



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *rpoS* EN
PISCIRICKETTSIA SALMONIS EN INDIVIDUOS SUSCEPTIBLES
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

Yasna Molina Carvajal

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR MARTÍNEZ MONCADA
Universidad de Chile

FONDECYT 1120608

SANTIAGO, CHILE
2015



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *rpoS* EN
PISCIRICKETTSIA SALMONIS EN INDIVIDUOS SUSCEPTIBLES
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE**

Yasna Molina Carvajal

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

Nota Final:

Nota: Firma:

| | | | |
|----------------------|------------------|-------|-------|
| Profesor Guía: | Víctor Martínez. | | |
| Profesor Consejero: | Sergio Bucarey. | | |
| Profesora Consejera: | Julio Larenas. | | |

FONDECYT 1120608

SANTIAGO, CHILE
2015

INDICE

| | |
|---|-----------|
| INDICE | I |
| RESUMEN | II |
| ABSTRACT | II |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| OBJETIVO GENERAL | 7 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 7 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| 1. Identificación de <i>rpoS</i> en <i>P. salmonis</i> LF-89..... | 8 |
| 2. Extracción del RNA total..... | 9 |
| 2.1 Cultivos celulares utilizados como control | 9 |
| 3. Transcripción Reversa (TR)..... | 10 |
| 4. Diseño de partidores | 10 |
| 5. PCR en tiempo real (qPCR)..... | 11 |
| 5.1 Matriz de partidores..... | 12 |
| 5.2 Curva de Eficiencia..... | 12 |
| 5.3 Expresión de <i>rpoS</i> en muestras de peces desafiados y placas de agar | 13 |
| 6. Análisis de la Expresión | 14 |
| 7. Análisis Estadístico..... | 14 |
| RESULTADOS | 15 |
| 1. Identificación de <i>rpoS</i> | 15 |
| 2. Partidores | 15 |
| 4. qPCR..... | 16 |
| 4.1 Curva de fusión y concentración óptima de partidores | 16 |
| 4.2 Eficiencia de Amplificación | 17 |
| 5. Expresión de <i>rpoS</i> en Salmones del Atlántico desafiados con <i>P. salmonis</i> | 18 |
| DISCUSION | 21 |
| CONCLUSIÓN | 26 |
| BIBLIOGRAFÍA | 27 |
| ANEXOS | 29 |

RESUMEN

La Piscirickettsiosis (también conocida como síndrome rickettsial del salmón), producida por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, es hoy en día una de las enfermedades que mayores pérdidas causa a la economía, en la industria acuícola del país. Dada su aparición en 1989, en el sur de Chile, la información sobre la infección y sus estrategias de sobrevivencia en el hospedero, son aún todavía escasas. Recientemente, se ha logrado secuenciar el genoma de *P. salmonis*, pero la anotación y transcriptoma de la bacteria es aún desconocido. Con el fin de conocer un poco más acerca de la estrategia utilizada por *P. salmonis* para sobrevivir y producir la enfermedad en los peces, en este ensayo se identificó y evaluó, a través de qPCR, la expresión del gen *rpoS* factor sigma alternativo implicado en la respuesta al estrés en varias Gammaproteobacterias

Palabras claves: Salmón, *Piscirickettsia salmonis*, gamaproteobacterias, genes de resistencia bacterianos, *rpoS*, qPCR,

ABSTRACT

The Piscirickettsiosis disease (also known as salmon rickettsial syndrome), produced by the bacteria *Piscirickettsia salmonis*, is nowadays one of the diseases that causes the biggest economics losses on aquaculture industry in the country. Given its apparition in 1989, on the South of Chile, the information about the infection and its surviving strategies on the host is still scarce. Recently, it has been achieved to sequence the genome of *P. salmonis*, but the annotation and transcriptome of the bacterial is still unknown. In order to know a little more about the strategy used by *P. salmonis* to survive and produce the disease in the fish, this assay was able to identify and evaluate through qPCR, the stress resistance gene *rpoS* alternative sigma factor involved in the stress response on several Gammaproteobacterias.

Key words: Salmon, *Piscirickettsia salmonis*, gamaproteobacterias, bacterial resistance genes, *rpoS*, qPCR

INTRODUCCIÓN

La industria acuícola representa un sector de gran importancia en la economía nacional, siendo actualmente el cuarto sector exportador del país (Figuroa *et al.*, 2011). El cultivo de salmónidos es una de las principales actividades relacionadas con la acuicultura a nivel nacional, pues genera los productos acuícolas con mayor valor económico a nivel mundial. Al igual que en otros sistemas intensivos de producción animal, el éxito depende en gran medida del control de las enfermedades infecciosas, lo que constituye una de las mayores amenazas durante el ciclo de producción. Previa y posterior a la aparición del virus ISA, la enfermedad más perjudicial que ha afectado a la salmonicultura en Chile, es el síndrome rickettsial del salmón o piscirickettsiosis (Figuroa *et al.*, 2011). El agente causal de la enfermedad, es la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. Poco se sabe acerca de su patogenicidad, los mecanismos por los cuales es capaz de persistir en el hospedero y escapar de la respuesta inmune montada por este, lo que ha influido en que las medidas utilizadas para su prevención y tratamiento aún no muestren resultados significativos.

En los estudios de desafío realizados a la fecha, se ha medido la expresión génica del hospedero frente a *P. salmonis*, evaluando su respuesta inmune y como la bacteria podría evadirla, produciendo la patología (Rise *et al.*, 2004; Tacchi *et al.*, 2011). Sin embargo, no existen estudios que evalúen la expresión génica del patógeno, ni su estrategia infectiva y de supervivencia.

En este trabajo proponemos evaluar la respuesta de la bacteria en individuos susceptibles infectados experimentalmente. Durante la infección, la respuesta inmune montada por el hospedero debe inducir en la bacteria la expresión de una respuesta que le permita sobrevivir frente a las condiciones limitantes y adversas. En los individuos susceptibles la respuesta de la bacteria debe ser exitosa, permitiendo su replicación y supervivencia, pese a las condiciones de estrés que debe enfrentar en este ambiente.

Para conocer la estrategia de supervivencia de la bacteria, se estudió la respuesta transcripcional del gen de resistencia al estrés *rpoS*, el cual codifica para el factor sigma alternativo *rpoS*, implicado en la respuesta al estrés en distintas Gammaproteobacterias (clase a la que pertenece *P. salmonis*). Se identificó y evaluó la expresión de este gen en *P. salmonis*

cepa LF-89, en muestras provenientes de peces sometidos a un desafío experimental, lo que permitió determinar que efectivamente *rpoS* es expresado por la bacteria en el hospedero.

Finalmente, conocer los genes expresados por *P. salmonis* en condiciones adversas, constituye una herramienta esencial para entender cabalmente la estrategia de patogenicidad de la bacteria y generar nuevos mecanismos orientados a establecer un control efectivo y sustentable de la piscirickettsiosis.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El síndrome rickettsial del salmón (SRS) o piscirickettsiosis, producido por la bacteria *P. salmonis*, la primera bacteria intracelular Gram-negativa aislada en peces, es una de las enfermedades que genera mayores pérdidas a la industria salmonera nacional (Rojas, 2007). Esta bacteria fue aislada inicialmente en Chile en 1989, desde salmones de cultivo afectados por altas mortalidades (Fryer *et al*, 199). Es un microorganismo inmóvil, de metabolismo aerobio, no encapsulada, pleomórfico, predominantemente cocoide, con un diámetro de 0,2 a 1,5 μm , que se multiplica en vacuolas citoplasmáticas de las células infectadas (Rojas *et al.*, 2009). Inicialmente, la bacteria sólo era cultivable en líneas celulares eucarióticas, pero reportes recientes muestran que también puede ser cultivada en medios con agar y líquidos enriquecidos con cisteína, lo que demuestra la naturaleza intracelular facultativa de este patógeno (Mikalsen *et al*, 2008; Yañez *et al*, 2012).

Las epizootias típicamente ocurren 10 a 12 semanas después de que los peces sanos se introducen en agua de mar y los brotes pueden durar hasta 10 semanas y luego desaparecer (Cvitanich *et al*, 1991). La mortalidad acumulada ha variado entre 30 a 90% (Fryer y Hedrick, 2003).

Actualmente, hay escasos antecedentes sobre la estrategia infectiva de la bacteria y la respuesta inmune del hospedero frente a esta. El organismo piscirickettsial infecta una amplia variedad de células, incluyendo macrófagos circulantes y replica unida a la membrana dentro de vacuolas intracitoplasmáticas (Cvitanich *et al*, 1991). Aunque un variado número de organismos se observan con frecuencia dentro de estas vacuolas intracitoplasmáticas, *P. salmonis* también se ha encontrado extracelularmente como resultado de lisis celular (Almendras y Fuentealba, 1997). Estudios realizados en individuos susceptibles desafiados experimentalmente con la bacteria, han demostrado que esta es capaz de replicar dentro de macrófagos, lo que indica que hay una interferencia impulsada por la bacteria en la maduración endosomal, inhibiendo la unión fagosoma-lisosoma, proceso que garantiza la supervivencia del patógeno (Rojas, 2007).

Por otro lado, a través de estudios de microarreglo, se ha estudiado la respuesta inmune y fisiológica desarrollada en el salmón del Atlántico. Estos experimentos han permitido

identificar genes que son transcritos diferencialmente frente a la infección con *P. salmonis*. Rise *et al.* (2004), evaluaron la expresión génica de macrófagos *in vitro* y tejido hematopoyético renal *in vivo* de salmónes del Atlántico desafiados. Se identificaron diez genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo inducidos en macrófagos infectados, pero no en tejido hematopoyético renal, por lo que los cambios en el estado redox de los macrófagos infectados podría permitir a estas células resistir la infección por *P. salmonis*.

La menor expresión de los genes que participan en la respuesta inmune adaptativa en el riñón hematopoyético infectado, pero no en los macrófagos infectados pueden contribuir al daño en el tejido renal. En otro estudio realizado por Tacchi *et al.* (2011), también en salmón del Atlántico, se midió la respuesta transcripcional del tejido hematopoyético renal, hígado y tejido muscular frente a la infección con *P. salmonis*. De los resultados obtenidos, destaca la inducción de los genes implicados en la respuesta oxidativa e inflamatoria, indicativo de la activación de la respuesta inmune innata. La supresión de los genes implicados en la respuesta inmune adaptativa, como la vía de señalización de la proteína G, y el proceso de apoptosis, pueden ser el reflejo de los mecanismos utilizados por *P. salmonis* para sobrevivir, replicar, y escapar de las defensas del hospedero. Sin embargo, aún no hay información específica del comportamiento de la bacteria en el hospedero, ni los mecanismos por los cuales esta es capaz de evadir la respuesta inmune, sobrevivir y consecuentemente producir la enfermedad. Por esto, el propósito de este estudio es aproximarse a una posible estrategia de sobrevivencia montada por la bacteria. Todas las bacterias deben enfrentar ambientes desfavorables, que limitan su tasa de crecimiento. Con el fin de sobrevivir a los cambios repentinos y potencialmente letales en los entornos en que se enfrentan, las bacterias deben ser capaces de detectar y responder rápida y adecuadamente a una amplia gama de factores estresores.

Una de las bacterias reconocidas por su capacidad de resistir numerosos factores estresantes, y además profundamente estudiada, son los serovares de *Salmonella entérica*, agentes frecuentes de enfermedad transmitida por los alimentos en todo el mundo. Como grupo, los serovares de *Salmonella* son reconocidos por su capacidad de adaptación para crecer y/o sobrevivir en un amplio rango de ambientes estresantes como: pH extracelular bajo a 3,99 o superior a 9,5, concentración de sal de hasta 4% Vw^{-1} NaCl y temperaturas de hasta 54 ° C o bajo 2 ° C. Estos ambientes críticos pueden tener un efecto significativo en la supervivencia de *Salmonella* durante el procesamiento, preparación y almacenamiento de alimentos, así como

su paso por el organismo hospedero y aunque pueden subsistir en estas condiciones, lo harán en estado de latencia o estado viable pero no cultivable, estrategia que le permite a la bacteria sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados (Spector y Kenyon, 2011).

Se han estudiado la expresión de numerosos genes implicados en la reprogramación de *Salmonella* y otras bacterias durante la adaptación a distintas condiciones ambientales y en el hospedero, lo que exige cambios coordinados en la expresión génica que permiten el uso eficiente de metabolitos y aumento de la supervivencia. Una importante forma de control génico es mediante el uso de factores sigma alternativos. Uno de ellos es el factor sigma *rpoS*, presente en muchas bacterias Gram-negativas (Dong *et al*, 2008).

Los factores sigma son reguladores de la actividad de la RNA polimerasa (enzima que lleva a cabo la transcripción de la información genética de DNA a RNA), y están implicados en el reconocimiento de los promotores (secuencias específicas de DNA a los que se une la RNA polimerasa). Un organismo determinado puede tener varios factores sigma diferentes; *E. coli* codifica 7, *Bacillus subtilis* codifica 17 (Madigan *et al*, 2003).

El factor sigma *rpoS*, juega un papel crítico en la expresión génica, regulando los genes que se requieren para la entrada, supervivencia y salida de la fase estacionaria de crecimiento (Majdalani *et al*, 2001). En *Salmonella*, el factor sigma *rpoS* es necesario para la transcripción de genes involucrados en la adaptación a ambientes estresantes, tales como shock ácido, agotamiento de nutrientes y estrés oxidativo. También se expresa *in vivo* en el medio intracelular eucariota. Como consecuencia una cepa *rpoS* mutante es incapaz de sobrevivir prolongadamente en un medio sin nutrientes o en ambientes de bajo pH (Rychlik y Barrow, 2005).

En otras bacterias, *rpoS* también regula la respuesta a condiciones de estrés. En *Pseudomona aeruginosa*, una cepa *rpoS* mutante es más sensible a privación de carbono, shock térmico a 50 °C, alta osmolaridad, y exposición prolongada a altas concentraciones de H₂O₂ respecto a la cepa no mutante (Suh *et al*, 1999). En *Legionella pneumophila*, *rpoS* está implicado en la supervivencia de esta dentro de un hospedero protozoario y en la tolerancia al estrés y virulencia del patógeno *Erwinia carotovora* (Majdalani *et al*, 2001)

En *E. coli*, *rpoS* permite la permanencia en estado viable pero no cultivable, ya que mutantes inactivados para el gen, son incapaces de activar esta estrategia de supervivencia y mueren rápidamente, en comparación a cepas no mutantes (Boaretti *et al*, 2003).

En este contexto, se propone identificar y medir la expresión del gen *rpoS*, posiblemente expresado frente a condiciones limitantes en *P. salmonis*, en salmones del Atlántico infectados experimentalmente con la bacteria.

Primero, con el fin de identificar el gen *rpoS* en *P. salmonis*, se utilizará genómica comparativa, definida como un campo dentro de la biología investigativa en el cual secuencias de genomas de distintas especies son comparadas. Esto permitirá evaluar el genoma de *P. salmonis* y el gen *rpoS* de distintas *Gammaproteobacterias*. Una vez identificado el gen, se medirán los niveles de expresión mediante la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR). De este modo, se dispondrá de nuevos antecedentes que posibiliten entender de mejor manera la estrategia de sobrevivencia de la bacteria y la interacción hospedero-patógeno, pudiendo así generar nuevas estrategias que permitan un control efectivo y sustentable de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión del gen *rpoS* en *Piscirickettsia salmonis* LF-89 en salmones del Atlántico susceptibles, infectados experimentalmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Utilizar genómica comparativa para identificar la secuencia del gen *rpoS* en *P. salmonis* LF-89.
2. Determinar la expresión diferencial del gen *rpoS* en *P. salmonis* LF-89, en riñón anterior, bazo e hígado de individuos susceptibles a la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Identificación de *rpoS* en *P. salmonis* LF-89

Para identificar el gen *rpoS* en *P. salmonis*, se alineó la secuencia de este factor sigma alternativo entre bacterias filogenéticamente asociadas a *Piscirickettsia salmonis* (seleccionadas desde la base de datos disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>). Estas corresponden a *Salmonella typhi* (número de acceso de la secuencia: NC_003198.1), *Salmonella typhimurium* (número de acceso de la secuencia: NC_017046.1), *Escherichia coli* (número de acceso de la secuencia: NC_000913.3), *Legionella pneumophila* (número de acceso de la secuencia: NC_006368.1) y *Shigella boydii* (número de acceso de la secuencia: NC_007613.1) todas Gammaproteobacterias, al igual que *P. salmonis*. El alineamiento fue realizado mediante el programa CLC Genomics Workbench 3.6.5©. De este modo, se logró identificar y seleccionar una región conservada del gen entre estas bacterias. Esta secuencia fue utilizada para realizar un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con los contigs disponibles de *P. salmonis* LF-89 (GenBank: AMFF00000000.1) disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esto permitió detectar alineamientos coincidentes entre la región conservada de *rpoS* (entre las distintas bacterias) y los contigs de *P. salmonis*. De este modo se identificó la secuencia del gen *rpoS* en *P. salmonis* y se diseñaron los partidores, para los ensayos de expresión génica, en distintas regiones del gen *rpoS* candidato, mediante el software GeneFisher®. Posteriormente los partidores se evaluaron mediante el software NetPrimer© con el objetivo de optimizarlos y evitar así la formación de estructuras secundarias que interfieren con el qPCR. Las muestras a evaluar en el ensayo de qPCR corresponden a RNA obtenido desde un cultivo celular infectado con la bacteria, utilizado como control, y muestras de riñón anterior, hígado y bazo provenientes de un desafío experimental con *P. salmonis* en salmones del Atlántico.

2. Extracción del RNA total

2.1 Cultivos celulares utilizados como control

P. salmonis se aisló desde cultivos celulares CHSE-214. Las células infectadas fueron incubadas a 16°C en medio esencial mínimo (MEM), suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se obtuvo una alícuota de 1 ml del sobrenadante de las placas infectadas que presentaron efecto citopático, la que se centrifugó a 2.500 rpm por cinco minutos a 4°C. El pellet obtenido se utilizó para la extracción del RNA bacteriano mediante el uso del “kit” TRIzol® Reagent (Ambion®) según instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue almacenado a -80°C. Estas muestras fueron utilizadas como control en los ensayos de qPCR.

2.2 Desafío *in vivo*

Las muestras evaluadas correspondieron a salmones del Atlántico (*Salmo salar*) sometidos a un desafío experimental con *P. salmonis*. Cien peces fueron anestesiados con 0,1 mg mL⁻¹ 12 MS-Tricaina 222 y desafiados por inyección intraperitoneal con una dosis de 0,2 x10^{4,8} TCID₅₀⁻¹ de *P. salmonis* en un volumen de inoculación de 0,1 ml. Al día 22 y 24 post inoculación se tomaron las muestras desde distintas familias de peces con signología clínica, grupo denominado como susceptibles. Las muestras de riñón anterior, hígado y bazo fueron removidas en 1 ml de RNAlater (Sigma).

La extracción de RNA total se realizó mediante el “kit” Gene Purification (Fermentas®) a partir de 10 mg de tejido de bazo y 30 mg de hígado y riñón anterior, siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenó -80° C.

Con la finalidad de evaluar la eficiencia del sistema de extracción de RNA total utilizado, tanto para las muestras de cultivo celular y peces desafiados, se realizó la cuantificación de RNA mediante fluorometría en equipo Qubit (Invitrogen).

3. Transcripción Reversa (TR)

Las muestras de RNA obtenidas (tanto *in vivo* como *in vitro*) se trataron con DNase I, RNase-free (Thermo scientific®), eliminando la posible contaminación con DNA. El RNA fue transcrito a cDNA usando el “kit” SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen®) usando hexámeros al azar como sigue: 200 ng de RNA total y hexámeros al azar (50 ng/ul) mezclados en un volumen total de 10 uL. La mezcla se calentó a 65°C por 5 min y luego se refrigeró en hielo. Las muestras fueron ajustadas con reactivos para obtener un volumen final de 20 uL conteniendo lo siguiente: 10x RT buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, 40 U RNaseOUT y 50 U SuperScript II transcriptasa reversa. La reacción se incubó a 42°C por 50 min, deteniendo la reacción por incubación a 70°C por 15 min. Se centrifugó brevemente y agregó 2 U de RNasa H, inmediatamente se incubó por 20 min a 37°C. Se midió la concentración de cDNA con el fluorímetro Qubit Molecular Probes (Invitrogen®). Finalmente el cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso en los ensayos de qPCR.

4. Diseño de partidores

Se han publicado recientemente los contigs de *P. salmonis*, los que fueron utilizados para la identificación del gen *rpoS in silico*, como fue descrito anteriormente en el punto 1 de Material y Métodos. Para la amplificación del gen *rpoS* mediante los ensayos de qPCR en *P. salmonis*, se diseñaron partidores dentro del ORF identificado como gen *rpoS*. Se escogieron secuencias al azar dentro del ORF, obteniendo amplicones de entre 100 y 200 pares de bases (pb) que se importaron al programa web GeneFisher2.0 (Bielefeld University Bioinformatics Server), para el diseño de los partidores. Una vez generados, se analizaron con el software Netprimer (Premier Biosof Internacional) programa que entrega la temperatura de melting del partidor y además analiza las estructuras secundarias, incluyendo horquillas, autodímeros y dímeros cruzados. Con esta información se seleccionó el juego de partidor que presentó las siguientes características: contenido de guanina y citosina entre 30 y 60%, temperaturas de fusión entre 50 a 60 °C, longitud de partidores entre 18 a 22 pb (Fraga *et al*, 2008). En la Tabla 2, se observa la secuencia y eficiencia del juego de partidor seleccionado para la amplificación del gen *rpoS*.

5. PCR en tiempo real (qPCR)

El ensayo de qPCR se realizó por el sistema de dos pasos de q-PCR en el termociclador Eco™ Real-Time PCR System de Illumina®. Las condiciones de tiempo y temperatura durante cada ciclo del ensayo, se ajustaron a las recomendadas por el fabricante del “kit” utilizado, KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems) y fueron: 3 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa, 3 segundos a 95°C para la denaturación y 30 segundos a 60°C para alineación y extensión. Las cantidades de solución de cada reacción fueron de 10 ul, según las cantidades indicadas por el fabricante y se describen en el anexo 1. Cada muestra se analizó en duplicado (Tabla 1). Se incluyeron tres controles negativos, que contienen todos los componentes del kit a excepción del templado o cDNA, más una muestra del aislado bacteriano, utilizada como control positivo.

Previo al análisis de expresión, se estandarizó y optimizó el ensayo de qPCR, obteniendo la matriz de partidores y curva de eficiencia para el juego de partidores seleccionado. Se utilizó como templado el cDNA obtenido de las muestras del aislado bacteriano.

Tabla 1. Órganos, familias y réplicas utilizados para el ensayo de q-PCR

| Órgano | Familia | Replicas biológicas | Replicas técnicas |
|----------------|------------|---------------------|-------------------|
| riñón anterior | familia 61 | 2 | 2 |
| riñón anterior | familia 32 | 2 | 2 |
| bazo | familia 8 | 2 | 2 |
| hígado | familia 8 | 2 | 2 |
| bazo | familia 36 | 2 | 2 |
| hígado | familia 36 | 2 | 2 |

Las réplicas biológicas permiten estimar la variación a nivel de población, en este caso corresponden a los órganos de distintos individuos.

Las réplicas técnicas corresponden a réplicas del mismo material biológico, en este caso, réplicas de cDNA de cada individuo analizado, lo que permite estimar el error experimental.

5.1 Matriz de partidores

Para evaluar la amplificación específica de la secuencia del gen *rpoS* y también para conocer la concentración óptima de partidores a utilizar en los ensayos de qPCR, se realizó un ensayo qPCR en el que se utilizó como templado el cDNA de los cultivos celulares infectados con la bacteria y distintas concentraciones del partidador seleccionado.

Los partidores liofilizados fueron reconstituidos a 100 uM y se alicuotaron a 10 uM para su uso. Se evaluaron cuatro diferentes concentraciones: 0,05 uM, 0,1 uM, 0,15 uM y 0,2 uM, (según las recomendaciones del fabricante) tanto para Forward como Reverse, obteniendo dieciséis posibles combinaciones. Cada una de las reacciones se realizó en duplicado.

La elección de la concentración óptima de partidador se definió en base a los valores C_T (C_T , del inglés *threshold cycle*), que representa el ciclo de amplificación de la qPCR en el cual la detección de DNA de doble hebra, por medio de fluorescencia, supera el nivel umbral, es decir, supera la fluorescencia basal.

Se eligió la concentración con menor valor C_T y menor desviación estándar entre repeticiones.

5.2 Curva de Eficiencia

Para obtener comparaciones validas entre las diferentes muestras evaluadas en el estudio, es importante determinar la eficiencia de amplificación de los partidores. Para esto, es necesario realizar el qPCR sobre diluciones seriadas del templado, también conocido como curva estándar. Teóricamente, una reacción de PCR procede con un 100% de eficiencia, es decir en una reacción ideal de PCR cada amplicón será replicado y la cantidad de producto será el doble luego de cada ciclo. Esto ocurre solamente durante la fase temprana de amplificación.

Esquematisando los valores C_T por el logaritmo de cada dilución seriada se generará un gráfico cuya pendiente está relacionada con la eficiencia de la reacción. La pendiente de esta línea y la eficiencia de amplificación pueden relacionarse usando la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/pendiente)}$$

Donde E, es la eficiencia de la reacción y *pendiente* se refiere a la pendiente del gráfico de valores C_T versus el logaritmo de la cantidad de templado inicial. Una pendiente entre -3.6 y -3.1 corresponde a una eficiencia entre 90% a 110% (Fraga *et al*, 2008).

La eficiencia de amplificación de la PCR fue estimada a partir de la muestra control de cDNA del cultivo celular infectados con *P. salmonis* y el juego de partidores del gen *rpoS*.

Se realizó una dilución seriada a 8 puntos, con una concentración inicial de 1 ng de templado en la primera dilución, utilizando un factor de dilución de 2.5 por punto. Se utilizó la concentración de partidores seleccionada como óptima (visto anteriormente en el punto 5.1 de Material y Métodos). Cada una de las reacciones fue realizada en triplicado.

5.3 Expresión de *rpoS* en muestras de peces desafiados

La expresión del gen *rpoS* fue evaluada en los peces susceptibles a la infección experimental con *P. salmonis*. Para este ensayo de qPCR, se utilizaron los protocolos anteriormente vistos en el punto 5 de Material y Métodos, con la concentración óptima de partidores. Cada reacción se realizó en duplicado.

6. Análisis de la Expresión

Para una correcta cuantificación de los datos de expresión génica obtenidos en un ensayo de qPCR, es necesario normalizar los resultados, es decir, corregir la variación entre cada muestra. Esto debido a que las muestras obtenidas desde distintos individuos, en el caso de este estudio, los peces desafiados con *P. salmonis*, usualmente varían en la cantidad de masa del tejido o número de células e integridad y/o cantidad del RNA. Por lo tanto, los resultados del qPCR deben ser normalizados contra un gen control o gen de referencia, que debe tener la característica de ser expresado sin cambios, independiente de las condiciones experimentales (Wong y Medrano, 2005).

Debido al escaso conocimiento y la reciente secuenciación del genoma de *P. salmonis*, no existen estudios sobre genes que puedan comportarse como genes de referencia en esta especie. En este caso, se utilizó el rRNA 23S como gen de referencia endógeno, ya que en la literatura se describe al rRNA como un factor de normalización habitual.

El modelo matemático escogido para la normalización del gen en estudio, fue el método del $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Usando este método los datos son presentados como el número de veces de cambio en la expresión normalizada con un gen de referencia endógeno (en este caso 23S) relativo a un control sin tratar (Livak y Schmittgen, 2001), que en este ensayo correspondió a la muestra de cultivo celular infectado con la bacteria (punto 2.1 Material y Métodos).

7. Análisis Estadístico

Se consideraron 3 familias de peces desafiados para el análisis de las muestras. Los órganos evaluados fueron 4 muestras de riñón, 4 de hígado y 4 de bazo (Ver Tabla 1 Material y Métodos). Las muestras de riñón se analizaron y compararon estadísticamente entre familias (familia 61 y 32), mientras que hígado y bazo fueron analizados en conjunto como órganos, también por familia (familia 8 y 36). Para determinar las diferencias entre órganos y familias se realizó la prueba T student o test- t. El nivel de significancia utilizado fue de $p < 0,05$

RESULTADOS

1. Identificación de *rpoS*

Como se mencionó en el punto 1 de Material y Métodos, los análisis de genómica comparativa se realizaron con el programa CLC Genomics Workbench 3.6.5©, obteniendo zonas de consenso del gen, que representan la equivalencia de bases entre las bacterias.

Se definió como región consenso, la zona con mayor estabilidad (bases altamente conservadas) entre las cinco bacterias comparadas, que se ubicó entre las bases 750 y 900 aproximadamente. La región consenso se presenta en el Anexo 1.

Se realizó el alineamiento local entre la región consenso y los contigs de *P. salmonis* LF-89 disponibles en NCBI. El resultado del alineamiento entre la región consenso y los contigs demostró un 100% de identidad con la región correspondiente a un ORF del contigs 75, alineamiento que presentó el mejor score (183/183) y e-value (2,2 E101), por lo que fue identificado como gen *rpoS*.

2. Partidores

Los partidores diseñados para la posterior amplificación del gen *rpoS* mediante qPCR, se observan en la tabla 2.

Tabla 2: Partidores utilizados en el ensayo de RT-qPCR

| Nombre del gen | Nombre del partidor | Secuencia del partidor | Eficiencia % |
|----------------|---------------------|------------------------|--------------|
| <i>rpoS</i> | F175 | TAACCGCAGAAGAAGAAGTC | 100.39 |
| | R175 | AAGCAAAGGTAAGCCACGA | |

4. qPCR

Como se mencionó en el punto 5 de Material y métodos, el primer paso antes de realizar el qPCR en las muestras en estudio, fue la estandarización y optimización del ensayo.

4.1 Curva de fusión y concentración óptima de partidores

La curva de fusión permite distinguir la amplificación específica del producto objetivo de artefactos del PCR, como dímeros de partidador o unión de este a sitios inespecíficos. Esto, porque el análisis del punto de fusión (del inglés “melting point”) deriva de la observación de la temperatura a la que la doble cadena de DNA se desnaturaliza, lo que es dependiente de su longitud y composición de nucleótidos (Fraga *et al*, 2008), por lo que se producirá un único peak si la amplificación genera solo un producto durante la qPCR. Esto se verificó en el ensayo a través de la matriz de partidores (punto 5.1 de Material y Métodos), donde se demostró la amplificación específica, determinado por un único peak en la curva de fusión y ausencia de amplificación en los controles sin cDNA, lo que se observa en la figura 4.

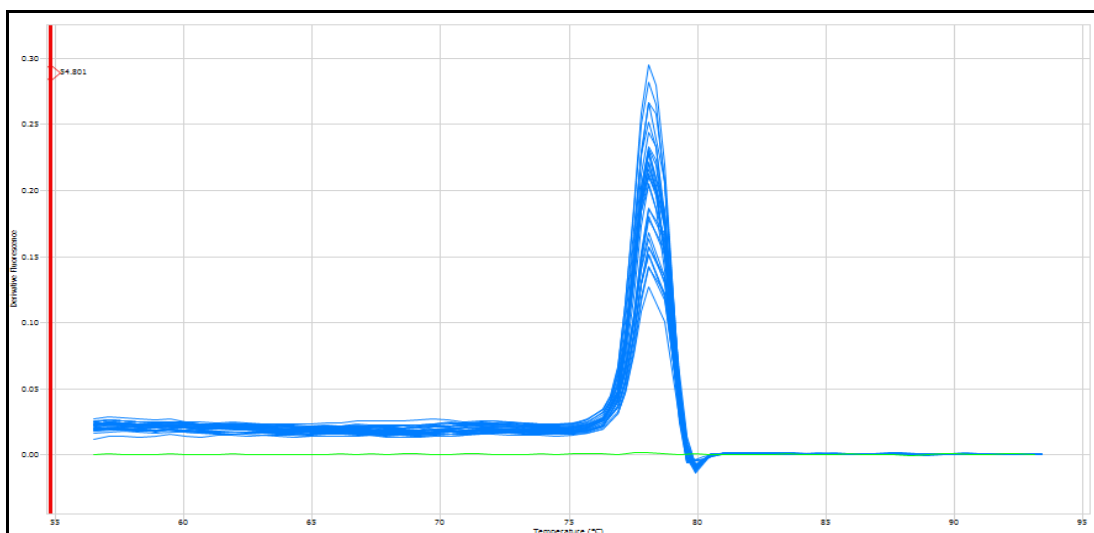


Figura 1: Curva de fusión de *rpoS*, con un único peak. El control sin templado no presentó amplificación como se observa en la línea verde.

Esto también permitió determinar la concentración óptima de partidores para los posteriores ensayos de qPCR, y fue 0,15 uM reverse y 0,15 uM forward, al ser esta la concentración que arroja uno de los valores C_T más bajos, es decir produce una amplificación más temprana, además tiene la menor desviación estandar entre las réplicas en la curva de amplificación.

4.2 Eficiencia de Amplificación

Los resultados de la curva estándar muestran que la eficiencia de amplificación es cercana al 100%, como se observa en la tabla 3. En la figura 5 se muestra la curva estándar del gen *rpoS*.

Tabla 3: Eficiencia de amplificación y coeficiente de correlación

| Nombre de gen | R2 | Eficiencia % |
|---------------|-------|--------------|
| <i>rpoS</i> | 0,956 | 100,393 |

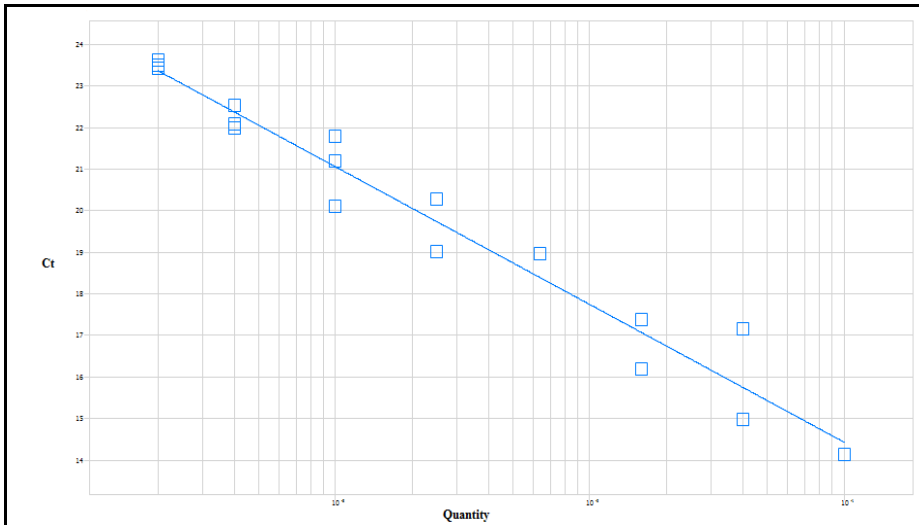


Figura 2: Curva estándar obtenido con muestra de cultivo celular infectado con la bacteria. Pendiente: -3,312, Intersección Y: 11,122, E: 1,99.

5. Expresión de *rpoS* en Salmones del Atlántico desafiados con *P. salmonis*

Se evaluó mediante qPCR las muestras de cDNA de los peces desafiados, utilizando 1 ul de cada muestra y 0,5 ul de la cepa control. Se utilizó como gen de referencia el rRNA 23S. Sin embargo, la expresión de los C_T no pudo ser normalizada por el método propuesto inicialmente, que era el $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001), debido a la poca estabilidad que presentó en las muestras el gen de referencia utilizado (Figura 3). Idealmente el gen de referencia no debiese ser regulado o influenciado por el tratamiento experimental (Radonic *et al*, 2004), sin embargo las fluctuaciones de 23S en los tratamientos fueron incluso mayor a 15 ciclos en un mismo tejido, en algunos casos, lo que evidencia su escasa estabilidad. Considerando esto, se decidió evaluar de acuerdo a dos criterios:

1. Riñón anterior se evaluó de manera independiente de hígado y bazo, pues al no tener un buen gen normalizador no es posible comparar su expresión con otros órganos. Esto se debe además, a la gran diferencia en la cantidad de bacteria que se observa en este tejido, presentando incluso diferencias marcadas en los individuos de una misma familia. Esto se puede explicar por la gran heterogeneidad que presentan las familias susceptibles a la enfermedad, en cuanto al nivel de carga bacteriana, en comparación a familias resistentes. (Dettleff *et al*, 2015). Por esto, se analizaron los C_T en bruto de *rpoS* entre familias (Figura 4). Aunque no es un método de normalización, ya que no permite comparar diferencias de expresión de *rpoS* en las muestras evaluadas, otorga una visión general de lo que puede estar sucediendo con la cantidad de bacteria en el órgano, ya que se relaciona directamente con el C_T del gen 23S en cada muestra. Mediante test-t se demostró que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las familias evaluadas, lo que probablemente se produce por las notorias diferencias en las cargas bacterianas, debido a la susceptibilidad individual a la bacteria (Dettleff *et al*, 2015).

2. Hígado y bazo presentaron una mayor estabilidad en cuanto al nivel de 23S expresado, con valores C_T que variaron entre el ciclo 25 y 29, lo que demuestra la menor carga bacteriana de estos órganos respecto a riñón anterior (Figura 3). Al presentar estos órganos una mayor estabilidad en cuanto a la cantidad de bacteria, es decir expresión de 23S, se decidió normalizar por el método del $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron aumentos de expresión exagerados, que sobreestiman la expresión de *rpoS*, lo que se relaciona

con la poca cantidad de bacteria presente en estas muestras, por lo que al corregir por la muestra, se alteran falsamente los resultados. Considerando esto, para hacer una comparación más certera de la expresión de *rpoS*, se decidió corregir por el método $2^{-\Delta C_T}$ (Figura 5). Este método no corrige las muestras tratadas contra una muestra control, sino que solamente por un control interno, en este caso el gen de referencia 23S. Mediante test-t se demostró que no existen diferencias significativas en la expresión de *rpoS* entre bazo e hígado ni entre las familias correspondientes ($p>0,05$).

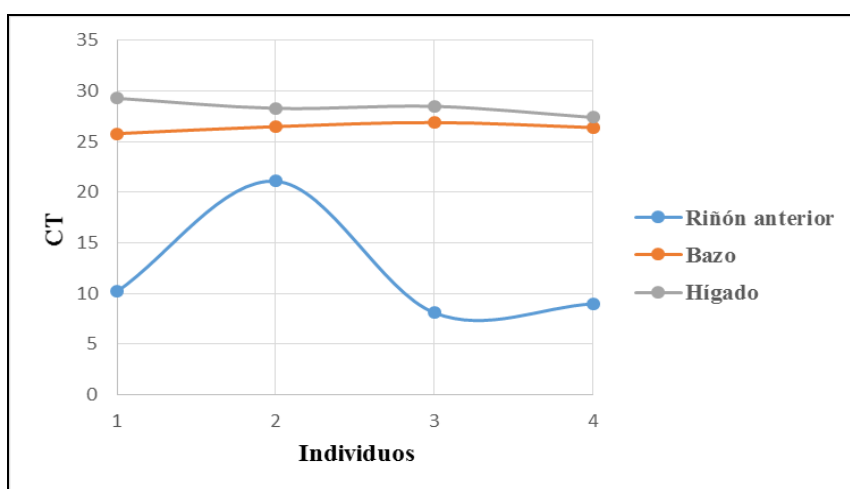


Figura 3: Valores del gen 23S presentados como C_T bruto en los 4 individuos evaluados por órgano. Esto demuestra la escasa estabilidad de 23S en las muestras, por ende, su bajo valor como gen de referencia para este ensayo.

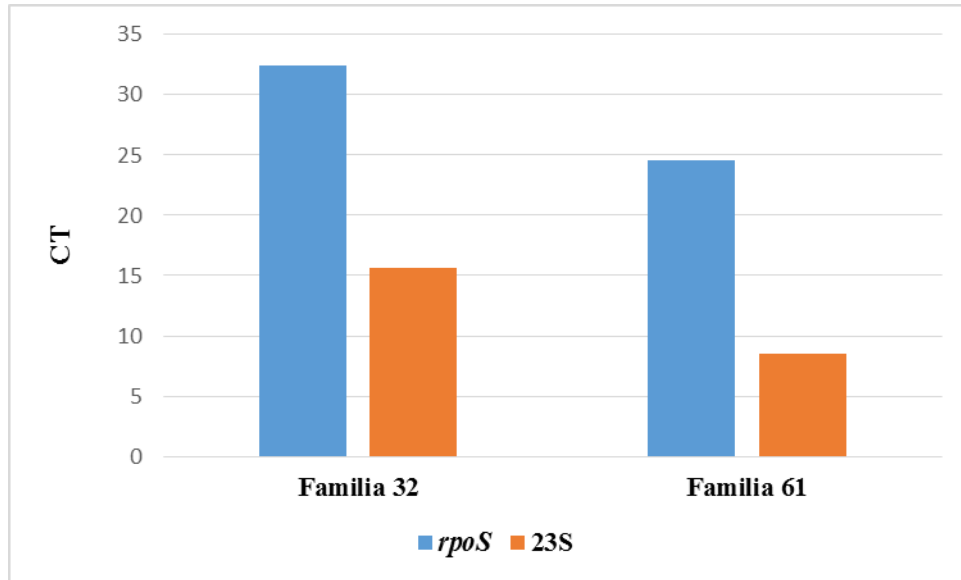


Figura 4: Valor C_T promedio en bruto de *rpoS* y 23S de las muestras de riñón anterior pertenecientes a las familias 32 y 61. Existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en los niveles de *rpoS* entre familias, que se explican principalmente por sus diferencias en las cargas bacterianas (expresión de 23S). Esto se relaciona con la gran heterogeneidad en cuanto al nivel de carga bacteriana que muestran los individuos susceptibles a la enfermedad (Dettleff *et al.*, 2015).

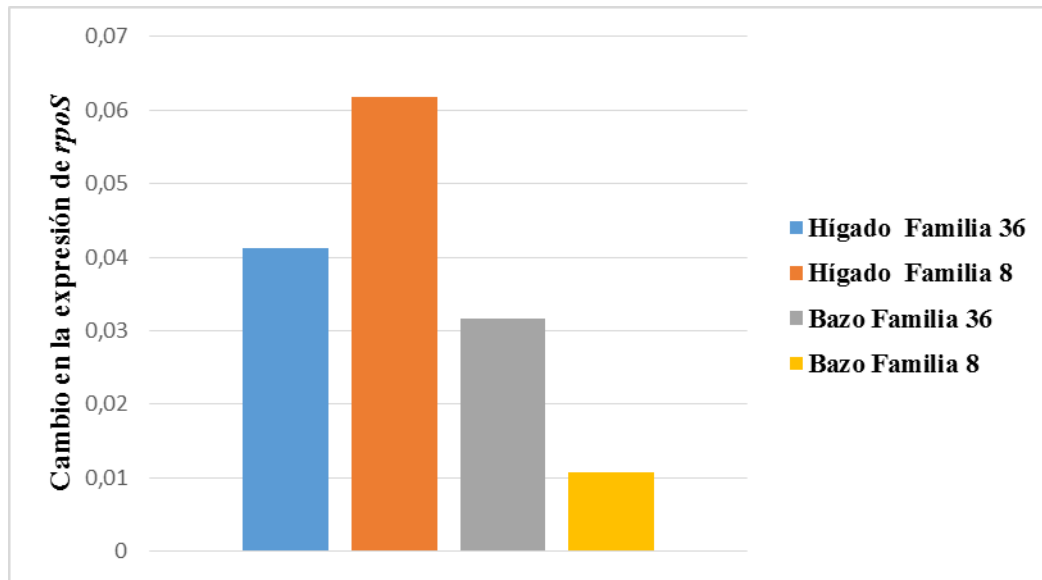


Figura 5: El número de veces de cambio en la expresión de *rpoS* fue calculado usando la ecuación $2^{-\Delta CT}$, donde $\Delta CT = (C_{T_{rpoS}} - C_{T_{23S}})$. No hay diferencias significativas en la expresión de *rpoS* por órgano ni familias ($p > 0,05$).

DISCUSION

Un aporte fundamental de los ensayos realizados en el estudio sobre *P. salmonis*, fue conocer algo más sobre las posibles estrategias de supervivencia que tiene esta bacteria en el hospedero, hasta ahora someramente conocidas. Los resultados obtenidos mediante genómica comparativa indican la existencia del gen *rpoS* en este patógeno. Para que la bacteria logre producir la enfermedad y, por lo tanto evadir las defensas del hospedero, debe activar mecanismos que le permitan permanecer viable en condiciones que no son favorables para su desarrollo, como son la respuesta inmune montada por el pez. Al ser *rpoS* un gen expresado por distintas Gammaprotobacterias frente a condiciones de estrés, es posible asumir que también forme parte de la estrategia de *P. salmonis*. En el ensayo de qPCR se verificó la existencia y expresión de *rpoS* por parte de la bacteria, tanto *in vitro* (cultivo celular infectado con la bacteria, utilizado como muestra control) como *in vivo* (grupo experimental). Sin embargo, el mayor problema para el análisis de los datos de expresión relativa obtenidos mediante qPCR, fue la ausencia de un gen de referencia adecuado, debido a la escasa estabilidad que el gen utilizado, 23S, mostró en el grupo experimental. Pese a todas las ventajas que presenta la técnica de qPCR, como son: rapidez, fácil uso, alta reproducibilidad, requiriendo una mínima cantidad de RNA, no necesitar manipulación posterior al PCR, ni el uso de radiactivos, el problema central radica en el análisis de la transcripción de genes, es decir la determinación precisa de la cantidad de molde amplificado durante la reacción.

La exactitud en la cuantificación con un verdadero gen de referencia permite la normalización de las diferencias en la cantidad de RNA o DNAc amplificable, en muestras individuales dados por: i) distinta cantidad de material inicial, ii) la calidad del material inicial y iii) diferencias en la preparación del RNA y síntesis del DNAc, ya que el gen de referencia es expuesto al mismo tratamiento que el gen objetivo. Además para los estudios de transcripción en distintos tejidos se requiere la investigación de un gen de referencia que presente una transcripción constante en todos los tejidos (Radonic *et al*, 2004). Sin embargo, esta investigación no se pudo realizar durante el ensayo, ya que el genoma de *P. salmonis* ha sido recientemente secuenciado, pero no anotado, por lo que no se conocen los genes presentes el microorganismo y en consecuencia no se han validado genes de referencia para realizar cuantificación relativa en esta especie.

Se utilizó como gen de referencia la subunidad ribosomal 23S, ya que es una secuencia disponible (al ser el rDNA 16S y 23S, los primeros genes identificados, por ser parte de la clasificación taxónomica de la bacteria). Además en la literatura se describe al rRNA como una fuente posible y utilizada para normalizar. Sin embargo, se han visto algunos problemas asociados a su uso. El rRNAs es transcrito con una polimerasa distinta a la del mRNA, por lo tanto, cambios en la actividad de la polimerasa podrían no afectar igualmente la expresión en ambos tipos de RNA. Esto se refleja en el hecho que la expresión del rRNA tiende a ser menos afectada por tratamientos que alteran significativamente la expresión del mRNA. Por otro lado, se han reportado relaciones variables de rRNA y mRNA, dada la extrema abundancia de rRNA. En una muestra de ARN total (donde 80% del total es rRNA), puede ser imposible medir con precisión el rRNA y el gen de interés (Wong y Medrano, 2005). Por ejemplo, el rRNA 18S fue uno de los genes de referencia más usados en los últimos años en ensayos como Northern Blots, ensayos de protección de RNasa y RT-PCR convencionales. Su uso es aceptable para estas técnicas no/semicuantitativas, donde se mide un cambio cualitativo. Esto porque este RNA se expresa en altos niveles en todas las células y funciona como un control positivo ideal si el gen de interés se apaga (es decir, deja de ser expresado). Sin embargo, con la llegada del qPCR se puso acento en el cambio cuantitativo, lo que debería haber dado lugar a una nueva evaluación de la utilización de 18S como gen de referencia, algo que no se hizo. Se siguió usando como un gen de referencia “clásico” para estos propósitos, pese a haberse demostrado, ya en 1975, que este sufría cambios en su expresión debido, por ejemplo a la infección por citomegalovirus (Hugget *et al*, 2005), por lo tanto no cumplía con la condición básica de un buen gen de referencia, que es ser expresado de manera estable, independiente del tratamiento al que es sometido.

Por esta razón, es vital que antes de realizar los ensayos de cuantificación relativa para un gen en estudio, se valide la utilidad del gen de referencia para el tejido en particular, tipo celular y condición experimental, lo que fue uno de los errores cometidos en este ensayo. Además la normalización en contra de un solo gen de referencia no es lo ideal, a menos que los investigadores presenten una clara evidencia que confirmen su expresión invariante bajo las condiciones experimentales descritas. El número óptimo y la elección de los genes de referencia debe ser experimental (Bustin *et al*, 2009). Actualmente existen varios programas,

basados en la plataforma Excel, diseñados para la evaluación de múltiples genes de referencia como Gnorm, BestKeeper y NormFinder, todos de libre disposición.

Pese a que no se pudo validar el gen de referencia, por las razones antes mencionadas, se analizaron los datos de acuerdo a dos criterios. La cuantificación relativa describe el cambio en la expresión de un gen en estudio en relación a un grupo de referencia, como un control sin tratar o una muestra al tiempo cero en un estudio medido en transcurso de tiempo (Livak y Schmittgen, 2001). El propósito del gen o control interno es normalizar la PCR para la cantidad de RNA añadido en la reacción de transcripción reversa. Usando el método del $2^{-\Delta\Delta C_T}$ los datos son presentados como el número de veces de cambio en la expresión de un gen normalizado con un gen de referencia endógeno y en relación a un control sin tratar. En el ensayo, como mencionamos, el grupo experimental correspondía a los peces desafiados con la bacteria, normalizados por el gen de referencia 23S, y en relación a una muestra control sin tratar, que fue el cultivo celular infectado con la bacteria. Los valores obtenidos utilizando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_T}$, mostró cambios aberrantes en la expresión génica de *rpoS* en los órganos evaluados, por ejemplo en hígado y bazo, el aumento respectivo fue de 2500 y 6000 veces aproximadamente. Estos cambios no se deben a un aumento real en la expresión del gen en estos tejidos, sino a la poca estabilidad mostrada por 23S, por lo que los cambios en la cantidad de transcrito inicial no lograron ser normalizados, obteniendo estos resultados. Como la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_T}$ no fue adecuada para lograr analizar cambios de expresión relativa en ninguna de las muestras, en hígado y bazo la expresión de *rpoS* fue normalizada mediante el método del $2^{-\Delta C_T}$, que a diferencia del método inicialmente propuesto no utiliza una muestra control para normalizar. Esto debido a que estos órganos mostraron una expresión más estable del gen de referencia 23S. En este caso, normalizar contra un gen de referencia endógeno proporciona un método para corregir los resultados para las diferentes cantidades de ARN inicial (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados obtenidos mostraron un aumento muy pequeño en la expresión de *rpoS* en ambos órganos, que no muestra diferencias significativas entre familias ni órganos ($p > 0,05$). Esto se puede explicar por la baja cantidad de bacteria presente en estos órganos.

En riñón anterior, no se pudieron normalizar los resultados, debido a la gran inestabilidad de 23S en el órgano, por lo que se utilizaron los valores C_T en bruto. Si bien cuando los valores

C_T se presentan en bruto o absolutos representan falsamente la variación, por lo que se deben evitar (Livak y Schmittgen, 2001), este fue el único método de análisis, y aunque no permite medir cambios en la expresión, evidencia la cantidad de bacteria que puede haber presente por muestra. Los datos obtenidos por el C_T, mostraron que riñón anterior fue el órgano donde la bacteria presentó un mayor aumento de *rpoS*, lo que se atribuye a ser este el órgano por el que la bacteria presenta mayor tropismo, lo que significa una mayor carga bacteriana. Otra posible explicación podría estar dada por la respuesta inmunológica que se activa en riñón anterior. En el estudio de Tachi *et al* (2011), donde se evaluó la respuesta transcriptómica frente a la infección por *P. salmonis* en salmón del Atlántico, riñón anterior fue el órgano que mostró un mayor aumento en la expresión de transcritos relacionados con la respuesta inmune, para evadir esto, la bacteria debe poner en marcha su respuesta, que significa la expresión de genes que le permitan escapar y/o sobrevivir a la respuesta inmune montada por el hospedero, lo que podría explicar la mayor expresión de *rpoS* en este sentido. Sin embargo, para lograr confirmar esta idea, es necesario contar con un buen gen normalizador, que permita medir de manera fehaciente cambios en la expresión génica, en comparación a un grupo control.

Por otro lado, es importante destacar el aporte de la genómica comparativa en el estudio de los genes bacterianos, permitiendo la identificación y posibles funciones que estos pueden cumplir en bacterias taxonómicamente cercanas, lo que ha resultado de vital importancia en este proyecto. Gracias a la genómica comparativa se pudo encontrar *in silico* el gen *rpoS* en *P. salmonis*, y así conocer algo más sobre los mecanismos usados por esta bacteria para sobrevivir, ya sea dentro o fuera del hospedero. Sin embargo, es necesario generar nuevos estudios sobre los genes implicados en la sobrevivencia de la bacteria dentro del hospedero y la interacción de estos factores. Un modo efectivo sugerido sería reproducir las condiciones del hospedero *in vitro*, para así establecer en qué etapa podrían expresarse los distintos genes asociados a la estrategia de sobrevivencia de la bacteria, tal como se ha demostrado para *Salmonella spp* o *M. tuberculosis*.

Finalmente, para realizar un estudio de expresión génica relativa mediante la técnica de qPCR, es muy importante seguir al menos estos tres pasos en el diseño y evaluación del experimento: i) seleccionar un gen de referencia ii) validar el gen de referencia para demostrar que no es afectado por el tratamiento experimental y iii) asegurar y demostrar que la eficiencia para el

gen en estudio y de referencia son similares (Livak y Schmittgen, 2001). De este modo se pueden obtener resultados confiables y reproducibles en otros ensayos de qPCR.

CONCLUSIÓN

Pese a no haber considerado la validación de un gen de referencia, ya que no se previó la gran variabilidad que presentó la bacteria en los distintos órganos, se logró identificar el gen *rpoS* en *P. salmonis*, posiblemente implicado en la respuesta al estrés de la bacteria, lo que constituye un gran aporte de este ensayo. Como se ha mencionado, es muy poca la información que existe sobre este patógeno, por lo que es muy importante realizar estudios genómicos precisos, especialmente en ensayos de cuantificación relativa, donde identificar y validar genes de referencia para los ensayos de qPCR debe ser el primer paso a seguir. De este modo, se logrará conocer de manera fehaciente la respuesta transcripcional de la bacteria frente a una condición particular de interés para el investigador.

Por último, los estudios de expresión génica constituyen una herramienta vital para entender de mejor manera la estrategia de infección y sobrevivencia de la bacteria en el hospedero, lo que permitirá generar nuevos mecanismos orientados a establecer un control efectivo y sustentable de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- ALMENDRAS, F.; FUENTEALBA, L.** 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. *Dis Aquat Organ.* 29:137-144.
- BOARETTI, M.; DEL MAR LLEÒ.; BONATO, B.; SIGNORETTO, C.; CANEPARI, P.** 2003. Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environ. Microbiol.* 5(10):986–996.
- BUSTIN, S.; BENES, V.; GARSON, J.; HELLEEMANS, J.; HUGGET, J.; KUBISTA, M.; MUELLES, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.; SHIPLEY, G.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.** 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55(4): 611-622.
- CVITANICH, J.; GARATE, O.; SMITH, C.** 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.
- DETTLEFF, P.; BRAVO, C.; PATEL, A.; MARTINEZ, V.** 2015. Patterns of *Piscirickettsia salmonis* load in susceptible and resistant families of *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immun.* [en línea]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464815001485> [consulta: 08-04-2015].
- DONG, T.; JOYCE, T.; SCHELLHORN, H.** 2008. The Role of RpoS in Bacterial Adaptation. **In:** El-Sharoud, W (Ed). *Bacterial Physiology: A Molecular Approach.* Springer. Berlin, Heidelberg. pp. 313-337.
- FIGUEROA, J.; JARA, M.C.; ROJAS, C.; HAUSSMAN, D.; ROMERO, A.** 2011. Genómica de los subtipos de *Piscirickettsia salmonis* presentes en la salmonicultura nacional. [en línea]. <http://www.genomicasrs.cl/files/Figueroa21.pdf> [consulta: 11-06-2012].
- FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S.** 2008. Real Time- PCR. [en línea]. <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CPUnit/refId-et1003.html> [consulta: 11-12-2013].
- FRYER, J.L.; HEDRICK, R.P.** 2003. *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *J. Fish Dis.* 26(5):251-262.
- HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A.** 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6:279-284.
- LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 1998. Estado actual de la Piscirickettsiosis en salmones. [en línea]. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=54> [consulta: 10-06-2012].
- LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods.* 25(4):402-408.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 2003. Brock Biología de los Microorganismos. 10 ed. Pearson, Príncipe Hall. Madrid, España. 1011 p.

MAJDALANI, N.; CHEN, S.; MURROW, J.; JOH, K.; GOTTESMAN, S. 2001. Regulation of *RpoS* by a novel small RNA: The characterization of RprA. Mol. Microbiol. 39 (5):1382–1394.

MIKALSEN, J.; SKJÆRVIK, O.; WIIK-NIELSEN, J.; WASMUTH, M.A.; COLQUHOU, D. 2008. Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. Fems Microbiol Lett. 278(1):43-47.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochem Bioph resco. 313:856-862.

RISE, M.; JONES, S.; BROWN, G.; VON SCHALBURG, K.; DAVIDSON, W.; KOOP, B. 2004. Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. Physiol Genomics. 20:21-35.

ROJAS, M.V. 2007. Relación del proceso apoptótico con la infección productiva del patógeno intracelular *Piscirickettsia salmonis* en células de salmónidos de cultivo. Tesis Doctoral en Ciencias Biomédicas. Santiago, Chile. U. Chile, Fac Medicina. 148 p.

ROJAS, M.V.; GALANTI, N.; BOLS, N.; MARSHALL, S. 2009. Productive Infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. J. Cell. Biochem. 108:631–637.

RYCHLIK, I.; BARROW, P. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. Fems Microbiol Rev. 29:1021–1040.

SPECTOR, M.; KENYON, W. 2011. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. Food Res In. 45 (2):455-481.

SUH, S.-J.; SILO-SUH, L.; WOODS, D.; HASSETT, D.; WEST, S.; OHMAN, D. 1999. Effect of *rpoS* Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181(13):3890–3897.

TACCHI, L.; BRON, J.E.; TAGGART, J.B.; SECOMBES, C.; BICKERDIKE, R.; ADLER, M.A.; TAKLE, H.; MARTIN, S. 2011. Multiple tissue transcriptomic responses to *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Physiol. Genomics. 43(21): 1241-1254.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 39(1):75-85.

YAÑEZ, A.; VALENZUELA, K.; SILVA, H.; RETAMALES, J.; ROMERO, A.; ENRIQUEZ, R.; FIGUEROA, J.; CLAUDE, A.; GONZALEZ, J.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; CARCAMO, JG. 2012. Broth medium for the successful culture of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Dis Aquat Organ. 79(3):197-205.

ANEXOS

Anexo 1

```
>TTACCTTTGCTTGATTTAATTGAAGAGGGCAATATGGGATTGATGCACTC  
TGTTGAAAAGTTTGATCCAGAAAAAGGCTTTCGTTTTTCGACTTATGCGAC  
ATGGTGGGTACGGCAAATATTGAACGAGCATTGATGAGTCAGACGAGAA  
CGATTCGCTTACCGATTCATATTGTTAAAGAG<
```

Región consenso del gen *rpoS*, obtenida mediante un alineamiento local de este gen entre 5 diferentes Gammaprotobacterias, realizado con el programa CLC Genomics Workbench 3.6.5©.