology Letters* **278**, 43-47.

Reed L. & Muench H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**, 493-497.

Rojas M.E., Galleguillos M., Díaz S., Machuca A., Carbonero A. & Smith P.A. (2013) Evidence of exotoxin secretion of *Piscirickettsia salmonis*, the causative agent of piscirickettsiosis. *Journal of Fish Diseases* 36, 703-709.

Rojas V., Galanti N., Bols N.C. & Marshall S.H. (2009) Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. *Journal of Cellular Biochemistry* 108, 631-637.

Venegas C.A., Contreras J.R., Larenas J. & Smith P.A. (2004) DNA hybridization assays for the detection of *Piscirickettsia salmonis* in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 27, 431-433.

Vera T., Isla A., Cuevas A. & Figueroa J. (2012) Un nuevo medio de cultivo líquido para el patógeno *Piscirickettsia salmonis*. *Archivos de Medicina Veterinaria* 44, 271-277.

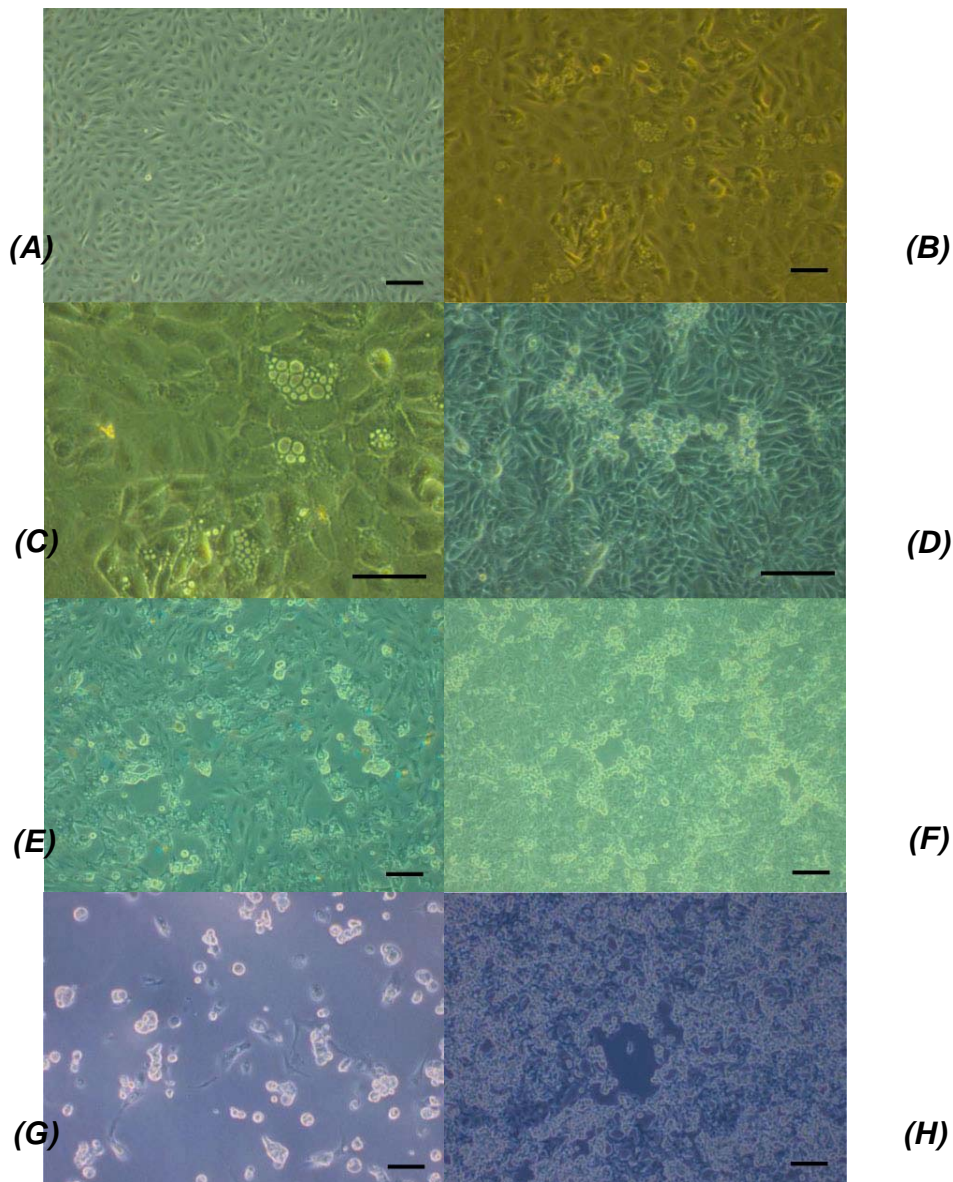


Figure 1 Monolayers of ASK [(A), (B), (C), (E) and (G)] and CHSE-214 cells [(D), (F) and (H)]. Inverted microscope with phase contrast. (A) Uninfected ASK cells. 100x. Illustrations (B) to (H) show cells after different post-inoculation (*p.i.*) days with *Piscirickettsia salmonis*. (B) ASK cells after 5 *p.i.* days. 100x. Some cells show intracytoplasmic vacuoles. (C) and (D), ASK and CHSE-214 cells, respectively, 5 *p.i.* days. 200x. (C) Intracytoplasmic vacuoles are observed with higher magnification than in (B). (D) Typical clusters of rounded refringent cells observed at the beginning of the cytopathic effect (CPE) caused by *P. salmonis* in CHSE-214 cells. (E) and (F), ASK and CHSE-214 cells, respectively, 11 *p.i.* days. 100x. (E) Extensive cell vacuolization and detachment of some of them. (F) Typical CPE in CHSE-214 cells with discrete foci of cell detachment surrounded by rounded refringent cells. (G) and (H), ASK and CHSE-214 cells, respectively, 14 *p.i.* days. 100x. (G) Detachment of more than 60% of the ASK cell monolayer. (H) Massive presence of rounded refringent CHSE-214 cells, but with less than the 15% of detachment of the cell monolayer. Bars \approx 20 μ m.

Artículo 2.1. (Objetivo 2) J. Fish Dis. 38:765-770. 2015.

Title Page:

Full title: “Infectivity of *Piscirickettsia salmonis* in immersion-bath exposed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fry”

Correspondence: P. A. Smith, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, University of Chile, Santa Rosa 11735, Santiago, Chile

e-mail: psmith@uchile.cl

Short running title: “*Piscirickettsia* infectivity in trout”

SHORT COMMUNICATION

Infectivity of *Piscirickettsia salmonis* in immersion-bath exposed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fry

P.A. Smith¹, J.R. Contreras¹, M.E. Rojas¹, A. Guajardo¹, S. Díaz¹, A. and Carbonero²

¹Department of Animal Pathology. Faculty of Veterinary Sciences. Pathology of Aquatic Animal Unit. University of Chile, Santiago, Chile

²Department of Animal Health, University of Córdoba, Spain.

Keywords: *Piscirickettsia*, infectivity, rainbow trout, pathogeny, piscirickettsiosis

Piscirickettsia salmonis is an obligate bacterial pathogen which causes piscirickettsiosis, a systemic disease affecting some anadromous and marine teleost fish species. To investigate the pathogenesis of this disease, a time-course study was conducted, using immunohistochemistry, after challenging rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fry by an immersion bath with *P. salmonis*.

To carry out this assay, fish (total n = 72; weight \approx 2.5 g) were allotted to six subgroups (12 fish each) held in individual 50-L tanks supplied with a flow-through freshwater system (25 L h⁻¹) at 15.4 °C (SD 0.8).

The SLGO-95 strain of *P. salmonis* (Smith, Vecchiola, Oyanedel, Garcés, Larenas & Contreras 1996) was used. Bacteria, after thawing, were cultured and titered, by end-point dilution assay, in the CHSE-214 cell line. Cells were cultured at 18 °C in Eagle's minimal essential medium with Earle's salts (MEM), which is autoclavable (MEM Auto-

Mod Sigma-Aldrich, KS, USA), supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% of foetal calf serum (both from Gibco, Life Technologies, CA, USA).

For the experimental challenge, four fish subgroups (A_1 , A_2 , B_1 and B_2) were exposed to *P. salmonis*, each one as an independent batch, by immersion for 15 min in a 50-mL bacterial suspension (in MEM) containing $\approx 10^5$ tissue culture infectious dose 50% per mL. After exposure, each subgroup was kept for 30 min in 1-L sterile MEM, although some fish were sampled within this period, and was then replaced in the 50-L tanks. Fish from subgroups A_1 and A_2 were used to record clinical signs, mortalities and gross and histological lesions (standard haematoxylin and eosin) for 30 days after the immersion challenge, as a bacterial virulence control. Methanol-fixed smears from the kidneys of dead fish were obtained for Gram staining and also for labelling to detect *P. salmonis* by the indirect immunofluorescence test (IFAT) according to Lannan, Ewing & Fryer (1991). Two additional fish subgroups (C_1 and C_2) were included as non-infected controls. Excepting that these fish were sham-exposed, they were treated as subgroups A_1 and A_2 . All these immersion procedures were carried out under permanent aeration at 16.5 (+/- 0.5) °C.

Fish of subgroups B_1 and B_2 were sequentially sampled. Three fish were euthanized by anaesthetic overdose (Tricaine Sigma-Aldrich, MO, USA) at each of the following post-exposure (*post-exp*) times counted from the start of the immersion with *P. salmonis*: 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 18 h and 3 days. Fish were formalin fixed and processed by standard histological methods. Five- μ m sagittal sections of the whole body, excepting the tail, were examined, using an immunoperoxidase test to detect *P. salmonis* in the tissues.

No mortalities or clinical signs occurred in the mock-treated fish (subgroups C_1 and C_2). In exposed fish (subgroups A_1 and A_2), cumulative mortalities reached 91.7% at day 23 *post-exp* (Fig. 1), indicating that fry were very susceptible to this *P. salmonis* strain.

Clinical signs of diseased fish were anorexia, skin darkness, lethargy and, usually when near to death, uncoordinated swimming behaviour close to the water surface. Gross pathology was characterized by pale gills, petechiae in the wall muscles of the coelomic cavity and liver, spleen and kidney enlargement and mucohaemorrhagic content in the large bowel. Histopathology showed haemorrhagic and necrotic foci mostly in haemopoietic kidney, liver, spleen and intestine. These tissues also exhibited perivascular and endothelial necrosis with associated thrombi. Examination of kidney smears, stained with Gram or labelled with IFAT, showed organisms with the characteristic morphology widely described for *P. salmonis* (Fryer, Lannan, Garcés, Larenas & Smith 1990; Lannan *et al.* 1991; Fryer & Hedrick 2003; Arkush & Bartholomew 2011). The clinical and pathological findings were consistent with those associated with acute piscirickettsiosis in salmonid fish in the field (Branson & Nieto Díaz-Muñoz 1991) or under experimental conditions (Garcés, Larenas, Smith, Sandino, Fryer & Lannan 1991; Smith, Contreras, Garcés, Larenas, Oyanedel, Caswell-Reno & Fryer 1996). This immersion-bath method allowed the experimental reproduction of piscirickettsiosis, which could thus be used as a model to develop challenging tests mimicking the natural way of fish exposure. Appropriate challenging methods are required to test vaccines and therapeutic drugs against fish pathogens in a reliable way (Adams, Leschen, Wilson & Horne 1987).

The outcome of the sequential tissue sample examination is shown in Table 1. In summary, the time-course of events, considering the first *post-exp* time that *P. salmonis* was detected in a particular tissue, was as follows: at 5 min it was found attached to the surface of the external epithelial cell layer of the skin and gills; from 15 to 30 min it was detected within the epithelial layer of skin, gills, oesophagus, pyloric caeca and intestine; from 3 to 6 h it was present in the wall muscle layers of oesophagus and stomach and in

skin dermis, and from 18 h onward it was evidenced in the lumen of blood vessels and virtually in all the fish organs.

Hence, these results show that there was a relatively steady progression of the bacterial invasion at early stages from skin, respiratory and digestive epithelia to deeper tissues, followed by a rapid spread to probably all the irrigated tissues of the fish body, once the micro-organism reached the blood stream. As already mentioned, the bacterium was found attached to the epithelial cells as early as 5 min *post-exp* (Fig. 2a), which is consistent with the results obtained in an *in vitro* infectivity study of *P. salmonis* in CHSE-214 cells (Smith, Reveco, Contreras, Rojas, Venegas & Guajardo 2010). An efficient attachment ability is expected in successful aquatic pathogens because without it these organisms would run the risk of being washed off the host or being voided from the host's gastrointestinal tract (Evelyn 1996). The mechanisms and/or structures used by *P. salmonis* for attachment to the epithelial cells are unknown, although the membrane extensions that are reported to allow the anchorage of this bacterium to the ova chorion (Larenas, Bartholomew, Troncoso, Fernández, Ledezma, Sandoval, Vera, Contreras & Smith 2003) may have occurred with a similar function in the present study.

The invasion kinetics from the attachment time to the moment when the blood stream was reached by this bacterium was too rapid to be explained only by cell to cell contiguity spreading. In this respect, although the multiplication rate of *P. salmonis* might be higher *in vivo* than *in vitro*, at least in an axenic culture medium, the generation time of *P. salmonis* (\approx 12 h) is relatively slow (Vera, Isla, Cuevas & Figueroa 2012) and the time it takes *in vitro* to be incorporated into the cytoplasm after cell exposure is 1 h in rainbow trout kidney macrophages (McCarthy, Bron, Brown, Pourahmad, Bricknell, Thompson, Adams & Ellis 2008) and is 3 to 6 h in CHSE-214 cells (Smith *et al.* 2010). The

mechanisms that *P. salmonis* uses to invade fish tissues *in vivo* are unknown, but the outer membrane lipopolysaccharides (Vadovič, Fodorová & Toman 2007; Vinogradov, Frimmelova & Toman 2013) and the recently described exotoxins (Rojas, Galleguillos, Díaz, Machuca, Carbonero & Smith 2013) of this bacterium might play a role in this phenomenon.

In the digestive tube walls, attachment and invasion were earlier in the epithelial layers of the anterior than in the posterior segments of this tract (Table 1), which probably reflects the normal way of transit of the digestive content in the alimentary canal. It is relevant to note that the oesophagus wall was invaded by *P. salmonis* (Table 1), including the muscularis externa layer (image not shown). This site of bacterial entry has not been described in previous infectivity studies of this pathogen in salmonid fish (Almendras, Fuentealba, Jones, Markham & Spangler 1997; Smith, Pizarro, Ojeda, Contreras, Oyanedel & Larenas 1999; Smith, Rojas, Guajardo, Contreras, Morales & Larenas 2004) and neither has it been reported among the usual routes of entry of fish pathogens in general (Evelyn, 1996; Birkbeck & Ringø 2005). Nevertheless, the infectious haematopoietic necrosis virus also uses the oesophagus as an entrance site in rainbow trout fry (Drolet, Rohovec & Leong 1994; Helmick, Bailey, La Patra & Ristow 1995), which suggests that this section of the digestive tract might be a more common entry portal for fish infectious agents than what has been reported to date.

Piscirickettsiosis is almost exclusively a sea-water disease (Fryer *et al.* 1990; Muel & Miller 2002; Arkush & Bartholomew 2011) and given the fact that fish in this environment drink large volumes of water (Edwards & Marshall 2013), in which *P. salmonis* can be suspended (Lannan & Fryer 1994; Olivares & Marshall 2010), it is

possible that the gut epithelium, especially that of the oesophagus and intestine, plays a role as an attachment point and subsequent route of entry of *P. salmonis* in natural conditions.

Although the bacterium was also found attached to the gastric epithelial lining (Fig. 2b and Table 1) and inside the wall muscle of the stomach (Table 1), it was clearly present in lower amounts than in the oesophagus and intestine (Table 1). It therefore appears that the stomach wall might be a potential entry portal for *P. salmonis*, at least in rainbow trout fry, although probably less efficient than other segments of the digestive tract. In a previous work to assess the routes of entry of *P. salmonis* in juvenile rainbow trout (Smith *et al.* 1999), fish were exposed by patch contact in skin and gills and by intubation in stomach and intestine. Cumulative mortalities were 52, 24, and 2 and 24 %, respectively. These results are consistent with those obtained here with respect to skin and gills as important entry portals and the gastric environment as a probable hostile medium, although not 100% lethal, to *P. salmonis*.

A final consideration about the gut infectivity results is that the bacterium reappeared in the intestine epithelium at advanced stages of infection (Table 1), which is consistent with the severe enteritis found in fish having piscirickettsiosis in the field (Branson & Nieto Díaz-Muñoz 1991) and in the exposed rainbow trout fry here.

In addition to the variety of cell types that *P. salmonis* has already been described to infect, the bacterium in this study was also found in the cytoplasm of goblet cells of the skin epidermis (Fig. 2c), which occurred from 15 min to 6 h *post exp*, and in skeletal muscular cells in more advanced stages of infection, from 18 h *post exp* (Fig. 2d and Table 1). The role of the goblet cells in the establishment of *P. salmonis* infection is unknown, but during differentiation these cells migrate to the superficial epithelial layers and remain there (Roberts & Ellis 2001; Janice & Khan 2013); it could therefore be hypothesised that they

do not aid movement of the bacterium into deeper tissues and probably have a defensive function instead. It has been well documented that goblet cell mucus is an important component of non-specific immunity against infectious agents in a wide variety of vertebrates including teleost fish (Ellis 2001; Janice & Khan 2013). However, it should also be taken into account that fish mucus can be beneficial to some pathogens either as a source of nutrients and/or chemoattractants, as it occurs with *Vibrio* (at present, *Aliivibrio*) *anguillarum* (Garcia, Otto, Kjelleberg & Nelson 1997; O'Toole, Lundberg, Fredriksson, Jansson, Nilsson & Wolf-Watz 1999).

Non-specific and specific immunity is developed to a large extent in salmonid fry of even smaller size (weight) than those of 2.5 g used here (Tatner 1996; Gadan, Sandtrø, Marjara, Santi, Munang'andu & Evensen 2013), but fully mature immunocompetence is obtained at later ontogenic stages, which in rainbow trout occurs in fish weighing over 4 g (Johnson, Flynn & Amend 1982). Due to this ontogenic variation in the immune response, together with other physiological changes, it is not possible to directly infer the results obtained here in fry to post-smolts or adult fish, in which the disease normally occurs.

In summary, infectivity of *P. salmonis* in rainbow trout fry would comprise three major stages: 1) a rapid attachment to epithelial cells mainly of skin and gills, but also of the alimentary canal; 2) a progressive invasion from the sites of entry to deeper underlying tissues until reaching the bloodstream and; 3) a rapid haematogenous spread to virtually all body tissues. It is evident that *P. salmonis* is very successful in systemically infecting its hosts, but the mechanisms this bacterium uses to breach, circumvent, or use to its advantage the many physical (starting from the mucus), anatomical and immunological barriers that healthy fish possess to avoid invasion by pathogenic micro-organisms are elusive and

intriguing so far. Therefore further research is necessary to reveal the pathogenesis, specially at a cellular and molecular level, of this significant fish disease.

Acknowledgements

This work was supported by Grant Fondecyt (Chile) 1010544.

References

Adams A., Leschen W., Wilson A. & Horne M.T. (1987) A bath challenge model for furunculosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **10**, 495–504.

Almendras F.E., Fuentealba I.C., Jones S.R.M., Markham F. & Spangler E. (1997) Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **20**, 409–418.

Arkush K.D. & Bartholomew J.L. (2011) *Piscirickettsia*, *Francisella* and Epitheliocystis. In: *Fish Diseases and Disorders. Volume 3 Viral, Bacterial and Fungal Infections* (ed. by P.T.K Woo & D.W. Bruno). 2nd edn, pp. 302–337. CAB International, Wallingford, U.K.

Birkbeck T.H. & Ringø E. (2005) Pathogenesis and the Gastrointestinal Tract of Growing Fish. In: *Microbial Ecology in Growing Animals. Biology of Growing Animals Series* (ed. by W.H. Holzapfel & P.J. Naughton). pp. 208–234. Elsevier, Edinburgh, U.K.

Branson E.J. & Nieto Díaz-Muñoz D. (1991) Description for a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *Journal of Fish Diseases* **14**, 147–156.

Drolet B.S., Rohovec J.S. & Leong J.A. (1994) The route of entry and progression of infectious haematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a sequential immunohistochemical study. *Journal of Fish Diseases* **17**, 337–347.

Edwards S.L. & Marshall W.S. (2013) Principles and Patterns of Osmoregulation and Euryhalinity in Fishes. In: *Euryhaline Fishes* (ed. by S.D. McCormick, A.P. Farrel & C.J. Brauner). pp. 1–45. Academic Press, Boston, USA.

Ellis A.E. (2001) The Immunology of Teleosts. In: *Fish Pathology* (ed by R.J. Roberts). pp. 133–150. W.B. Saunders, London, U.K.

Evelyn T.P.T. (1996) Infection and Disease. In: *The Fish Immune System. Organism, Pathogen, and Environment* (ed. by G. Iwawa & T. Nakanisi). pp. 339–366. Academic Press, San Diego, USA.

Fryer J.L., Lannan C.N., Garcés L.H., Larenas J.J. & Smith P.A. (1990) Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathology* **25**, 107–114.

Fryer J.L. & Hedrick R.P. (2003) *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases* **26**, 251–262.

Gadan K., Sandtrø A., Marjara I.S., Santi N., Munang'andu H.M. & Evensen Ø. (2013) Stress-induced reversion to virulence of infectious pancreatic necrosis virus in naïve fry of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS ONE* **8**, e54656. doi:10.1371/journal.pone.0054656

Garcés L.H., Larenas J.J., Smith P.A., Sandino S., Fryer J.L. & Lannan C.N. (1991) Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Diseases of Aquatic Organisms* **11**, 93–97.

Garcia T., Otto K., Kjelleberg S. & Nelson D.R. (1997) Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1034–1039.

Helmick C.M., Bailey J.F., La Patra S. & Ristow S. (1995) The esophagus/cardiac stomach region: site of attachment and internalization of infectious hematopoietic necrosis virus in challenged juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and coho salmon *O. kisutch*. *Diseases of Aquatic Organisms* **23**, 189–199.

Janice J.K. & Khan W.I. (2013) Goblet cells and mucins: role in innate defense in enteric infections. *Pathogens* **2**, 55–70; doi:10.3390/pathogens2010055.

Johnson K.A., Flynn J.K. & Amend D.F. (1982) Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. *Journal of Fish Diseases* **5**, 207–213.

Lannan C.N., Ewing S.A. & Fryer J.L. (1991) A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. *Journal of Aquatic Animal Health* **3**, 229–234.

Lannan C.N. & Fryer J.L. (1994) Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of Fish Diseases* **17**, 545–548.

Larenas J.J., Bartholomew J., Troncoso O., Fernández S., Ledezma H., Sandoval N., Vera P., Contreras J. & Smith P. (2003) Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**, 25–30.

McCarthy U.M., Bron J.E., Brown L., Pourahmad F., Bricknell I.R., Thompson K.D., Adams A. & Ellis A.E. (2008) Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head macrophages. *Fish and Shellfish Immunology* **25**, 477–484.

Mauel M.J. & Miller D.L. (2002) Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: A review. *Veterinary Microbiology* **87**, 279–289.

Olivares J. & Marshall S.H. (2010) Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. *Journal of Fish Diseases* **33**, 261–266.

O'Toole R., Lundberg S., Fredriksson S., Jansson A., Nilsson B. & Wolf-Watz H. (1999) The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *Journal of Bacteriology* **181**, 4308–4317.

Roberts R.J. & Ellis A.E. (2001) The Anatomy and Physiology of Teleosts. In: *Fish Pathology* (ed by R.J. Roberts). pp. 12–54. W.B. Saunders, London, U.K.

Rojas M.E., Galleguillos M., Díaz S., Machuca A., Carbonero A. & Smith P.A. (2013) Evidence of exotoxin secretion of *Piscirickettsia salmonis*, the causative agent of piscirickettsiosis. *Journal of Fish Diseases* **36**, 703–709.

Smith P.A., Contreras J.R., Garcés L.H., Larenas J.J., Oyanedel S., Caswell-Reno P. & Fryer J.L. (1996) Experimental challenge of coho salmon and rainbow trout with *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of Aquatic Animal Health* **8**, 130–134.

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

Smith P.A., Reveco F., Contreras J., Rojas M.E., Venegas C. & Guajardo A. (2010) Infectivity study of *Piscirickettsia salmonis* in CHSE-214 cells by confocal and transmission electron microscopy. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **30**, 128–136.

Smith P.A., Rojas M.E., Guajardo A., Contreras J., Morales M.A. & Larenas J. (2004) Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **61**, 53–57.

Smith P.A., Vecchiola I.M., Oyanedel S., Garcés L.H., Larenas J. & Contreras J. (1996) Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **16**, 164–168.

Tatner M.F. (1996) Natural Changes in the Immune System of Fish. In: *The Fish Immune System. Organism, Pathogen, and Environment* (ed. by G. Iwawa & T. Nakanisi). pp. 225–287. Academic Press, San Diego, USA.

Vadovič P., Fodorová M. & Toman R. (2007) Structural features of lipid A of *Piscirickettsia salmonis*, the etiological agent of the salmonid rickettsial septicemia. *Acta Virologica* **51**, 249–259.

Vera T., Isla A., Cuevas A. & Figueroa J. (2012) A new liquid medium for the pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Archivos de Medicina Veterinaria* **44**, 273–277.

Vinogradov E., Frimmelova M. & Toman R. (2013) Chemical structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Piscirickettsia salmonis*. *Carbohydrate Research* **378**, 108–113.

Figures and Tables

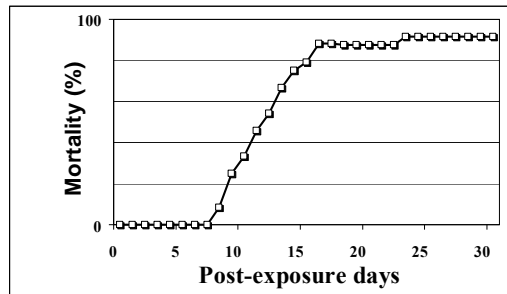


Figure 1 Cumulative mortality (%) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry exposed to *Piscirickettsia salmonis* via an immersion bath.

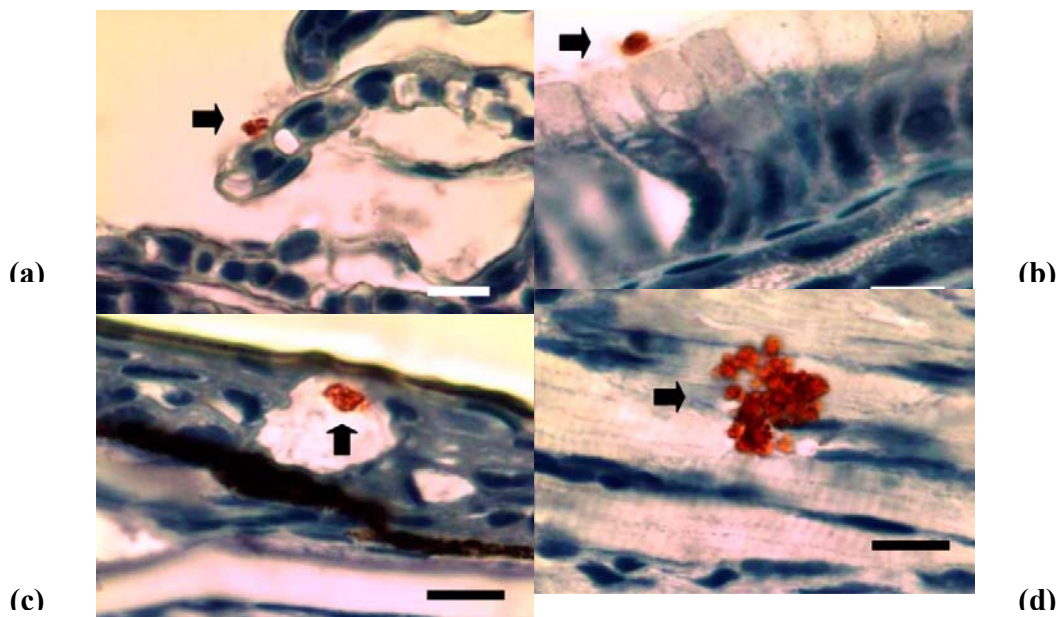


Figure 2 Immunoperoxidase test. Tissue sections of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry exposed by an immersion bath with *Piscirickettsia salmonis* (*P.s.*) at different post-exposure (*post-exp*) times counted from the moment of the initiation of the exposure. *P.s.* presence is indicated by black arrows. (a) *P.s.* on gill epithelial surface at 5 min *post-exp*. (b) *P.s.* on the surface of columnar epithelial cell of the gastric mucosa at 30 min *post-exp*. (c) *P.s.* inside a goblet cell cytoplasm at 1 h *post-exp*. (d) *P.s.* cluster in skeletal muscle at 3 days *post-exp*. Bars $\approx 10 \mu\text{m}$. 1,000x.

Table 1 Time-course detection of *Piscirickettsia salmonis* by immunoperoxidase in selected tissues obtained from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to this bacterium by an immersion bath¹

Tissue	Post-exposure time							
	5 min	15 min	30 min	1 h	3 h	6 h	18 h	72 h
Gills								
Epithelium surface	3	3	2	3	1	0	0	0
Epithelium	0	0	1	1	3	2	2	2
Skin								
Epithelium surface	3	3	2	2	1	0	0	0
Epidermis	0	1	1	2	2	2	1	0
Dermis	0	0	0	0	0	1	1	1
Subcutaneous tissue	0	0	0	0	0	0	1	0
Oesophagus								
Epithelium	0	3	2	2	1	0	0	0
Muscle layers	0	0	0	0	1	2	3	3
Stomach								
Epithelium surface	0	0	1	0	0	0	0	0
Muscle layers	0	0	0	0	1	0	1	0
Pyloric caeca								
Epithelium surface	0	0	1	0	1	0	0	0
Epithelium	0	0	1	0	2	1	0	0
Intestine								
Epithelium surface	0	0	1	1	1	0	0	0
Epithelium	0	0	2	1	3	2	0	1
Muscle layers	0	0	0	0	0	0	0	1
Liver	0	0	0	0	0	0	3	3
Spleen	0	0	0	0	0	0	2	3
Skeletal muscle	0	0	0	0	0	0	3	3
Kidney	0	0	0	0	0	0	3	3
Cardiac muscle	0	0	0	0	0	0	3	3
Blood	0	0	0	0	0	0	3	3
Brain	0	0	0	0	0	0	1	1
Spinal cord	0	0	0	0	0	0	1	1

¹Figures show the number of fish in which *P. salmonis* was detected in a particular tissue. The tissues were obtained from three fish at each sampling time.

Artículo 3.1. (Objetivo 3) J. Fish Dis.36:703-709. 2013.

Title Page:

Full title: “Evidence of exotoxin secretion of *Piscirickettsia salmonis*, the causative agent of piscirickettsiosis”

Correspondence: P. A. Smith, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, University of Chile, Santa Rosa 11735, Santiago, Chile

e-mail: psmith@uchile.cl

Short running title: “*Piscirickettsia salmonis* exotoxin secretion”

**Evidence of exotoxin secretion of *Piscirickettsia salmonis*, the causative agent of
piscirickettsiosis**

M.E. Rojas¹, M. Galleguillos², S. Díaz¹, A. Machuca¹, A. Carbonero³ and P. A. Smith¹

¹ Department of Animal Pathology. Faculty of Veterinary Sciences. University of Chile, Santiago, Chile.

² Department of Animal Biological Sciences, Faculty of Veterinary Sciences. University of Chile, Santiago, Chile.

³ Department of Animal Health, University of Córdoba, Spain.

Abstract

Piscirickettsia salmonis is the etiological agent of piscirickettsiosis, a disease which affects a variety of teleost species and that is particularly severe in salmonid fish. Bacterial-free supernatants, obtained from cultures of three isolates of *Piscirickettsia salmonis*, were inoculated in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) and in three continuous cell lines searching for evidences of the secretion of extracellular products (ECPs) by this micro-organism. Although steatosis was found in some liver samples, no mortalities or clinical signs occurred in the inoculated fish. Clear cytotoxicity was observed after inoculation in the cell lines CHSE-214 and ASK, derived from salmonid tissues, but not in MDBK, which has a mammal origen. The degree of cytotoxicity of the ECPs was different among the *P. salmonis* isolates tested. The isolate that evidenced the highest cytotoxicity in its ECPs exhibited only an intermediate virulence level after challenging fish with bacterial suspensions of the three *P. salmonis* isolates. Almost complete inhibition of the cytotoxic

activity of ECPs was seen after proteinase K treatment, indicating their peptidic nature, and a total preclusion of the cytotoxicity was shown after their incubation at 50 °C for 30 min. Results show that *P. salmonis* can produce ECPs and at least some of them are thermolabile exotoxins that probably play a role in the pathogenesis of piscirickettsiosis.

Keywords: *Piscirickettsia salmonis*, pathogenicity, exotoxins, salmon, virulence.

Introduction

At present, a number of fastidious gram negative bacteria which replicates intracellularly in their hosts, either obligated or in a facultative mode (Mauel, Ware & Smith 2008), are associated as causative agents of important diseases in aquatic animals including mollusks, crustaceans and teleost fishes. This emergent group of pathogens has been named loosely as rickettsia-like organisms and/or *Piscirickettsia*-like organisms (Mauel & Miller 2002). Within this bacterial group, *Piscirickettsia salmonis* was the first microorganism that was confirmed as a highly virulent pathogen, being the etiological agent of piscirickettsiosis, a devastating disease in salmonid fish (Fryer & Hedrick 2003). A significant number of studies on this bacterium have allowed to get important advances such as obtaining a more accurate taxonomic classification and to understand, at least partially, the immune response against it and the routes of entrance in its hosts (Fryer, Lannan, Giovannoni & Wood 1992; Smith, Pizarro, Ojeda, Contreras, Oyanedel & Larenas 1999; Marshall, Conejeros, Zahr, Olivares, Gómez, Cataldo & Henríquez 2007). Nevertheless, the virulence factors of this pathogen are poorly known. In this work, it was explored if *P. salmonis* is able of exporting extracellular products (ECPs) through their possible biological effects either *in vitro* in fish cell lines and/or *in vivo* in salmonid fish.

Material and Methods

Fish. In total, 560 Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) pre-smolts, held in fiberglass tanks supplied with a flow-through system of fresh water, were used. Some fish (n=400) were employed for testing the virulence of the *P. salmonis* isolates and the remaining ones, to test the effect of bacteria-free supernatants.

Cells. Monolayers of the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum) embryo CHSE-214 (Lannan, Winton & Fryer 1984), Atlantic salmon kidney ASK (Devold, Krossoy, Aspehaug & Nylund 2000) and Madin-Darby bovine (*Bos taurus* L.) kidney MDBK (Madin & Darby 1958) cell lines were used. All of them were grown in absence of antibiotics and antimycotics. Salmonid cells (CHSE-214 and ASK) were incubated at 17 °C and mammal cells (MDBK), unless explained, at 37 °C. The CHSE-214 and MDBK cells were cultured using Eagle's minimal essential medium with Earle's salts (Auto-mod, Sigma, MO) added with L-glutamine (EMEM) and with 10% of foetal calf serum (EMEM-10). The ASK cells were grown using L-15 Leibovitz medium with L-glutamine supplemented with β -mercaptoethanol and with 10% of foetal calf serum (all of them from Gibco, CA).

Bacteria. Three isolates of *P. salmonis*, named *Ps-1*, *Ps-2* and *Ps-3*, obtained from rainbow trout (*O. mykiss* Walbaum), Atlantic salmon and coho salmon (*O. kisutch* Walbaum), respectively, were used in this study. Bacteria were isolated from fish suffering piscirickettsiosis outbreaks from three different sea sites in the south of Chile. After the primary isolation, bacteria were preserved at -196°C in liquid nitrogen until used. They were cultured in all the experiments in monolayers of the CHSE-214 cell line and incubated

at 17 °C. Bacterial titration was carried out using the end-point dilution method (Reed & Muench 1938) in 96 well microplates.

Virulence test of *P. salmonis* isolates. Ten experimental groups, with 40 fish each, were used. Fish were distributed equally in two 2.5 m³ tanks, each having 200 tagged animals in total, with 20 fish per experimental group. Fish were inoculated with three different doses (10³, 10⁴ and 10⁵ TCID₅₀ fish⁻¹) of each isolate. Bacterial suspensions were intraperitoneally (*ip*) injected (0.1 mL per individual) in fish of the two tanks (*i.e.* 40 fish per dose of each isolate). Forty sham-inoculated fish (20 individuals per tank), injected *ip* with 0.1 mL of a sterile suspension of CHSE-214 cells, were used as control of the assay. Mortalities were recorded up to 46 post-inoculation (*p.i.*) days. Dead fish were examined by necropsy. Besides, kidney smears, fixed in absolute methanol, were gram stained and also analysed by an indirect immunofluorescence test (IFAT) (Lannan, Ewing & Fryer 1991) to confirm the presence of *P. salmonis* in these tissues.

Toxicity test in fish of *P. salmonis*-free supernatants (*Ps*-fs). Four experimental groups with 40 fish each were used. Fish of three groups were injected *ip* with 0.1 mL of a *Ps*-fs obtained from isolates *Ps*-1, *Ps*-2 and *Ps*-3, respectively. The fish belonging to the remaining group were sham-inoculated. Fish of each group were allotted equally in two 100 L tanks (8 tanks in total). *Piscirickettsia salmonis*-free supernatants were obtained from supernatants of CHSE-214 cells infected with *P. salmonis* and harvested when cytopathic effect reached approximately 100%. Those supernatants were centrifuged twice at 5°C. First centrifugation was at 1,000 x g for 15 min. The pellet was discarded and then the supernatant centrifuged at 10,000 x g for 1h. The pellet was again discarded and finally the supernatant was filtered through a membrane of mixed cellulose ester (DISMIC-25AS, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) with 0.2 µm size pores. The experiment lasted 47 *p.i.* days.

At the end of the assay, three fish per group were euthanised by anesthetic overdose (Benzocaine at 200 mg/L) to obtain tissue samples (gills, heart, kidney, liver and spleen) for histological examination.

Cytotoxicity test of *Ps*-fs in CHSE-214, ASK and MDBK cell cultures. Fresh monolayers of cells grown in 25 cm² flasks were inoculated in duplicated with 1 mL of individual *Ps*-fs obtained from the isolates *Ps*-1, *Ps*-2 and *Ps*-3. Inoculated cells were observed daily until day 25 *p.i.* under inverted optical microscope and their morphology was compared with sham-inoculated cell monolayers. CHSE-214 and ASK cells were always incubated at 17 °C while MDBK cells were incubated in two different temperature regimes: at 37 °C during all the assay or at 17 °C for 7 days after the inoculation time and then at 37 °C until the end of the experiment at day 25 *p.i.*

Titration of *Ps*-fs cytotoxicity and effect of temperature and proteinase K on its cytotoxic ability in CHSE-214 cell cultures. Only the *Ps*-fs obtained from the *Ps*-3 isolate was tested. Unless otherwise explained, the incubations were at 17 °C and the general method described just above was used in these assays. For titration, ten-fold dilutions of *Ps*-fs were used. For the temperature test the *Ps*-fs were incubated at 50 °C and 60 °C for 30 min and then inoculated in cell monolayers. Proteinase K assay was carried out treating a *Ps*-fs with 3.5 µM of this enzyme (United States Biological, Swampscott, MA). After a 48 h incubation period, the enzymatic reaction was stopped adding AEBS (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Sigma, St. Louis, MO) at 0.5 mM. Solutions were inoculated in cell cultures 40 min after AEBS addition. Besides, the following solutions were used as controls of this assay: *a*) *Ps*-fs obtained from *Ps*-3 isolate; *b*) EMEM-10 with proteinase K (3.5 µM); *c*) EMEM-10 with proteinase K (3.5 µM) and

AEBS (0.5 mM); *d*) EMEM-10 with AEBS (0.5 mM) and *e*) EMEM-10. After an incubation period of 48 h, solutions *a*, *b* and *e* were directly inoculated in cells. In solutions *c* and *d* the AEBS was added after the incubation of 48 h and 40 min later they were inoculated in the cell monolayers.

Results

Virulence of *P. salmonis* isolates. Disease was reproduced with the three isolates inoculated. Sick fish showed clinical signs of piscirickettsiosis and dead fish exhibited gross pathology consistent with this disease. Examination of kidney smears of dead fish by IFAT showed the presence of *P. salmonis* in these tissues. No clinical signs or mortality occurred in the mocked-inoculated fish. Total cumulative mortalities of salmon inoculated with doses 10^3 , 10^4 and 10^5 TCID₅₀ fish⁻¹ were, respectively, 82.5%, 100% and 100% for isolate *Ps-1*; 50%, 67.5% and 87.5% for isolate *Ps-2* and finally, 65%, 77.5% and 100% for isolate *Ps-3*. Within each of these doses there were significant differences in survivability among fish groups (Log rank test $p \leq 0.05$). The order of the isolates, depending on the survivability they caused in the inoculated fish, was $Ps-2 > Ps-3 > Ps-1$ (Fig. 1).

***Ps-fs* toxicity in fish.** No diseased fish or mortalities were observed throughout the assay. Histopathology showed lesions in the liver of the fish inoculated with the *Ps-3* isolate characterised by severe steatosis and focal necrosis. Livers of fish inoculated with isolates *Ps-1* and *Ps-2* had moderate steatosis, but same findings were observed in sham-inoculated fish.

Cytotoxicity test of *Ps-fs* in cell cultures. Monolayers of CHSE-214 cells inoculated with *Ps-fs* of each of the three isolates showed morphological abnormalities compared with the

sham-inoculated cells. The most dramatic and fastest changes occurred in the cells inoculated with a *Ps*-fs prepared from the isolate *Ps*-3, which exhibited from day 4 *p.i.* foci of rounded refringent cells with morphology resembling cells infected with whole *P. salmonis*. In addition, boundaries between cells were conspicuous and some cells showed pleomorphism, hypertrophy and cytoplasm vacuolation (Fig. 2). Cytotoxicity progressed with time reaching about 80% of the monolayer at day 15 *p.i.*. Cells exposed with *Ps*-fs of isolates *Ps*-1 and *Ps*-2 also showed cytotoxicity, but the morphological changes appeared later (at day 10 *p.i.*), with only about 50% of the monolayer being affected at day 25 *p.i.*. A similar pattern, but milder cytotoxic effect, was observed in ASK cells. No evidence of cytotoxicity was observed in MDBK cells either when they were always incubated at 37 °C or when they were held for 7 days after inoculation at 17 °C and then at 37 °C.

Titration. *Ps*-fs of the isolate *Ps*-3 in CHSE-214 showed cytotoxic effect up to dilution 10^{-2} .

Temperature effect. No cytotoxic effect was caused by *Ps*-fs after these were subjected to either 50 or 60 °C for 30 min.

Proteinase K. The cytotoxic effect of the *Ps*-fs treated with proteinase K was completely inhibited until day 18 *p.i.*, but from day 19 to 25 *p.i.* the intercellular boundaries were more distinctly, although subtly, observed. As expected, cells inoculated with solution *a*, from day 4 *p.i.* exhibited a clear cytotoxic effect. Addition of AEBS did not cause cytotoxicity (solution *d*) and suppressed the proteinase K effect on cells (solution *c*).

Discussion

Bacterial pathogens contain genes that code for virulence factors which in turn allow these organisms to infect and frequently cause disease in their hosts (Mims, Nash & Stevens 2000; Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts & Walter 2008). To succeed as infectious agent, pathogenic bacteria must colonize their host, reach an appropriate niche, avoid host defenses, replicate, exit from the invaded eucaryote and be transmitted to a new susceptible host (Mims *et al.* 2000; Gyles & Prescott 2010). In spite of these basic steps of all bacterial infections, the specific mechanisms and virulence factors that pathogens use to cause disease in their hosts are as diverse as these microorganisms themselves (Alberts *et al.* 2008).

There are no published works related to ECPs of *P. salmonis* and their pathogenic function but there is some information about other possible virulence mechanisms of this bacterium. Surface projections that would allow the attachment of *P. salmonis* to the chorion of the salmonid ova have been observed by scanning electron microscopy (Larenas, Troncoso, Ledezma, Fernández, Sandoval, Vera, Contreras & Smith 2003). Generation of antibiotic resistance of *P. salmonis* has been reported (Smith, Vecchiola, Oyanedel, Garcés, Larenas & Contreras 1996), although the molecular mechanisms which would explain this phenomenon are unknown. The ability of *P. salmonis* to survive and replicate in the cytoplasm of macrophages has been documented (McCarthy, Bron, Brown, Pourahmad, Bricknell, Thompson, Adams & Ellis 2008). A similar pathogenic strategy is also used for other intracellular pathogens (Alberts *et al.* 2008). Besides macrophages, also *P. salmonis* invades a variety of cells that are normally non-phagocytic (Branson & Nieto Díaz-Muñoz 1991; Cvitanich, Gárate & Smith 1991). Therefore, it is likely that this bacterium induces

its own endocytosis by such cells. On the other hand, structural features of the predominant *P. salmonis* lipid A, representing the hexaacyl form, show a high degree of similarity with these classical forms of enterobacterial lipid A (Vadovič, Fodorová & Toman 2007). This finding suggests that the lipopolysaccharides (LPS) of this bacterium may have a strong endotoxic activity which could explain the cause of the disseminated intravascular coagulation described in cultured coho salmon infected with *P. salmonis* (Cvitanich *et al.* 1991). The transcriptomic response of Atlantic salmon experimentally inoculated with *P. salmonis* showed a downregulation of genes involved in the adaptive immune response, G protein signaling pathway and apoptotic process which may be reflective of virulence mechanisms used by this pathogen to survive, replicate and escape host defenses (Tacchi, Bron, Taggart, Secombes, Bickerdike, Adler, Takle & Martin 2011).

Results here in show that *P. salmonis* secretes ECPs and at least one of their components have cytotoxic effects *in vitro* and probably mediates some tissular damage *in vivo* in salmonid fish infected with this microorganism. The almost complete inhibition of the *in vitro* effect of the *P. salmonis* ECPs by proteinase K treatment indicates their peptidic nature and therefore they can be categorized as exotoxins. The slight residual cytotoxicity of ECPs may have been caused by an incomplete hydrolysis of proteins because of an insufficient incubation time and/or dose used of the proteinase K or, although unlikely, by the presence of some proteins resistant to that enzyme (Butler, Kotani, Kong, Frick, Evancho, Stanbridge & McGarrity 1991; Dabaghian, Zerr, Heinemann & Zanusso 2008). Another hypothetical explanation could be the action of LPS released to the culture medium (Brunson & Nicolson 1978).

The effect of these exotoxins seems to be selective depending on the target cells because any of the ECPs of the three *P. salmonis* isolates tested produced damage in

eucaryotic cells (MDBK) and all of them caused higher cytotoxicity in CHSE-214 compared with ASK cells. On the other hand, it appears that the quality and/or the quantity of the secreted ECPs may vary depending on the *P. salmonis* strain. This is supported by the fact that the degree of the cytotoxic effect of the ECPs in the fish cell lines was clearly different according to the isolate used to obtain these supernatants.

There was no clear association between the virulence degree of the isolates, measured through fish inoculation with bacterial suspensions, and the cytotoxic effect of their ECPs on cell monolayers. The isolate *Ps-3* showed only an intermediate virulence, compared with the other two isolates, but its ECPs had the highest cytotoxic effect on cell cultures. In turn, ECPs of the most virulent isolate (*i.e. Ps-1*) exhibited a lower cytotoxicity compared with those of the isolate *Ps-3*. These findings, along with the fact that the ECPs injection in fish did not reproduce the disease, suggest that there are other virulence factors besides the exotoxins evidenced here that are important in the pathogenicity of *P. salmonis* in salmonid fish.

The *in vitro* toxigenic potency of *P. salmonis* ECPs appears to be significant because they still cause cytotoxicity in cultured cells after a 10^{-2} dilution. Conversely, it seems that the *in vivo* potency of these exotoxins would be low because, as already mentioned, fish injected with undiluted ECPs did not show clinical signs of piscirickettsiosis. These last results, however, should be interpreted cautiously because the inoculation procedure used in this work, in terms of dose, administration via and/or other factors, may have not been adequate to evidence the pathogenic effect of these ECPs. Probably, *P. salmonis* secretes ECPs permanently while infecting their hosts, therefore a single dose, which was the method used here to inoculate the fish, may not replicate the effect produced in the natural course of the disease. Histopathology of fish, both sham-

inoculated and inoculated with ECPs of the three isolates, showed some level of liver steatosis, but the severity of such lesions were clearly higher in fish inoculated with ECPs of the isolate *Ps-3*. This finding is consistent with the highest cytotoxicity of ECPs *in vitro* shown by the *Ps-3* isolate, suggesting an association between the *in vitro* and *in vivo* effect of exotoxins of *P. salmonis*. Nevertheless, since the histopathology was carried out only in a reduced number of animals and, in addition, this was not a time-course study these results are not conclusive.

Although there are no publications referred to *P. salmonis* ECPs, many authors have reported their presence and significance as virulence factors in a number of other gram negative salmonid pathogens, including bacteria of the genera *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Moritella*, *Photobacterium*, *Tenacibaculum*, *Vibrio* (*Listonella*) and *Yersinia* (Austin & Austin 2007; Tobback, Decostere, Hermans, Haesebrouck & Chiers 2007; van Gelderen, Carson & Nowak 2009; Bjornsdottir, Gudmundsdottir & Gudmundsdottir 2011; Frans, Michiels, Bossier, Willems, Lievens & Rediers 2011). Bacteria belonging to the genera *Francisella* and *Coxiella* are phylogenetically related to *P. salmonis* and thus it is worth discussing, at least briefly, if their virulence mechanisms include the ability of secreting exotoxins. With respect to *Francisella tularensis*, the most conspicuous species of this genus, there is no consensus opinion on the synthesis of exotoxins, and genes encoding toxins have not been found in this species. Nevertheless, in *F. novicida*-like isolates, which are close relatives of *F. tularensis*, genes coding for putative RTX exotoxins have been recently found (Siddaramappa, Challacombe, Petersen, Pillai, Hogg & Kuske 2011). In the case of *Coxiella burnetii* no exotoxins have been described and LPS is indeed the only defined virulence factor (Gilk, Voth & Heinzen 2009). However, it should be noticed that *C. burnetii* isolates have genes encoding a type IV secretion system predicted to deliver to the

host cytosol effector proteins that mediate the formation of the parasitophorous vacuole, in which it replicates, and other cellular events (Voth, Beare, Howe, Sharma, Samoilis, Cockrell, Omsland & Heinzen 2011).

In summary, main conclusions of this work are that *P. salmonis* secretes ECPs which contain heat-labile exotoxins that produce a selective cytotoxicity *in vitro* depending on the type of targeted cell; the quality and/or quantity of the secreted exotoxins is heterogeneous among *P. salmonis* strains; and, finally, these exotoxins probably play a role in the piscirickettsiosis pathogenesis. It is important to know the virulence factors of pathogenic microorganisms for several practical reasons such as to develop vaccines, therapeutic and diagnostic methods and to discover epidemiological markers. As it is also widely known, toxoids have been successfully employed to prevent some important bacterial diseases in humans and domestic animals and therefore this is an obvious potential use of *P. salmonis* exotoxins. Although this work has provided some information about the virulence factors of *P. salmonis* it is evident that further knowledge is required to fully understand the mechanisms of pathogenicity of this bacterium. Identification and characterization of the *P. salmonis* exotoxins is one, among many, of the tasks that remain to be done and the use of genomic and proteomic tools should be very helpful to accomplish these objectives.

Acknowledgements

Authors would like to thank Mrs. D. Vega for its valuable technical help with cell cultures. This work was supported by Grant Fondecyt (Chile) 1080692.

References

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2008) Pathogens, infection, and innate immunity. In: *Molecular Biology of The Cell*, 5th edn. *Reference Edition*, pp. 1485-1537. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.

Austin B. & Austin D. (2007) Pathogenicity. In: *Bacterial Fish Pathogens*, 4th edn., pp. 283-321. Springer-Praxis, Chichester, U.K.

Bjornsdottir B., Gudmundsdottir T. & Gudmundsdottir B.K. (2011) Virulence properties of *Moritella viscosa* extracellular products. *Journal of Fish Diseases* **34**, 333-343.

Branson E.J. & Nieto Díaz-Muñoz D. (1991) Description for a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *Journal of Fish Diseases* **14**, 147-156.

Brunson K.W. & Nicolson G.L. (1978) Lipopolysaccharide effects on sensitive and resistant variant Chinese hamster ovary cell lines. *Journal of Supramolecular Structure* **9**, 231-242.

Butler G.H., Kotani H., Kong L., Frick M., Evancho S., Stanbridge E.J. & McGarrity G.J. (1991) Identification and characterization of proteinase K-resistant proteins in members of the class *Mollicutes*. *Infection and Immunity* **59**, 1037-1042.

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

Dabaghian R., Zerr I., Heinemann U. & Zanusso G. (2008) Detection of proteinase K resistant proteins in the urine of patients with Creutzfeldt-Jakob and other neurodegenerative diseases. *Prion* **2**, 170-178.

Devold M., Krossoy B., Aspehaug V. & Nylund A. (2000) Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Diseases of Aquatic Organisms* **40**, 9-18.

Frans I., Michiels C.W., Bossier P., Willems K.A., Lievens B. & Rediers H. (2011) *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases* **34**, 643-661.

Fryer J.L., Lannan C.N., Giovannoni S.J. & Wood N.D. (1992) *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 120-126.

Fryer J.L. & Hedrick R.P. (2003) *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases* **26**, 251-262.

Gilk S.D., Voth D.E. & Heinzen R.A. (2009) *Coxiella burnetii*. In: *Intracellular Niches of Microbes: A Pathogens Guide Through the Host Cell*. (ed. by U.E. Schaible & A. Haas) pp. 287-300. Wiley-VCH. Weinheim, Germany.

Gyles C.L. & Prescott J.F. (2010) Themes in bacterial pathogenic mechanisms. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (ed. by C.L. Gyles, J.F. Prescott, G. Songer & C.O. Thoen), 4th edn, pp. 3-8. Wiley-Blackwell, Iowa.

Lannan C.N., Ewing S.A. & Fryer J.L. (1991) A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. *Journal of Aquatic Animal Health* **3**, 229-234.

Lannan C.N., Winton J.R. & Fryer J.L. (1984) Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* **20**, 671-676.

Larenas J., Troncoso O., Ledezma H., Fernández S., Sandoval N., Vera P., Contreras, J. & Smith P. (2003) Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**, 25-30.

Madin S.H. & Darby N.B. (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **98**, 574-576.

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

Mauel M.J. & Miller D.L. (2002) Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. *Veterinary Microbiology* **7**, 279-289.

Mauel M.J., Ware C. & Smith P.A. (2008) Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**, 213-214.

McCarthy Ú.M., Bron J.E., Brown L., Pourahmad F., Bricknell I.R., Thompson K.D., Adams A. & Ellis A.E. (2008) Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish and Shellfish Immunology* **25**, 477-484.

Mims C., Nash A. & Stephen J. (2000) General principles. In: *Mims' Pathogenesis of Infectious Disease*, 5th edn, pp. 1-8. Academic Press, London, U.K.

Reed L. & Muench H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**, 493-497.

Siddaramappa S., Challacombe J.F., Petersen J.M., Pillai S., Hogg G. & Kuske C.R. (2011) Common ancestry and novel genetic traits of *Francisella novicida*-like isolates from North America and Australia as revealed by comparative genomic analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 5110-5122.

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

Smith P.A., Vecchiola I.M., Oyanedel S., Garcés L.H., Larenas J. & Contreras J. (1996) Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* **16**, 164-168.

Tacchi L., Bron J.E., Taggart J.B., Secombes C.J., Bickerdike R., Adler M.A., Takle H. & Martin S.A. (2011) Multiple tissue transcriptomic responses to *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Physiological Genomics* **43**, 1241-1254.

Tobback E., Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F. & Chiers K. (2007) *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* **30**, 257-268.

Vadovič P., Fodorová M. & Toman R. (2007) Structural features of lipid A of *Piscirickettsia salmonis*, the etiological agent of the salmonid rickettsial septicemia. *Acta Virologica* **51**, 249-259.

Van Gelderen R., Carson J. & Nowak B. (2009) Effect of extracellular products of *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **32**, 727-731.

Voth D.E., Beare P.A., Howe D., Sharma U.M., Samoilis G., Cockrell D.C., Omsland A. & Heinzen R.A. (2011) The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates. *Journal of Bacteriology* **193**, 1493-1503.

Figures

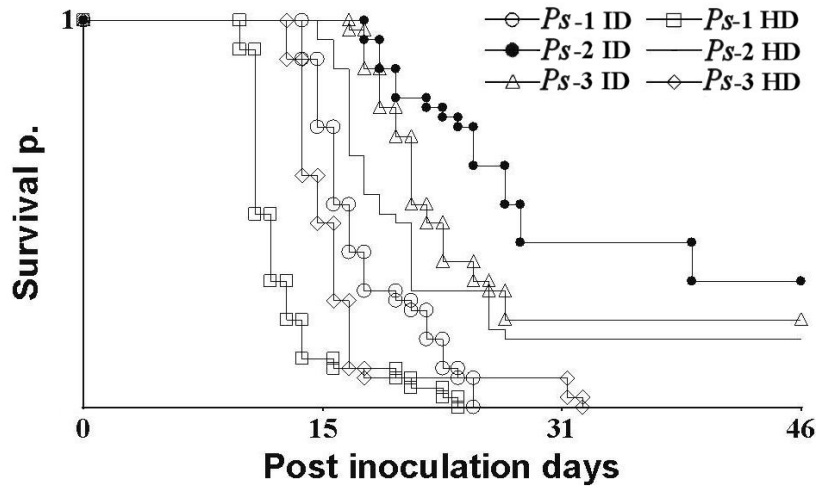


Figure 1 Survival curves of Atlantic salmon inoculated with high (HD) and intermediate (ID) doses of three *P. salmonis* isolates (*Ps-1*, *Ps-2* and *Ps-3*). Abbreviation p. means probability. HD and ID were 10^5 and 10^4 TCID₅₀ fish⁻¹, respectively.

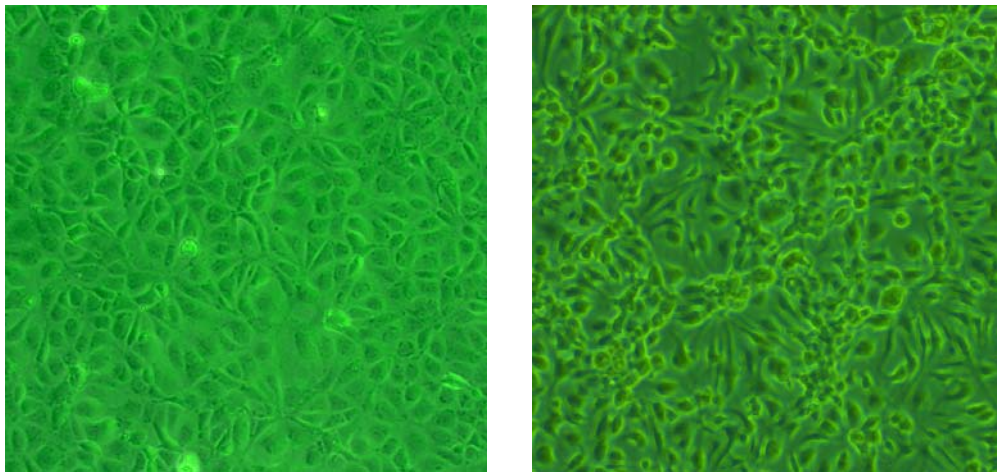


Figure 2 Monolayers of CHSE-214 cells. Right: uninoculated. Left: cytototoxic effect nine days after inoculation with extra cellular products of *Piscirickettsia salmonis* (isolate *Ps-3*). Phase contrast 100x.

CONCLUSIONES

1-Los eventos iniciales de la infectividad *in vitro* de *P. salmonis* en células CHSE-214, originadas de embrión de salmón chinook, involucrarían una etapa de adherencia rápida de la bacteria a la superficie de la membrana plasmática (≤ 5 min posinoculación) seguida de una penetración de ésta e incorporación al citoplasma celular, proceso que ocurre entre las 3 y las 6 h posinoculación.

2-Las células ASK, derivadas de riñón de salmón del Atlántico, son permisivas a la infección con *P. salmonis* donde esta bacteria es capaz de multiplicarse y generar un efecto citopático característico.

3-El proceso de infectividad *in vivo* de *P. salmonis* en alevines de trucha arcoíris comprendería tres etapas principales: (i) una fase de rápida adhesión a células epiteliales principalmente de piel y branquias, pero también del canal alimentario; (ii) una invasión progresiva desde los sitios de entrada hacia tejidos más profundos hasta alcanzar el torrente sanguíneo y; (iii) una rápida diseminación vía hematológica para alcanzar virtualmente todos los tejidos corporales.

4-*Piscirickettsia salmonis* puede secretar exotoxinas termolábiles, que tienen un efecto citotóxico selectivo según la célula blanco expuesta, y, que probablemente son parte de los factores de virulencia involucrados en la patogénesis de la piscirickettsiosis.