



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

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO
DE ADHESIÓN PISCIRICKETTSIAL (CAP) DE *PISCIRICKETTSIA*
SALMONIS EN CONCHAS DE CHORITO (*MYTILUS CHILENSIS*) Y
SU CAPACIDAD INFECTIVA**

Manuel Alejandro Pérez Maldonado

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: DR. JULIO LARENAS H.

Financiamiento: Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de
Especies Hidrobiológicas, Universidad de Chile; Salmones Humboldt Ltda.

SANTIAGO, CHILE

2017



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

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO
DE ADHESIÓN PISCIRICKETTSIAL (CAP) DE *PISCIRICKETTSIA*
SALMONIS EN CONCHAS DE CHORITO (*MYTILUS CHILENSIS*) Y
SU CAPACIDAD INFECTIVA**

Manuel Alejandro Pérez Maldonado

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

Nota Final

Profesor Guía Dr. Julio Larenas

Profesora Correctora Dra. Mariana Acuña

Profesora Correctora Dra. Consuelo Borie

SANTIAGO, CHILE

2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al doctor Julio Larenas por todas sus enseñanzas que me hicieron crecer tanto en el ámbito académico como en el humano. A Carolina Moraleda por su enorme ayuda en la realización de esta tesis. A mis compañeros de laboratorio por sus consejos y buena onda. A la doctora Mariana Acuña por sus correcciones y apoyo. A todos los funcionarios del departamento de Patología Animal por su disposición a ayudar siempre.

Por otro lado, agradezco a mis compañeros y compañeras que me acompañaron a lo largo de la carrera, y que fueron un pilar fundamental en este periodo de mi vida.

A mis amigos, por siempre estar y por su alegría. A toda mi familia; a mi mamá, papá y hermanos, por su amor, unidad y por siempre apoyarme incondicionalmente.

Por último, dedico este trabajo y doy infinitas gracias a mi abuela, Enedina Ruiz, quien nos educó a mí, a mi hermano y a mis dos hermanas, y que sé que está orgullosa de nosotros.

RESUMEN

Piscirickettsia salmonis es una bacteria intracelular facultativa, de tipo cocoide, de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, gramnegativa, inmóvil, y se encuentra asociada a cuadros clínicos de tipo septicémico con alta mortalidad en salmones de cultivo en Chile. Las formas de transmisión no son claramente conocidas. En condiciones experimentales se ha demostrado que el microorganismo produce un sistema de adhesión a las ovas, denominado Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP) y que probablemente corresponda a un factor de virulencia. Por otra parte, existe evidencia de la presencia de *P. salmonis* en órganos de moluscos bivalvos, como es el chorito (*Mytilus chilensis*) y otras especies de animales acuáticos.

El presente estudio tuvo como objetivo establecer la unión de *P. salmonis* mediante la formación del CAP a la superficie de conchas de chorito, y su capacidad de infectar un cultivo con células CHSE-214 de peces una vez formado el sistema de adhesión. Como inóculo se utilizó un aislado de campo asociado a un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). El microorganismo fue cultivado en la línea celular CHSE-214 libre de antibióticos y fungistáticos, a una temperatura de 15 °C, hasta que se produjo un 100% de efecto citopático (ECP). Se utilizó como inóculo un tercer pasaje, que fue obtenido del sobrenadante, filtrado (2 μm) y titulado en microplacas. El título utilizado correspondió a $10^{5,3}$ TCID₅₀/ml. Para el desafío se ocuparon trozos de conchas de chorito de aproximadamente 0,5 cm², previamente sometidos a un proceso de limpieza y desinfección. Para el estudio se realizó una cinética de infección, colocando los trozos de concha en la suspensión bacteriana por inmersión en tubos Eppendorf, en tiempos de 1, 24 o 48 h a temperatura de 15 °C. Cada grupo se realizó en duplicado. Una vez transcurridos los tiempos, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en cacodilato de sodio, sometidas a secado de punto crítico, sombreadas con oro, observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido. Adicionalmente, dos trozos de concha fueron sometidos a 48 h de infección, luego lavadas en tampón PBS (pH= 7,2) estéril y colocadas en una botella de cultivo con la línea CHSE-214, y observadas para detectar el efecto

citopático. Los resultados demostraron la unión de la bacteria mediante CAP a la superficie de la concha a partir del primer tiempo estudiado (1 h). Además, las conchas infectadas por 48 h, colocadas en CHSE-214, mostraron un efecto citopático alrededor de su borde a partir de los 3 días postinfección, para luego a los 14 días producir un ECP de 100%. Estos resultados comprueban la adhesión de *P. salmonis* a la superficie de conchas de chorito y la posibilidad de liberación de bacterias infectantes al medio. Esto podría tener una implicancia epidemiológica, puesto que en condiciones naturales estas superficies podrían constituirse en reservorios del agente.

Palabras claves: Enfermedad en salmones, Piscirickettsiosis, *Piscirickettsia salmonis*, Complejo de Adhesión Piscirickettsial, *Mytilus chilensis*

ABSTRACT

Piscirickettsia salmonis is a facultative intracellular bacterium, coccoid type, diameter 0.5 to 1.5 μm , gram-negative, non-motile and is associated with clinical symptoms of sepsis with high mortality in farmed salmon in Chile. Mechanisms of transmission are not clearly known. Experimentally, it has been shown that the microorganism produces a system of adhesion to ova, called “Piscirickettsial Attachment Complex” (PAC) and probably corresponds to a virulence factor. Moreover, there is evidence of the presence of *P. salmonis* in organs of bivalve molluscs such as mussels (*Mytilus chilensis*) and other species of aquatic animals.

This study aimed to establish the binding of *P. salmonis* by CAP to the surface of mussel shells, and if once formed this structure, the bacteria could be released and infect cultured fish cells. As inoculum a bacteria was used from an isolated from an outbreak of piscirickettsiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The microorganism was cultured on CHSE-214 cell line free of antibiotics and fungistatics at a temperature of 15 °C, until 100% cytopathic effect was obtained. A third passage was used as inoculum, which was obtained from the supernatant filtered (2 μm) and entitled microplate. The titre used corresponded to $10^{5.3}$ TCID₅₀/ml. 0,5 cm² mussel shell pieces were used as challenge, previously subjected to a process of cleaning and disinfection. Kinetics of infection were performed, by placing the shell pieces in a bacterial suspension for 1, 24 or 48 h at 15 °C. Each group was performed in duplicate. The samples were fixed in 2% glutaraldehyde in sodium cacodylate, subjected to critical point drying, shaded with gold, observed and photographed in a scanning electron microscope. Additionally, two shells were subjected to 48 h of infection, then washed in PBS buffer (pH = 7.2) and placed in a sterile culture bottle with CHSE-214 cell line, and observed to detect the cytopathic effect. Results demonstrated the binding of bacteria by CAP to the surface of shell from the first time studied (1 h). In addition, 48 h infected shells placed in CHSE-214, showed cytopathic effect around its edge from 3 days post-infection and then at 14 days producing 100%

cytopathic effect. These results prove the adhesion of *P. salmonis* to the surface of mussel shells and the possibility of releasing infecting bacteria on the environment. This could have epidemiological implications, because under natural conditions these surfaces could become reservoirs of the agent.

Keywords: Salmon disease, Piscirickettsiosis, *Piscirickettsia salmonis*, Piscirickettsial Attachment Complex, *Mytilus chilensis*

INTRODUCCIÓN

La piscirickettsiosis es una enfermedad producida por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* y que causa la mayor mortalidad de salmones en cultivos de agua de mar en Chile. Por esto es una de las amenazas más importantes en la industria del salmón (Bravo, 1994; SERNAPESCA, 2015).

La bacteria se ha detectado en las principales especies de salmones de cultivo en el sur de Chile, donde existen las mejores condiciones para la salmonicultura (Bravo, 1994). Fue aislada por primera vez en 1989 en salmón coho por Fryer *et al.* (1990). Además, en diversos estudios se ha detectado su presencia en órganos de peces silvestres, crustáceos, ectoparásitos, y moluscos como el chorito (*Mytilus chilensis*), sin presentar la enfermedad (Correal, 1995; Venegas, 1996; Campalans, 2011). Es una bacteria intracelular facultativa, gramnegativa, aeróbica y pleomórfica, pero principalmente cocoide. Su tamaño fluctúa entre los 0,5 a 1,5 μm (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991; Gómez *et al.*, 2009).

Los trabajos realizados por Larenas *et al.* (2003) han demostrado *in vitro*, que el microorganismo forma unas prolongaciones parecidas a pseudópodos, las que se denominaron “Complejo de Adhesión Piscirickettsial” (CAP), con el cual se une a las ovas de salmón para posteriormente penetrarlas. Sumado a esto, observaron que estas prolongaciones podían formarse entre las mismas bacterias. Similar resultado obtuvo Quinteros (2005), en un estudio comparativo de cinética de formación del CAP en dos cepas de *P. salmonis* (LF-89 y SLGO-95) con diferentes grados de virulencia. En dicho estudio la cepa más virulenta (SLGO-95) formó un CAP mucho más prominente, sugiriendo que correspondería a un factor de virulencia. Además, el autor sugiere que el CAP podría corresponder a un *biofilm*, que entregaría a la bacteria protección frente ambientes adversos, resistencia a antibióticos y persistencia en el medio acuático, pero que debe confirmarse a través de otras técnicas. Además, se ha descrito la presencia de CAP en branquias y piel de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*), a partir de las mismas cepas antes mencionadas (Bravo, 2007).

En el caso del chorito, escasos son los estudios para establecer su rol en el ciclo de la bacteria en condiciones marinas. Al respecto, Correal (1995) y Venegas (1996),

describieron la presencia de la bacteria en órganos del molusco, sin generar lesiones histopatológicas. Resultados similares obtuvo Campalans (2011), quien además concluyó que *P. salmonis* puede estar presente en los órganos internos de *M. chilensis* por periodos de hasta al menos 66 días.

Por otra parte, existen estudios que describen la presencia de una variedad microorganismos en la superficie de las conchas de diversos moluscos, los que interactúan a menudo formando *biofilms*. Entre los más importantes están algunas bacterias marinas del género *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Shewanella* (Tamburri *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1995; Pawlowska *et al.*, 2008; Cuadrado-Silva *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). En el caso del mejillón coreano (*Mytilus coruscus*), se han descrito bacterias aisladas a partir del *biofilm* en la superficie de la concha de los géneros *Pseudoalteromonas*, *Tenacibaculum* y *Shewanella* (Li *et al.*, 2014). También se ha descrito la formación de *biofilm* por cianobacterias en la superficie de la concha del mejillón (*Mytilus edulis*) (Pawlowska *et al.*, 2008).

Con estos antecedentes, y teniendo en cuenta la distribución del chorito en Chile, desde Arica a Cabo de Hornos (Lancelloti y Vásquez, 2000), es importante dilucidar su posible rol en el ciclo marino de *P. salmonis*.

En el presente trabajo se estudió la posible formación de CAP por parte de *P. salmonis* en superficie de conchas del chorito, y su potencial infectivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas, dependiente de la Unidad de Anatomía Patológica del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Línea Celular CHSE-214

Para el cultivo de *P. salmonis* se utilizó la línea CHSE-214 (ATCC® CRL 1681) de acuerdo a lo descrito por Fryer *et al.* (1990). La monocapa de células se cultivó en botellas de cultivo celular (TRP® 90026) de poliestireno de 25 cm², con medio esencial mínimo de Eagle (MEM) con sales de Earle (Biological Industries®), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biological Industries®) (MEM-10), L-glutamina (Biological Industries®) y bicarbonato de sodio (1%) para mantener un pH= 7,4. Las botellas fueron mantenidas a 15 °C en una estufa de cultivo refrigerada (YIH DER LE-509RD). El medio de cultivo no contenía antibióticos ni fungistáticos.

Piscirickettsia salmonis

La bacteria provenía de un aislado de campo asociado a un brote de piscirickettsiosis en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), gentilmente donado por el doctor Marcos Godoy (Laboratorio ETECMA). El microorganismo fue cultivado de acuerdo a lo establecido por Fryer *et al.* (1990), a una temperatura de 15 °C, hasta que se produjo un 100% de efecto citopático (ECP) a los 10 días postinoculación. Se utilizó como inóculo el tercer pasaje, el cual fue obtenido del sobrenadante que se hizo pasar a través de un filtro (EDLAB ® CA Syringe Filter) con un poro de 0,22 µm de diámetro, y titulado en microplacas de 24 pocillos. El título utilizado, calculado de acuerdo al método de Reed y Muench (1938), correspondió a 10^{5,3} TCID₅₀/ml. Todos los procedimientos de replicación e inoculación de las líneas celulares se realizaron en un gabinete de bioseguridad clase II (BIOBASE 11231 BBC 86).

Conchas de chorito

Se utilizaron cinco conchas de chorito, las cuales fueron seleccionadas de animales de origen comercial. Para efectos del estudio con microscopía de barrido, se eligieron conchas con superficie lo más homogénea y lisa posible. De cada concha se obtuvieron dos trozos de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ mediante el corte con una sierra para metal (Redline®). Estos trozos se usaron como “control pre-limpieza y desinfección” (CPreL), los que fueron fijados y procesados para su observación en el microscopio electrónico de barrido, de acuerdo a lo indicado más adelante.

En una primera etapa el resto de las conchas, a excepción de los CPreL, fueron lavadas con abundante cantidad de agua, para luego ser sometidas a un procedimiento de limpieza y desinfección, que consistió en sumergirlas por 24 h en amonio cuaternario (Billow®) a una concentración final de 0,02% (200 ppm). Las conchas una vez desinfectadas, fueron cepilladas 5 min cada una, con un cepillo dental del tipo suave (sumergidas en el mismo detergente). Finalizado esto, fueron enjuagadas diez veces en agua destilada. Posteriormente, se mantuvieron a una temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, por un período mínimo de 24 h. Luego de ese período, fueron sometidas a un proceso de limpieza con un scaler dental con ultrasonido, utilizado para destartraje en humanos, y trozadas en varios pedazos de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$. Los trozos de conchas fueron enjuagados en agua destilada estéril 10 veces, mantenidos en etanol 70% por 24 h y luego almacenados a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Posterior a este proceso de limpieza y desinfección, se obtuvieron dos trozos de $0,5 \text{ cm}^2$ de cada concha como “control post-limpieza” (CPosL), que fueron fijados y procesados para su observación en un microscopio electrónico de barrido, de acuerdo a lo indicado más adelante.

Los trozos de concha limpios y desinfectados fueron sometidos a dos tipos de tratamientos: 1.- Cinética de formación de CAP y 2.- Estudio de liberación de *P. salmonis* desde el CAP neoformado.

Cinética de formación de CAP sobre conchas de chorito

Se utilizaron 12 fragmentos de conchas con un tamaño aproximado de 0,5 cm². Los grupos experimentales se muestran en la tabla 1. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito por Larenas *et al.* (2003) para la formación de CAP y modificado para el presente estudio. Todo el experimento se realizó en tubos Eppendorf, uno por cada trozo de concha (en duplicado), a una temperatura de 15 °C correspondiente a la óptima para el crecimiento y desarrollo de la bacteria (Fryer *et al.*, 1990). El grupo “Desafío” se conformó por trozos de conchas expuestas a *P. salmonis* hasta los tiempos de 1, 24 y 48 h (tabla 1). Además, se conformaron tres grupos controles negativos (CNeg1, CNeg2 y CNeg3). En CNeg1 y CNeg2, las conchas no fueron expuestas con la bacteria y variaron en la presencia de 0,5 ml de MEM (CNeg1) o 0,5 ml de sobrenadante de células CHSE-214 lisadas (CNeg2). Este último grupo se obtuvo mediante la lisis de la línea celular CHSE-214 utilizando un medio hipotónico (agua destilada); dicho procedimiento se muestra en el anexo 1. Para establecer que la lisis de este grupo (CNeg2) había sido exitosa, se procedió a cultivar, a 15 °C, 0,5 ml de la suspensión post-lisis en una botella de cultivo celular que contenía MEM-10, la cual fue observada en un microscopio invertido durante 23 días en busca de señal de multiplicación y propagación de las células (Anexo 2).

El grupo CNeg3 correspondió a trozos de concha expuestos a 0,5 ml de *P. salmonis* muerta. Para ello la bacteria contenida en 0,5 ml de sobrenadante obtenido de la línea celular CHSE-214 previamente inoculada y con 100% de efecto citopático, fue sometida a una temperatura de 100 °C por 10 min y posteriormente cultivada en la línea celular CHSE-214 para comprobar que ésta no era viable (Anexo 3).

Las conchas de todos los controles negativos estuvieron expuestas por 1 h en el estudio de cinética (tabla 1). Los protocolos de los grupos de la cinética de infección se muestran en el Anexo 4.

Tabla 1. Grupos experimentales utilizados en el tratamiento de conchas de choritos con *Piscirickettsia salmonis*

Grupo	Tratamiento	Tiempo de exposición**		
		1 h	24 h	48 h
Desafío*	Concha + Ps	+	+	+
Control negativo 1 (CNeg1)	Concha + MEM	+		
Control negativo 2 (CNeg2)	Concha + Células lisadas***	+		
Control negativo 3 (CNeg3)	Concha + Ps muerta****	+		

MEM = Medio Esencial Mínimo. Ps = *Piscirickettsia salmonis*. *Las conchas (en duplicado) fueron tratadas con una suspensión bacteriana de *P. salmonis* que contenía un título de $10^{5.3}$ TCID₅₀/ml. **La temperatura de exposición fue de 15 °C. ***Grupo mantenido con una suspensión de medio de cultivo que contenía células lisadas provenientes de la línea CHSE-214 sometidas previamente a un medio hipotónico por 10 min. ****La bacteria fue previamente sometida a ebullición por 10 min.

Procesamiento para la técnica de microscopía electrónica de barrido

Todas las muestras, luego de ser incubadas durante sus correspondientes tiempos y tratamientos, fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio (0,2 M) y mantenidas a temperatura ambiente durante al menos 24 h. Posteriormente las muestras se procesaron en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Pontificia Universidad Católica de Chile, donde se realizaron lavados con agua destilada. Luego fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), llevadas a secado de punto crítico y sombreadas con oro con un espesor de 20 nm. Las muestras se guardaron al vacío en un desecador hasta el momento de su observación en un microscopio de barrido en la misma unidad (Jeol, JSM 25 SII), donde se capturaron y digitalizaron las imágenes. Se realizó un análisis descriptivo de las muestras para establecer las diferencias en la formación de CAP entre los grupos, de acuerdo a lo establecido por Quinteros (2005).

Prueba de infectividad

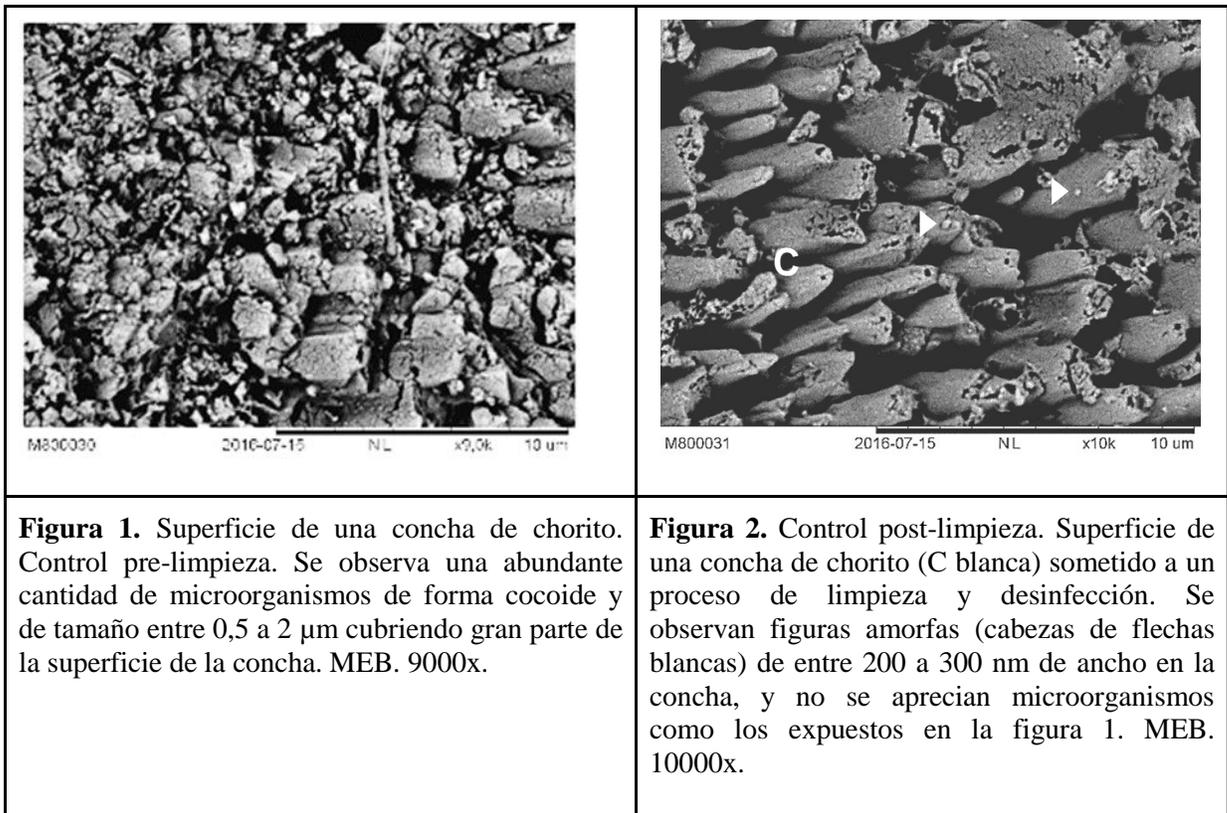
Para demostrar la capacidad de liberación de bacterias desde el CAP, dos trozos de conchas se trataron de igual forma que el grupo “Desafío” del experimento de cinética de infección (tabla 1), y se mantuvieron hasta las 48 h. Después de ese período, éstas fueron lavadas con una solución fosfato salino (PBS pH= 7,2), se colocaron en botellas de cultivo con una monocapa al 100% de la línea celular CHSE-214 e incubaron en una estufa de cultivo a 15 °C por un periodo de 14 días. Desde el día 1, se observó cada 24 h si se producía efecto citopático. Al final del periodo, uno de los trozos de concha fue procesado para su observación en microscopio de barrido.

Como grupo control, se utilizó un trozo de concha no desafiada (en duplicado), la cual fue colocada en una botella con la línea celular CHSE-214. Los protocolos de los grupos de la prueba de infectividad se muestran en el Anexo 5.

RESULTADOS

Comparación de conchas de chorito pre (CPreL) y post-limpieza (CPosL)

Las conchas del grupo control Pre-limpieza (CPreL) presentaron una superficie irregular con la presencia de una abundante cantidad de microorganismos mayoritariamente cocoides, de tamaño entre 0,5 a 2 μm , y una pequeña cantidad de formas del tipo bacilo de tamaño promedio de 2 μm de largo. Estas estructuras se observaron principalmente dispuestas en forma agrupada y ocasionalmente aisladas, en distintas áreas de la superficie de la concha (Figura 1). A diferencia del anterior, en el control pos-limpieza (CPosL) se observaron algunas estructuras amorfas del orden de 200 a 300 nm de ancho (Figura 2).



Cinética de infección de conchas en MEB

Controles negativos

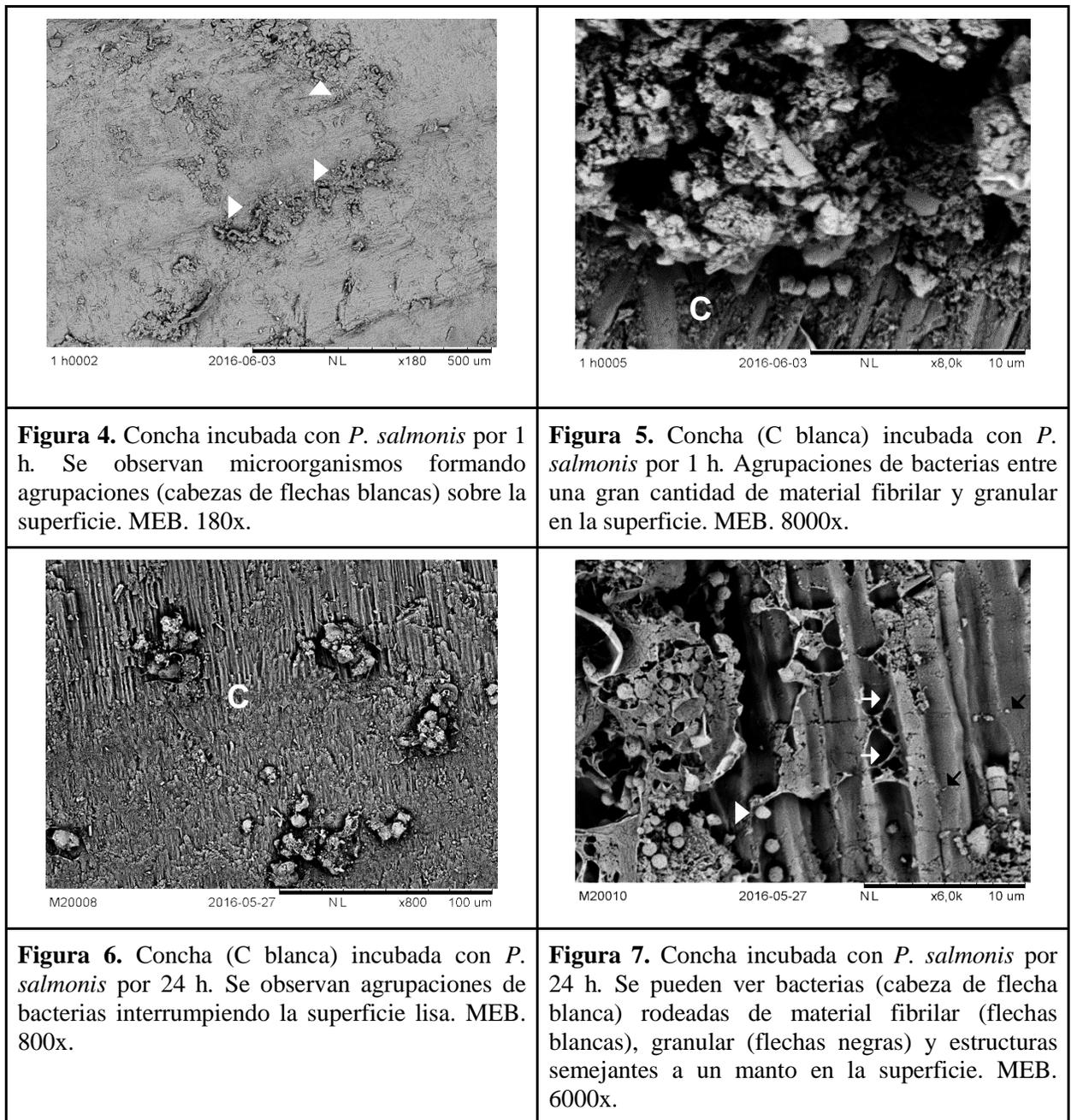
En todos los controles negativos (CNeg1, CNeg2 y CNeg3), las superficies de las conchas se presentaron libres de microorganismos. Ocasionalmente se observaron algunas figuras amorfas del orden de 50 a 200 nm (Figura 3).



Grupo “Desafío”

Conchas incubadas con *P. salmonis*

Desde el primer tiempo estudiado, se pudo observar bacterias sobre la superficie de las conchas de chorito, unidas entre ellas formando conglomerados celulares (Fig. 4 y 6) que fueron más evidentes en el último período de exposición con *P. salmonis* (48 h). Los microorganismos unidos tuvieron tamaños promedios de 1 μm de diámetro, no observándose formas pequeñas (Fig. 5, 7 y 8).



A medida que avanzaron los periodos de desafío, se pudo observar con mayor nitidez la presencia de cuatro tipos de estructuras: bacterias cocáceas y tres tipos de materiales, fibrilar, granular y tipo manto. El material fibrilar se encontró uniendo bacterias entre ellas y con la superficie (Fig. 8). El material granular, de aproximadamente 10 a 20 nm de diámetro, se observó sobre y alrededor de los grupos bacterianos y aumentó marcadamente

a las 48 h de exposición (Fig. 9). Las estructuras semejantes a un manto se observaron a partir de las 24 h en adelante, y éstas podían llegar a cubrir por completo las sinuosidades propias de las conchas (Fig. 7). Esta última estructura se observó más gruesa a las 48 h, formando un aspecto tabicado (Fig. 11). Las diferentes estructuras, incluidas las bacterias, llegaron a ocupar un 100% de la superficie de la concha a las 48 h post-exposición con *P. salmonis*.

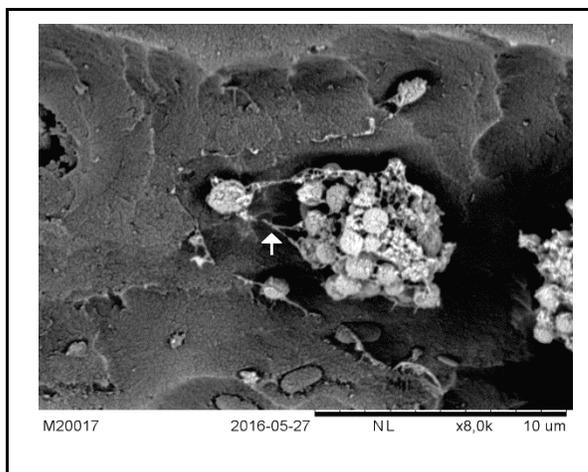


Figura 8. Concha incubada con *P. salmonis* por 24 h. Aglomeración de bacterias de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, interconectadas a través de material fibrilar (flecha blanca) sobre la superficie de una concha de chorito. MEB. 8000x.

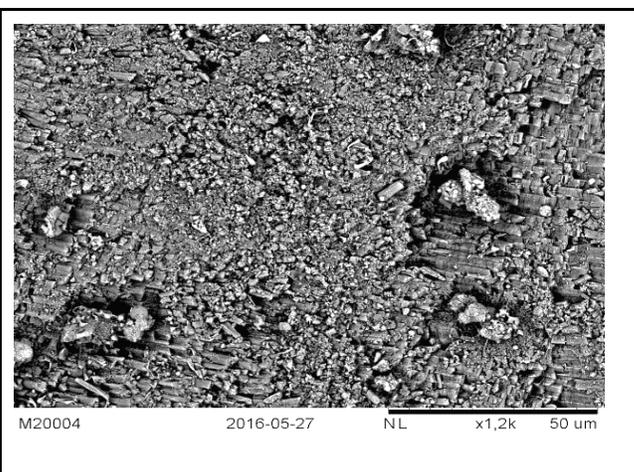


Figura 9. Concha incubada con *P. salmonis* por 48 h. Bacterias rodeadas de material granular, cubriendo la totalidad de la superficie de la concha. MEB. 1200x.

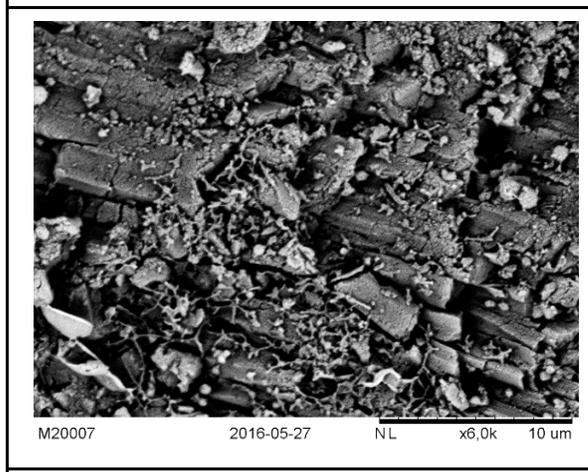


Figura 10. Concha incubada con *P. salmonis* por 48 h. Gran número de bacterias cocáceas rodeadas por material fibrilar y granular en la superficie. MEB. 6000x.

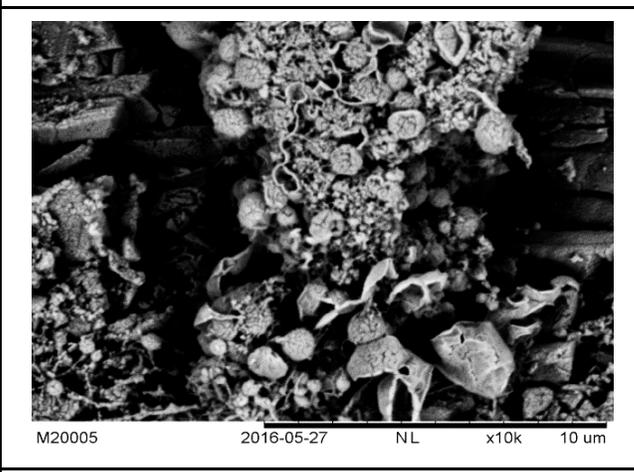


Figura 11. Concha incubada con *P. salmonis* por 48 h. Agrupación de bacterias, rodeadas por material fibrilar, granular y estructuras que forman especies de tabiques en la superficie. MEB. 10000x.

Prueba de infectividad

El control negativo no mostró ningún efecto en las líneas celulares estudiadas al día 23 de colocado un trozo de concha en la botella de cultivo. En las células con trozos de conchas, expuestas con *P. salmonis* por 48 h, se observó un efecto citopático desde el día 3 post-exposición. Las células afectadas se observaron con vacuolas, inmediatamente alrededor del borde de la concha (Fig. 12). Al día 6 post-exposición el efecto citopático se hizo más evidente en las zonas más cercanas al borde de la concha y al día 10 ya había un 80% de células afectadas.

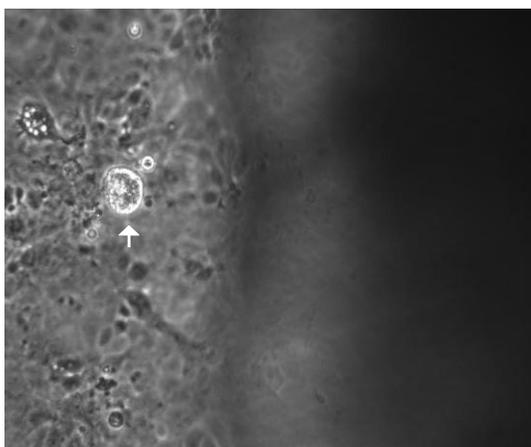


Figura 12. Línea celular CHSE-214. Las células fueron expuestas con una concha tratada con una suspensión de *P. salmonis* por 48 h. La zona oscura a mano derecha de la fotografía muestra el borde de la concha. Se observa un efecto citopático en las células cercanas al borde de la concha (flecha blanca). Día 3 post-exposición. Microscopio invertido de luz polarizada. 200x..

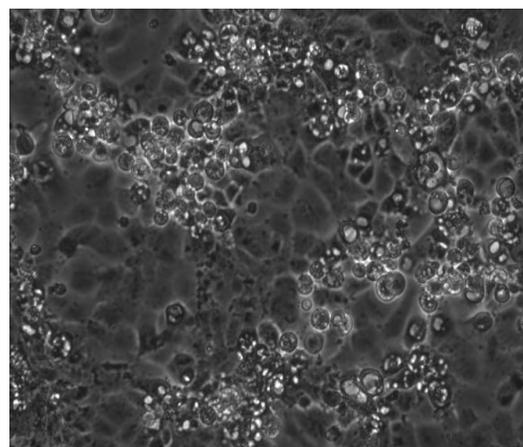
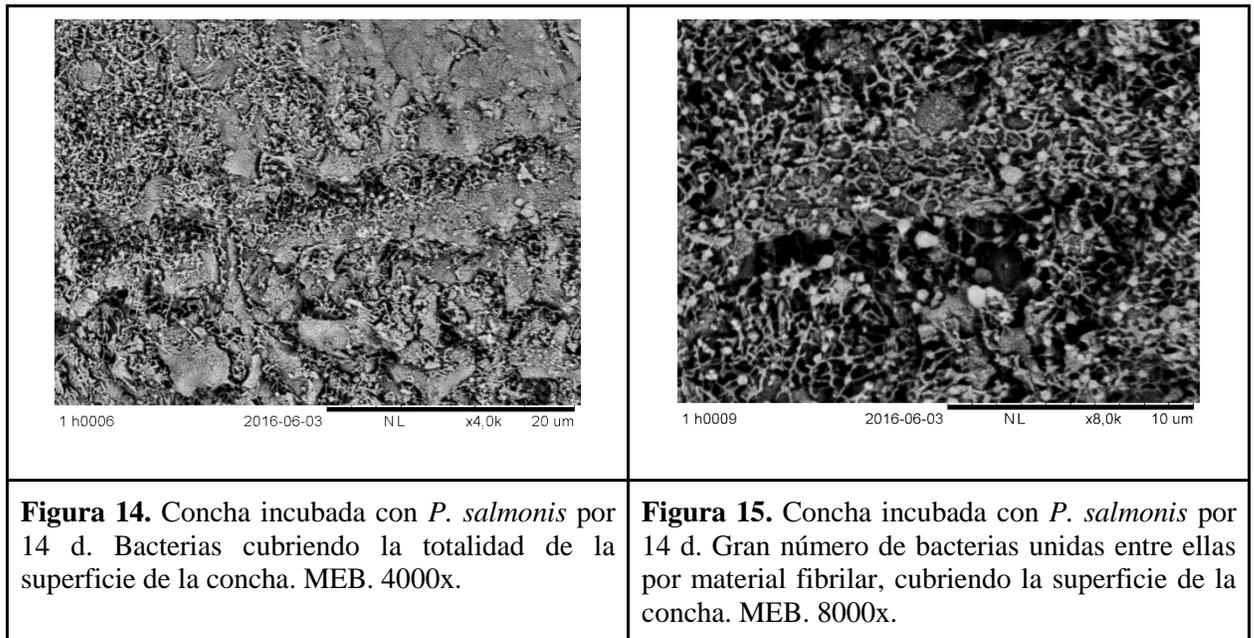


Figura 13. Línea celular CHSE-214. Corresponde a las mismas células de la figura 12 al día 6 post-exposición. Se observa un efecto citopático más avanzado que compromete aproximadamente un 50% de la monocapa. Día 6 post-exposición. Microscopio invertido de luz polarizada. 200x.

Al día 14, una de las conchas (un duplicado) fue fijada y observada con un microscopio de barrido. El 100% de la superficie se apreció con bacterias unidas por un material fibrilar (Fig. 14 y 15).



DISCUSIÓN

La piscirickettsiosis es una enfermedad provocada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* y que afecta a los salmónidos que se cultivan en Chile, siendo el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), salmón chinook (*O. tshawytscha*) y trucha arcoíris (*O. mykiss*) las principales especies donde se produce mortalidad. Esto ha provocado grandes pérdidas económicas en la industria del cultivo de salmón en nuestro país (Cvitanich *et al.*, 1991; Rozas y Enríquez, 2014). También se ha detectado la presencia de la bacteria en peces silvestres (*Helicolenus lengerichi*, *Odontesthes regia*, *Eleginops maclovinus*, *Pinguipes chilensis*, *Paralabrax humeralis*, *Trachurus murphyi*, *Basilichthys australis*, *Merluccius australis*), crustáceos (*Balanus psittacus*, y otros sin determinar especie), ectoparásitos (*Ceratothoa gaudichaudii*, *Caligus sp.*), anélidos (sin determinar especie), y moluscos (*Mytilus chilensis*) (Correal, 1995; Venegas, 1996; Campalans, 2011; Miranda *et al.*, 2012; Vargas, 2014; Valdés, 2016). En cuanto al chorito (*M. chilensis*), los estudios realizados por Correal (1995) y Campalans (2011) son los únicos que han estudiado si la bacteria se encuentra presente en este molusco.

Por otro parte, existen antecedentes de la presencia de diversas bacterias en conchas de bivalvos, de caracoles de río, caparazón de cangrejos y langostas (Bischoff y Wetmore, 2009; Russell, 2015). Con respecto a la concha del chorito, no se han realizado estudios que determinen la presencia de bacterias en su superficie. Sin embargo, en las especies de mejillón, *M. edulis* y *M. coruscus*, se ha podido determinar la existencia de diferentes microorganismos en la superficie de la concha, en su mayoría pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Shewanella* y *Pseudoalteromonas* (Pawlowska *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Por todo lo anterior, éste es el primer estudio que demuestra la unión de *P. salmonis* en conchas de chorito en condiciones de laboratorio.

En las conchas incubadas con *P. salmonis* en la cinética de infección, se pudo observar la bacteria sobre la superficie en todos los tiempos estudiados a través de MEB. Ésta se presentó normalmente en agrupaciones junto con estructuras que fueron definidas como: material granular, fibrilar y de tipo manto. En los estudios realizados por Larenas *et al.* (2003), Quinteros (2005) y Bravo (2007), la cantidad de bacterias con su respectivo CAP se

incrementó según mayor fue el tiempo de exposición de la muestra, al igual que en los resultados de este experimento. Sin embargo, lo más probable es que este aumento se deba a una agregación de otras bacterias a la superficie de la concha, desde el sobrenadante utilizado como desafío y no una multiplicación de ellas.

El material fibrilar se presentó en todos los tiempos con forma de prolongaciones entre las bacterias y entre éstas últimas con la superficie de la concha. Estas prolongaciones midieron aproximadamente de 1 a 2 μm de largo y son de características similares a lo descrito como CAP en los estudios realizados en ovas, piel y branquias de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) (Larenas *et al.*, 2003; Quinteros, 2005; Bravo, 2007). Con respecto al material granular, su tamaño aproximado fue de los 10 a 20 nm de diámetro y se ubicaron rodeando las bacterias, así como en diversas partes de la superficie de la concha. Esto concuerda con lo observado por Quinteros (2005), que destaca la presencia de abundante material granular rodeando las bacterias desde los tiempos más tempranos de exposición de 1 y 5 min. Por otra parte, en los tiempos de cinética de 24 y 48 h se observó la formación de un material de tipo manto, que cubría múltiples áreas, en promedio, desde 2 a 7 μm de superficie de la concha, normalmente cercano a los grupos de bacterias o *clusters*.

La prueba de infectividad demostró que la bacteria conserva su potencial infectivo *in vitro* aun cuando forma estas estructuras denominadas CAP, confirmando también su viabilidad. Con respecto a lo anterior, en los estudios de Correal (1995) y Campalans (2011) se sugirió que el chorito actúa como reservorio de *P. salmonis*, pero debido a que los métodos de identificación fueron inmunofluorescencia indirecta y PCR respectivamente, no se pudo determinar la viabilidad del agente. En contraste, en este estudio se demostró que una vez formado el CAP en la concha de chorito, la bacteria posteriormente (desde el día 3) pudo infectar células de peces, es decir, se produce una liberación de *P. salmonis* desde el CAP neoformado al medio. Sin embargo, para confirmar este fenómeno se requieren mayores estudios ya que su existencia podría implicar un nuevo enfoque en la epidemiología de la piscirickettsiosis.

El modo de transmisión específico en condiciones naturales es desconocido (Rozas y Enríquez, 2014). Además, no se ha determinado con exactitud reservorios y vectores de la bacteria (Olivares y Marshall, 2010). Se describe que *P. salmonis* puede ingresar a través de las branquias, piel o vía oral en trucha arcoíris (Smith *et al.*, 1999). En cuanto a la vía de salida, el agente puede ser eliminado a través de las heces de: alevines de salmón coho (Larenas *et al.*, 2005), salmón coho adulto (Lillo, 2016) y trucha arcoíris (Peirano, 2015), favoreciendo la diseminación del agente. Esto adquiere gran importancia debido a que los peces en agua de mar beben grandes cantidades de agua (Edwards y Marshall, 2013), y se sabe que la bacteria puede sobrevivir hasta por un periodo de 15 días a diferentes temperaturas en agua de mar (Lannan y Fryer, 1994; Olivares y Marshall 2010). Esto puede significar a la vez que, al eliminarse el agente al medio acuático, éste podría estar en contacto con las conchas de choritos.

Según Larenas (2005) el CAP podría corresponder a un tipo de biopelícula. Esto podría ser posible debido a la formación de agrupaciones de bacterias unidas por un material en red que se observa comúnmente en las imágenes a través de MEB, lo que también fue observado claramente en el presente estudio, en la concha con *P. salmonis* fijada en el día 14 (Larenas *et al.*, 2003; Quinteros 2005; Bravo, 2007). Además, se sabe que la bacteria es capaz de producir una biopelícula en condiciones estresantes en medio marino, siendo detectado a través de fluorescencia indirecta y microscopía electrónica de barrido (Marshall *et al.*, 2012). Sin embargo, para saber si el CAP es una biopelícula serían necesarios más estudios. De cualquier forma, siendo o no una biopelícula, el CAP producido en las conchas de chorito es sugerido como un factor de virulencia de la bacteria.

Como se dijo anteriormente, los resultados de este trabajo sugieren que el chorito podría actuar como reservorio de *P. salmonis*. El reservorio de un agente infeccioso es el hábitat en el que el agente normalmente vive, crece y se multiplica (CDC, 2012).

El chorito tiene dos fases en su ciclo de vida, una de vida libre y otra bentónica. En la primera, la larva tiene la capacidad de moverse libremente en la columna de agua, y en la bentónica, la postlarva se fija en un sustrato por el resto de su vida (Uriarte, 2008). Es por esto que se sugiere que la concha del chorito puede actuar manteniendo el agente fuera del

hospedero y diseminándolo en sistemas acuícolas. No obstante, dado que este experimento se realizó en condiciones de laboratorio y con MEM-10 como medio (diferentes a las del agua salada), se plantea realizar futuros trabajos en condiciones *in vivo*.

La presencia de CAP en conchas de chorito y la mantención de la capacidad infectiva de *P. salmonis*, puede significar un factor de riesgo importante en la mantención y transmisión de la bacteria hacia individuos sanos. Se sabe que los agentes patógenos pueden diseminarse a través de cuerpos de agua, peces portadores silvestres o vectores en el ambiente marino (Mortensen, 2000; Mortensen *et al.*, 2006). Por ejemplo, Page *et al.* (2005) demostraron que las corrientes marinas pueden provocar intercambio de aguas con partículas de virus ISA entre hasta 7 centros de cultivo en una región circular de 5 km de diámetro (pudiendo alcanzar los 13,9 km de distancia recorrida). Lo anterior adquiere aun mayor importancia, debido a que es conocido que los choritos están distribuidos a lo largo de toda la costa de Chile, desde Arica a Cabo de Hornos (Lancelloti y Vásquez, 2000). Por lo tanto, la industria de cultivo de salmones en nuestro país no estaría exenta de éste factor de riesgo ya que el Reglamento Ambiental para la Acuicultura establece que la distancia mínima que debe haber entre centros de cultivos de salmones, y de estos con centros de cultivos de choritos es de 1,5 millas náuticas (2,78 km) (Chile. Ministerio de Economía, 2001). Por tanto, de comprobarse que el chorito actúa como reservorio de *P. salmonis*, sería importante conocer las distancias de transporte que puede alcanzar la bacteria en el mar, y entre centros de cultivo de salmones y choritos, lo que en definitiva podría replantear las estrategias de control y prevención de la enfermedad. Bajo esta misma premisa, surge la interrogante de si *P. salmonis* puede formar CAP en otras superficies que son parte de los centros de cultivo de salmones, como son cabos, flotadores, boyas y mallas, entre otros.

En conclusión, se demostró que *P. salmonis* produce el CAP en la superficie de conchas de chorito, y que una vez formado puede liberar bacterias con capacidad infectiva.

BIBLIOGRAFÍA

BISCHOFF, P; WETMORE, S. 2009. Seasonal abundances of naked amoebae in biofilms on shells of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) with comparative data from rock scrapings. J. Eukaryot. Microbiol. 56: 397-399.

BRAVO, S. 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 14: 137-138.

BRAVO, C. 2007. Comparación de la cinética de presentación del complejo de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* en piel y branquias de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 84 p.

CAMPALANS, M. 2011. Determinación de patógenos de importancia en la salmonicultura en Cáligus y moluscos bivalvos. Informe final, Escuela de Ciencias del Mar, Facultad de Recursos Naturales, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 238 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2012. Principles of epidemiology in public health practice. An introduction to applied epidemiology and biostatistics. [en línea]
<<http://www.cdc.gov/ophss/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section10.html>> [consulta: 03-11-2016]

CHILE. MINISTERIO DE ECONOMÍA. 2001. Reglamento Ambiental para la Acuicultura. 14 diciembre 2001.

CORREAL, P. 1995. Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 62 p.

CUADRADO-SILVA, C.; CASTELLANOS, L.; ARÉVALO-FERRO, C.; OSORNO, O. 2013. Detection of quorum sensing systems of bacteria isolated from fouled marine organisms. Biochem. Syst. Ecol. 46: 101-107.

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.

EDWARDS, S; MARSHALL, S. 2013. Principles and Patterns of Osmoregulation and Euryhalinity in Fishes. In: Euryhaline Fishes. 32: 2-45.

FRYER, J.; LANNAN, C.; GARCÉS, H.; LARENAS, J.; SMITH, P. 1990. Isolation of a Rickettsiales-Like organism from diseased Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. Fish Pathol. 25: 107-114.

GÓMEZ, F.; HENRÍQUEZ, V.; MARSHALL, S. 2009. Additional evidence of the facultative intracellular nature of the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Arch. Med. Vet. 41: 261-267.

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

LANCELLOTTI, D.; VÁSQUEZ, J. 2000. Zoogeografía de macroinvertebrados bentónicos de la costa de Chile: contribución para la conservación marina. Rev. Hist. Nat. Chil. 73: 99-129.

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

LARENAS, J. 2005. Visión general sobre la patogenicidad en la piscirickettsiosis. [en línea] <<http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET2-2005/html/Aqua2005.htm>> [consulta: 01-11- 2016]

LI, Y.; GUO, X.; YANG, J.; LIANG, X.; BAO, W.; SHEN, P.; SHI, Z.; LI, J. 2014. Effects of bacterial biofilms on settlement of planigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. Aquaculture. 433: 434-441.

LILLO, E. 2016. Determinación de la presencia y asociación de *Piscirickettsia salmonis* en heces, hígado y riñón de salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) en condiciones de cultivos en mar. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 31 p.

MARSHALL, S.; GÓMEZ, F.; RAMIREZ, R.; NILO, L.; HENRIQUEZ, V. 2012. Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth stress conditions: a putative *in vivo* survival/ persistence strategy in marine environments. Res. Microbiol. 163: 557-566.

MIRANDA, P.; CIFUENTES, V.; OLMOS, P.; SHULZE, F. 2012. Evaluación y seguimiento sanitario de especies ícticas silvestres en agua dulce y de mar. Informe Final Subpesca, IFOP (Instituto de Fomento Pesquero). 257 p.

MORTENSEN, S. 2000. Scallop introductions and transfers, from an animal health point of view. *Aquacult. Int.* 8:123-138.

MORTENSEN, S.; KORSNES, K.; BERGH, O. 2006. “Eyes wide shut”- a critical view of aquaculture health management and risk factors in the “real world”. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 26: 1-5.

OLIVARES, J.; MARSHALL, S. 2010. Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. *J. Fish Dis.* 33: 261-266

PAGE, F.; CHANG, B.; LOSIER, R.; GREENBERG, D.; CHAFFEY, J.; MCCURDY, E. 2005. Water circulation and management of infectious salmon anemia in the salmon culture industry of southern Grand Manan Island, Bay of Fundy. [en línea] <<http://www.dfo-mpo.gc.ca/Library/315102.pdf>> [consulta: 01-11- 2016]

PAWLOWSKA, A.; PALIŃSKA, K.; PIEKAREK-JANKOWSKA, H. 2008. Colonisation and bioerosion of marine bivalve shells from the Baltic Sea by euendolithic cyanobacteria: an experimental study. In: *Current Developments in Bioerosion*. Universität Erlangen-Nürnberg Inst. Paläontologie. Berlín, Alemania. pp. 109-122.

PEIRANO, P. 2015. Determinación de la presencia y asociación de *piscirickettsia salmonis* en heces, hígado y riñón de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en condiciones de cultivo en mar. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 36 p.

QUINTEROS, J. 2005. Comparación en la presentación de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 54 p.

REED, L.J.; MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 497-499.

ROZAS, M.; ENRÍQUEZ, R. 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J. Fish Dis.* 37: 163-188.

RUSSELL, M.; CREECH, C.; JACKSON, D. 2015. Bacterial Diversity and Abundance in Shell Biofilms from the Freshwater Snail *Pleurocera canaliculatum* (Cerithioidea: Pleuroceridae). Pol. J. Microbiol. 64: 181-184.

SERNAPESCA. 2015. Informe sanitario: Salmonicultura en centros marinos. Primer semestre, año 2015. [en línea] <http://www.aqua.cl/wp-content/uploads/sites/3/2015/10/Informe_Sanitario_Salmonicultura_Centros_Marinos_2015.pdf> [consulta: 01-11- 2016]

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

TAMBURRI, M.; ZIMMER-FAUST, R.; TAMPLM, M. 1992. Natural sources and properties of chemical inducers mediating settlement of oyster larvae: A re-examination. Biol. Bull. 183: 327-338.

URIARTE, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. [en línea] <<http://www.fao.org/3/a-i0444s/i0444s04.pdf>> [consulta: 03-11- 2016]

VALDÉS, L. 2016. Vulnerabilidad del pejerrey de mar (*Odontesthes regia*) frente a *Piscirickettsia salmonis* en la Décima Región, Chile. Memoria para optar al título de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza. 56 p.

VARGAS, N. 2014. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en peces silvestres del sur de Chile y en *Caligus rogercresseyi*. Memoria para optar al título de Bioquímico. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile, Fac. Cs. Veterinarias. 158 p.

VENEGAS, C. 1996. *Piscirickettsia salmonis*: Prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Periodo invierno primavera. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 95 p.

WILLIAMS, H.; SCHOEFFIELD, A.; GUETHER, D.; KELLEY, J.; SHAH, D.; FALKLER JR, W. 1995. Recovery of bdellovibrios from submerged surfaces and other aquatic habitats. Microb. Ecol. 29: 39-48.

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de lisis de la línea celular CHSE-214

- 1- **Objetivo:** Obtener células lisadas de la línea CHSE-214
- 2- **Alcance:** Involucra a los operarios que manejen la sala de cultivo celular del laboratorio.
- 3- **Responsabilidades:** Dra. Carolina Moraleda, Dr. Julio Larenas y Manuel Pérez

4- **Materiales:**

Concha de chorito
Glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio 0,2 M
Tubos Eppendorf estériles
Botella de cultivo con Línea celular CHSE-214
Suero fisiológico estéril
Agua destilada estéril
Pipetas de 5 ml estériles
Guantes estériles
Campana de flujo laminar
Papel absorbente
Portaobjetos
Tripsina
Alcohol 70%
Gradilla para tubos Eppendorf
Propipeta
Centrífuga
Agitador tipo vórtex

5- **Procedimiento**

1. Se tiene una botella de cultivo celular CHSE-214 en la campana de flujo laminar.
2. Tripsinizar el cultivo con 1,5 ml.
3. Centrifugar el sobrenadante a 1500 rpm por 5 min.

4. Agregar 1 ml de suero fisiológico al “pellet” resultante. Homogeneizar con agitador tipo vórtex.
5. Botar el sobrenadante y agregar nuevamente 1 ml de suero fisiológico (segundo lavado, para sacar tripsina).
6. Centrifugar el sobrenadante.
7. Hacer citología de una pequeña parte del pellet resultante (control de citología 1)
8. Lo que sobre del “pellet”, lavarlo con 1 ml de agua destilada estéril por 10 minutos.
9. Realizar otro centrifugado del sobrenadante.
10. Agregar 3 ml de medio al pellet resultante.
11. Hacer otra citología del pellet resultante mezclado con el medio (control de citología 2).
12. Filtrar 1 ml de sobrenadante, del cual se “inocularán” 0,5 ml en la concha del CNeg2
13. Para el grupo anterior, una vez pasada 1 hora, fijar la muestra con glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio 0,2 M
14. Dejar al menos 24 horas con el fijador, y en temperatura ambiente.

Anexo 2

Protocolo de control de viabilidad de células CHSE-214 lisadas

- 1- Objetivo:** Observar si se presenta multiplicación de células CHSE-214 lisadas
- 2- Alcance:** Involucra a los operarios que manejen la sala de cultivo celular del laboratorio.
- 3- Responsabilidades:** Dra. Carolina Moraleda, Dr. Julio Larenas y Manuel Pérez
- 4- Materiales:**
 - Botella de cultivo con Línea celular CHSE-214 lisada
 - Botella de cultivo celular con MEM-10
 - Pipetas de 5 ml estériles
 - Guantes estériles
 - Campana de flujo laminar

Papel absorbente
Alcohol 70%
Auxiliar de pipeteo
Estufa de cultivo refrigerada
Microscopio invertido

5- Procedimiento

1. Pipetear 0,5 ml del sobrenadante de la botella con células CHSE-214 lisadas
2. Agregarlos en una botella de cultivo celular con MEM-10, y cultivar a 15 °C
3. Observar si se presenta multiplicación y propagación de las células en un microscopio invertido durante 23 días.

Anexo 3

Protocolo de lisis de *P. salmonis* y control de viabilidad post-lisis

- 1- **Objetivo:** Lisar *P. salmonis*, y posteriormente observar si ésta produce efecto citopático
- 2- **Alcance:** Involucra a los operarios que manejen la sala de cultivo celular del laboratorio.
- 3- **Responsabilidades:** Dra. Carolina Moraleda, Dr. Julio Larenas y Manuel Pérez
- 4- **Materiales:**
 - Concha de chorito
 - Glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio 0,2 M
 - Tubos Eppendorf estériles
 - Parafilm
 - Botella de cultivo con Línea celular CHSE-214 con *P. salmonis*
 - Botella de cultivo con Línea celular CHSE-214
 - Agua destilada estéril
 - Pipetas de 5 ml estériles
 - Guantes estériles
 - Campana de flujo laminar
 - Papel absorbente

Portaobjetos
Alcohol 70%
Gradilla para tubos Eppendorf
Auxiliar de pipeteo
Hervidor
Recipiente de plástico
Microscopio invertido
Estufa de cultivo refrigerada

5- Procedimiento

1. Bullir 1 litro de agua en un hervidor
2. Pipetear 1 ml de sobrenadante de cultivo celular con *P. salmonis* y agregarlos a un tubo Eppendorf
3. Sellar el tubo Eppendorf con parafilm
4. Verter el agua hervida en un recipiente
5. Ingresar el tubo Eppendorf al recipiente con el agua recién bullida, y mantenerlo sumergido por 10 minutos
6. Sacar 0,5 ml del sobrenadante bullido con una pipeta de 1 ml, e inocularlo en una línea de cultivo celular CHSE-214
7. Observar durante 13 días en microscopio invertido si se produce efecto citopático o no, para verificar que la bacteria realmente está muerta
8. Ingresar un trozo de concha en un tubo Eppendorf
9. Agregarle 0,5 ml del sobrenadante bullido, y mantener a temperatura constante de 15 °C por 1 hora. Luego de transcurrido este tiempo, fijar la muestra (Control negativo 3)

Anexo 4

Protocolo de grupos de cinética de infección

- 1- **Objetivo:** Obtener muestras de conchas de chorito con *Piscirickettsia salmonis*, para su posterior observación en Microscopía electrónica de barrido.
- 2- **Alcance:** Involucra a los operarios que manejen la sala de cultivo celular del laboratorio.
- 3- **Responsabilidades:** Dra. Carolina Moraleda, Dr. Julio Larenas y Manuel Pérez

4- Materiales:

Conchas de chorito
Tubos Eppendorf estériles
Botellas de cultivo con Línea celular CHSE-214 con *P. salmonis*
Botellas de cultivo con Línea celular CHSE-214 lisada
Botellas de cultivo con Línea celular CHSE-214
Suero fisiológico estéril
Agua destilada estéril
Pipetas de 1 ml estériles
Glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio 0,2 M
Guantes estériles
Campana de flujo laminar
Papel absorbente
Alcohol 70%
Gradilla para tubos Eppendorf
Auxiliar de pipeteo
Estufa de cultivo refrigerada

5- Procedimiento

1. Desafío (Concha + *P. salmonis*):
 - 1.1. Introducir un trozo de concha en un tubo Eppendorf
 - 1.2. Extraer 0,5 ml de sobrenadante de una botella de cultivo con línea CHSE-214 infectada con *P. salmonis*, con una pipeta estéril de 1 ml
 - 1.3. Se introducen los 0,5 ml en el tubo Eppendorf que contiene la concha
 - 1.4. Se repite los pasos anteriores seis veces (6 tubos Eppendorf con conchas y sobrenadante con bacteria)
 - 1.5. Los primeros dos tubos se dejan hasta 1 hora en temperatura constante (15 °C). El segundo par hasta 24 horas, y el tercer par hasta 48 horas. Después de transcurridos estos respectivos tiempos, fijar las muestras con glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio 0,2 M.
2. Control negativo 1 (Concha + MEM):
 - 2.1. Introducir un trozo de concha en un tubo Eppendorf
 - 2.2. Agregar 0,5 ml de MEM con una pipeta estéril de 1 ml

- 2.3. Se deja hasta 1 hora en temperatura constante (15 °C). Después de transcurrido este tiempo, se fija la muestra.
3. Control negativo 2 (Concha + Células lisadas):
 - 3.1. Introducir un trozo de concha en un tubo Eppendorf
 - 3.2. Agregar 0,5 ml de sobrenadante de células lisadas (Anexo 1), con una pipeta de 1 ml
 - 3.3. La muestra se deja hasta 1 hora en temperatura constante (15 °C). Después de transcurrido este tiempo, se fija la muestra.
4. Control negativo 3 (Concha + *P. salmonis* muerta):
 - 4.1. Introducir un trozo de concha en un tubo Eppendorf
 - 4.2. Agregar 0,5 ml de sobrenadante con bacteria muerta (Anexo 3), con una pipeta de 1 ml
 - 4.3. La muestra se deja hasta 1 hora en temperatura constante (15 °C). Después de transcurrido este tiempo, se fija la muestra.

Anexo 5

Protocolo de grupos de prueba de infectividad

- 1- **Objetivo:** Observar si *P. salmonis* en concha de chorito puede producir efecto citopático en línea celular CHSE-214.
- 2- **Alcance:** Involucra a los operarios que manejen la sala de cultivo celular del laboratorio.
- 3- **Responsabilidades:** Dra. Carolina Moraleda, Dr. Julio Larenas y Manuel Pérez
- 4- **Materiales:**
 - Conchas de chorito con *P. salmonis*
 - Tubos Eppendorf estériles
 - Botellas de cultivo con Línea celular CHSE-214

Pipetas de 1 ml estériles
Guantes estériles
Campana de flujo laminar
Papel absorbente
Alcohol 70%
Gradilla para tubos Eppendorf
Auxiliar de pipeteo
Estufa de cultivo refrigerada

5- Procedimiento

1. Prueba de infectividad (Desafío + línea celular CHSE-214):

- 1.1 Introducir un trozo de concha en un tubo Eppendorf
- 1.2 Extraer 0,5 ml de sobrenadante (con bacteria) de una botella de cultivo, con una pipeta estéril de 1 ml
- 1.3 Se introducen los 0,5 ml en el tubo Eppendorf que contiene la concha
- 1.4 Se repite los pasos anteriores 2 veces (2 tubos Eppendorf con conchas y sobrenadante)
- 1.5 Los dos tubos se dejan hasta 48 horas en temperatura constante (15 °C)
- 1.6 Una vez transcurrido este tiempo, las conchas se lavan con tampón PBS (pH= 7,2) estéril
- 1.7 Introducir la muestra en una botella de cultivo celular CHSE-214
- 1.8 Observar durante 4-5 días si se presenta efecto citopático

2. Prueba de infectividad (Control mecánico, Concha + línea celular CHSE-214):

- 1.1 Introducir un trozo de concha en una botella del cultivo con la línea celular CHSE-214
- 1.2 Observar durante 4-5 días si se presenta efecto citopático