

# Coinfección por genogrupos LF-89 y EM-90 de *Piscirickettsia salmonis*: implicancias para la vigilancia y el control de la piscirickettsiosis

## Resumen

Actualmente, el programa oficial de vigilancia y control de la piscirickettsiosis en Chile se basa únicamente en la detección de *P. salmonis*, pero no a nivel de genogrupos (LF-89-like y EM-90-like). La vigilancia a nivel de genogrupo es esencial no sólo para definir y evaluar la estrategia de vacunación contra la enfermedad, sino que también es de suma importancia para el diagnóstico temprano, pronóstico clínico en campo, tratamiento y control de la enfermedad. El presente estudio demostró que la distribución espacio-temporal de los genogrupos LF-89 y EM-90 es muy variable dentro y entre centros de cultivo en mar. También se evidenció que la infección por *P. salmonis* es causada por ambos genogrupos a nivel de centro, peces y tejidos. La tasa de detección de *P. salmonis* LF-89-like aumentó significativamente entre 2017 y 2021 y fue el genogrupo más prevalente en la salmonicultura chilena durante este período. Por último presentamos una nueva estrategia para identificar genogrupos de *P. salmonis* basada en qPCR.

**M. Rozas-Serri<sup>1,\*</sup>, A. Peña<sup>1</sup>, I. Gardner<sup>2</sup>, E. Peñaloza<sup>1</sup>, L. Maldonado<sup>1</sup>, A. Muñoz<sup>1</sup>, F. Mardones<sup>3</sup>, R. Ildefonso<sup>3</sup>, C. Senn<sup>1</sup> y F. Aranis<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Pathovet Labs SpA, Puerto Montt, Chile

<sup>2</sup> Department of Health Management, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada

<sup>3</sup> Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

\*marco.rozas@pathovet.cl

## Introducción

La piscirickettsiosis (SRS) es causada por la bacteria intracelular facultativa Gram negativa *Piscirickettsia salmonis* (Fryer y col., 1992). La infección por *P. salmonis* se ha detectado en los principales países productores de salmón del mundo, pero es notablemente más prevalente en el salmón cultivado en Chile (Rozas y col., 2014).

Las estructuras genómicas y las relaciones filogenéticas soportan la existencia de los genogrupos LF-89 y EM-90 de *P. salmonis* (Otterlei y col., 2016; Nourdin-Galindo y col., 2017; Rozas-Serri y col., 2017; Saavedra y col., 2017; Aravena y col., 2020; Isla y col., 2021), los cuales están ampliamente distribuidos en la salmonicultura chilena (Rozas-Serri y col., 2018a; Rozas-Serri y col., 2018b; Rozas-Serri y col., 2019; Aravena y col., 2020).

El equilibrio ecológico de ambos genogrupos cambió desde una mayor prevalencia de LF-89-like entre 2010 y

2014, a una dominancia de EM-90-like en 2015 (Rozas-Serri y col., 2019) y en 2019 (Rozas-Serri y col., 2018a). Este cambio de tendencia entre 2015 y 2019 pudo ser la razón del por qué los laboratorios farmacéuticos decidieron utilizar únicamente el genogrupo EM-90-like en sus vacunas comerciales.

Sin embargo, no existen pruebas objetivas sobre la dinámica espacio temporal de la infección temprana de ambos genogrupos en condiciones de campo, ni ninguna confirmación respecto de la probabilidad de coinfección por ambos genogrupos en los mismos peces y/o tejidos.

La patogénesis de la piscirickettsiosis en post *smolt* de salmón Atlántico infectados con aislados LF-89-like y EM-90-like puede ser diferente (Figueroa y col., 2017) cuando se utiliza un modelo experimental basado en la infección por cohabitación. Además, tanto los aislados LF-89-like como los EM-90-like modulan una respuesta inmunológica similar

basada en una activación sustancial de la respuesta inmunitaria innata pero una inhibición significativa de la respuesta adaptativa mediada por células (Jakob y col., 2014; Figueroa y col., 2020; Happold y col., 2020).

Se ha documentado ampliamente que las vacunas disponibles comercialmente para el control del SRS han demostrado una eficacia insuficiente en condiciones de campo (Karatas y col., 2008; Rozas y col., 2014; Gaete-Carrasco y col., 2019; Figueroa y col., 2020; Laurin y col., 2020; Delphino y col., 2021; Vargas y col., 2021). El estándar actual de estrategia de vacunación en la industria chilena, se basa en una vacuna viva de un aislado EM-90-like.

No obstante lo anterior, el plan oficial de vigilancia y control del SRS implementado en 2012 (Rees y col., 2014), se basa sólo en la enfermedad causada por *P. salmonis*, es decir, no incorpora la detección para ninguno de los genogrupos.

Es posible que los mecanismos biológicos de ambos genogrupos de *P. salmonis* modulen la interacción con su hospedador, apoyando así nuestra hipótesis de que *P. salmonis* promueve

una coinfección muy compleja que parece ser muy dinámica a lo largo del tiempo, lo que plantea un reto importante para un tratamiento y control óptimos.

Además, la estrategia de vacunación basada en la administración de vacunas formuladas únicamente con EM-90-like podría haber causado un aumento de la incidencia y la tasa de positividad de los aislados LF-89-like en los últimos años.

Los objetivos de este estudio fueron (a) caracterización prospectiva de la distribución espacio-temporal y dinámica de la presencia del genogrupo de *P. salmonis* dentro y entre centros de cultivo, peces y tejidos durante la infección temprana en salmón Atlántico; (b) caracterización retrospectiva de la tasa de positividad de genogrupos de *P. salmonis* entre 2017 y 2021; y (c) generación de conocimiento para mejorar la estrategia de vigilancia y control del SRS en Chile.

## Material y métodos

### Estudio prospectivo de campo

Se incluyeron en este estudio seis centros de cultivo en mar de salmón Atlántico en la Región de Los Lagos, los

Empresa	Centro	Fecha siembra mar	Fecha inicio monitoreo	Fecha término monitoreo	Total de semanas	Jaulas	N° total peces
A	1	30.08.2018	25.09.2018	04.01.2019	14	2-10-11-15	210
	2	30.05.2018	06.07.2018	31.01.2019	23	2-6-7-14	330
B	3	28.08.2018	29.09.2018	20.02.2019	26	04-06-13	378
	4	21.09.2018	17.10.2018	01.01.2019	10	1-2-3-7-8-9-17-18	148
C	5	26.09.2018	18.10.2018	06.02.2019	25	1-3-4-6-7-9	164
	6	02.08.2018	17.08.2018	01.03.2019	11	1-2-3-4-8	372

**Tabla 1.** Centros de salmón Atlántico en agua de mar incluidos en el estudio, fecha de entrada/siembra y fecha de inicio del seguimiento semanal, número total de semanas bajo seguimiento, jaulas y número total de peces muestreados.

cuales fueron sembrados entre mayo y septiembre de 2018 (Tabla 1). Por término medio, se recogieron cinco peces de tres jaulas de cada centro durante el tiempo de seguimiento, es decir, una media de 15 peces moribundos o muertos recientemente, por muestreo. Los peces se inspeccionaron individualmente mediante un examen anatomopatológico completo, y la gravedad de los hallazgos se registró mediante un sistema semicuantitativo estandarizado. De cada pez se tomaron muestras de tejido de aproximadamente 5 mm<sup>3</sup> de cerebro, hígado, bazo, riñón anterior y posterior, que se colocaron en tubos de microcentrífuga de 2 mL con etanol al 70% v/v.

### Estudio retrospectivo de campo

Trescientos sesenta y tres (363) muestras de órganos (hígado, riñón, bazo y cerebro) provenientes de salmones Atlántico cultivados en Los Lagos y la Región de Aysén en Chile fueron recibidos en el laboratorio para la detección de *P. salmonis* y la identificación del genotipo por qPCR entre 2017 y 2021. Todas las muestras de tejido se entregaron al laboratorio fijadas en etanol al 70% v/v.

### Extracción de ADN, cuantificación y detección de *P. salmonis* mediante qPCR

*P. salmonis* se detectó mediante qPCR basada en Taqman, como describieron previamente Karatas y col. (2008). Estos cebadores se han utilizado previamente tanto en condiciones de campo (Rise y col., 2004; Rozas-Serri 2022) como experimentales (Jakob y col., 2014; Figueroa y col., 2017; Figueroa y col., 2020; Happold y col., 2020). En adelante, nos referiremos a este ensayo como qPCR "universal" de *P. salmonis*; el cual detecta aislados LF-89-like y EM-90-like porque utiliza el gen 16S rRNA. Se extrajo ADN genómico de cerebro, hígado, bazo, riñón anterior y posterior de cada pez utilizando el kit EZNA Tissue DNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las qPCR se llevaron a cabo en el sistema de qPCR en tiempo real StepOne Plus utilizando los parámetros: 95°C durante 3 min para la desnaturalización inicial, 95 °C durante 1 s y 60 °C durante 20 s para 40 ciclos. Se registraron los valores del umbral de

ciclo (Ct), y un Ct de <33,01 se consideró positivo, y negativo en caso contrario, basándonos en lo que hemos descrito previamente (Rozas-Serri 2022).

### PCR específica de genotipo para discriminar LF-89-like y EM-90-like

Diseñamos una qPCR basada en TaqMan para amplificar la región genéticamente más diversa del gen 16S rRNA. Se trabajó con 67 peces con resultados positivos de qPCR "universal" de *P. salmonis*. El mismo ADN extraído en el paso anterior se utilizó para realizar la qPCR específica de genotipo. Las PCR se llevaron a cabo en el sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus utilizando el programa: 95 °C durante 3 min para la desnaturalización inicial, 95 °C durante 1 s y 60 °C durante 20 s durante 40 ciclos.

Los puntos de corte para los ensayos de genotipo fueron 34,54 (LF-89-like) y 33,37 (EM-90-like). Se calculó el valor Ct más bajo para EM-90-like y LF-89-like en los 5 tejidos muestreados (cerebro, bazo, hígado, riñón anterior y riñón posterior) para clasificar a los peces como infectados tanto por EM-90-like como por LF-89-like (valores Ct < 33,37 para EM-90-like y valor Ct < 34,54 para LF-89-like), infectados sólo con EM-90-like (valor Ct < 33,37 para EM-90-like y valor Ct ≥ 34,54 para LF-89-like), infectados sólo con LF-89-like (valor Ct < 34,54 para LF-89-like y valor Ct ≥ 33,37 para EM-90-like), e infectados con ninguno de los dos genotipos (valores Ct ≥ 33,37 para EM-90-like y valor Ct ≥ 34,54 para LF-89-like).

### Gestión de datos y análisis estadístico

La frecuencia de resultados positivos de qPCR de genotipo a nivel de peces se tabuló de forma cruzada por centro de cultivo (ambos, EM-90-like, EM-89-like o ninguno) y a nivel de tejido para los resultados positivos de EM-90-like y EM-89-like (rango, 0 a 5 tejidos positivos).

En los centros con coinfección se utilizó la prueba de McNemar para comprobar si los porcentajes de resultados positivos por qPCR diferían significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los genotipos. La gestión de los datos y los análisis se realizaron con el programa estadístico MedCalc versión 20.215.

Centro	Ambos	EM-90-like	LF-89-like	Ninguno	Total	
					n	%
1	0	1	0	0	1	1,5
2	7	11	4	0	22	32,8
3	0	0	0	0	0	0,0
4	2	15	1	1	19	28,4
5	0	0	19	0	19	28,4
6	0	1	3	2	6	9,0
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>28</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>67</b>	<b>100</b>
	<b>13,4</b>	<b>41,8</b>	<b>40,3</b>	<b>4,5</b>	<b>100</b>	

**Tabla 2.** Frecuencia de ambos genogrupos a nivel de peces (n = 67) según las explotaciones de agua de mar incluidas en el periodo de seguimiento.

## Resultados

### La distribución espacio-temporal de los genogrupos LF-89-like y EM-90-like es altamente variable dentro de los centros de agua de mar y entre ellos

Los peces de los centros 1 y 2 (empresa A) mostraron el primer resultado positivo en la qPCR 111 días (peso medio 775 g) y 197 días (2.486 g) después de ser sembrados en mar, respectivamente. El tiempo transcurrido entre la fecha de siembra y la primera detección en los centros 5 y 6 (empresa C) fue de 92 días (690 g) y 141 días (1.026 g), respectivamente. Mientras el centro 4 presentó la primera positividad más temprana del estudio (83 días después de siembra y 611 g), el centro 3 no mostró peces positivos hasta el final del periodo (176 días y 1948 g) y se mantuvo como control sin brotes de SRS (Empresa B).

### La infección por *P. salmonis* es multi-genogrupo (coinfeción) en centros, peces y tejidos

Tres de los cinco centros (2, 4 y 6) del estudio prospectivo revelaron indicios de coinfecciones EM-90-like y LF-89-like a nivel de centro, y dos a nivel de peces (2 y 6) (Tabla 2). El centro 1 sólo mostró una muestra positiva a EM-90-like, mientras que el centro 5 sólo reveló positivos a LF-89-like (n = 19) (Tabla 2). En el centro 6

sólo se detectó infección por EM-90-like (n = 1) y sólo por LF-89-like (n = 3), pero no se detectó coinfección (Tabla 2). En el centro 2, se detectó infección con EM-90-like (n = 11) y con LF-89-like (n = 4), pero también coinfección con ambos genogrupos (n = 7) (Tabla 2). El genogrupo EM-90-like se detectó en el 81,8% (18 de 22) de los peces positivos del centro, mientras que LF-89-like se detectó en el 50% (11 de 22) (McNemar p = 0,119). En el centro 4, la infección fue sólo con EM-90-like (n = 19) y coinfección con LF-89-like (n = 2), pero no se registró infección solo con LF-89-like (Tabla 2). Entonces, EM-90-like se detectó en el 89,5% (17 de 19) de los peces positivos, en comparación con el 15,8% (3 de 19) de LF-89-like (McNemar p = 0,0005). La mayor proporción de peces infectados con EM-90-like (65,2%) y/o LF-89-like (62,6%) no mostró patología macroscópica (puntuación 0) o mostraban lesiones leves (puntuación ≤ 2). Sin embargo, el 34,3 y el 37,4% de los peces infectados por EM-90-like y/o LF-89-like mostraron lesiones patológicas de moderadas a graves (puntuación > 2), respectivamente. Por lo tanto, existe una alta probabilidad de detección precoz del patógeno e incluso de discriminar su genogrupo de peces asintomáticos o con patología macroscópica leve.

Por último, no se detectaron diferencias en cuanto a la frecuencia de los genogrupos EM-90-like y LF-89-like en

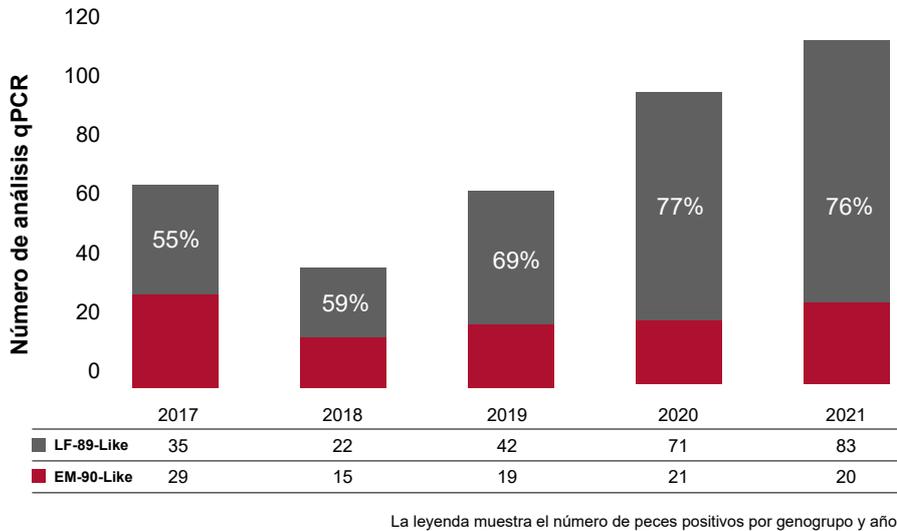
hígado, riñón anterior y posterior, bazo y cerebro de los 67 peces qPCR positivos. Sin embargo, mientras que la frecuencia de EM-90-like fue ligeramente superior en cerebro, la detección de LF-89-like fue marginalmente superior en cabeza-riñón.

### Los nódulos hepáticos se asocian con la infección con EM-90-like, pero no con la de tipo LF-89 ni con la coinfección de ambos genogrupos

De las 12 lesiones macroscópicas consideradas para el análisis de asociación de genogrupos, sólo nódulos hepáticos, esplenomegalia, renomegalia, hepatomegalia y anomalías cerebrales presentaban al menos 10 casos de lesiones moderadas (puntuación = 2) o graves (puntuación = 3). El nódulo hepático fue la única lesión que mostró una asociación causal con el genogrupo EM-90-like (p < 0,05). Así, la probabilidad de nódulos hepáticos (puntuaciones 2 y 3) fue 19,5 veces mayor para las infecciones de tipo EM-90 en comparación con las infecciones LF-89.

### La tasa de positividad de *P. salmonis* LF-89-like aumentó significativamente entre 2017 y 2021, y fue el principal genogrupo circulante en la industria chilena durante el periodo.

La Figura 1 muestra la distribución de los diagnósticos para la identificación



**Figura 1.** Tasa de positividad comparativa para los genogrupos LF-89-like y EM-90-like de *P. salmonis* entre 2017 y 2021 mediante qPCR específica de genogrupo (n = 363).

del genogrupo de *P. salmonis* entre 2017 y 2021 en salmón Atlántico. Aunque la tasa de positividad de LF-89-like fue mayor que la de EM-90-like en 2017 (55% LF-89-like vs. 45% EM-90-like), su porcentaje aumentó gradualmente año a año hasta que aproximadamente tres de cada cuatro resultados qPCR positivos "universales" de *P. salmonis* fueron del genogrupo LF-89-like en 2020 y 2021.

### Discusión

Los resultados prospectivos mostraron que la primera detección de *P. salmonis* por qPCR se registró entre 83 días (centro 4) y 197 días (centro 2) después del inicio de la fase de cultivo marina, lo que coincide con el intervalo entre 30 y 180 días descrito en estudios epidemiológicos retrospectivos previos (Rees y col., 2014; Gaete-Carrasco y col., 2019; Laurin y col., 2020). La infección por *P. salmonis* puede asentarse pronto en la fase de agua de mar, afectando negativamente a la salud de los peces y requiriendo un tratamiento antibacteriano temprano (Happold y col., 2020). Sin embargo, los aislados de campo de LF-89-like y EM-90-like presentan diferencias genómicas que pueden inducir distintos grados de virulencia

(Nourdin-Galindo y col., 2017; Saavedra y col., 2017), patogénesis (Figueroa y col., 2017) y respuesta inmunitaria (Rise y col., 2004; Tacchi y col., 2011; Jakob y col., 2014; Rozas-Serri y col., 2018; Figueroa y col., 2020; Happold y col., 2020; Rozas-Serri 2022).

Los peces infectados con EM-90-like mostraron un mayor porcentaje de nódulos hepáticos que los infectados sólo con LF-89-like o los coinfectados, lo que concuerda con lo descrito por Rozas-Serri y col. (2017) en post *smolts* de salmón Atlántico infectados experimentalmente con ambos genogrupos, ya que se registraron nódulos focales multifocales de color blanco amarillento de aproximadamente 1-2 mm de diámetro en el hígado en el 6 y el 14% de los peces infectados con LF-89-like y EM-90-like durante la fase temprana de la infección, respectivamente. Los resultados de este estudio demuestran que la detección temprana de genogrupos de *P. salmonis* en múltiples órganos es muy probable en peces vivos y asintomáticos, por lo que la vigilancia epidemiológica de *P. salmonis* puede complementarse con la identificación del genogrupo.

Saavedra y col. (2017) describieron una tasa de positividad de *P. salmonis* EM-90-like significativamente mayor que la de LF-89-like en 2015, lo que indica un cambio de tendencia en comparación con el periodo 2010-2014, en el que predominaban los aislados del genogrupo LF-89-like. Según Aravena y col. (2017), *P. salmonis* EM-90-like fue el genogrupo más frecuente en la industria en 2019, resultados que no concuerdan con los nuestros porque en 2019 la proporción fue del 69 y 31% para LF-89-like y EM-90-like, respectivamente. Especulamos que la razón principal para explicar estas diferencias es que consideramos un número diferente de aislados de áreas geográficas con diferentes tasas de incidencia y prevalencias de infección de ambos genogrupos, y consideramos solo la situación del salmón Atlántico.

Nuestros resultados demuestran no sólo que el salmón Atlántico puede estar infectado por ambos genogrupos por separado en un momento dado y, en cada centro de cultivo, sino que existe coinfección con aislados de ambos

genogrupos en el mismo y en diferentes tejidos/órganos del mismo pez al mismo tiempo.

Hasta donde sabemos, ésta es la primera descripción hasta la fecha de una coinfección compleja con ambos genogrupos de *P. salmonis* a nivel de centro, pez e incluso tejido del salmón Atlántico. Además, los resultados demuestran un cambio en la tendencia de la relación de la tasa de positividad de ambos genogrupos, ya que los diagnósticos de LF-89-like se consolidaron como los más frecuentes en 2020 y 2021. Así, tres de cada cuatro resultados positivos "universales" de qPCR para *P. salmonis* durante 2020-2021 fueron LF-89-like cuando se utilizaron los ensayos de PCR específicos de genogrupo descritos aquí.

Precisamente en los últimos dos años hemos encontrado un aumento en la susceptibilidad al SRS en el salmón Atlántico, básicamente en términos de tiempo de primera detección y brote, aumentos en el número de terapias, aumentos en la mortalidad asociada, aumentos en la frecuencia de fracasos terapéuticos, entre otros indicadores.

Aunque sabemos que las vacunas actuales no activan la respuesta inmune adaptativa mediada por células necesaria

para proteger y controlar una bacteria intracelular facultativa como *P. salmonis* durante todo el ciclo productivo en el mar (Karatás y col., 2008; Gaete-Carrasco y col., 2019; Vargas y col., 2021, reconocemos que las vacunas juegan un papel importante en el control relativo actual de la enfermedad.

La primera vacuna viva atenuada entró en el mercado en 2016, pero se basa solo en un aislado EM-90-like. Desde 2017, la estrategia de vacunación basada en esta vacuna, utilizada junto con una vacuna pentavalente cuyo componente de *P. salmonis* es también EM-90-like pero inactivado, ha crecido hasta convertirse en el estándar actual de la industria. Por lo tanto, en 2017 podría haberse iniciado un proceso biológico que podría haber promovido un aumento de la presión de infección de los aislados LF-89-like.

Los genogrupos de *P. salmonis* LF-89-like y EM-90-like pertenecen a la misma especie, pero son aislados diferentes que incluso podrían presentar antígenos distintos (Rozas-Serri y col., 2015; Saavedra y col., 2017). En consecuencia, es esencial que todas las vacunas comerciales disponibles para el control del SRS en Chile sean formuladas con ambos genogrupos o sus respectivos componentes antigénicos para inducir una respuesta inmune de "amplio espectro" contra *P. salmonis*.

## Conclusiones

La distribución espacio-temporal de LF-89-like y EM-90-like es altamente variable dentro y entre los centros de agua de mar, y la infección por *P. salmonis* es a menudo una coinfección compleja que es un multi-genogrupo a nivel de centro, pez e incluso tejido. La tasa de positividad de *P. salmonis* LF-89-like aumentó significativamente entre 2017 y 2021, siendo el principal genogrupo circulante en la industria salmonera chilena.

Finalmente, se reporta una estrategia para identificar genogrupos de *P. salmonis* basada en una qPCR específica para LF-89-like y EM-90-like. En consecuencia, nuestros resultados ayudan a comprender mejor la interacción biológica de *P. salmonis* y el hospedador y generan conocimientos para mejorar la estrategia de vigilancia y control del SRS en Chile.

## Referencias

Para descargar estas referencias visita [www.salmonexpert.cl/descargas](http://www.salmonexpert.cl/descargas)

**+ Ahorro**

**Sustentable**

**Oxigenación**

**Remediación de Fondos**

**Dale un respiro a tu inversión con nanoburbujas de oxígeno**

**nanoox**

ITG CHILE

www.itgchile.com - www.nanoox.cl