

Salmonexpert



Avanza la inclusión y equidad en la industria

Página 10

Las iniciativas que apuestan por reducir el robo de salmones en Chile

Página 16

Lago Sofía: innovación en tecnología y producción de peces

Página 22

Seafood Expo Global: entrevista a Felipe Rojas, director comercial de Invermar

Página 28

I+D+i: Análisis de la mucosa de la piel de salmónidos infectados por *Piscirickettsia* y *Tenacibaculum*

Página 36

Análisis de la barrera mucosa de la piel de trucha arcoíris y salmón del Atlántico infectados por inmersión con *Piscirickettsia* y *Tenacibaculum*

Resumen

Tanto la piscirickettsiosis como la tenacibaculosis pueden provocar cuadros ulcerativos en la piel de salmónidos de cultivo, requiriéndose de herramientas diagnósticas específicas y/o personal altamente capacitado y con experiencia para reconocer cada una de las infecciones. Para el salmón del Atlántico existe información disponible en cuanto a la composición proteica del moco de la piel, para trucha arcoíris sigue siendo un enigma. En el presente estudio se evaluaron diferentes aspectos del mucus de la piel de salmónidos frente a infecciones experimentales por inmersión con *T. dicentrarchi* y *P. salmonis*. Los resultados mostraron que existen cambios significativos en la composición de taxones de las comunidades bacterianas del moco de la piel de *S. salar* durante todo el desafío. Estos cambios estuvieron relacionados a una dominancia de *T. dicentrarchi* en el salmón desafiado a las 2 hpi.



H. Levipan^{1*}, C. Salinas¹, R. Irgang^{2, 3}, H. Wicki¹, F. Barrios-Henríquez^{2, 3} y R. Avendaño-Herrera^{2, 3, 4*}

¹Laboratorio de Ecopatología y Nanobiomateriales, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, Chile

²Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuicola, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile

³Interdisciplinary Center for Aquaculture Research, Concepción, Chile (Incar)

⁴Centro de Investigación Marina Quintay (Cimarq), Universidad Andrés Bello, Quintay, Chile

*hector.levipan@upla.cl; ravendano@unab.cl

Introducción

La salmonicultura chilena se remonta a principios de la década de los años 80, con una producción de aproximadamente 0,5 toneladas. Muy rápidamente, la industria acuícola nacional alcanzó un posicionamiento entre los principales cultivadores y productores mundiales de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Sin embargo, el aumento sostenido de la producción de salmónidos dio los primeros traspiés sanitarios a inicios de la década de los 90, principalmente asociados a una enfermedad denominada Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) o piscirickettsiosis, cuyo agente etiológico se aisló en 1989 y hoy se conoce su condición de bacteria intracelular facultativa y Gram negativa, recibiendo el nombre de *Piscirickettsia salmonis* (Rozas-Serri, 2022).

En la actualidad, después del salmón del Atlántico, la trucha arcoíris es la especie

más afectada por la piscirickettsiosis (Sernapesca, 2024). Sin embargo, a partir del 2018, se reconoce el surgimiento de la tenacibaculosis causada principalmente por la bacteria Gram negativa *Tenacibaculum dicentrarchi* como la segunda causa de muerte infecciosa de salmónidos cultivados.

Ambas patologías son capaces de provocar cuadros ulcerativos en la piel de los salmónidos cultivados, requiriéndose de herramientas diagnósticas específicas y/o personal altamente capacitado y con experiencia para reconocer cada una de las infecciones.

Un denominador común cuando ocurre un proceso infeccioso es la capacidad del patógeno de contrarrestar la respuesta inmune de los peces. El sistema inmunológico de los peces teleosteos está organizado anatómicamente en tejidos linfoides primarios y secundarios; la segunda categoría incluye los tejidos linfoides asociados a las mucosas (MALTs) (Kelly & Salinas, 2017).

Los MALTs incluyen el tejido linfoide asociado a la piel (SALT), implicado en la defensa contra patógenos exógenos oportunistas (Parra y col., 2015).

Las células caliciformes epidérmicas de los peces secretan moco con propiedades antimicrobianas basadas en diversos componentes biológicamente activos (e.g., lisozimas, muramidasa, componentes del complemento, lectinas, peroxidasa, esterasas, proteasas, etc.) (Esteban & Cerezuela, 2015). La caja negra de la composición proteica del moco de la piel de ejemplares de salmón del Atlántico está comenzando a ser descifrada mediante cromatografía líquida de alta presión y espectrometría de masas de alta resolución (Fæste y col., 2020).

Las proteínas más abundantes detectadas son la desoxirribonucleasa, histona H2A, cofilina-2, albúmina de suero, peroxiredoxina-1, malato deshidrogenasa, por mencionar algunas. En el caso de la trucha arcoíris, no se conoce la composición del moco de la piel, aunque existen algunas proteínas diferencialmente expresadas que han sido identificadas por espectrofotometría de masas en respuesta a desafíos con el patógeno de agua dulce *Flavobacterium psychrophilum* (Hoare y col., 2022).

Hasta ahora, no se conoce muy bien cómo las infecciones bacterianas causadas por *P. salmonis* y *T. dicentrarchi* afectan las características del moco de la piel de ejemplares de trucha arcoíris y salmón del Atlántico, respectivamente. Estudios *in vitro* sobre el mucus del salmón del Atlántico recolectado a partir de peces cultivados han determinado el efecto de *T. dicentrarchi* sobre la actividad de diferentes enzimas como la esterasa, antiproteasa, lisozima, y otros parámetros como el cortisol (Echeverría-Bugueño y col., 2023). Sin embargo, son escasos los estudios de desafíos con patógenos que se sospecha que tienen una ruta de entrada mucosa, como los antes señalados, siendo altamente recomendado emular la ruta de infección natural que es el agua de cultivo.

De hecho, la mayoría de los experimentos de desafío de peces se realizan mediante el método de inyección intraperitoneal o

intramuscular. Ambos métodos a priori evaden la primera barrera natural, como es la piel mucosa, lo cual puede limitar las principales conclusiones derivadas de este tipo de estudios. Por ejemplo, se ha demostrado que la ruta de entrada de un patógeno, dependiendo del modelo de desafío usado, inmersión versus inyección, genera diferencias en los perfiles proteómicos del mucus de la piel de la trucha arcoíris cuando se analizaron las proteínas con geles de 2 dimensiones (Hoare y col., 2022). En este sentido, los desafíos por cohabitación resuelven en parte el problema de la ruta de entrada del patógeno, pero no en el caso de los peces troyanos.

En el curso de la ejecución de los proyectos Fondecyt Regular 1230068 “Anticipating instead of reacting to the imminent threat of bacterial coinfection in farmed salmon: elucidation of host susceptibility and treatment efficacies during coinfection in Atlantic salmon with causative isolates of BKD and/or tenacibaculosis” (Universidad Andrés Bello) y Fondecyt de Iniciación 11200708 “Ecopathology of piscirickettsiosis: elucidating the role of the mucous skin of seawater-adapted rainbow trout in the defense against *Piscirickettsia salmonis*” (Universidad de Playa Ancha), se evaluaron diferentes aspectos del mucus de la piel de salmónidos frente a infecciones experimentales por inmersión con *T. dicentrarchi* y *P. salmonis*. Ambas iniciativas fueron conducidas en la Unidad Experimental del Centro Incar localizado en el Centro de Investigación Marina de Quintay (Cimarq) de la Universidad Andrés Bello.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron especímenes de *S. salar* (~250 g) y *O. mykiss* (120-130 g) desde la compañía Mowi Chile. Los peces fueron transportados desde pisciculturas del sur de Chile a las instalaciones de la Universidad Andrés Bello, previa certificación de los peces como libre de enfermedades y cumpliendo con los requerimientos de Sernapesca. Los peces se encontraban fisiológicamente aptos para la etapa de agua de mar.

En el Cimarq, los peces se aclimataron a las condiciones fisicoquímicas del agua de

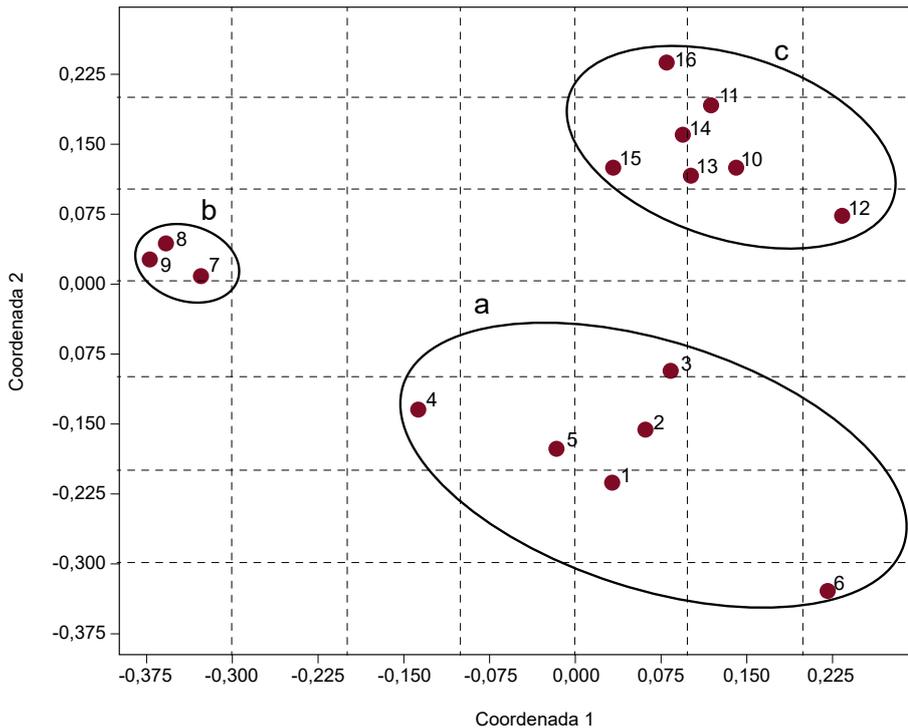


Figura 1. Ordenación de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de muestras de microbioma de mucosa de la piel de *S. salar*. Las muestras más cercanas tienen un mayor grado de similitud. Grupo a = peces antes de comenzar los desafíos (muestras 1-3) y controles sin desafiar (muestras 4-6) a las 2 hpi. Grupo b = peces desafiados con *T. dicentrarchi* TdCh05 a las 2 hpi (muestras 7-9). Grupo c = peces de control sin desafiar (muestras 10-12) y desafiados con TdCh05 (muestras 13-16) a los 21 dpi.

mar, siendo filtrada a 10 μm y tratada con UV usando estanques de flujo continuo de 600 litros durante 30 días. Después de transcurrido este periodo de aclimatación, los ejemplares de salmón del Atlántico fueron desafiados por inmersión con la cepa *T. dicentrarchi* TdCh05, mientras que las truchas arcoíris fueron desafiadas (también por inmersión) con tres cepas de *P. salmonis* (cepa tipo LF-89T y aislados Psa1-103 [genotipo tipo LF-89] y Psa1-104 [genotipo tipo EM-90]).

Los baños infectantes se efectuaron durante 2 horas, siendo los peces expuestos a oxígeno a saturación y de manera individual con cada cepa. La concentración promedio infectante de *P. salmonis* fue de $1,9 \times 10^6$ bacterias mL⁻¹ y de $\sim 1 \times 10^6$ bacterias mL⁻¹ para *T. dicentrarchi* TdCh05.

Después de realizados los desafíos, los peces infectados con *T. dicentrarchi* y *P. salmonis* fueron supervisados

durante 21 y 30 días, respectivamente. El experimento se realizó en duplicado en un sistema de recirculación acuícola (RAS) con estanques de 80 litros a una densidad inicial entre 12-13 kg/m³. El agua de mar fluctuó entre 14 a 15°C para salmón del Atlántico y a dos temperaturas promedio ($14,1 \pm 1,4^\circ\text{C}$ y $11,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) en el caso de las truchas. Todos los peces fueron alimentados diariamente con una ración de *pellet* comercial al 1% del peso corporal. Además, diariamente se registraron las mortalidades y se analizaron microbiológica y molecularmente para confirmar que la causa de muerte fue por cada una de las bacterias.

Adicionalmente, se colectaron muestras de peces tomados al azar antes de cada desafío y de ejemplares desde los estanques tratamientos y controles a diferentes tiempos durante los 21 o 30 días post-desafíos. Para salmón del Atlántico, los muestreo fueron 2 horas post-infección (hpi) y a los 21 días post-infección (dpi), mientras que en las truchas arcoíris fue a las 2 hpi y a los 15 y 30 dpi. Las muestras fueron colectadas por triplicado mediante hisopado de la piel para el análisis del microbioma asociado a la barrera piel mucosa.

Las bibliotecas de amplicones de la región hipervariable V4 de los genes del ARNr 16S se construyeron en Genoma Mayor SpA (<http://www.genomamayor.com/>). Además, se colectaron muestras de moco de la piel para los análisis proteómicos en el caso de las truchas desafiadas, las que fueron enviadas a analizar en el laboratorio de Melisa Institute (<https://es.melisainstitute.org/>).

Resultados

Un análisis NMDS basado en variantes de secuencia de amplicón (AVS) ordenó las muestras de microbioma de *S. salar* en tres grupos. Es decir, (a) peces antes de comenzar los desafíos y controles sin desafiar a las 2 hpi, (b) peces desafiados con la cepa TdCh05 a las 2 hpi, y (3) peces de control sin desafiar y desafiados con TdCh05 a los 21 dpi (Figura 1). A nivel de especie, los componentes mayoritarios del grupo (a) estuvieron conformados por unas pocas especies donde *T. dicentrarchi* fue también detectado

(Figura 2). El grupo (b) estuvo dominado por *T. dicentrarchi*, mientras que en el grupo (c) *T. dicentrarchi* no fue detectada en los peces control negativo, pero si en uno de los peces desafiados (muestra 15) después de 21 dpi (Figura 2).

Es importante mencionar que durante los 21 dpi, el estanque control (conteniendo especímenes de *S. salar*) no experimentó mortalidades en el sistema RAS, no así en los estanques conteniendo los peces desafiados con la cepa TdCh05 (Figura 3). En estos últimos, el estanque N°2 alcanzó casi un 100% de mortalidad de los peces desafiados desde el día 3 en adelante y los signos clínicos observados son compatibles con *T. dicentrarchi* como causa de mortalidad (Figura 3), lo cual fue posteriormente confirmado por PCR y microbiológicamente.

En el caso de las truchas arcoíris desafiadas con 3 diferentes cepas de *P. salmonis*, un total de 110 muestras fueron colectadas mediante hisopado de piel mucosa para el análisis del microbioma.

Estas muestras fueron mayoritariamente (pero no exclusivamente) seleccionadas de acuerdo con el diagnóstico positivo de *P. salmonis* utilizando el protocolo de PCR descrito por Marshall y col. (1998), incluyendo los correspondientes controles negativos y blancos. El análisis de los microbiomas aún está en la etapa del análisis bioinformático, pero un resultado representativo de las diferencias entre peces desafiados y controles en términos de la detección de *P. salmonis* se muestra en la Figura 4.

Conclusión y perspectivas

Observamos cambios significativos en la composición de taxones de las comunidades bacterianas del moco de la piel de *S. salar* durante todo el desafío. Estos cambios estuvieron relacionados a una dominancia de *T. dicentrarchi* en el salmón desafiado a las 2 hpi. A nivel de especies, también se encontraron importantes diferencias entre los ejemplares antes de los desafíos/controles a las 2 hpi y los peces

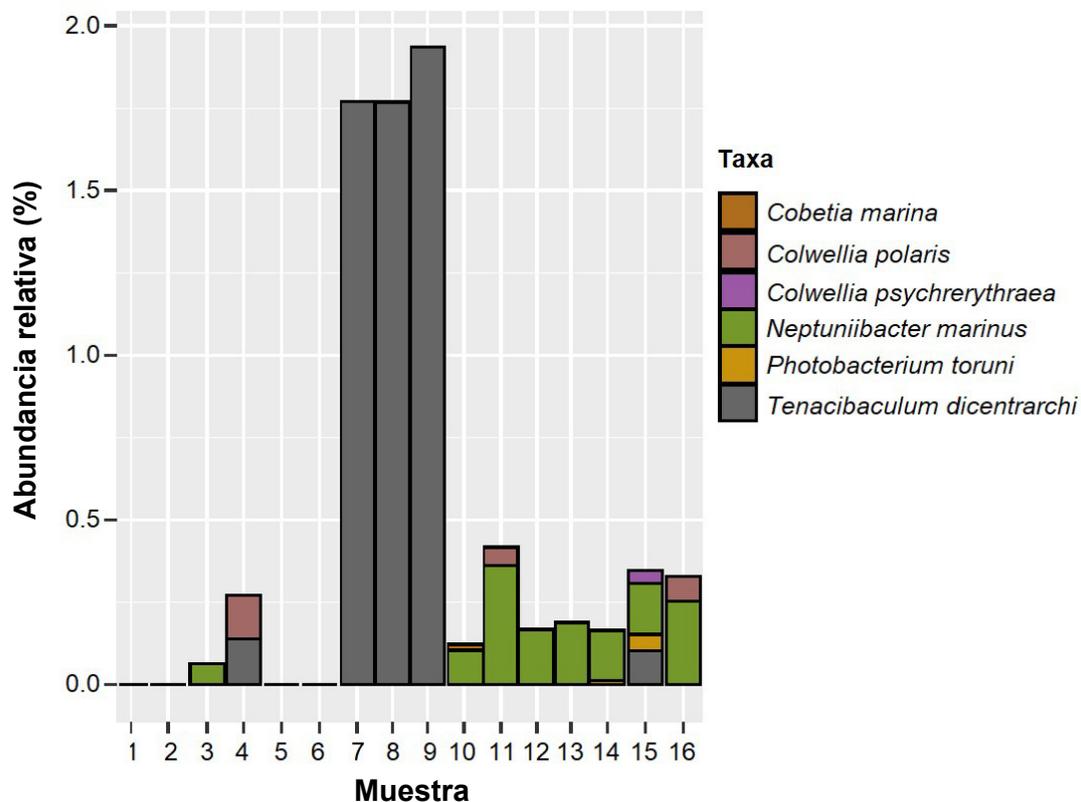


Figura 2. Principales especies bacterianas en muestras de microbioma asociado al moco de la piel de *S. salar*. Muestras 1-3: peces antes de comenzar los desafíos con *T. dicentrarchi* TdCh05. Muestras 4-6: controles sin desafiado a las 2 hpi. Muestras 7-9: peces desafiados con TdCh05 a las 2 hpi. Muestras 10-12: peces de control sin desafiado a los 21 dpi. Muestras 13-16: peces desafiados con TdCh05 a los 21 dpi.

A

Ulceración



Sin aleta caudal / Aleta deshilichada y hemorrágica



Principio de ulceraciones (descamaciones localizadas de tendencia circular)



Boca lastimada (erosionada)



B

En su mayoría los órganos se encontraban inflamados, en ocasiones el bazo demasiado pequeño y frágil, hígado poco o muy pálido con tendencia en bordes color amarillo verdoso.

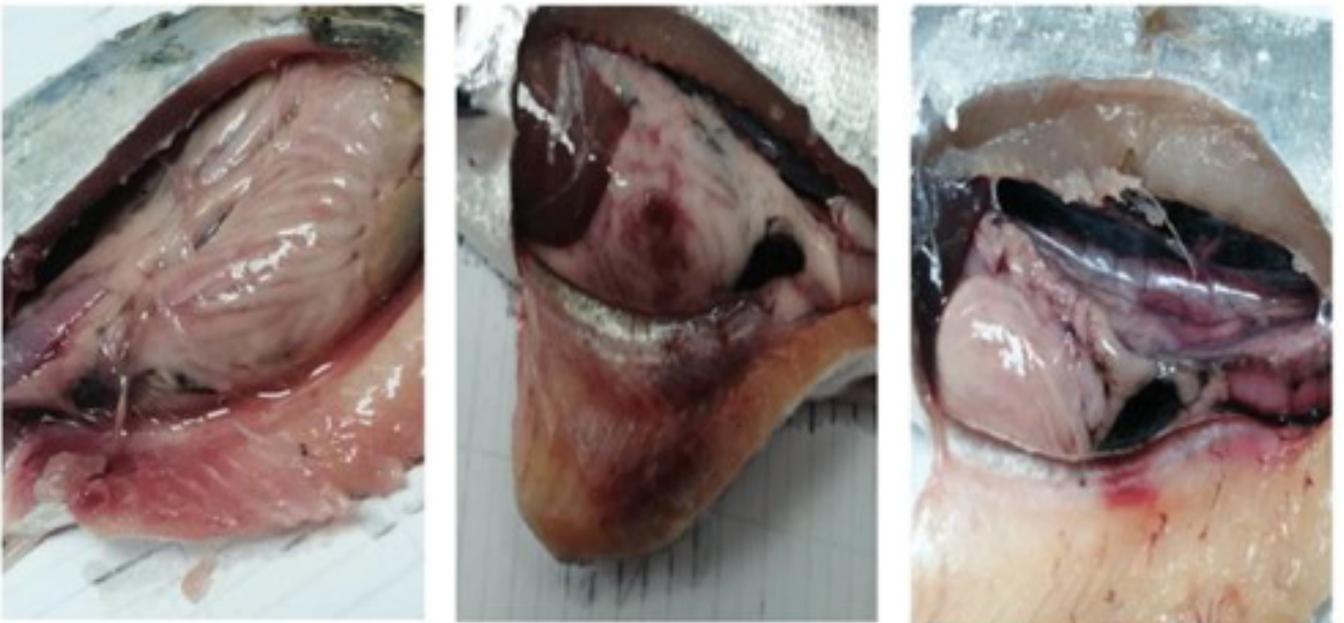


Figura 3. Mortalidades registradas en estanques con peces desafiados por *T. dicentrarchi* TdCh05. A) Se muestran las señales clínicas externas más graves y B) las características internas de órganos.

desafiados/controles a los 21 dpi. Al final del proyecto esperamos determinar los efectos de *T. dicentrarchi* sobre el microbioma asociado a la piel de *S. salar* durante los períodos intermedios de las infecciones.

Al momento de la generación de este artículo, muchas de las muestras de microbioma y proteómicas colectadas en los desafíos de la trucha arcoíris con las cepas de *P. salmonis* aún están en la etapa de análisis, pero se espera que el conocimiento adquirido aclare la importancia de las funciones de la piel de la trucha y su mucosidad como barrera contra los patógenos transmitidos por el agua.

Agradecimientos

Fondecyt de Iniciación en Investigación N°11200708, Fondecyt Regular N°1230068 y Fondap 1523A0007. Todos estas fuentes de financiamiento fueron otorgados por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID, Chile). Se agradece al Dr. Jorge Mancilla de Mowi Chile por la donación de los peces empleados en el experimento •

Referencias

- Esteban, M. & Cerezuela, R. 2015. Fish mucosal immunity: skin. In: Beck, B.H. & Peatman, E. (eds.) Mucosal Health in Aquaculture, 4: 67-92.
- Echeverría-Bugueño, M., Irgang, R., Mancilla-Schulz, J. & Avendaño-Herrera, R. 2023. Healthy and infected Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin-mucus response to *Tenacibaculum dicentrarchi* under in vitro conditions. Fish Shellfish Immunol., 136: 108747.
- Fæste, C., Tartor, H., Moen, A., Kristoffersen, A., Dhanasiri, A., Anonsen, J., Furmanek, T. & Grove, S. 2020. Proteomic profiling of salmon skin mucus for the comparison of sampling methods. J Chromatogr B., 1138: 121965.
- Hoare, R., Shahin, K., McLean, K., Adams, A. & Thompson, K. 2022. Skin mucus proteins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to mucosal vaccination and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. J Fish Dis., 45: 491-495.
- Kelly, C. & Salinas, I. 2017. Under pressure: interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. Front Immunol., 8: 559.
- 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.
- Parra, D., Reyes-Lopez, F. & Tort, L. 2015. Mucosal immunity and B cells in teleosts: effect of vaccination and stress. Front Immunol., 6: 354.
- Rozas-Serri, M. 2022. Why does *Piscirickettsia salmonis* break the immunological paradigm in farmed salmon? biological context to understand the relative control of piscirickettsiosis. Front Immunol., 13: 856896.
- Sernapesca. 2024. Informe sanitario con información sanitaria de agua dulce y maraño 2022. [https://www.sernapesca.cl/noticias/sernapesca-publico-informe-sanitario-de-la-salmonicultura-del-primer-semestre-del-ano-2023/]

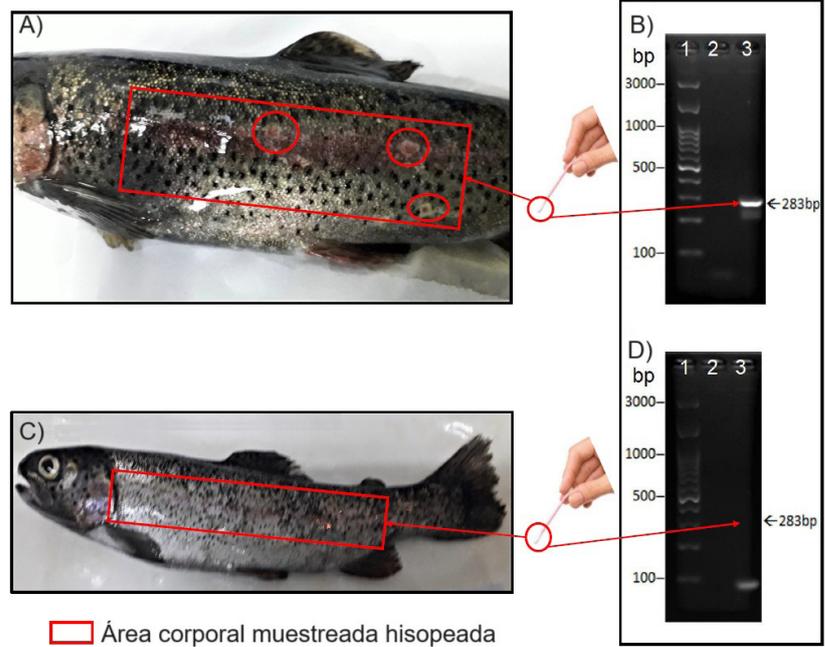


Figura 4. Características externas de truchas arcoíris desafiadas con *P. salmonis* a los 15 dpi. Imágenes representativas para A) truchas arcoíris desafiadas por inmersión con *P. salmonis* Psal-104 y B) truchas control negativo. C) Detección de *P. salmonis* por PCR de la región ITS a los 15 dpi y visualización de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa. Líneas 1-3: ladder, control negativo y tamaño de amplicón esperado (283 pb), respectivamente. D) La bacteria no fue detectada por PCR en truchas control no expuestas a los 15 dpi.