



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

**Evaluación de la eficacia de productos comerciales  
no tradicionales (Suprateg<sup>TM</sup> y Cleanmix) como tratamiento en  
ovas de *S. salar* desafiadas con *Saprolegnia* spp.**

**Ana María Nilo Hernández**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

**PROFESOR GUÍA: JOSÉ MANUEL YÁÑEZ LÓPEZ**  
Universidad de Chile

**SANTIAGO, CHILE**  
2022



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

**Evaluación de la eficacia de productos comerciales  
no tradicionales (Suprateg<sup>TM</sup> y Cleanmix) como tratamiento en  
ovas de *S. salar* desafiadas con *Saprolegnia* spp.**

**Ana María Nilo Hernández**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

Nota Final: .....

**Firma**

Profesor Guía: José Manuel Yáñez .....  
Profesor Corrector: Galia Ramírez .....  
Profesor Corrector: Javiera Cornejo .....

PROFESOR GUÍA: JOSÉ MANUEL YÁÑEZ LÓPEZ  
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE  
2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi madre Ana María Hernández Hinojosa y hermana Diana Cristina Nilo Hernández, que siempre han creído en mí y han estado a mi lado. A mi esposo Francisco Castro Olgún que me dio la paz, tranquilidad y libertad de vida que me permitieron desarrollar este proceso de la mejor manera. A mis amigos de pregrado que se convirtieron en mis amigos de la vida: Romina Neira y Sebastián Zavala, que además me introdujo al mundo de la acuicultura. A todos los miembros del Laboratorio de Genómica Acuícola de FAVET, que me trataron como alguien capaz de enfrentar nuevos desafíos desde el primer momento, siempre dispuestos a explicar y enseñar. A Carolina Araya, que con su constante guía y enseñanza me mostró un nuevo mundo en la práctica de las ciencias veterinarias, y por supuesto, al Doctor José Manuel Yáñez, quien siempre revisó de manera rápida y eficaz cada avance y siempre tuvo la mejor disposición al responder mis dudas y corregir mi trabajo.

## RESUMEN

La saprolegniasis es una patología producida por *Saprolegnia* spp, género *Oomycetes*, de gran importancia a nivel nacional y mundial debido a las pérdidas que genera en los centros de acuicultura, afectando desde ovas a peces adultos.

Actualmente, lo más utilizado para su control es la Formalina y el Agua Oxigenada, demostrando buenos resultados, pero sus efectos adversos complican su utilización en ciertas etapas del desarrollo del *Salmo salar* y se considera a Formalina como un producto cuestionado para su uso en acuicultura.

Se realizó un ensayo para evaluar la efectividad para su control de dos productos que no presentan componentes tóxicos, con ingredientes naturales, y no dañinos para el humano, peces, ni el medio ambiente, SuprTECT™ y Cleanmix. Se utilizaron 204 ovas de *S. salar*, dispuestas en 6 grupos (Control Negativo, Control Positivo, Formalina, Agua Oxigenada, SuprTECT™ y Cleanmix), de 34 individuos cada uno, que fueron sometidas a infestación por *Saprolegnia* mediante inóculo (excepto control negativo) y posteriormente tratadas con los compuestos tradicionales y no tradicionales (excepto control negativo y control positivo).

Los resultados evidenciaron una equivalencia entre tratamientos tradicionales (Formalina y Agua Oxigenada; 59% y 62% de sobrevivencia) y no tradicionales (SuprTECT™ y Cleanmix; 62% y 56% de sobrevivencia). Se sugiere realizar ensayos a mayor escala para evaluar su utilización en conjunto con los productos tradicionales y disminuir la utilización de estos, o estimular sinergia entre ambos.

Palabras clave: saprolegniasis, *Saprolegnia* spp., acuicultura, formalina, agua oxigenada, *Salmo salar*, ovas

## ABSTRACT

Saprolegniasis is a pathology caused by *Saprolegnia* spp., genus *Oomycetes*, of great importance at national and global level due to the losses it generates in aquaculture centers, affecting from eggs to adult fish.

Currently, the most used products for its control are Formalin and Hydrogen Peroxide, showing good results. However, their adverse effects complicate their use in certain stages of the development of *Salmo salar* and Formalin is considered as a product not suitable for use in aquaculture.

Two products that do not have toxic components, with natural ingredients, and are not harmful to people, fish, or the environment, Supratect™ and Cleanmix, were tested for their effectiveness to control the agent. Two hundred and four eggs of *S. salar* were used, arranged in 6 groups (Negative Control, Positive Control, Formalin, Hydrogen Peroxide, Supratect™ and Cleanmix), of 34 individuals each, which were subjected to Saprolegnia infestation by inoculum (except negative control) and subsequently treated with traditional and non-traditional compounds (except negative and positive control).

The results showed an equivalence between traditional treatments (Formalin and Hydrogen Peroxide; 59% and 62% survival) and non-traditional treatments (Supratect™ and Cleanmix; 62% and 56% survival). Larger-scale trials are suggested to evaluate their use in conjunction with traditional products to reduce their use, or even promote synergy between the two.

Keywords: saprolegniasis, *Saprolegnia* spp., aquaculture, formalin, hydrogen peroxide, *Salmo salar*, eggs

## ÍNDICE

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| INTRODUCCIÓN .....  | 7                                    |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....  | 9                                    |
| Situación mundial y nacional de la acuicultura .....  | 9                                    |
| Desafíos de la acuicultura .....  | 9                                    |
| Saprolegniasis y su impacto en la acuicultura .....   | 10                                   |
| Ciclo biológico.....  | 111                                  |
| Verde de Malaquita.....   | 111                                  |
| Estrategias de control.....   | 12                                   |
| Suprateg <sup>TM</sup> .....  | 13                                   |
| Cleanmix .....  | 13                                   |
| OBJETIVO GENERAL.....   | 15                                   |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 16                                   |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 17                                   |
| RESULTADOS .....  | 21                                   |
| DISCUSIÓN.....  | 27                                   |
| CONCLUSIÓN.....   | 30                                   |
| BIBLIOGRAFÍA .....  | 31                                   |
| ANEXOS .....  | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| ANEXO I: Certificado CICUA.....   | 34                                   |
| ANEXO II: Protocolo desafío <i>Saprolegnia</i> .....  | 39                                   |
| ANEXO III: Protocolo PCR <i>Saprolegnia</i> .....   | 40                                   |
| ANEXO IV: Ciclo y evaluación estructuras <i>Saprolegnia</i> .....   | 45                                   |
| ANEXO V: Protocolo de supervisión para Ovas modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985)..... | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Resultados tabulados en Curva de Kaplan-Meier ..... | 25 |
| Tabla 2. Regresión de Poisson.....                           | 26 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Aleta caudal de <i>S. salar</i> con lesiones provocadas por <i>Saprolegnia</i> spp.....  | 10 |
| Figura 2. a) Cultivo de saprolegnia en sda a 20°C durante 3 días. b) Estructuras microscópicas en donde podemos evidenciar micelio, hifas no septadas, y zoosporangios. .... | 21 |
| Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, marcador pares de bases 100 bp plus dna de maestrogen. ....  | 22 |
| Figura 4. Árbol filogenético aprolegnia.....   | 23 |
| Figura 5. Reacción halos de inhibición, sensidiscos en sda sembrado con <i>S. diclina</i> .....  | 23 |
| Figura 6. Tejido de ova fijado con LCB, en donde se observan racimos de hifas, estructuras representativas de <i>Saprolegnia</i> spp.....                                    | 24 |

## INTRODUCCIÓN

La saprolegniasis, es una enfermedad que afecta tanto a ovas como a peces alrededor del mundo, siendo de gran impacto para la acuicultura. El género *Saprolegnia*, pertenece a la clase *Oomycetes*, incluido en el phylum *Oomycota*. Son conocidos como hongos de agua, sin embargo, no pertenecen al Reino Fungi, sino al Reino Chromista, estando más emparentados con algas y plantas que con hongos y animales. Varios miembros del género *Saprolegnia* son conocidos por causar cambios patológicos en peces y ovas infestadas, generando daño hasta en un 80% de la superficie total del individuo afectado, ocasionando mermas en la producción, y pérdidas económicas.

El Verde de Malaquita fue durante años el método de control más efectivo para *Saprolegnia*, pero desde su prohibición en Estados Unidos en el año 1983, por sus efectos tóxicos y carcinogénicos, se ha producido una reemergencia y aumento de casos de saprolegniasis, por lo que se ha hecho imperativo encontrar un método de control igual de efectivo, pero sin los efectos adversos del Verde de Malaquita.

Actualmente se encuentran en estudio gran cantidad de tratamientos que van desde la utilización de antimicrobianos, hasta extractos de plantas con propiedades antifúngicas, pero hasta ahora no han logrado resultados comparables con el Verde de Malaquita. El tratamiento más efectivo actualmente corresponde al uso de formalina, la cual, a pesar de entregar buenos resultados a una dosis de 1700 ppm, también posee características negativas por su toxicidad y efecto carcinogénico, por lo que se sospecha que será prohibida su utilización en acuicultura en los próximos años.

Este estudio busca comparar el efecto de métodos tradicionales, junto al análisis de dos nuevos tratamientos específicos para la saprolegniasis: SuprTECT™, elaborado en base a extractos de plantas con propiedades antifúngicas, sin presentar toxicidad ni efectos adversos en peces ni humanos; y Cleanmix, producto en base a ácido acético y ácido lingosulfónico, que juntos generan un efecto desinfectante, ya que el primero genera una respuesta oxidativa sobre la membrana del microorganismo, y el segundo previene la formación de biofilm, esporulación y desarrollo del agente. Esto con el objetivo de aportar

nuevo conocimiento sobre su efectividad contra *Saprolegnia* en ovas de salmón del Atlántico (*Salmo Salar*).

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Situación mundial y nacional de la acuicultura**

Se estima que la producción mundial de pescado ha alcanzado 179 millones de toneladas en 2018. La acuicultura representó el 46% de la producción total y 52% de esta es para consumo humano. Se reconoce a China como el principal productor acuícola con un 35% de la producción total, seguido por Noruega, Vietnam (desde el 2014), India (desde 2017), Chile y Tailandia (FAO, 2020).

En Chile, los centros de acuicultura representan el 41% del desembarque total del país, equivalente a 1.505.486 toneladas de un total de 3.691.358 toneladas, el cual incluye al sector de pesca industrial y artesanal. El 72% de la cosecha de acuicultura proviene de especies como salmón plateado con 204.740 toneladas, trucha arcoíris con 87.724 toneladas y salmón del Atlántico con 787.131 toneladas (Sernapesca, 2020).

### **Desafíos de la acuicultura**

Dentro de los desafíos a enfrentar por la acuicultura, tanto mundial como nacional, se encuentra el entorno macroeconómico futuro; los aranceles y las normas comerciales internacionales; la frecuencia y los efectos de eventos extremos en los recursos naturales; la presencia de otros efectos climáticos catastróficos como tsunamis, tormentas tropicales (ciclones, huracanes y tifones), inundaciones, bioseguridad y control de enfermedades emergentes y reemergentes (FAO, 2020). Después de la crisis producida por el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISA) ocurrido en 2007, que generó una disminución en la producción de casi un 50%, es de suma importancia la vigilancia epidemiológica de enfermedades producidas por agentes virales, bacterianos y hongos (Bustos-Gallardo, 2012).

## Saprolegniasis y su impacto en la acuicultura

El alza en la producción de salmón en Chile y el mundo ha generado también un aumento en la aparición de enfermedades infecciosas. La saprolegniasis es una enfermedad producida por *Saprolegnia* spp., pseudo-hongo perteneciente a la clase *Oomycetes*, también conocidos como hongos de agua. Se cree que *Saprolegnia* spp. genera un 10% de las pérdidas económicas en centros de acuicultura, principalmente de agua dulce o sistemas estuarinos. En casos dramáticos, hasta un 50%, comparándose con el piojo de mar y enfermedades bacterianas (Sandoval-Sierra *et al.*, 2014). El cuadro clínico se caracteriza por la aparición de una cobertura algodonosa blanco-grisácea en la piel del pez afectado, pudiendo cubrir hasta un 80% de la superficie total del individuo, invadiendo músculo, branquias y órganos internos lo que causa daños en la osmorregulación, problemas respiratorios y fallo multisistémico en la última etapa de la enfermedad (Lone y Manohar, 2018). *Saprolegnia* infesta a las ovas por medio de adhesión directa, seguido por penetración dinámica del micelio en el corion resultando en una mortalidad masiva por pérdida de oxígeno del entorno del embrión (Eissa *et al.*, 2013).



Figura 1. Aleta caudal de *S. Salar* con lesiones provocadas por *Saprolegnia* spp. Dependencias de Aquagen, 2021.

## **Ciclo biológico**

El ciclo de vida de *Saprolegnia* se caracteriza por poseer producción asexual de esporangios y zoosporas, y reproducción sexual, generando las características oosporas que lo diferencian de las otras especies de *Oomycetes* (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2004).

- Reproducción asexual: son estas las etapas en el desarrollo de *Saprolegnia* responsables de la saprolegniasis. Este tipo de reproducción genera la liberación de zoosporas natatorias desde los esporangios en función de encontrar nuevos hospederos, y esto se desencadena por un ambiente bajo en nutrientes o un descenso brusco en la temperatura del agua. Las zoosporas primarias pueden desplazarse sólo por un par de minutos, por lo que se enquistan, y luego de germinar se liberan las zoosporas secundarias, que son mótils por más tiempo, por lo que son consideradas el medio de dispersión e infestación de *Saprolegnia*. En esta etapa sucede el fenómeno conocido como “poliplanetismo”, el cual corresponde a una sucesión de enquistamiento y liberación de zoosporas de manera repetitiva (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2007).
- Reproducción sexual: esta etapa del ciclo involucra la producción de anteridio y oogonia gametangia, que deben unirse para la fertilización, generando las oosporas. Es mediante estas estructuras que se pueden identificar las distintas especies de *Saprolegnia* (Lone y Manohar, 2018).

## **Verde de Malaquita**

El Verde de Malaquita es un colorante básico, hidrosoluble, con propiedades antimicrobianas, por lo que se ha utilizado de manera efectiva para el control de infecciones bacterianas, protozoarias y de manera exitosa en el tratamiento de la saprolegniasis en peces adultos y como profilaxis en ovas (Ali *et al.*, 2015), ya que genera un daño en la capacidad de la célula para producir la energía necesaria para sus procesos metabólicos (Sutili y Gressler, 2021).

El producto se utilizaba para mantener bajo control las infestaciones por *Saprolegnia* en acuicultura. Sin embargo, su uso en acuicultura ha sido prohibido en Estados Unidos y Europa por sus efectos tóxicos y carcinogénicos, generando estrictas medidas de control para prevenir el ingreso de peces desde otras zonas en donde su uso no ha sido totalmente regulado (Zusková *et al.*, 2007). Esto ha resultado en un notable aumento de saprolegniasis en acuicultura, por lo que se ha convertido en un hongo patógeno de importancia económica, afectando particularmente a bagres, salmones y truchas. En esto último radica la importancia de encontrar un compuesto que lo sustituya (Lone y Manohar, 2018).

### **Estrategias de control**

Muchas alternativas de control para *Saprolegnia* han sido probadas: por ejemplo, el glutaraldehído, agua oxigenada, yodo, permanganato de potasio y sulfato de cobre, y los herbicidas diquat y simazine. Formalina es actualmente utilizada en acuicultura para el control de la saprolegniasis con aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, sin embargo, es posible que sea prohibida en el futuro cercano (Lone y Manohar, 2018). Por otro lado, altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) pueden utilizarse para la inhibición del crecimiento de *Saprolegnia* (Ali, 2005). Bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) es un antibiótico eficaz en el control de *Saprolegnia* en trucha arcoíris, y usado en su dosis máxima, previene la infestación en ovas fertilizadas (Branson, 2002). El permanganato de potasio  $KMnO_4$  genera una respuesta que disminuye el estrés oxidativo, por lo que estimula la respuesta del sistema inmune del hospedero contra el patógeno (Zahran y Risha, 2013). Además de estos, se conocen otros compuestos que se utilizan para el control, tales como los productos de cobre y radiación UV (Lone y Manohar, 2018).

En China es muy utilizado el biocontrol para *Saprolegnia*, aunque la evidencia científica aún no es concluyente. Actinobacteria, del género Frondihabitans (*Microbacteriaceae*), inhibe la adhesión de *Saprolegnia* a las ovas de salmón. De hecho, se correlaciona la baja incidencia de *Saprolegnia* con un ambiente rico en esta Actinobacteria. *Pseudomonas* acuáticas también han sido evaluadas, mediante un inóculo vivo como

reemplazo del compuesto bioactivo, pudiendo ser esta una forma biológica y sustentable para disminuir las enfermedades por *Oomycetes* en acuicultura (Liu *et al.*, 2015). Se cree que especies de *Trichoderma* tienen un rol importante en la supresión de *Saprolegnia* en acuicultura (Liu *et al.*, 2016). Hay algunos estudios con respecto a los efectos antifúngicos de los probióticos que, por medio de la asociación, generan la estimulación del sistema inmune del pez además de inhibir la actividad de *Saprolegnia* (Lategan *et al.*, 2004). Se ha descubierto que las vías de síntesis del complejo esterol de *S. parasitica* puede guiar la identificación de puntos específicos para la inhibición, ya que los esteroides son vitales para la existencia de *Oomycetes*, por lo que estas moléculas podrían ser utilizadas como drogas potenciales para estrategias de control (Dahlin *et al.*, 2017).

### **SuprTECT™**

Es un producto natural no tóxico de origen canadiense, de consistencia acuosa en base a extractos de plantas y vegetales, patentado (por lo que no se indica su composición exacta), seguro para seres humanos y el medio ambiente. Se utiliza como acondicionador de agua, tanto para peces adultos como para ovas, y ayuda a la no formación y eliminación de agentes como *Saprolegnia* (RPS Biologiques Inc., 2022).

### **Cleanmix**

Producto formulado en base a dos componentes orgánicos naturales (60% de ácido acético y 40% de ácido lingosulfónico (LSA)), haciéndolo un acondicionador y acidificante suave del agua, seguro para peces adultos y ovas. El mecanismo de acción contra bacterias y hongos está determinado por una acción combinada del ácido acético y del LSA. La actividad desinfectante del ácido peracético radica en su capacidad oxidante sobre la membrana externa de las bacterias, endosporas, hongos y levaduras. Ejerce su actividad al descomponerse en ácido acético, peróxido de hidrógeno y oxígeno (productos no dañinos). Por parte de LSA, inhibe un mecanismo de comunicación bacteriana, llamada Quorum sensing (QS), cuyo efecto se traduce en la menor formación de biofilm e inhibición de la bomba de eflujo (Soto, 2021).

El desarrollo de nuevos tratamientos contra *Saprolegnia* en base a productos naturales no tóxicos supone un gran paso en el mejoramiento de seguridad en el proceso productivo completo, tanto para usuarios, como para los animales y los consumidores de estos, sin embargo, lograr la eficacia anteriormente lograda con la utilización de productos tóxicos supone un gran desafío para la acuicultura actual, la producción esperada y las enfermedades que reemergen.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinación de la eficacia de tratamiento de Supratect™ y Cleanmix (no tradicionales) en sobrevida de ovas de *Salmo salar* y presencia de *Saprolegnia* spp. en desafío experimental *in vivo*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la infestación por *Saprolegnia* en ovas post tratamiento con productos tradicionales y no tradicionales.
2. Comparar la efectividad de tratamientos aplicados a ovas infestadas con *Saprolegnia*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Objetivo específico 1:

Se realizó la toma de muestra de aleta caudal de *S. Salar* adulto con cambios anatomopatológicos atribuibles a saprolegniasis (tejido con micelio algodonoso blanco grisáceo) de 5mm, y se transfirió a una placa de cultivo (con agar Sabouraud (SDA)), siguiendo el protocolo utilizado por Sandoval-Sierra *et al.*, (2014), durante 4 días a temperatura ambiente (TA) que generó el cultivo primario. De éste, se tomaron 5 mm del crecimiento más externo del micelio, se transfirió a una nueva placa de cultivo durante 3 días a TA, dando como resultado el cultivo purificado. Se realizaron subcultivos a partir del cultivo purificado y con estos se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificación de la región de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) utilizando el kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) para identificación molecular y secuenciación de *Saprolegnia*, para inspección macroscópica en la cual se evidenciaron características positivas a *Saprolegnia*, como crecimiento de micelio algodonoso blanco grisáceo, que luego fue fijado con tinción Lactofenol Cotton Blue (LCB) para análisis microscópico en donde se diagnosticó *Saprolegnia* a la identificación de cuerpo de la hifa, forma de la hifa, presencia de septum y estructuras reproductivas (zoosporangia) (Prada-Salcedo *et al.*, 2011). Se realizó una prueba de susceptibilidad a los productos fortificando sensidiscos de Penicilina 10 unidades (U) con los diferentes productos a probar (Cleanmix, Suprprotect™, Formalina, Agua Oxigenada) de acuerdo con la dosis recomendada por el productor, poniéndolos en una placa de SDA, previamente sembrada con *Saprolegnia* (Subcultivo purificado), por triplicado a TA por 48 horas, con monitoreo diario en donde se evaluó la formación del halo de exclusión.

Se realizó observación macro y microscópica a ovas durante y post desafío para realizar diagnóstico de *Saprolegnia*, además de cultivo de estas en donde se evaluó el crecimiento del micelio, macro y microscópicamente.

El inóculo de *Saprolegnia* se obtuvo mediante los siguientes pasos: se cortó con bisturí tres trozos de cultivo purificado de *Saprolegnia*, de 5 mm de diámetro de la parte

más externa del crecimiento del micelio y se transfirieron a placa Petri con 40 ml de caldo glucosa-levadura (glucosa 10 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 2,5 g L<sup>-1</sup>) por 72 horas a 20° C. Transcurrido este tiempo, el micelio blanco generado se lavó con dH<sub>2</sub>O para eliminar el exceso de caldo glucosa-levadura. Para inducir la producción de zoosporas, los micelios se colocaron en 30 ml de una mezcla 1:2 de agua deionada y dH<sub>2</sub>O a 10 °C durante 72 horas (Diéguez-Uribeondo *et al.*, 1994).

Mediante la utilización de un Cell Strainer 40 µm se separó la parte líquida que contiene las zoosporas, de los restos celulares más grandes y el micelio, posteriormente se cuantificó las zoosporas con Cámara de Neubauer. El inóculo debía tener una concentración de 1,0 x 10<sup>4</sup> zoosporas x L<sup>-1</sup> (Tohen *et al.*, 2011), que se consiguió mediante dilución.

Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron ensayos experimentales en las dependencias del Laboratorio de Genómica Acuícola de Favet, Universidad de Chile, durante Enero-Febrero, 2022. Se utilizaron 204 ovas, según lo calculado para lograr potencia estadística de 90% con el siguiente modelo:

$$X_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij}$$

$X_{ij}$ : observación de ovas infestadas con *Saprolegnia*

$\mu$ : media poblacional

$A_i$ : efecto fijo de biocidas como tratamiento, para 6 tratamientos (Control Negativo, Control Positivo, Formalina, Agua Oxigenada, Suprprotect™, Cleanmix)

$\varepsilon_{ij}$ : efecto residual

La Unidad Estadística es la ova, debido a que se evaluó infectado/ no infectado, por lo que corresponde a una variable binaria.

Según lo calculado empleando la fórmula de tamaño muestral para detectar una diferencia mínima significativa en el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2015), se empleó un número de 34 individuos por tratamiento para alcanzar una potencia

estadística de 90% con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , por lo que el número total de individuos utilizados durante el desarrollo del estudio no podía ser inferior a 204.

Las ovas tenían 400-405 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA), de las cuales fueron mantenidas durante todo el ensayo a un rango de temperatura de 4-8 °C. Primero pasaron por “ami-momi” (AM), ajustado para este estudio, método que genera abrasión en la mucosa protectora del corion mediante fricción leve con malla metálica para facilitar la infestación (Hatai y Hoshiai, 1994), para después ser traspasadas en grupos de 34 ovas a seis frascos de vidrio con 500 mL de dH<sub>2</sub>O, con su respectivo aireador, a las que se le agregó el inóculo. El grupo control negativo no fue expuesto al inóculo y los cinco frascos restantes (170 ovas) fueron inoculadas con *Saprolegnia* durante 24 horas, para luego ser lavadas y transferidas a los frascos con los tratamientos respectivos, los cuales fueron aplicados en el agua, previa dilución (en 5 ml de dH<sub>2</sub>O obtenida desde el mismo frasco). El agua fue recambiada inmediatamente post tratamiento y cada 48 horas, tanto en tratamientos como en controles, durante los 4 días del desafío y 7 días post desafío, con lo que se evaluó la sobrevivencia de las ovas. Se utilizó la dosis recomendada de los productos para llevar a cabo los ensayos, que fueron:

1. Control negativo (n= 34)
2. Control positivo (n=34)
3. Formalina 37% 1700 ppm. (n=34)
4. Agua Oxigenada 250 ppm (n=34)
5. SuprTECT™ 1250 ppm (n=34)
6. Cleanmix 100 ppm (n=34)

Se tomaron muestras de ovas de frascos correspondientes a tratamientos y a controles que presentaron características físicas compatibles con infestación por *Saprolegnia*, para realizar cultivos y evaluar si hubo crecimiento de *Saprolegnia* tanto a la observación macroscópica, en donde se evaluó desarrollo de micelio característico, como

microscópica, en donde mediante tinción con LCB, se evaluó presencia de hifas y zoosporangia. Estas ovas fueron registradas en una tabla en donde se contabilizaron como infestadas/muertas.

Objetivo específico 2:

Para el análisis de las variables dicotómicas, ovas vivas (sanas) y muertas (infestadas), se empleó el análisis de curvas de Kaplan-Meier que permite estudiar la sobrevida en función de una variable dicotómica (ovas vivas u ovas muertas). Este análisis calculó el Log Rank, para la prueba de igualdad de  $k \geq 2$  curvas de sobrevida, por lo tanto, un valor de Log Rank elevado presenta una correspondencia con un valor-p pequeño y si el valor-p es menor al nivel de significancia de 5%, sugiere que al menos una de las  $k$  curvas de sobrevida comparadas es distinta, es decir, este análisis entregó cuál de los tratamientos tuvo mayor sobrevida de ovas en contraste a los demás tratamientos.

Se empleó una regresión de Poisson, siendo esta una forma de análisis de regresión utilizada para modelar datos de conteo en contraste con una tabla de contingencia, basándose en el conteo de ovas que están sanas e infestadas, utilizando el tratamiento como factor regresor en el modelo de Poisson.

La regresión de Poisson supone que la variable de respuesta ( $Y$ : número de ovas infestadas) tiene una distribución de Poisson y que el logaritmo de su valor esperado se puede modelar mediante una combinación lineal de parámetros conocidos usando los tratamientos antifúngicos como dichos parámetros. La prueba de hipótesis sobre el coeficiente de regresión indica si hubo relación entre el número de ovas infestadas y los tratamientos. Además, el coeficiente de regresión permitió inferir si esta relación fue directa o inversamente proporcional.

## RESULTADOS

El desafío tuvo una duración de 11 días. La infestación con el inóculo de *Saprolegnia* se realizó 24 horas antes de iniciar el desafío (ANEXO II Protocolo desafío *Saprolegnia*). Una vez concluido el estudio, las ovas fueron retiradas del sistema mediante eutanasia química mediante inmersión con Benzocaína 20% (solución de sedación, 0,2 mL en 1 L).

### 1. Identificación *Saprolegnia*

#### 1.1. Obtención de cultivo purificado de *Saprolegnia*

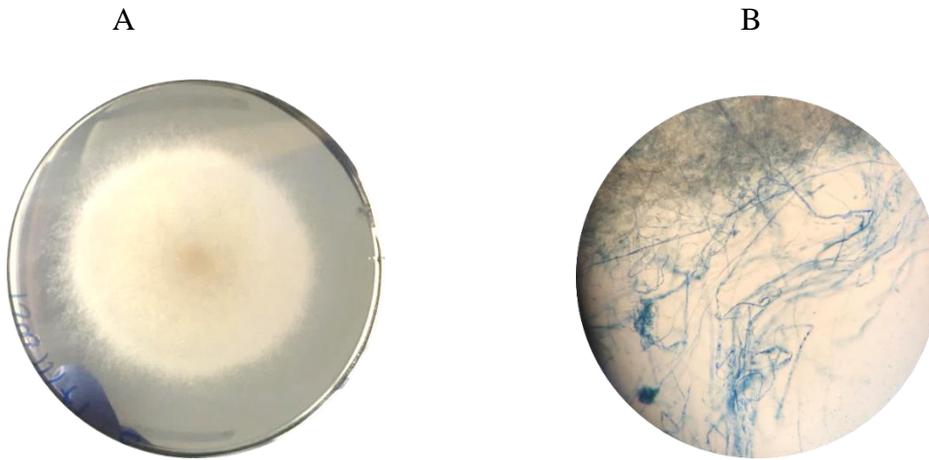


Figura 2. A) Cultivo de *Saprolegnia* en SDA a 20°C durante 3 días. B) Estructuras microscópicas en donde podemos evidenciar micelio, hifas no septadas, y zoosporangios.

Las hifas separadas y no septadas son características compatibles con *Saprolegnia* spp. a la tinción con LCB. (Ver ANEXO IV Ciclo y Evaluación estructuras *Saprolegnia*).

#### 1.2. Amplificación de la región ITS mediante PCR.

Se realizó mediante el protocolo de PCR, detallado en el ANEXO III (Protocolo PCR *Saprolegnia*). Posterior a esto se obtiene un amplicón de aproximadamente 700 pb, evaluado mediante electroforesis, tamaño esperado para un organismo como *Saprolegnia* spp. El peso molecular del fragmento se midió utilizando Plus DNA Ladder de MaestroGen.

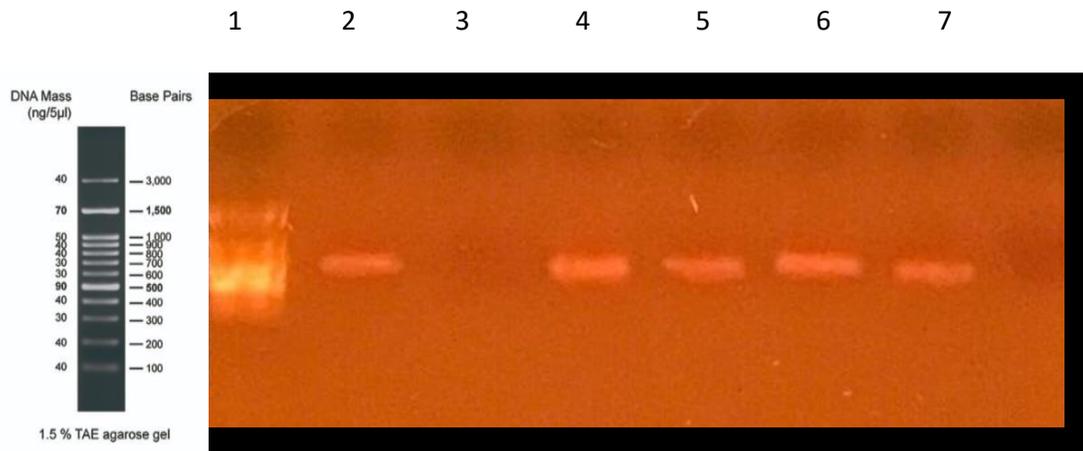


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, marcador pares de bases 100 bp Plus DNA de MaestroGen. Columna 1 corresponde al Ladder; 2, 4, 5, 6, 7 muestra cultivo purificado *Saprolegnia*; columna 3 control negativo.

### 1.3. Secuenciación: *Saprolegnia diclina*

El árbol filogenético basado en la región ITS del ADNr de *Saprolegnia* spp. se construyó realizando múltiples alineamientos de secuencias mediante el algoritmo ClustalW seguido del método neighbour-joining en el software MEGA X version 10.2.6. La secuencia objetivo (*Saprolegnia* aislado Aq.) fue obtenida a partir de un aislado purificado de tejido infestado con *Saprolegnia*, mientras que las secuencias de *S. parasitica*, *S. diclina*, *S. australis*, *S. delica* y *S. subterranea*, utilizadas como referencia, fueron obtenidas de la base de datos NCBI (Sandoval-Sierra *et al.*, 2013).

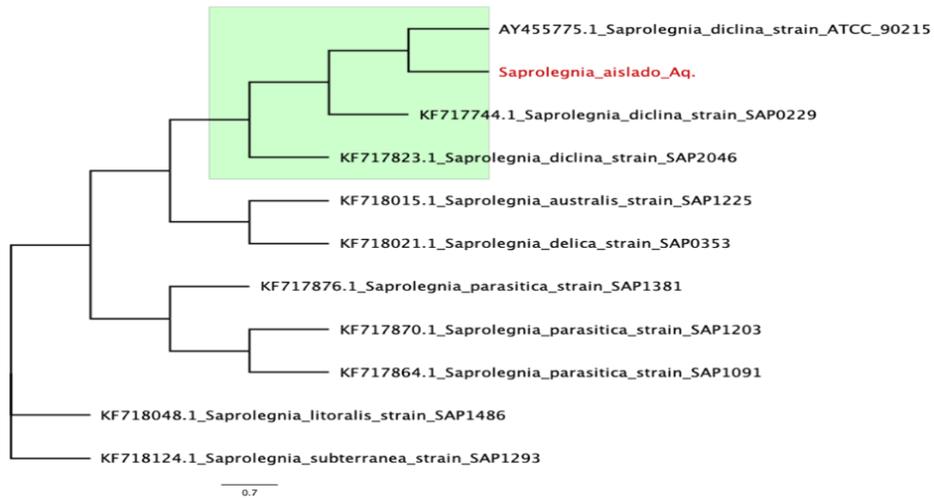


Figura 4. Árbol filogenético *Saprolegnia*. En la zona enmarcada en el cuadro se observa el grupo *Saprolegnia diclina*, en donde fue catalogado el aislado utilizado en esta tesis, correspondiente a *Saprolegnia* aislado Aq.

## 2. Susceptibilidad a tratamientos en placa

Formalina (a), el tratamiento más utilizado en la industria en la actualidad presentó un halo de inhibición de 14 mm. Cleanmix (c) y SuprTECT™ (d) presentaron halo de inhibición de 11 mm en ambos casos. Agua Oxigenada (b) presentó un halo de 10 mm.

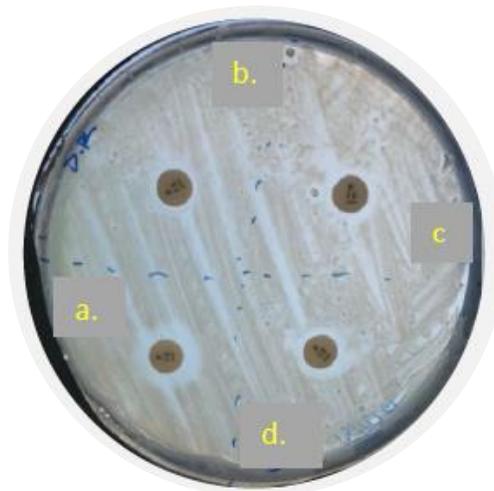


Figura 5. Reacción halos de inhibición, sensidiscos en SDA sembrado con *S. diclina*.

### 3. Desafío

Se tomaron muestras de las mortalidades en todos los grupos al finalizar el estudio. Las mortalidades apreciadas en el control negativo fueron evaluadas macro y microscópicamente para determinar la causa de muerte. Macroscópicamente, los signos eran compatibles con aborto, por manejo y estrés (ANEXO V Protocolo de supervisión para Ovas) y al análisis microscópico no se apreciaban indicios de *S. diclina* (crecimiento de micelio interno y externo, corion perforado). Al cultivo en SDA, no hubo crecimiento de micelio, por lo que se descarta que estas mortalidades sean atribuibles a saprolegniasis.

En el control positivo, se presentó un aumento sustancial de casos que mostraban las características de *Saprolegnia*. A la observación macroscópica se evidenció aglutinación de grupos de ovas con crecimiento de micelio algodonoso blanco. Al análisis microscópico de tejido de ovas fijado con LCB, se aprecia crecimiento interno y externo de micelio con estructuras compatibles con *Saprolegnia* spp. Al cultivo en SDA, hubo crecimiento de micelio algodonoso blanco grisáceo a las 72 horas.

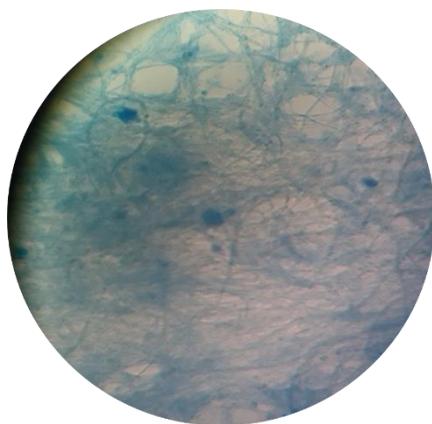


Figura 6. Tejido de ova fijado con LCB, en donde se observan racimos de hifas, estructuras representativas de *Saprolegnia* spp.

En los tratamientos Formalina, Agua oxigenada, SuprTECT™ y Cleanmix, la mortalidad total es muy similar entre sí. Se tomaron dos muestras de cada tratamiento para evaluar infestación. Todas las muestras fueron positivas a signos de infestación por

*Saprolegnia*, tanto por sus características macroscópicas como microscópicas. La mayoría de las ovas infestadas tendió a formar grupos cubiertos por micelio. Microscópicamente se observó perforación del corion y crecimiento interno de micelio e hifas. Al cultivo en placas con SDA, hubo crecimiento de micelio, sin embargo, es importante considerar la posibilidad de contaminación del cultivo debido al tejido en proceso de descomposición de las ovas.

#### 4. Análisis estadístico de resultado

##### 4.1. Curva de sobrevida Kaplan-Meier

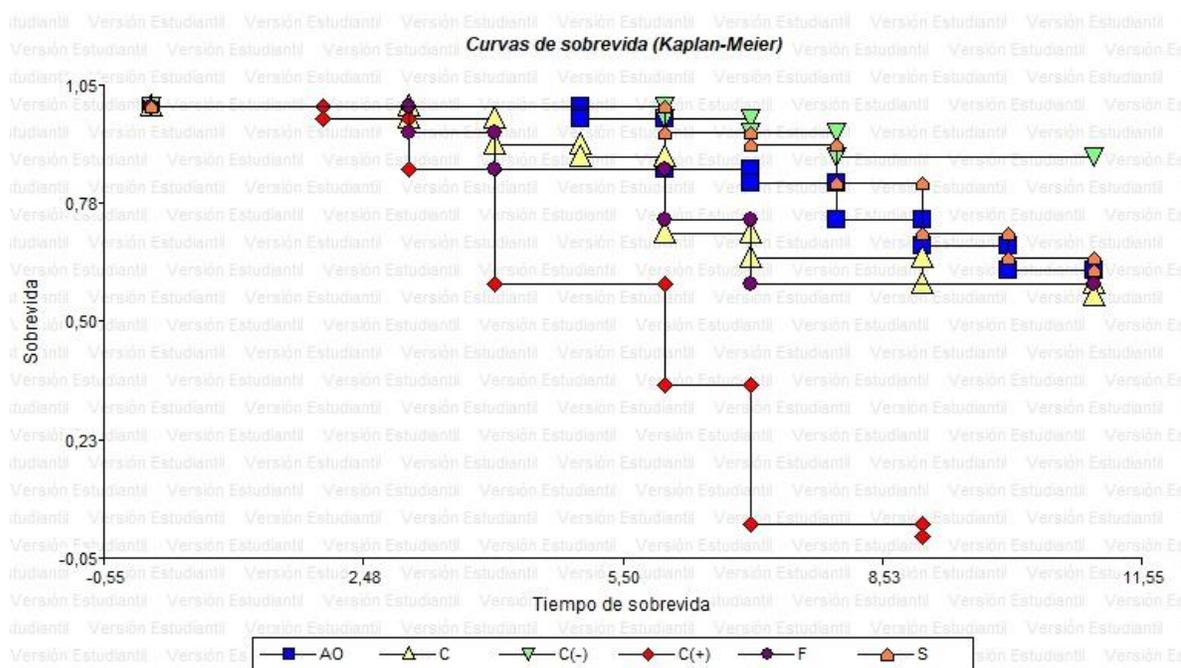


Tabla 1. Resultados tabulados en Curva de Kaplan-Meier. AO (Agua Oxigenada), C (Cleanmix), C(-) (Control Negativo), C(+) (Control Positivo), F (Formalina), S (Suprprotect™). Tiempo (días) y sobrevida (porcentaje).

La curva de Kaplan-Meier nos indica el porcentaje de sobrevida de las ovas en cada tratamiento en función del tiempo. Los cuatro tratamientos presentan resultados similares en su efectividad contra *Saprolegnia* spp. Suprprotect™ y Agua Oxigenada presentaron un

62% de sobrevivida siendo los más exitosos, versus Cleanmix (56% de sobrevivida) y Formalina (59%de sobrevivida). Para contrastar los resultados obtenidos en los tratamientos la curva nos muestra el porcentaje de sobrevivida del Control Negativo (88%) y el Control Positivo (0%), con la totalidad de las ovas infestadas al final del estudio.

#### 4.2. Regresión de Poisson

La regresión de Poisson se ajustó utilizando como variable respuesta el número de ovas infestadas y variable independiente el tratamiento, como factor regresor. Los resultados del ajuste del modelo se muestran en la Tabla 2.

| Comparacion |      | Coeficiente de Poisson | p-value | e^coeficiente | 1- e^coeficiente | %     |
|-------------|------|------------------------|---------|---------------|------------------|-------|
| C(+)        | AO   | -0,96                  | 0,0032  | 0,38289       | 0,61711          | 61,71 |
| C(+)        | C    | -0,82                  | 0,0083  | 0,44043       | 0,55957          | 55,96 |
| C(+)        | S    | -0,96                  | 0,0032  | 0,38289       | 0,61711          | 61,71 |
| C(+)        | F    | -0,89                  | 0,0052  | 0,41066       | 0,58934          | 58,93 |
| C(+)        | C(-) | -2,14                  | 0,0001  | 0,11765       | 0,88235          | 88,23 |

Tabla 2. Regresión de Poisson.

Los tratamientos presentaron en un valor-p significativo ( $p < 0,05$ ), por lo tanto, existe evidencia estadística suficiente para inferir la relación entre el número de ovas infestadas y los tratamientos utilizados. Cambiar de control positivo a Agua Oxigenada, implica que el número de infectados se reducirá en un 61,71 % ; cambiar de control positivo a Cleanmix, implica que el número de infectados se reducirá en un 55,96 % ; cambiar de control positivo a SuprTECT™, implica que el número de infectados se reducirá en un 61,71%; cambiar de control positivo a Formalina implica que el número de infectados se reducirá en un 58,93%; cambiar de control positivo a control negativo implica que el número de infectados se reducirá en un 88,23%.

## DISCUSIÓN

El tratamiento y control de los diferentes agentes patógenos que afectan a los peces es uno de los principales desafíos en la acuicultura a nivel mundial. Actualmente, *Saprolegnia* spp., es un organismo de gran importancia en salmonicultura por las pérdidas que genera en el stock de cultivo, en alevines y en peces (Zaror, *et al.*, 2004). Existen diferentes especies de *Saprolegnia*, que afectan de manera distinta a su hospedero, siendo algunas más infecciosas en adultos (*Saprolegnia parasítica*), otras en ovas y etapas embrionarias (*Saprolegnia diclina* y *Saprolegnia ferax*), y otras que incluso afectan a anfibios (*Saprolegnia ferax*) (Vredenburg y Drake, 2004).

*S. diclina*, que fue la especie detectada en el desarrollo de esta tesis, es un organismo que afecta con mayor agresividad a las ovas. El mecanismo de infestación que utiliza genera la perforación del corion y muerte de la ova de manera directa, por el crecimiento del micelio desde dentro de esta afectando al embrión, a diferencia de la actividad que ejerce *S. parasítica*, que genera mortalidad de estas de manera indirecta, al atrapar a las ovas en un micelio alimentado por las ovas muertas que le sirven de sustrato, generando dificultades en la osmorregulación del ambiente interno y externo de la ova, culminando con la muerte (Songe *et al.*, 2016). Esto pudo influir en el alto porcentaje de infestación, ya que se ha demostrado que esta especie es más agresiva en ovas y estadios embrionarios (Tohen *et al.*, 2011).

Luego de la prohibición del Verde de Malaquita se han probado diversos tratamientos para el control de esta patología, sin embargo, los más utilizados en la actualidad poseen características que los hacen peligrosos en su manipulación y empleo, pudiendo afectar tanto a los organismos tratados como a los futuros consumidores. Entre estos destaca la Formalina (37%) que, por sus características, se sospecha su pronta prohibición para su uso en acuicultura (Lieke *et al.*, 2020). En peces, producto del estrés crónico que produce se ha reportado irritación del tejido branquial, disfunción de las branquias, desórdenes en la osmorregulación, alteraciones sanguíneas (producto de la hipoxia) y endocrinas, que se evidencia en los análisis histopatológicos como hiperplasia de la corteza adrenal y reducción del tejido linfático del bazo (Smith y Piper, 1972). Además,

este producto está catalogado como carcinogénico Grupo- 1 para humanos (IARC, 2004) y, si bien, son conocidos los efectos a corto plazo por exposición y/o consumo de formalina en altas dosis (irritación de las vías respiratorias, cáncer nasofaríngeo, cáncer cerebral, muerte), los efectos por consumo crónico en bajas dosis, como por ejemplo por ingesta a través de los alimentos, se desconocen (Goon *et al.*, 2014). El Agua Oxigenada es un tratamiento que se utiliza con cada vez más frecuencia en peces, y en salmones principalmente para el control del “piojo de mar” (*Lepeophtheirus salmonis* y *Caligus rogercresseyi*). Sus efectos adversos no están tan documentados como en el caso de Formalina, pero hay reportes sobre alteraciones en el sistema de regulación del estrés oxidativo en peces adultos, y en el caso de ovas ojo y estadios tempranos, problemas en el desarrollo de los sistemas involucrados en dicha regulación, aunque se concluye que estas alteraciones no afectarían el desarrollo y crecimiento del pez a largo plazo (Vera y Migaud, 2016). Karlsen *et al.*, (2021), desarrolló un ensayo *in vivo* e *in vitro* para analizar el efecto de Agua Oxigenada sobre la piel de *S. salar* en donde no se encontraron indicadores de afectación del bienestar externo ni metabolitos en la sangre de los peces, sin embargo el transcriptoma detectó estrés en la piel, demostrando efectos adversos en la migración de queratocitos, por lo que si bien no son efectos adversos inmediatos, el Agua Oxigenada puede interferir en la reepitelización de lesiones y aumento de la susceptibilidad a infecciones.

Los resultados del presente estudio demostraron que, si bien, hubo un porcentaje de mortalidad cercano al 40% en todos los tratamientos, SuprTECT™ fue el tratamiento alternativo con mayor sobrevivencia, con una efectividad equivalente a Agua Oxigenada. Sin embargo, durante el screening con sensidiscos, el halo de inhibición generado por SuprTECT™ presentó poca definición, haciéndose difuso con el transcurso del tiempo (72 h), lo que podría indicar pérdida de la potencia del producto. Se sugieren más estudios para un mayor entendimiento de su capacidad biocida en el tiempo. SuprTECT™ y Cleanmix, tienen efectos terapéuticos equivalentes a los productos tradicionalmente utilizados en cuanto a sobrevivencia de ovas infestadas con *S. diclina*, con un 62% y 56 % de sobrevivencia respectivamente, evitando la infestación total y consecuente muerte, como fue en el caso

del control positivo, en donde la sobrevivencia fue de 0% al día 9 del desafío. Se indica que ambos productos, son de origen natural y no presentan toxicidad para el hombre, ovas y peces y medio ambiente en general, por lo que, de acuerdo a los resultados de este estudio preliminar, se recomienda el uso intercalado de SuprTECT<sup>TM</sup> y Cleanmix con Formalina y Agua Oxigenada en centros de acuicultura, para comenzar con estudios en terreno y a mayor escala. Agua Oxigenada (62% de sobrevivencia), demostró ser efectivo para el tratamiento de *Saprolegnia*, pero se recomienda discreción en su utilización, por los efectos a largo plazo que genera en el pez, y en cuanto a Formalina (59% de sobrevivencia) demostró efectividad para el tratamiento de *Saprolegnia* en ovas, sin embargo, es importante tener en consideración los efectos tóxicos tanto para peces como para seres humanos que genera su utilización.

## CONCLUSIÓN

De la presente Memoria de Título se puede concluir que, bajo las condiciones generadas para el desarrollo de este ensayo, la utilización de productos alternativos (Suprateg <sup>TM</sup> y Cleanmix) en la prevención y tratamiento de *Saprolegnia* spp. tiene una efectividad equivalente y levemente superior a los productos tradicionalmente utilizados, con la ventaja de que estos nuevos compuestos no generan efectos adversos por toxicidad. Por lo tanto, son una opción factible para controlar la saprolegniasis en centros de acuicultura siendo una alternativa segura, tanto para manipuladores, como para los peces y futuros consumidores. Se recomienda el desarrollo de estudios en terreno y a mayor escala para evaluar *in situ* y bajo otras condiciones su efectividad en sinergia con los productos utilizados actualmente.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALI, E.** 2005. Morphological and biochemical alterations of oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* as affected by salinity, ascorbic acid and their synergistic action. *Mycopathologia*, 159:231-243.

**ALI, S.; EVENSEN, Ø.; SKAAR, I.** 2015. Recent advances in the mitigation of *Saprolegnia* infections in freshwater fish and their eggs. **In:** Méndez-Vilas, A (Ed). *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, Formatex Research Center. Badajoz. pp. 691-697.

**BUSTOS-GALLARDO, B.** 2012. Brote del virus ISA: crisis ambiental y la capacidad de la institucionalidad ambiental para manejar el conflicto. *EURE*. 38(115):219-245.

**BRANSON, E.** 2002. Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with the fungus *Saprolegnia* species. *Vet. Rec.* 151:539–541.

**DAHLIN, P.; SRIVASTAVA, V.; EKENGREN, S.; MCKEE, L.; BULONE, V.** 2017. Comparative analysis of sterol acquisition in the oomycetes *Saprolegnia parasitica* and *Phytophthora infestans*. *PLoS ONE* 12(2): 170-873.

**DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K.** 1994. Repeated zoospore emergence in *Saprolegnia parasitica*. *Mycol. Res.* 98:810–815.

**DIEGUEZ-URIBEONDO, J.; GIERZ, G.; BARTNICKI-GARC, S.** 2004. Image analysis of hyphal morphogenesis in *Saprolegniaceae* (Oomycetes). *Fung. Genet. Biol.* 41:293-307.

**DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; FREGENEDA-GRANDES, J.; CERENIUS, L.; PÉREZ-INIESTA, E.; ALLER-GANCEDO, J.; TELLERÍA, M.; SÖDERHÄLL, K.; MARTÍN, M.** 2007. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina-Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genet Biol.* 44(7):585–601.

**DI RIENZO, J.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.** InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar>

**EISSA, A.; ABDELSALAMA, M.; THARWATB, N.; ZAKI, M.** 2013. Detection of *Saprolegnia parasitica* in eggs of angelfish *Pterophyllum scalare* (Cuvier–Valenciennes) with a history of decreased hatchability. *Int. J. Vet. Sci.* 1: 7-14.

**FAO.** 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in action.* Roma. 206 p.

**GOON, S.; BIPASHA, M. S.; ISLAM, M. S.** 2014. Fish Marketing Status with Formalin Treatment in Bangladesh. *Int. J. Med. Sci. Public Health.* 3(2): 95-100.

**HATAI, K.; HOSHIAI, G.** 1992. Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker. *Journal of Wildlife Diseases*, 28:532– 536.

**IARC.** 2004. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Vol. 88

**KARLSEN, C.; STURE BOGEVIK, A.; KRASNOV, A.; YTTEBORG, E.** 2021. In vivo and in vitro assessment of Atlantic salmon skin exposed to hydrogen peroxide, *Aquaculture*. Vol. 540.

**LATEGAN, M.; TORPY, F.; GIBSON, L.** 2004. Control of saprolegniosis in the eel (*Anguilla australis*, Richardson) by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture*. 240:19-27.

**LIEKE, T.; MEINELT, T.; HOSEINIFAR, S.; PAN, B.; STRAUS, D.; STEINBERG, C.** 2020. *Rev Aquacult*. 12: 943-965.

**LIU, Y.; RZESZUTEK, E.; VAN DER VOORT, M.; WU, C.; TOEN, E.; SKAAR, I.** 2015. Diversity of Aquatic *Pseudomonas* Species and their Activity against the Fish Pathogenic Oomycete *Saprolegnia*. *PLoS ONE* 10(8): 136-241.

**LIU, Y.; ZACHOW, C.; RAAIJMAKERS, J.; DE BRUIJN, I.** 2016. Elucidating the Diversity of Aquatic *Microdochium* and *Trichoderma* Species and their Activity against the Fish Pathogen *Saprolegnia diclina*. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 140.

**LONE, S.; MANOHAR, S.** 2018. *Saprolegnia parasitica*, A Lethal Oomycete Pathogen: Demands to be Controlled. *J. Infect. Mol. Biol.* 6: 36-44.

**MATTHEWS, E.; ELLISON, A.; CABLE, J.** 2021. *Saprolegnia parasitica* zoospore activity and host survival indicates isolate variation in host preference. *Fungal Biology*, 125(4): 260–268.

**PRADA-SALCEDO, L.; FRANCO-CORREA, M.; ACOSTA-GALVIS, A.** 2011. First record of *Saprolegnia* sp. in an amphibian population in Colombia. *Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.* V. 16 (3): 234-242.

**RICH, J.; NEELY, J.; PANIELLO, R.; VOELKER, C.; NUSSENBAUM, B.; WANG, E.** 2010. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 143(3): 331–336.

**RPS BIOLOGIQUES INC.** 2022. Supratect: for maintaining optimal health in fish and fish eggs. [en línea]. <<https://www.rpsbiologiques.com/supratect/>> [consulta: 31-03-2022]

**SANDOVAL-SIERRA, J.; LATIF-EUGENIN, F.; MARTÍN, M.; ZAROT, L.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.** 2014. *Saprolegnia* species affecting the salmonid

aquaculture in Chile and their associations with fish developmental stage. *Aquaculture*, v.434. 462-469.

**SANDOVAL-SIERRA, J.; MARTÍN, M.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.** 2014. Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): Defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal Biology*, 118(7):559–578.

**SERNAPESCA.** 2020. Anuarios estadísticos de pesca y acuicultura. [en línea] <<http://www.sernapesca.cl/informacion-utilidad/anuarios-estadisticos-de-pesca-y-acuicultura>> [consulta:05-11-2021]

**SMITH, C.; PIPER, R.** 1972. Pathological Effects in Formalin-Treated Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 29(3): 328–329.

**SONGE, M.; WILLEMS, A.; WIJK-NIELSEN, J.; THOEN, E.; EVENSEN, Ø.; VAN WEST, P.; SKAAR, I.** 2016. *Saprolegnia* *diclina* IIIA and *S. parasitica* employ different infection strategies when colonizing eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*, 39(3), 343–352.

**SOTO, F.** 2021. Desarrollan acondicionador de agua orgánico para pisciculturas. [en línea] <<https://www.salmonexpert.cl/article/desarrollan-acondicionador-de-agua-orgnico-para-pisciculturas/>> [consulta:01-04-2022]

**SUTILI, F.; GRESSLER, L.** 2021. Antimicrobial Agents. **In:** Kibenge, F., Baldisserotto, B., Chong, R (Eds). *Aquacult. Pharmacol. Aquaculture*. 131-168.

**THOEN, E.; EVENSEN, Ø.; AND SKAAR, I.** 2011. Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *Journal of Fish Diseases*. 34: 601-608.

**VERA, L. M.; MIGAUD, H.** 2016. Hydrogen peroxide treatment in Atlantic salmon induces stress and detoxification response in a daily manner. *Chronobiology International*, 33(5), 530–542.

**VREDENBURG, V.; WAKE, D.** 2007. Global declines of amphibian. **In:** *Encyclopedia of Biodiversity*. 1-9.

**ZAROR, L.; COLLADO, L.; BOHLE, H.; LANDSKRON, E.; MONTAÑA, J.; AVENDAÑO, F.** 2004. *Saprolegnia* *parasitica* en salmones y truchas del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 36(1):71-78.

**ZAHARAN, E.; RISHA, E.** 2013. Protective role of adjuvant and potassium permanganate on oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Saprolegnia* *ferax*. *Springer Plus* 2:94.

**ZUSKOVÁ, E.; MÁCHOVÁ, J.; SVOBODOVA, Z.; VESELY, T.** 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: A review. *Veterinarni Medicina*. 52(12):527-539.

## ANEXO I



Santiago, 21 de enero de 2022  
Certificado N°: 22529 – VET – UCH

### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **01-2022** del Proyecto de Investigación titulado **“Evaluación de la eficacia de productos comerciales no tradicionales (Suprpect™ y Cleanmix) como tratamiento en ovas de *Salmo salar* desafiados con *Saprolegnia spp*”**, de la investigadora Srta. Ana Nilo, tesista de pregrado de la carrera de Medicina Veterinaria y del patrocinante Dr. José Manuel Yáñez, Profesor Asociado, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los investigadores se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de **204 ovas**, especie *Salmo salar*, provenientes de la **Piscicultura Comau, AquaGen**, ubicada en Camino Vecinal a Punta Gruesa km 5, Sector Poyo, Península Huequi, Comuna Chaitén, Región de Los Lagos, desde el **21 de enero hasta el 28 de febrero del 2022**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Convenio de colaboración Aquagen S.A. FAVET-UChile**.

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.*

Claudia Delgado Acevedo  
Directora Ejecutiva  
CICUA – VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>  
email: [coordinador.cicua@uchile.cl](mailto:coordinador.cicua@uchile.cl)

## ANEXO II: Protocolo desafío *Saprolegnia*

### 1. Reactivos

- Agar Sabouraud (SDA) 39 g L<sup>-1</sup>
- Extracto de levadura
- Placa de cultivo: placa Petri con agar Sabouraud (medicina preventiva/microbiología)
- ~ 40 ml caldo de glucosa- levadura (glucosa 10 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 2,5 g L<sup>-1</sup>)
- Agua declorada (con anticloro comercial para peces en gotas)
- Anticloro 30 ml 3 gotas x L de agua.
- Cleanmix 100 ml/m<sup>3</sup> (40-100 ppm) (Dosis recomendada según fabricante 40- 100 ml/m<sup>3</sup>)
- Supratect™ 1250 µL por litro de agua (Dosis recomendada según fabricante)
- Formalina 37% grado farmacéutico (100 ppm) (Dosis recomendada)
- Hipoclorito de sodio 20mg/L

### 2. Equipos y materiales

- Cámara de Neubauer
- Colador 5 cm diámetro, 1,5 mm celdilla
- Colador 9 cm diámetro, 1,5 mm celdilla
- Refrigerador 4-8 ° C
- Pinzas anatómicas
- Incubadora
- Placas Petri 90 x 15,8 mm
- Bisturí
- Frascos conserveros de vidrio 1 L de capacidad
- Cell Strainer 40 µm

### 3. Individuo de estudio

204 ovas de la especie *Salmo Salar* con XXX UTA, 34 por tratamiento para la obtención de potencia estadística 0,9.

### 4. Material biológico

Muestras de *Saprolegnia* a partir de individuos infestado, cultivo primario y cultivo purificado:

- Con bisturí, cortar 5 mm de tejido con *Saprolegnia* y poner en centro de placa de cultivo

- Incubar a temperatura ambiente de 3 -5 días (cultivo primario)
- Extraer 5 mm<sup>2</sup> de micelio de *Saprolegnia* de agar a partir de la parte más externa del crecimiento observado en la placa y traspasar a nueva placa de cultivo
- Incubar a temperatura ambiente de 3 -5 días (cultivo purificado)

Consideraciones: Se obtendrá un micelio algodonoso y grisáceo (manchas amarillas indican contaminación y debe ser descartado). Recambio de cultivos una vez por mes, para evitar contaminación futura. Después de 2-5 recambios, se debe remuestrear *Saprolegnia* desde individuos infectados, para mantener virulencia.

#### 5. Producción de zoosporas para desafío:

- Tomar tres trozos de 5 mm de diámetro de agar con micelio blanco a partir de cultivo purificado de *Saprolegnia*
- traspasar a ~ 40 ml caldo de glucosa- levadura
- incubar a 20°C durante 72 h (crecimiento de micelio)

##### 5.1. Inducción de producción de zoosporas:

- Lavar micelio previamente incubado por 72 h con 70 ml de agua deionada - destilada 50/50 por tres veces, agitar antes de eliminar agua, para eliminar exceso de SDA
- Traspasar micelio a un volumen de 30 ml de agua deionada - destilada 50/50 a 20°C durante 24 h

##### 5.2. Concentración de zoosporas:

- Colar con un Cell Strainer 40 µm la solución anterior.
- Cuantificar zoosporas con Cámara de Neubauer
- Concentrar para cada tratamiento a  $1,0 \times 10^4 \times L^{-1}$  (inóculo)
- Si es necesario centrifugar a 3000 g x 5 minutos a TA la suspensión previa (50/50 deionada-destilada) para concentrar.
- **Concentración zoosporas/ml:**  $\frac{n^{\circ} \text{ de células} \times 10.000}{n^{\circ} \text{ cuadros contabilizados}}$

## 6. Desafío:

El desafío tendrá una duración de 7 días. Se deben aclimatar los individuos de estudio por 72 h a temperatura máxima de 8°C.

| Tratamiento      | inóculo | Ovas (n) | agua destilada (mL)/agua tratamiento (mL)                     | Tiempo de tratamiento | repetición de tratamiento (veces por semana) |
|------------------|---------|----------|---|-----------------------|--|
| control negativo | no      | 34       | 500 mL agua declorada   | no aplica             | -  |
| control positivo | sí      | 34       | 500 mL agua declorada   | no aplica             | -  |
| ensayo 1         | sí      | 34       | 500 mL de agua declorada con 850 $\mu$ L <b>formalina 37%</b> | 15 min                | 2 (cada 48 horas)                            |
| ensayo 2         | sí      | 34       | 500 mL de agua declorada con 50 $\mu$ L <b>Cleanmix</b>       | 1 h                   | 2 (cada 48 horas)                            |
| ensayo 3         | sí      | 34       | 500 mL agua declorada con 625 $\mu$ L <b>SuprTECT™</b>        | 1 h                   | 2 (cada 48 horas)                            |
| ensayo 4         | sí      | 34       | 500 mL agua declorada con 4 ml de <b>Agua Oxigenada 3%</b>    | 15 min                | 2 (cada 48 horas)                            |

Tabla 1. Dosificación y posología aplicación productos en ovas de *S. Salar*

### 6.1. Procedimiento

- Agregar 500 ml de agua destilada en 6 frascos, marcar según tratamientos descritos en Tabla 1.
- Instalar aireador a cada frasco.
- Generar abrasión de mucus protector y corion (ami-momi) mediante agitación sobre colador 9,5 cm de diámetro por 30 s a todas las ovas. No más de 20 individuos por ciclo.
- Añadir el inóculo de esporas en todos los frascos excepto en “control negativo”.
- Tomar 34 ovas con colador de 5 cm de diámetro y traspasar a cada frasco. Dejar reposar con inóculo durante 24 horas.
- Lavar todas las ovas con agua destilada utilizando un pistilo y devolver a su frasco correspondiente con 500 mL de agua destilada fresca.

- Añadir tratamientos según tiempo indicado en Tabla 1.
- Cambiar agua.

#### 7. Evaluación de infestación:

- Buscar signos de infestación en ovas, como interior blanquecino opaco, y/o crecimiento de micelio, durante 168 h. Revisión ovas AM y PM.
- Contabilizar mortalidad diaria para controles y tratamientos
- Tomar muestras de ovas para cultivo
- Escribir en planilla: fecha, cambios encontrados (visualización macroscópica) mortalidad y frasco en el que se observa.

#### 7.1. Identificación de *Saprolegnia*:

- Macroscópica: Visualizar a simple vista opacidad en ovas, y/o crecimiento de micelio blanco/ grisáceo.
- Microscópica: Visualización de estructuras microscópicas positivas a *Saprolegnia spp* (ANEXO IV).
- En cultivo: Estructuras ciclo asexual: Micelio extenso y denso, hifas ramificadas sépticas junto a masas de zoosporangios maduros e inmaduros, esporangiosporas al interior de estos.

Estructuras ciclo sexual: oogonias terminales con oosporas céntricas y anteridios.

\* Ver ANEXO IV Ciclo y evaluación estructuras *Saprolegnia*

- Molecular

Confirmación de *Saprolegnia spp.* mediante PCR de la región ITS.

\* Ver ANEXO III Protocolo PCR *Saprolegnia*

### **ANEXO III: Protocolo PCR *Saprolegnia***

1. Amplificar la región ITS utilizando los primers ITS5-F (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) Y ITS4-R(TCCTCCGCTTATTGATATGC), según indica Matthews *et al.*, (2021).
2. Realizar las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con el kit Taq PCR Master Mix (Qiagen), en duplicado, con 30 µl de reacción de mezcla, agregando:
  - 15 µL de Taq PCR Master Mix (Qiagen)
  - 1.5 µL de primer forward ITS5 (10 µM)
  - 1.5 µL de primer reverse ITS4 (10 µM)
  - 20-50 ng de ADN
  - Completar hasta 30 µL con agua libre de nucleasas
3. Incluir controles de reacción negativos sin muestra de ADN.
4. Las condiciones de amplificación por PCR serán:
  - Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos.
  - 5 ciclos de Amplificación: Desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 58°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 1 minuto.
  - 33 ciclos: Desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 48 °C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto.
  - Extensión final a 72°C por 10 minutos.
5. Agrupar y disponer los amplicones de cada muestra en un gel de agarosa al 1%
6. Posterior secuenciación utilizando el método indicado por Sandoval-Sierra *et al.*, (2014).

ANEXO IV: Ciclo y evaluación estructuras *Saprolegnia*

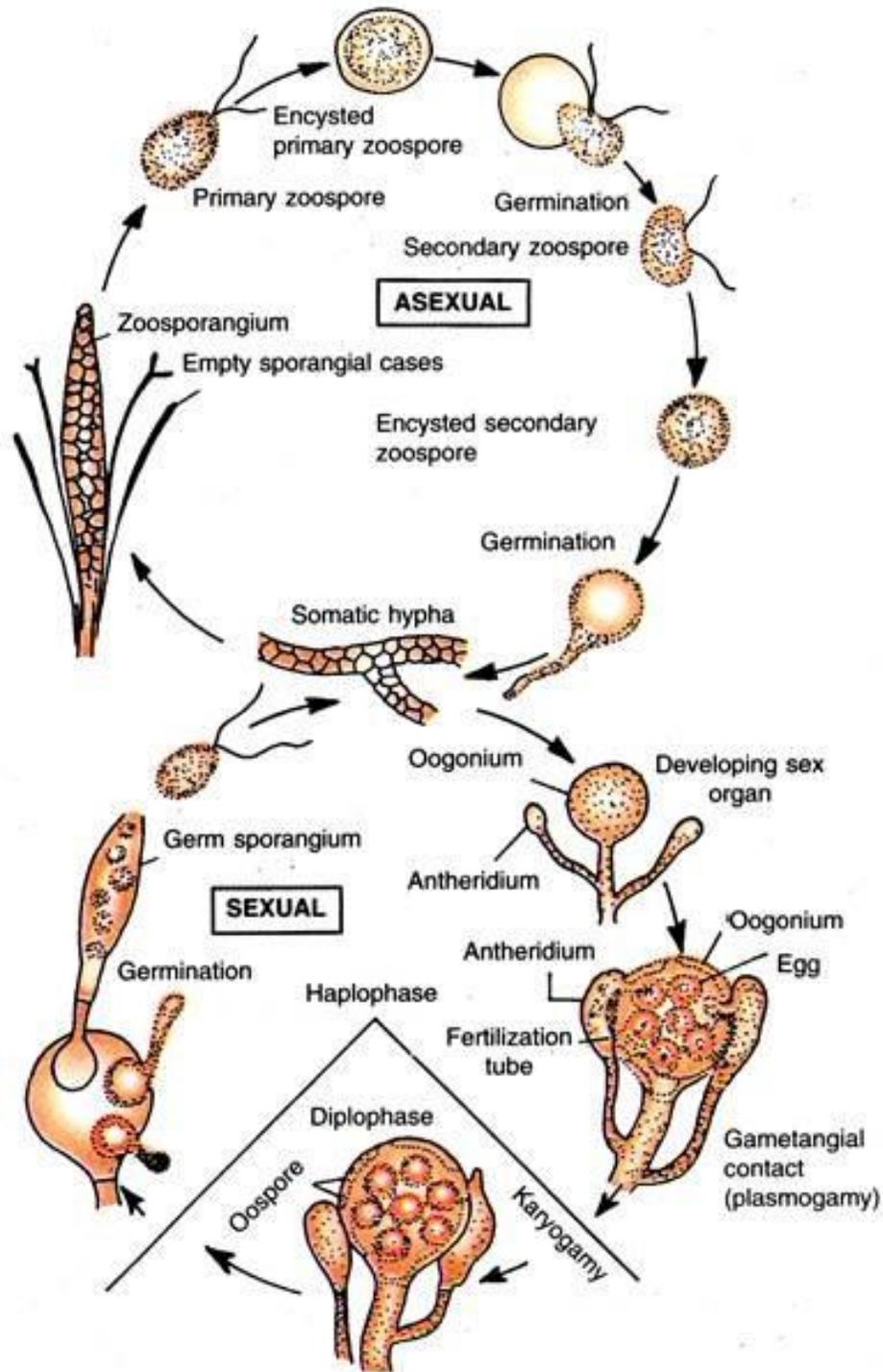


Figura 1. Representación pictórica del ciclo de vida de *Saprolegnia*.

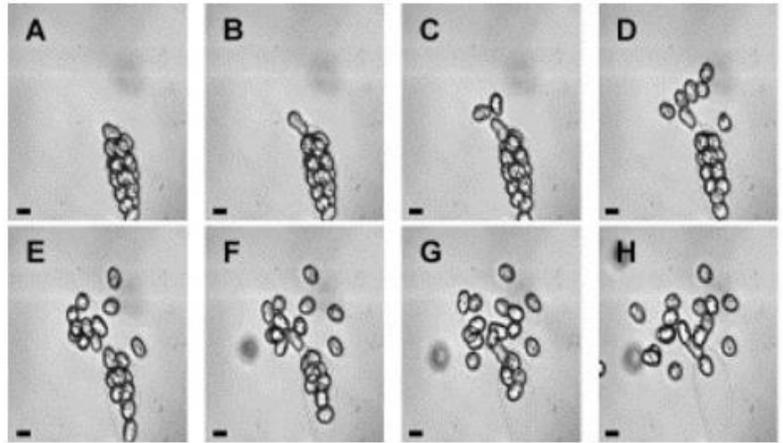


Figura 2. Imágenes de microscopio óptico de un esporangio de *Saprolegnia parasitica* liberando zoosporas primarias. Una vez que se formaron las zoosporas en el esporangio, todo el proceso de liberación de esporangios tuvo lugar en menos de un minuto. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

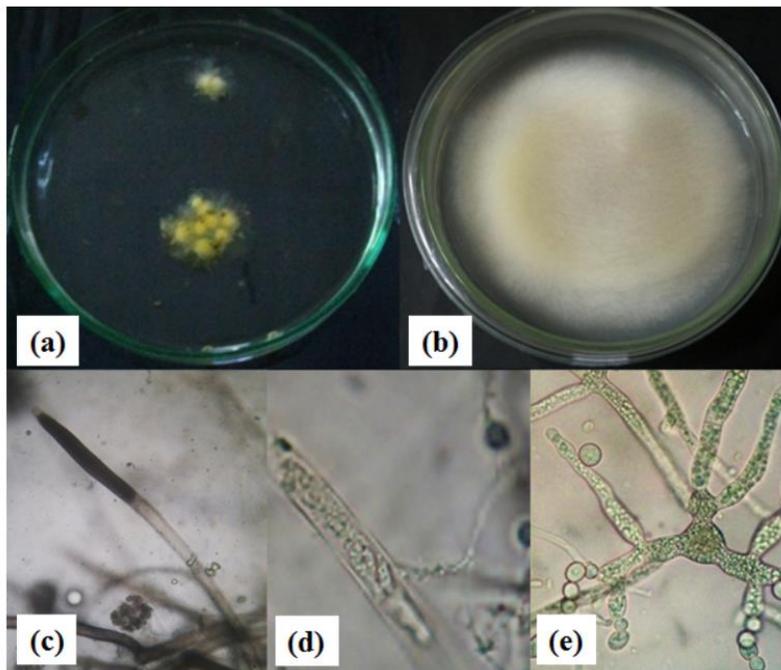


Figura 3. (a). Huevos de gouramy infectados por *Saprolegnia sp.*, (b). *Saprolegnia sp.* colonia en GYA (Agar de extracto de levadura de glucosa), (c). Zoospongario en la punta de la hifa, (d). Zoospongario con zoosporas maduras, y (e). Estructura de reproducción asexual.

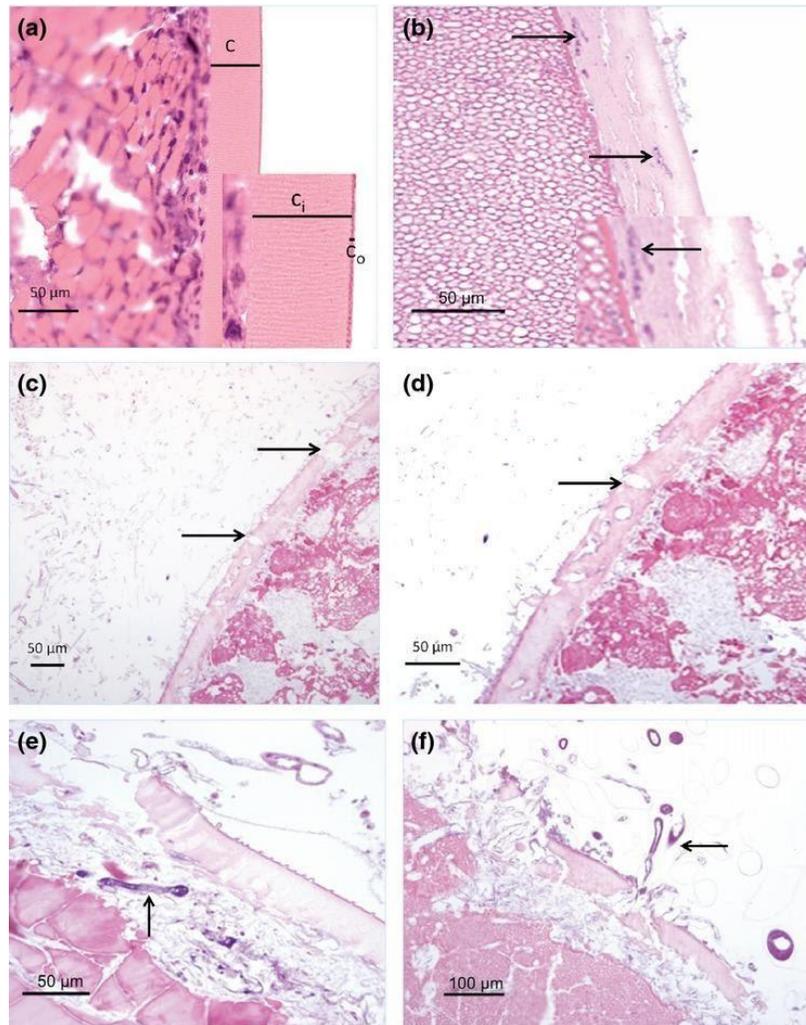


Figura 4. Histología de normal (a) e histopatología de huevos infectados (b – f). (a) Corion sano separado en una capa delgada externa (co; inserto) y una capa interna más gruesa (ci). La capa rica en células dentro del corion es probablemente parte del blastodermo. (b) Las hifas de *S. parasitica* están ubicadas dentro del corion, que muestra cambios menores. Las hifas se ubican en la parte media y hacia los gránulos de yema (flechas). Los detalles de las hifas se muestran en el inserto (flecha). (c) Infección por *S. parasitica* con cambios moderados del corion. Numerosas hifas en el exterior del huevo, y se ven varios poros y vacuolas en la pared del corion (flechas). (d) Mayor aumento de (c) detallando las vacuolas y las grietas en el corion (flecha). Nótese numerosas hifas. (e) Infección por *S. diclina*, con cambios moderados a severos del corion (y citoplasma). Los quistes germinados se presentan debajo del corion agrietado y dentro del huevo (flecha). (f) Infección por *S. diclina*, cambios severos en el corion. Casi una eliminación completa del corion en algunas áreas y con un corion más delgado de lo normal en otras. El corion también es discontinuo y los cambios se asocian con la presencia de hifas (flecha). Barras = 50  $\mu\text{m}$ .

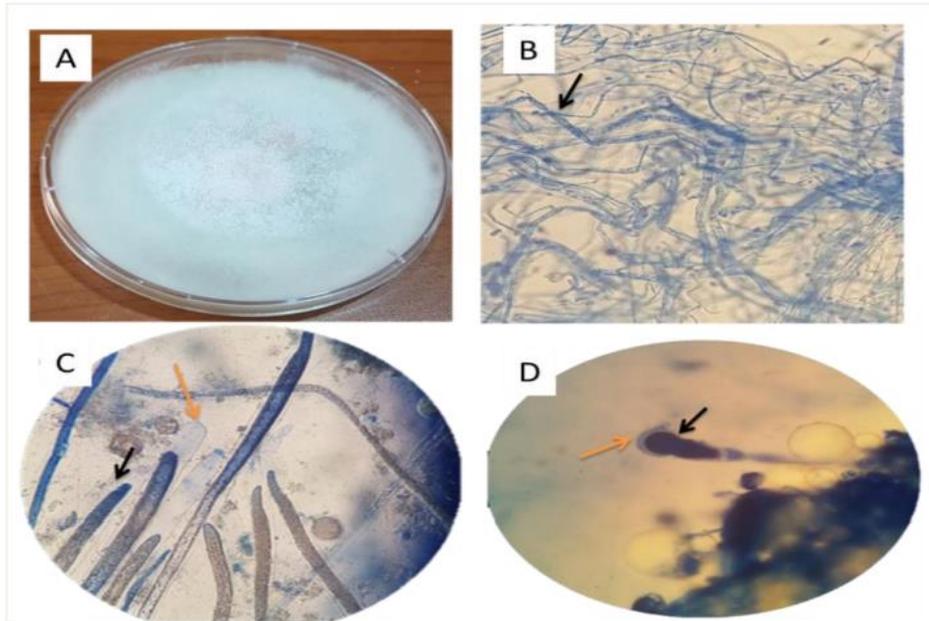


Figura 5. A- *Saprolegnia* spp. cultivos en SDA a 20 ° C durante 3-4 días comenzaron como pelos largos con algodoncillo blanquecino. B- El frotis de piel húmeda que muestra masas de esporangios maduros e inmaduros llenos de una gran cantidad de esporangiosporas. C y D- Las hifas se veían profusamente separadas y no estaban septadas, las características morfológicas de estas hifas fueron representativas de *Saprolegnia* spp., teñidas con azul de algodón Lactofenol. 400 X.

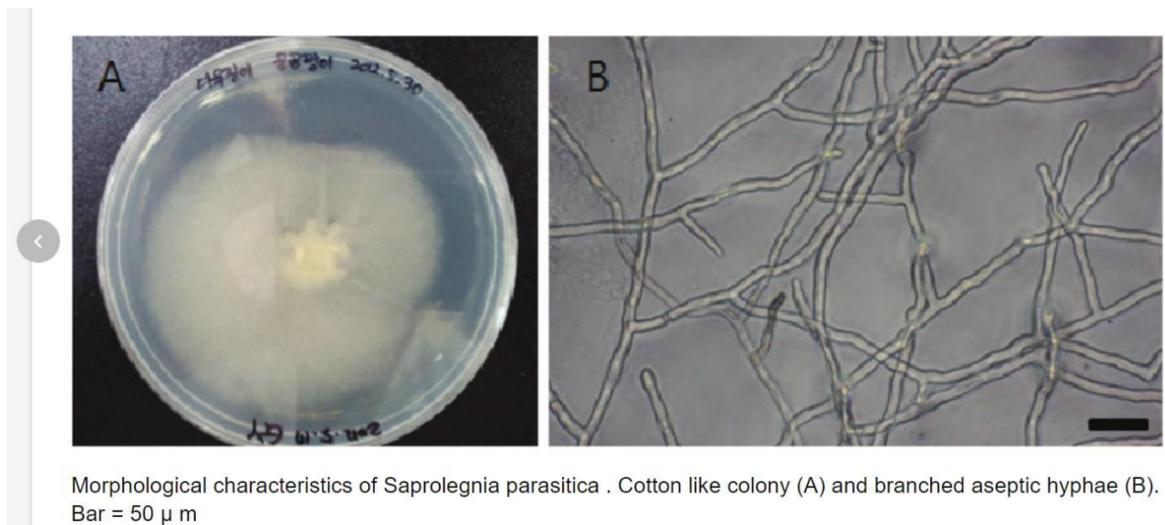


Figura 6. Características morfológicas de *Saprolegnia parasitica*. Colonia algodonosa (A) e hifa aseptica ramificada (B). Barra= 50 μm.

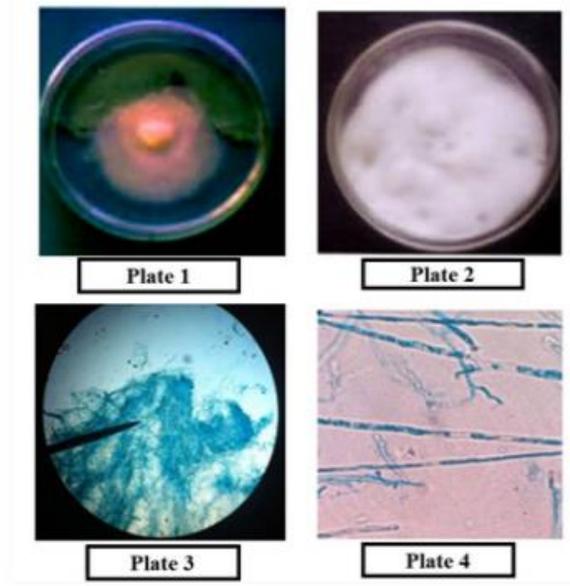


Figura 7. Placa 1: *Saprolegnia* spp., en un cultivo con método de disco de control PDA; Placa 2: *Saprolegnia* spp., completamente desarrollada en un cultivo de método de disco de control PDA de control; Placa 3: racimo de micelios con aumento de X40; Placa 4: hifa sola con aumento X100

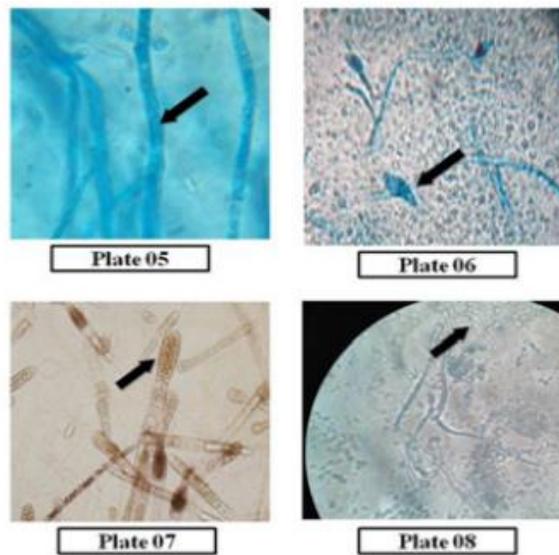


Figura 8. Placa 5: Citoplasma polinucleado de hifa con aumento de X400; Placa 6: Zoosporangio de *Saprolegnia* spp.; Placa 7: Zoosporangio en etapa temprana sin teñir de *Saprolegnia* spp.; Placa 8: Zoosporas de *Saprolegnia* spp. bajo aumento X400.

**ANEXO V: Protocolo de supervisión para Ovas modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985)** (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985). Este protocolo puede ser ajustado según los requerimientos y capacidades del investigador.

| Protocolo de supervisión para ovas |   |            |
|------------------------------------|---|------------|
| Variable                           | Rangos  | Puntuación |
| Transparencia                      | Normal (se puede ver a través del corion, forma de ojo normal)  | 0          |
|                                    | Sub-normal 1 (opacidad leve, mayor dificultad para evidenciar ojo y estructuras internas)                     | 1          |
|                                    | Sub-normal 2 (completamente opaco, no se puede ver el interior)   | 2          |
| Color                              | Normal (rosado-naranja, homogéneo)  | 0          |
|                                    | Sub-normal 1 (levemente blanquecino)  | 1          |
|                                    | Sub-normal 2 (totalmente blanco)  | 2          |
| Movimiento                         | Normal (reacciona a la agitación de una placa estando en ella, es posible ver movimiento a través del corion) | 0          |
|                                    | Sub-normal 1 (movimiento disminuido ante un estímulo)   | 1          |
|                                    | Sub-normal 2 (no hay movimiento)  | 2          |
| Aspecto                            | Normal (sin erosión ni anomalía evidente del corion)  | 0          |
|                                    | Sub-normal 1 (pérdida de regularidad en la superficie del corion)   | 1          |
|                                    | Sub-normal 2 (Evidente pérdida de continuidad, protrusión de membranas internas)                              | 2          |
|                                    | Sub-normal 3 (adherencias de corion formando agregados con otras ovas)  | 3          |
| Turgencia                          | Normal (ova redonda, bien hidratada, firme al tacto)  | 0          |
|                                    | Sub-normal 1 (Corion blando, frágil)  | 1          |

|  |   |   |
|--|---|---|
|  | Sub normal 2 (Corion endurecido y con adherencias desde el interior con membranas más internas, además de aumento de presión producto de crecimientos anormales en su interior) | 2 |
|  | Puntuación Total  |   |

**Puntuación:**

**Desde 0-2: Normal**

**Desde 3-5: Supervisar cuidadosamente (considerar cambio en manejo)**

**Desde 6-8: Sufrimiento intenso, manejo correctivo (considerar eutanasia)**

**Desde 9-más: Eutanasia**

La evaluación será realizada por personal que conoce el comportamiento de los peces incluyendo al investigador responsable del proyecto y al personal técnico entrenado para el monitoreo de los estanques experimentales. El protocolo debe ser visado por un Médico Veterinario con experiencia en peces.