

**Short communication**

***Caligus rogercresseyi*: posible vector en la transmisión horizontal del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAv)**

**Karin Oelckers<sup>1</sup>, Siri Vike<sup>2</sup>, Henrik Duesund<sup>2</sup>, Javier González<sup>3</sup>  
Are Nylund<sup>2</sup> & Gabriel Yany<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso  
P.O. Box 2950, Valparaíso, Chile

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad de Bergen, Thormohlensgt 55 N-5020, Bergen, Noruega

<sup>3</sup>Ewos Innovation, Camino a Pargua, km 57, Colaco km 5, Calbuco, Puerto Montt, Chile

Corresponding author: Karin Oelckers (koelckers@yahoo.es)

**RESUMEN.** Chile el año 2007 se convirtió en el segundo país productor de salmónidos a nivel mundial. Al año siguiente la industria salmonera nacional comenzó a experimentar una severa crisis sanitaria producida por el virus causante de la anemia infecciosa del salmón. Este virus se presentó por primera vez en Noruega (1984), luego en Canadá, Escocia, Islas Faroe, Estados Unidos y Chile (2007). La anemia infecciosa del salmón (ISA), es una enfermedad altamente contagiosa entre los peces, producida por un virus de la familia *Orthomyxoviridae*. La especie más vulnerable a este virus es el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). La plaga parasitaria producida por el piojo de mar, *Caligus rogercresseyi*, copépodo ectoparásito, ha ido en aumento lo que favorece el contagio de enfermedades bacterianas y virales. De todas las especies cultivadas en Chile, el salmón del Atlántico, *S. salar* es una de las especies más susceptibles de ser infestadas por *C. rogercresseyi*. Durante el 2006, la industria presentó un aumento significativo en las tasas de infestación por *Caligus*; luego en el 2007, aparecieron brotes del virus ISA. En Noruega, se ha demostrado que el piojo de mar, *Lepeophtherius salmonis* puede tener un rol como vector en la transmisión del virus ISA, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si *C. rogercresseyi* es un vector de transmisión del virus ISA en el salmón del Atlántico, cultivado en el sur de Chile.

**Palabras clave:** *Caligus rogercresseyi*, copépodo ectoparásito, vector, anemia infecciosa del salmón, ISA.

***Caligus rogercresseyi*: possible vector in the horizontal transmission of the virus of infectious salmon anaemia (ISAv)**

**ABSTRACT.** In 2007 Chile became the second largest producer of salmonids worldwide. The following year the salmon industry began to experience a severe health crisis produced in Chile by the virus causing infectious salmon anaemia. This virus was first recorded in Norway (1984), then in Canada, Scotland, Faroe Islands, United States and Chile in 2007. The infectious salmon anaemia (ISA) is a highly contagious disease of fish produced by a virus from the *Orthomyxoviridae* family. The most vulnerable species to this virus is the Atlantic salmon (*Salmo salar*). The parasitic plague caused by the ectoparasite copepod sea louse, *Caligus rogercresseyi*, has been increasing and promotes the transmission of bacterial and viral illnesses. From all the species farmed in Chile, the Atlantic salmon is the one most susceptible to infestation by *C. rogercresseyi*. In 2006, the industry showed a significant increase in infestation rates by *Caligus*, and then in 2007 appeared outbreaks of infectious salmon anaemia (ISA). In Norway, it has been shown that sea louse, *Lepeophtherius salmonis*, may have a role as a vector in the transmission of ISA virus, so the aim of this study was to determine whether *C. rogercresseyi* is a vector of transmission of infectious salmon anaemia virus in the Atlantic salmon, farmed in the south of Chile.

**Keywords:** *Caligus rogercresseyi*, copepod ectoparasite, vector, infectious salmon anaemia, ISA.

Para que Chile se convirtiera en el segundo país productor de salmónidos a nivel mundial tuvo que desarrollar una acuicultura intensiva producto de lo cual han surgido graves problemas derivados de enfermedades naturales y originadas por el cautiverio.

Debido al sistema intensivo de producción en el mar, los peces están más expuestos a contraer enfermedades, ya sea bacterianas, parasitarias y/o virales (Wootten *et al.*, 1982).

Las altas densidades de cultivo favorecen el contagio de plagas parasitarias, tales como el piojo de mar del género *Caligus*. La infestación de salmones de cultivo por estos piojos de mar es un problema y una preocupación que atraviesa las fronteras y se ha transformado en un impacto negativo común a todos los países productores de salmones. Esta plaga parasitaria promueve el contagio de enfermedades pues produce heridas en la piel del pez y los deprime inmunológicamente (Almendras *et al.*, 1997; Nolan *et al.*, 1999). Desde el inicio de la actividad salmonera se ha informado la presencia de *Caligus* en salmones de cultivo. Son copépodos ectoparásitos exclusivamente marinos que habitan sobre la piel de varias especies de peces, siendo *Caligus rogercresseyi* la especie que produce mayores daños económicos a la industria nacional (Boxshall & Bravo, 2000). En 2007, SalmonChile A.G. informó que la infestación producida por este parásito había aumentado en más de cinco veces llegando, en febrero de ese año, a un promedio de 34 *Caligus*/pez (Rozas & Ascencio, 2007) y en algunos casos superó los 100 *Caligus*/pez. No sólo en salmones se ha reportado la presencia de *Caligus*, sino también en especies nativas como *Odontheistes regia* (pejerrey), *Paralichthys microps* (lenguado de ojo chico) y *Eleginops maclovinus* (róbalo) (Carvajal *et al.*, 1998; González *et al.*, 2000; González & Carvajal, 2003).

Las especies de salmónidos más susceptibles de sufrir la infestación por *C. rogercresseyi* son el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (González *et al.*, 2000). Antecedentes sugieren que el *Caligus* fue transmitido a los salmones desde el róbalo (*E. maclovinus*), reservorio natural del parásito, donde vive en cierto equilibrio (Carvajal *et al.*, 1998). Por ello, aunque se apliquen tratamientos a los peces en cultivo para reducir la presencia del parásito, siempre existirá la reinfestación de salmones en cultivo debido a la presencia del parásito en el ambiente. Como este piojo de mar se alimenta de mucus, piel y probablemente sangre de los peces, produce lesiones por erosión, generando una serie de efectos negativos sobre los peces, entre ellos, estrés, disminución del apetito y mayor vulnerabilidad a adquirir enfermedades secundarias, bacterianas o virales (Bravo, 2008). Además, el hecho que la fase móvil del parásito puede moverse entre peces, hace que este parásito sea un posible vector para bacterias y virus (Nylund *et al.*, 1991, 1993).

La anemia infecciosa del salmón (ISA) es una enfermedad congestiva y anémica, provocada por un virus de la familia *Orthomyxoviridae*, del género *Isavirus* (Falk *et al.*, 1997; Mjaaland *et al.*, 1997; Krossoy *et al.*, 1999). La mortalidad durante un brote de ISA puede variar notablemente, al inicio la

mortalidad diaria puede variar de 0,5 al 1% pero puede aumentar con el tiempo, la mortalidad acumulada puede superar el 90% en casos graves (OIE, 2006). La causa de esta variación de la mortalidad ha sido asociada a ciclos de producción, densidad de carga, nivel de estrés de los peces y grado de infestación por *C. rogercresseyi*.

El primer brote de virus ISA se registró en Noruega en 1984 (Thorud & Djupvik, 1988) y desde entonces la enfermedad se ha registrado en todos los principales países productores de salmón del Atlántico: Canadá (Mullins *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 2001), Escocia (Rodger *et al.*, 1998; Rowley *et al.*, 1999), Estados Unidos (Maine) (Bouchard *et al.*, 2001), Islas Faroe (Lyngøy, 2003) y Chile (Kibenge *et al.*, 2001; Godoy *et al.*, 2008). La especie más susceptible es el salmón del Atlántico (*S. salar*), pero también logra sobrevivir e infectar a la trucha de mar (*Salmo trutta*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmon coho (*O. kisutch*) (Kibenge *et al.*, 2001), los cuales no manifiestan la enfermedad pero pueden actuar como vectores y reservorios del virus ISA (Nylund *et al.*, 1995, 1998; Hastein, 1997; Rolland & Nylund, 1998).

La vía de transmisión del virus ISA más común es de tipo horizontal a través del agua, por contacto directo con peces infectados mediante la exposición a mucus, sangre, vísceras y heces (Totland *et al.*, 1996; Rolland & Nylund, 1998). Otras vías de transmisión están asociadas, posiblemente, con las operaciones de cosecha y traslado de peces infectados a través de wellboats con sistemas abiertos de flujo de agua y la inapropiada disposición de la mortalidad y de peces moribundos, han mostrado ser los principales factores de diseminación de la enfermedad. Además, la proximidad de sitios con brotes del virus ISA es un factor de riesgo significativo en el cultivo de salmones en Noruega (Jarp & Karlsen, 1997; Murray *et al.*, 2002; Gustafson *et al.*, 2005; Hammell & Dohoo, 2005; McClure *et al.*, 2005; Sheel *et al.*, 2007). Lyngstad *et al.* (2008) sugieren que la propagación continua de los sitios infectados es consistente con la transmisión horizontal de la enfermedad, pero no está claro, si esto se debe al contacto entre sitios con brotes, transmisión pasiva vía agua de mar o algún otro factor local, ya que no se ha encontrado un reservorio definido del virus.

En Chile se sospecha que *C. rogercresseyi* podría actuar como un vector para el contagio del virus ISA de forma similar a como fuera descrito el rol de vector de *Lepeophtheirus salmonis* en el hemisferio norte (Nylund *et al.*, 1993). Este parásito portaría pasivamente al virus que produce la enfermedad del ISA. Sin embargo, la transmisión del virus por *C. rogercresseyi* no ha sido demostrada, así como tampoco se sabe si el virus ISA replica en *C. rogercresseyi*, aunque esto es

poco probable debido a que los virus son usualmente especie-específicos a diferencia de las enfermedades bacterianas.

Actualmente, la técnica de diagnóstico más utilizada es el RT-PCR descrita por Mjaaland *et al.* (1997). Sin embargo, el uso del RT-PCR en tiempo real (real time RT-PCR o qRT-PCR) puede aumentar la especificidad y también la sensibilidad de la prueba (Munir & Kibenge, 2004), ya que se incluye una sonda específica de secuencia, siendo posible estimar la cantidad relativa de RNA vírico de la muestra a ser analizada. Nylund *et al.* (1993) demostraron que el virus ISA estaba presente en el intestino de *L. salmonis*, pero no existe información acerca de cuánto tiempo permanece el virus en el parásito y si éste tiene capacidad de replicar en él.

El objetivo de este estudio fue determinar si *C. rogercresseyi* puede actuar como vector del virus ISA y ser capaz de transmitir el virus desde peces portadores a peces sanos. Para ello previamente se determinó que este parásito era portador del virus ISA, si es que éste había estado en contacto con peces enfermos o portadores del virus, además se demostró que el virus ISA puede permanecer por al menos 48 h en el parásito y que éste tiene capacidad infectiva ya que en cultivo en células ASK produjo un efecto citopático característico.

En el Centro Experimental de Fundación Chile en Puerto Montt se realizó el estudio para determinar si *C. rogercresseyi* portadores del virus ISA son capaces de infectar salmones del Atlántico sanos. Los peces utilizados en esta experiencia fueron previamente chequeados para IPN e ISAv. 540 salmones del Atlántico de aproximadamente 100 g infestados con *Caligus* a una tasa de 50 *Caligus*/pez, fueron distribuidos en tres estanques (180 peces por estanque). A estos peces se les inyectó intraperitonealmente un inóculo que contenía el virus ISA. Este inóculo fue proporcionado por Laboratorios Diagnostec. La cepa utilizada fue la HPR 1c, con un título viral de  $10^5$  ufp (Diagnostec). Cada estanque tuvo un abastecimiento individual de agua de mar y flujo abierto. El agua utilizada fue agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV. Los peces fueron alimentados con una dieta comercial, con una tasa de alimentación específica (SRF) de 0,5%. La temperatura del agua fue de  $\sim 15^\circ\text{C}$ , con una salinidad  $\geq 30$ .

Adicionalmente, en la misma unidad experimental había siete estanques de 720 L cada uno, que contenían 30 salmones del Atlántico de  $\sim 100$  g, los cuales estaban libres de ISAv y no estaban infestados con *Caligus*. De estos estanques, dos fueron utilizados para infestar los peces con *Caligus* obtenidos a T0, dos para infestar los peces con *Caligus* obtenidos a T12, dos con peces

infestados con *Caligus* T 48 y un estanque control que fue infestado con *Caligus* ISAv negativos provenientes de otra unidad experimental de Fundación Chile.

Los peces infestados con *Caligus* e infectados con el virus ISA fueron anestesiados con Aquí-S para recolectar en forma individual los *Caligus*. Se recolectaron sólo los estadios móviles (adultos). A los 8 días post-desafío con inóculo del virus ISA, se recolectaron 30 *Caligus* al azar de cada uno de los tres estanques con los peces troyanos. Los *Caligus* del muestreo fueron puestos en nitrógeno líquido y enviados al laboratorio de EWOS Innovation en Colaco, Calbuco. Por qRT-PCR se analizaron 10 *Caligus* de cada estanque para determinar si eran positivos para el virus ISA. Una vez que se determinó que los *Caligus* eran positivos, se extrajeron desde los peces infectados (troyanos)  $\sim 450$  *Caligus*, para cada periodo de tiempo. Los *Caligus* fueron puestos en fuentes de vidrio, de aproximadamente 5 L cada una, con agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV y con burbujeo constante de oxígeno.

La primera infestación con los *Caligus* recolectados desde los peces troyanos se realizó al día 10 post-inmunización de los peces con el inóculo de virus ISA. Los *Caligus* recolectados para T0, fueron lavados con agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV y colocados inmediatamente, en dos estanques, cada uno con 30 peces. Para realizar la infestación, el volumen de agua del estanque se redujo a la mitad y se detuvo el flujo de agua de mar por 8 h, luego se restableció el flujo de agua a la mitad durante 2 h; pasado este tiempo, se restableció el flujo normal de agua de mar. Durante este lapso, la fuente que contenía los *Caligus* fue puesta dentro del estanque. Durante el periodo de infestación se midió la concentración de oxígeno disuelto de manera de controlar que no fuera inferior al 85% de saturación. En el caso de T12 h, una vez extraídos los *Caligus* ( $\sim 450$ ) desde los peces troyanos, fueron mantenidos en la unidad experimental por 12 h en una fuente de vidrio con agua de mar filtrada, esterilizada y aireación constante, antes de realizar la infestación. Para la infestación se redujo el volumen de agua de mar de cada uno de los estanques y se detuvo el flujo de agua de mar durante 8 h, luego se restableció el flujo de agua a la mitad durante 2 h; y luego se restableció el flujo normal de agua de mar. En cada estanque se colocó una fuente de vidrio con los *Caligus*, que habían sido recolectados de los peces 12 h antes. Los  $\sim 450$  *Caligus* utilizados para infestar los peces a T48, se recolectaron junto con los *Caligus* que se utilizaron para T0 y T12, siendo dejados en el laboratorio en dos fuentes de vidrio con aireación constante por 48 h. El agua de cada una de estas fuentes fue cambiada diariamente. El procedimiento para la infestación fue el

mismo utilizado para realizar las infestaciones a T0 y T12 h. El mismo día que se efectuó la infestación a T0, se realizó la infestación del estanque control que contenía 30 peces infestados con 450 *Caligus* que provenían de otra unidad experimental de Fundación Chile y que estaban libres de virus ISA. Este análisis se realizó en el laboratorio de PCR de Ewos Innovation en Colaco, Calbuco. Esta infestación se realizó del mismo modo que las anteriores. Se realizó una segunda infestación al día 12 post-inoculación de los peces troyanos con virus ISA. Se efectuó exactamente el mismo protocolo que fue utilizado en la primera infestación, en cada uno de los estanques.

Cuando comenzaron a morir los peces de los diferentes estanques, se extrajeron los peces muertos, recolectando los *Caligus* adheridos al pez y se tomaron muestras de branquias y corazón que se almacenaron en alcohol al 70%. Estas muestras fueron analizadas por el Laboratorio Diagnostec, de Puerto Montt.

La presencia del virus ISA en las muestras analizadas se determinó mediante la técnica de qRT-PCR; para la extracción del RNA del virus se utilizó el protocolo de extracción mediante la técnica de Trizol (Invitrogen), descrita por Devold *et al.* (2000).

Se realizó la técnica de qRT-PCR TaqMan® de un solo paso con partidores y sondas específicos para el segmento 8 del virus ISA de acuerdo a lo descrito por Snow *et al.* (2006), sin límite de corte para los valores de Ct. Ct, son los valores umbral del ciclo (threshold cycle values). Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas específicas en la muestra original. Brevemente, 8 µL de RNA se agregaron a 12 µL de master mix, 1,13 µL de partidador directo e inverso del segmento 8 (20 mM cada uno) y 1,04 µL de la sonda del segmento 8 (6 µM).

Tiempos de reacción: 1 ciclo a 63°C por 3 min para formar el cDNA, seguido por la denaturación a 95°C por 3 seg y 45 ciclos de denaturación a 95°C por 15 s y alineamiento y extensión a 60°C por 1 min y finalmente 72°C por 1 min.

En forma paralela para cada muestra se utilizó como "house keeping gene" al factor  $\alpha$  de elongación del salmón del Atlántico (Olsvik *et al.*, 2005). Este factor de elongación se utiliza como un control interno de referencia para comprobar que tanto la extracción del RNA como el qRT-PCR han sido realizados correc-

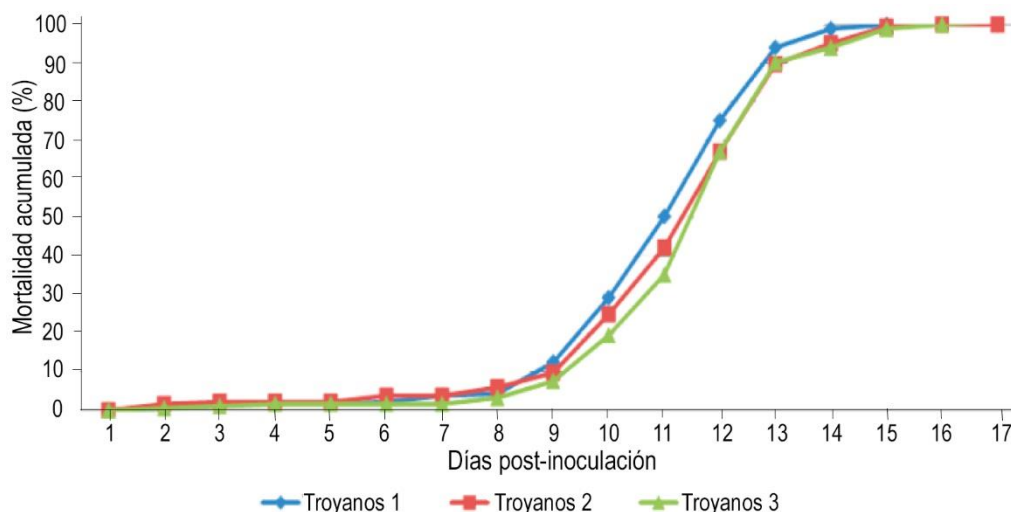
tamente. En esta prueba se realizaron dos blancos: el primero se obtiene cuando se hace la extracción de RNA del virus, para la cual en uno de los tubos Eppendorf no se coloca ningún tejido a homogenizar pero se siguen todos los pasos de la extracción, y el segundo blanco se obtiene al momento de realizar el real time RT-PCR, en cuyo caso en vez de tomar 8 µL de templado se colocan 8 µL de agua libre de RNAasa.

El porcentaje de la mortalidad acumulada de los peces inoculados con virus ISA que sirvieron como fuente de los parásitos portadores del virus se indica en la Figura 1. Se observó que al sexto día post-inoculación los peces comienzan a morir, por lo que la recolección de parásitos se realizó al día 10 y 12 (2 infestaciones) post-inoculación, tratando de asegurar que los parásitos tuvieran una alta carga viral e igualmente poder obtener un número suficiente de *Caligus* para realizar la siguiente etapa de la experiencia. La curva de mortalidad de los peces inyectados con un inóculo de virus ISA, presentó una curva de mortalidad característica para este desafío. Al cabo de 15 días murió el 100% de los peces.

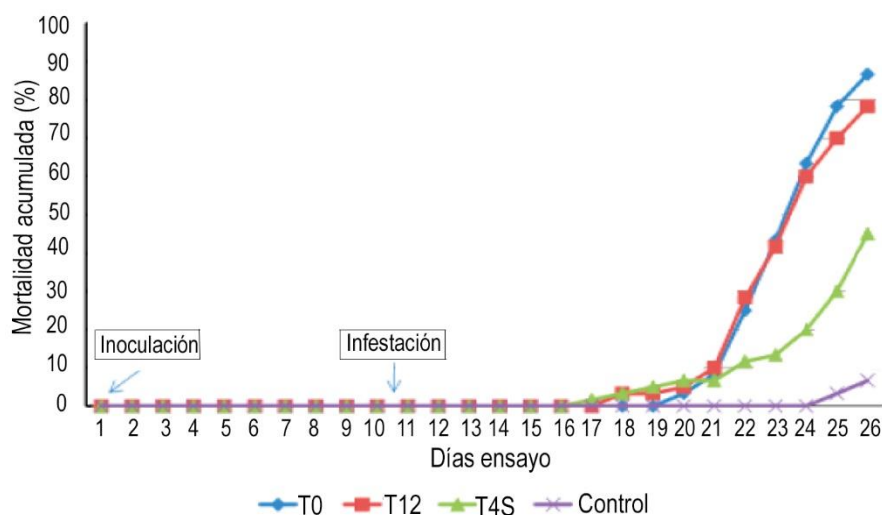
La mortalidad acumulada de los tres grupos infestados con parásitos ISA positivos más el grupo control, infestado con *Caligus* ISA negativos, se muestra en la Figura 2. Esta indica que al día 7 post-primera infestación, los peces infestados con *Caligus* portadores del virus ISA comienzan a morir. La mayor tasa de mortalidad se determinó en peces infestados con los *Caligus* recolectados a T0, llegando a 86,7% luego de 16 días post-primera infestación. La mortalidad acumulada fue concordante con los tiempos de infestación, observándose que a los 16 días post-infestación, el 86,7% de los peces infestados con *Caligus* T0 murieron, 78,3% de los peces infestados con *Caligus* T12 y 45,6% de los peces infestados con *Caligus* T48. La mortalidad de este último grupo mostró el debilitamiento de la capacidad infectiva del virus o una disminución de la carga viral en el parásito; en cambio, a T0 y T12 prácticamente no hay diferencia en el porcentaje de mortalidad acumulada.

Nylund *et al.* (1994), realizó una experiencia similar con peces sanos infestados con *Lepeophtheirus salmonis* portadores del ISAv, encontrando como resultado que estos parásitos tenían la capacidad de transmitir el virus ISA. Los peces infestados presentaron signos clínicos de la enfermedad y mortalidad; la mortalidad comenzó al día 5 post-infestación llegando a morir el 100% de los peces después de 30 días. En dicho ensayo la tasa de infestación de estos peces fue de 3-4 parásitos por pez.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que *Caligus* portadores de virus ISA tienen la capacidad de transmitir al virus y que la



**Figura 1.** Curva de mortalidad de peces inoculados intraperitonealmente con un inóculo de virus ISA.



**Figura 2.** Curvas de mortalidad de los peces sanos infestados con *Caligus* positivos para virus ISA.

tasa de mortalidad de los peces está en directa relación con la carga viral de los parásitos, ya que *Caligus* recién desprendidos de los peces producen una mayor tasa de mortalidad que los *Caligus* que permanecieron por más tiempo en el laboratorio, antes de parasitar a los peces sanos correspondientes. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que la carga viral presente en los parásitos disminuye a medida que transcurre el tiempo desde que los parásitos fueron desprendidos de los peces portadores de virus ISA. La tasa de mortalidad más alta (86%) se presentó en los *Caligus* recién extraídos de los peces portadores del virus ISA, luego con aquellos *Caligus* que permanecieron 12 h en el laboratorio (76% de mortalidad) y finalmente con los peces que fueron infestados con *Caligus* que permanecieron en el laboratorio por 48 h (45% de

mortalidad). En salmón del Atlántico infestado con *L. salmonis* portadores de IHNV se observó que hay una mayor mortalidad de los peces a medida que la carga viral de los parásitos es mayor, ya que es retenida por más tiempo al interior del parásito (Jacob *et al.*, 2011).

La mortalidad de los peces sanos infestados con *Caligus* portadores del virus ISA comienza al día 7 post-infestación, siendo la mortalidad acumulada luego de 10 días de 86 a 45% (dependiendo del periodo de permanencia de los parásitos en el laboratorio). Esta alta tasa de mortalidad en tan pocos días no se había descrito en ensayos similares. Sin embargo, un factor importante a considerar es que los peces tenían alta tasa de infestación, alrededor de 20 *Caligus*/pez, lo que produce un estrés crónico en los peces que los haría más susceptibles a otras enfermedades. Se ha descrito que el

estrés crónico produce un aumento en los niveles de cortisol plasmático los cuales producen un aumento de la mortalidad de peces (Pickering & Pottinger, 1989; Fast *et al.*, 2006). Además del aumento en los niveles de cortisol, también se ha descrito que a medida que aumenta la tasa de infestación se produce un mayor deterioro del epitelio lo que provocaría una falla osmoregulatoria además de permitir la entrada de otros patógenos (Nolan *et al.*, 1999; Bowers *et al.*, 2000).

Los peces infestados con *Caligus* negativos para ISAv tuvieron una mortalidad acumulada de 5%. La cuantificación del virus ISA por medio de la técnica de qRT-PCR en estos peces no demostró la presencia del virus, por lo que la mortalidad sería atribuida a otra causa. Este resultado corrobora que *C. rogercresseyi* es vector del virus ISA y tiene la capacidad de infectar salmones sanos.

### REFERENCIAS

- Almendras, F., I. Fuentealba, S. Jones, F. Markham & E. Spangler. 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis., 20: 409-418.
- Bouchard, D.A., K. Brockway, C. Giray, W. Keleher & P.L. Merrill. 2001. First report of infectious salmon anaemia (ISA) in the United States. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 21(2): 86-88.
- Bowers, J.M., A. Mustafa, D.J. Speare, G.A. Conboy, M. Brimacombe, D.E. Sims & J.F. Burka. 2000. The physiological response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. J. Fish Dis., 23: 165-172.
- Boxshall, G.A. & S. Bravo. 2000. On the identity of the common *Caligus* (Copepoda: *Siphonostomatoida*: *Caligidae*) from salmonid net pen systems in southern Chile. Contr. Zool., 69: 137-146.
- Bravo, S. 2008. Coordinación es la mejor forma de enfrentar al *Caligus*. Aqua. <http://www.aqua.cl/entrevista/entrevista.php?doc=186>. Revisado: 3 Abril 2014.
- Carvajal, J., L. González & M. George-Nascimento. 1998. Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. Aquaculture, 166: 241-246.
- Devold, M., B. Krossoy, V. Aspehaug & A. Nylund. 2000. Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAv) in carrier sea trout (*Salmo trutta*) after experimental infection. Dis. Aquat. Organ., 40: 9-18.
- Falk, K., E. Namork, E. Rimstad, S. Mjaaland & B.H. Dannvig. 1997. Characterization of infectious salmon anaemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Virol., 71: 9016-9023.
- Fast, M.D., D.M. Muise, R.E. Easy, N.W. Ross & S.C. Johnson. 2006. The effects of *Lepeophtheirus salmonis* infections on the stress response and immunological status of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Shellfish Immunol., 21: 228-241.
- Godoy, M.G., A. Aedo, M.T.J. Kibenge, D.B. Groman, C.V. Yason, H. Grothusen, A. Lisperguer, M. Calbucura, F. Avendaño, M. Imilán, M. Jarpa & F.S.B. Kibenge. 2008. First detection, isolation and molecular characterization of infectious Salmon anaemia virus associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Vet. Res., 4: 28.
- González, L., J. Carvajal & M. George-Nascimento. 2000. Differential infectivity of *Caligus flexispina* (Caligidae: Copepoda) in 3 salmonid host species cultivated in Chile. Aquaculture, 183: 13-23.
- González, L. & J. Carvajal. 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. Aquaculture, 220: 101-117.
- Gustafson, L.L., S.K. Ellis & C.A. Bartlett. 2005. Using expert opinion to identify risk factors important to infectious salmon anemia (ISA) outbreaks on salmon farms in Maine, USA and New Brunswick, Canada. Prev. Vet. Med., 70: 17-28.
- Hammell, K.L. & I.R. Dohoo. 2005. Risk factors associated with mortalities attributed to infectious salmon anemia virus in New Brunswick, Canada. J. Fish Dis., 28: 651-661.
- Hastein, T. 1997. Workshop of infectious salmon anaemia. St. Andrews, New Brunswick, Canada, 92 pp.
- Jacob, E., D.E. Barker & K.A. Garver. 2011. Vector potential of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in the transmission of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV). Dis. Aquat. Organ., 97: 155-165.
- Jarp, J. & E. Karlsen. 1997. Infectious salmon anemia (ISA) risk factors in sea-cultured Atlantic salmon, *Salmo salar*. Dis. Aquat. Organ., 28: 79-89.
- Kibenge, F.S.B., O.N. Gárate, G. Johnson, R. Arriagada, M.J.T. Kibenge & D. Wadowska. 2001. Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from coho salmon in Chile. Dis. Aquat. Organ., 45: 9-18.
- Krossoy, B., I. Hordvik, F. Nilsen, A. Nylund & C. Endresen. 1999. The putative polymerase sequence of infectious salmon anaemia virus suggests a new genus within the *Orthomyxiviridae*. J. Virol., 73: 2136-2142.
- Lyngøy, C. 2003. Infectious salmon anaemia in Norway and the Faroe islands: an industrial approach. In: O. Miller & R.C. Cipriano (Tech. Coord.). International response to infectious salmon anaemia: prevention, control, and eradication. Proceedings of a Symposium.

- New Orleans, L.A. 3-4 September, 2002, Tech. Bull., 1902: 97-109.
- Lyngstad, T.M., P.A. Jansen, H. Sindre, C.M. Jonassen, M.J. Hjortaa, S. Johnsen & E. Brun. 2008. Epidemiological investigation of infectious salmon anaemia (ISA) outbreaks in Norway 2003-2005. *Prev. Vet. Med.*, 84: 213-227.
- McClure, C.A., K.L. Hammell & I.R. Dohoo. 2005. Risk factors for outbreaks of infectious anemia in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Prev. Vet. Med.*, 72: 263-280.
- Mjaaland, S., E. Rimstad, K. Falk & B.H. Dannevig. 1997. Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *J. Virol.*, 71: 7681-7686.
- Mullins, J.E., D. Groman & D. Wadowska. 1998. Infectious salmon anaemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 18(4): 110-114.
- Munir, K. & F.S. Kibenge. 2004. Detection of infectious salmon anaemia virus by real-time RT-PCR. *J. Virol. Meth.*, 117: 37-47.
- Murray, A.G., R.J. Smith & R.M. Stagg. 2002. Shipping and spread of infectious salmon anemia in Scottish aquaculture. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 1-5.
- Nolan, D.T., P. Reilly & S.E. Wendelaar-Bonga. 1999. Infection with low numbers of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* induces stress-related effects in postsmolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 56: 947-959.
- Nylund, A., B. Bjorknes & C. Wallace. 1991. *Lepeophtheirus salmonis*-a possible vector in the spread of diseases on salmonids. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 11: 213.
- Nylund, A. & P. Jakobsen. 1995. Sea trout as a carrier of infectious salmon anaemia virus. *J. Fish Biol.*, 47: 174-176.
- Nylund, A., C. Wallace & T. Hovland. 1993. The possible role of *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer) in the transmission of infectious salmon anaemia. In: G. Boxhall & D. Defaye (eds.). *Pathogens of wild and farmed fish: sea lice*, Ellis Horwood, London, pp. 367-373.
- Nylund, A., T. Hovland, K. Hodneland, F. Nilsen & P. Løvik. 1994. Mechanisms for transmission of infectious salmon anaemia (ISA). *Dis. Aquat. Organ.*, 19: 95-100.
- Nylund, A., B. Krossoy, M. Devold, V. Asphaug, N.O. Steine & T. Hovland. 1998. Outbreak of ISA during first feeding of salmon fry (*Salmo salar*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 19: 71-74.
- Olsvik P.A., K. Kai, A.O. Jordal, T.O. Nilsen & I. Hordvik. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol. Biol.*, 2005: 6: 21.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2006. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. París, versión on line. <http://www.oie.int>.
- Pickering, A.D. & T.G. Pottinger. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 253-258.
- Ritchie, R.J., M. Cook, K. Melville, N. Simard, R. Cusack & S. Griffiths. 2001. Identification of infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon from Nova Scotia (Canada): evidence for functional strain differences. *Dis. Aquat. Organ.*, 44: 171-178.
- Rodger, H.D., T. Turnbull, F. Muir, S. Millar & R.H. Richards. 1998. Infectious salmon anaemia (ISA) in the United Kingdom. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 18: 115-116.
- Rolland, J.B. & A. Nylund. 1998. Sea running brown trout: carrier and transmitter of infectious salmon anaemia virus (ISAv). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 18: 50-55.
- Rowley, H.M., S.J., Campbell, W.L. Curran, T. Turnbull & D.G. Bryson. 1999. Isolation of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Scottish farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 22: 483-487.
- Rozas, M. & G. Ascencio. 2007. Evaluación de la situación epidemiológica de Caligiasis en Chile: hacia una estrategia de control efectiva. *Salmociencia*, 2: 43-59.
- Scheel, I., M. Aldrin, A. Frigessi & P.A. Jansen. 2007. A stochastic model for infectious salmon anemia (ISA) in Atlantic salmon farming. *J. R. Soc. Interface*, 4: 699-706.
- Snow, M., P. McKay, A.J. McBeath, J. Black, F. Doig, R. Kerr, C.O. Cunningham, A. Nylund & M. Devold. 2006. Development, application and validation of a Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev. Biol. (Basel)*, 126: 133-145.
- Thorud, K.E. & H.O. Djupvik. 1988. Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 8: 109-111.
- Totland, G.K., B.K. Hjeltnes & P.R. Flood. 1996. Transmission of infectious salmon anaemia (ISA)

through natural secretions and excretions from infected smolts of Atlantic salmon, *Salmo salar*, during their presymptomatic phase. Dis. Aquat. Organ., 26: 25-31.

Wootton, R., J. Smith & E. Needham. 1982. Aspects of the biology of the parasitic copepods *Lepeophtherius salmonis* and *Caligus elongatus* on farmed salmonids, and their treatment. Proc. R. Soc. Edimb., 81: 185-197.

*Received: 17 July 2014; Accepted: 10 March 2015*