



Informe Final Técnico

Código del proyecto	PYT-2013-0014
Nombre del proyecto	Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola: un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de salmónidos
Región o Regiones de Ejecución (Originalmente planteadas en la propuesta y las efectivas)	4
Agente Ejecutor	Universidad Andrés Bello
Agente(s) Asociado(s) (Originalmente planteados en la propuesta y los efectivos)	Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA)
Coordinador del Proyecto	Dr. Ruben Avendaño
Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total)	
Período de Ejecución (Programado y Real)	Programado: Desde el 03 de Junio del 2013 hasta el 30 de Noviembre del 2015 Real: Desde el 03 de Junio del 2013 hasta el 15 Diciembre de 2015 del 2015

I. RESUMEN EJECUTIVO

Resumen ejecutivo del desarrollo del proyecto, sus objetivos, justificación, resultados e impactos logrados. Debe ser **globalizante**, incorporando aspectos de importancia general dentro del proyecto, y dejando el detalle de la discusión en el Texto Principal. Debe ser corto y específico, no repitiendo las discusiones, análisis y calificaciones específicas contenidas en el Texto Principal.

Esta iniciativa financiada por FIA y ejecutada por la UNAB en conjunto con SERNAPESCA fue iniciada en el año 2013 con el objetivo de desarrollar un paquete tecnológico para el diagnóstico, tratamiento y prevención de aislados bacterianos que provocan enfermedades de salmónidos basado en el uso de nuevas tecnologías moleculares. Para ello, se desarrolló un gran trabajo en la zona centro y sur de nuestro país que nos permitió coleccionar aislados bacterianos a partir de muestras de peces de salmónidos cultivados. Los agentes etiológicos asociados a problemas sanitarios se identificaron a nivel de especie, encontrándose al final de la ejecución de este proyecto una colección de 58 aislados de *F. psychrophilum*, 21, 26 y 11 obtenidos en los años 2013, 2014 y 2015, respectivamente. Asimismo, hemos obtenido 42 aislados de *R. salmoninarum*, 34 durante el 2014 y otros 8 aislados el 2015. Por otro lado, el plan de difusión incluyó la realización de un taller en Valparaíso realizado en conjunto con SERNAPESCA el que incluyó representantes de los 6 laboratorios de la Red de Diagnóstico de SERNAPESCA, fiscalizadores y personal del propio Servicio, el Taller Teórico-Práctico “Técnicas para la evaluación de susceptibilidad con estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute® que se realizó en marzo de 2015, lo que se complementó con los talleres de discusión cerrado de los avances desarrollados por nuestro equipo de investigación en dependencias del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca) en la región de Aysén. Asimismo, en enero del 2014 fuimos invitados a presentar y discutir los resultados obtenidos del muestreo realizado a los centros de la empresa Los Fiordos en las inmediaciones de Pucón. Además, validamos diversos protocolos de diagnósticos por PCR y qPCR (Diseases of Aquatic Organisms 107:223–234), lo que permite transferir los resultados de manera directa a los usuarios. En el área del uso de antimicrobianos, en un estudio colaborativo con investigadores de la Universidad Austral de Chile se publicó en Journal of Fish Diseases 37: 505-509 las condiciones óptimas para el estudio de susceptibilidad para *Piscirickettsia salmonis*, el cual ha sido incluido por la CLSI en la nueva normativa: VET04-A2—*Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline—Second Edition*. En el contexto de investigación se ha determinado la especificidad de un nuevo método de identificación para *F. psychrophilum*, el cual se sustenta en el uso de “Universal Probe Library”, el cual es altamente sensible y específico para el diagnóstico del patógeno. La página web www.patosalm.com contiene la información derivada de todo el trabajo desarrollado en este proyecto e incluye el Manual con los protocolos de técnicas diagnósticas moleculares y antigénicas de *F. psychrophilum*, *V. ordalii*, *S. phocae* y *R. salmoninarum*, así como los procedimientos para realizar el ERIC-PCR, REP-PCR y RAPD-PCR, así como las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.

II. INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)

1. Objetivos del Proyecto:

- Descripción del cumplimiento de los objetivos general y específicos planteados en la propuesta de proyecto, en función de los resultados e impactos obtenidos.
- En lo posible, realizar una cuantificación relativa del cumplimiento de los objetivos.

Objetivo general

“Desarrollar un paquete tecnológico para el diagnóstico, tratamiento y prevención de aislados bacterianos que provocan enfermedades de salmónidos basado en el uso de nuevas tecnologías moleculares”.

Todos los esfuerzos dirigidos a recolectar y caracterizar los aislados chilenos de los patógenos propuestos nos permitieron completar una colección totalmente caracterizada tanto en sus genotipos y serotipos como en su susceptibilidad a antimicrobianos lo que nos ha permitido generar líneas de servicios que se encuentran en la actualidad totalmente disponibles para la industria.

Objetivos específicos

Nº	Objetivos Específicos (OE)
1	Desarrollar técnicas de identificación diagnóstica presuntivas y confirmativas para los patógenos bacterianos <i>F. psychrophilum</i> , <i>V. ordalii</i> , <i>S. phocae</i> , <i>A. salmonicida</i> y <i>F. columnare</i> .
2	Establecer una colección de aislados bacterianos chilenos (<i>F. psychrophilum</i> , <i>V. ordalii</i> , <i>S. phocae</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>F. columnare</i> , <i>P. salmonis</i> , <i>Francisella</i> sp. y <i>R. salmoninarum</i>) asociado a la industria salmonera.
3	Caracterizar antigénicamente los aislados bacterianos, determinando los serotipos predominantes en Chile.
4	Analizar la existencia de variabilidad genética intra-específica de los aislados chilenos y su relación con las propiedades de virulencia.
5	Determinar los perfiles y niveles de susceptibilidad contra antibióticos de los aislados bacterianos.
6	Generar un servicio de monitoreo sistemático de riesgo basado en indicadores microbiológicos, antigénicos y genéticos
7	Implementar el mecanismo de transferencia y difusión de los resultados y desarrollos generados a partir de la ejecución del proyecto.

2. Metodología del Proyecto:

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada (*aunque sea igual a la indicada en la propuesta de proyecto original*).

Objetivo 1:

Para el desarrollo del objetivo 1 se emplearon 2 aislados chilenos de colección cada uno de los patógenos incluidos en el proyecto.

- a) PCR cuantitativa: El diseño de partidores específicos para cada patógeno se realizó usando las bases del GenBank, EMBL y el Ribosomal Database Project. Además, se empleó el Assay Design Center Web Service para diseñar los oligonucleótidos y seleccionar las sondas Universal ProbeLibrary. Usando kit comerciales se validó la especificidad de cada protocolo de PCR o qPCR así como la sensibilidad a cada test diseñando un plásmido contenedor de cada producto de amplificación, previamente clonado en pGEM®-T Easy Vector Systems. También, se evaluaron algunos protocolos de PCR en distintas matrices como agua, sedimentos, biopelículas, ovas, tejidos de peces (mucus, músculo, riñón, hígado y bazo), gametos, sangre y mucus. Ello con el fin de proponerlos como métodos de diagnósticos apropiados para ser empleados sin aislamiento y verificar que la matriz no interfiere en la especificidad y sensibilidad de la técnica.
- b) Inmuno-diagnóstico: Homogeneizados de los aislados fueron empleados como inmunógenos en conejo con el fin de generar anticuerpos (Acs) policlonales. Estos sueros hiper-inmunes fueron testeados por inmunoblot en geles mono y bidimensionales contra proteínas totales de cada patógeno. Además, los homogeneizados fueron analizados mediante ELISA usando los sueros de conejos en placas que contengan proteínas (Pt) totales, Pt recombinantes o fracciones de Pt de membrana de las distintas bacterias. Con el fin de aumentar la sensibilidad del método convencional de revelado utilizando Acs marcados con HRP y revelado con 1-Step Slow TMB-ELISA, se procederá a utilizar Acs marcados con Alexa Fluor 488 o Dylight 488 con el fin de establecer mediante la cuantificación fluorométrica (Synergy, Biotek) la sensibilidad de diagnóstico de cada uno de los test.

Objetivo 2:
La colección nacional de aislados serán obtenidos a partir de peces, agua de cultivo y estructuras de cultivo usando 2 tipos de muestreo: A) Muestreo programado: En los 30 meses de ejecución del proyecto se realizaron numerosos muestreos a centros de cultivo de salmónidos (agua dulce y marina) localizados entre las Regiones Metropolitana a Magallanes y de la Antártica Chilena. Todos estos muestreos se coordinaron con el Sernapesca de acuerdo a la situación sanitaria asociada a los reportes de diagnósticos entregadas por las empresas cultivadoras (datos informáticos del PSGRD). Todas las visitas fueron realizadas por un equipo constituido por un fiscalizador del Servicio y al menos un miembros del equipo de investigación. Cada muestreo fue dirigido a peces con sintomatología clínica, considerando las distintas etapas en las cuales se podría encontrar los ejemplares (ovas, alevinaje, juveniles, entre otras). Además, se realizaron siembras microbiológicas de 50 ml de agua por cada unidad de muestreo así como el caso de las biopelículas a partir de la superficie de las jaulas. B) Muestreos ante eventos no programados: En caso de infecciones bacterianas severas, los jefes de centros de cultivo se contactaron con nosotros y un equipo de muestreo acudió a realizar el muestreo microbiológico. La conservación de los aislados se realizará a -80°C en medio de cultivo líquido al 10% de glicerol (%V/V) y en el caso de aquellos empleados mas rutinariamente se liofilizaron.
Objetivo 3:
La caracterización serológica se realizó de acuerdo a Silva-Rubio et al. (DAO 2008, 79: 27–35) y Valdebenito & Avendaño (JFD 2009, 32, 321–333). Para ello, se llevó a cabo ensayos de aglutinación, micro titulación, dot-blot y Western-blot usando los Acs policlonales preparados con cepas representativas de cada patógeno y componentes celulares como lipopolisacáridos y proteínas totales. Además, mediante electroforesis mono y bidimensional se realizará la búsqueda de bandas o spot diferenciales para cada especie bacteriana. La identidad de proteínas totales se realizó por espectrometría de masa mediante MALDI-TOF-TOF o MALDI-Q-TOF MS/MS en el Centro de Biotecnología (UFRGS, Porto Alegre-Brasil). Se localizó la identidad de péptidos por massfingerprinting.
Objetivo 4:
Los análisis de los tipos genéticos se realizó usando las técnicas de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), amplificación aleatoria del ADN (RAPD-PCR), amplificación de las secuencias palindrómicas repetitivas extragenómicas (REP-PCR) y electroforesis de campo pulsado (PFGE), dependiendo del patógeno. La similitud se calculó mediante el índice de Dice (1945). Además, se consideró en el caso de <i>F. psychrophilum</i> y <i>R. salmoninarum</i> el análisis de secuencias de genes funcionales (MLST), donde se empleó números arbitrarios para la identificación inequívoca de los alelos estudiados (STs; alelos particulares de ATs en un locus particular) y las secuencias tipos (STs; única combinación de ATs en los diversos locus).
Objetivo 5:
En el proyecto se evaluó la susceptibilidad a antimicrobianos usando los protocolos de difusión en placa (antibiograma) y Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) recomendados por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI 2006a; b). En algunos casos se procedió a optimizar las condiciones del ensayo dependiendo de los requerimientos de los patógenos chilenos. Además, los resultados se validaron usando la cepa control de calidad <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658^T.

Objetivo 6:

En el caso de *F. psychrophilum*, los resultados de los objetivos 1 a 5 fueron empleados para generar información que permita conocer el estado sanitario de la salmonicultura en Chile para el patógeno, asociando los tipos bacterianos a factores de riesgo asociado a las vacunas disponibles así como las dosis aplicadas de antibióticos empleadas.

Para el análisis espacial se diseñaron mapas asociados a las pisciculturas y se identificó la existencia de clúster asociados a pisciculturas. De estos se determinarán las áreas de riesgo de ingreso y de propagación del agente. El SMSR incluirá indicadores microbiológicos, es decir, clasificaciones de bajo, mediano y alto riesgo a brote de las especies de salmónidos considerando las concentraciones de carga total de bacterias y los valores de cada patógeno en el agua de cultivo.

También, se difundieron los resultados en distintos medios y presentándose un documento científico-técnico de procedimientos para el monitoreo de peces previo a su movimiento de un lugar a otro, considerando el sero y genogrupo dominante y virulencia (asociado a brotes). Además, sobre la base de los resultados del objetivo N°4 se propuso un programa y una Guía de Uso de Antibióticos que considere los lineamientos básicos para la buena utilización de los antimicrobianos, es decir, pertinencia y uso.

Objetivo 7:

La transferencia y difusión de los resultados se realizó mediante la implementación de una UICPOA y del LIDPABSA, los que permitirán prestar una serie de servicios privados y públicos, respectivamente, destinados a mejorar la competitividad de la industria salmonera nacional.

Entre los servicios se encuentra la venta de aislados, caracterización antigénica y genética de nuevos aislados, análisis de la CIM del antibiótico de selección, entre otros.

Se publicaron manuales en la plataforma web para que los laboratorios de diagnóstico reconocidos por el Sernapesca realicen de manera estándar la identificación de los respectivos patógenos y su patrón de susceptibilidad, permitiendo la adecuada y oportuna identificación y selección de antimicrobiano.

- Principales problemas metodológicos enfrentados.

La situación sanitaria asociada a patógenos bacterianos se ha modificados durante la ejecución del proyecto, por lo que hemos tenido que modificar el tipo y número de microorganismos patógenos a estudiar. Por tanto, se incorporó la especie bacteriana *Renibacterium salmoninarum*, y se solicitó no considerar como imprescindible de estudio las especies *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare* y *Francisella piscicida* por su baja prevalencia actual.

- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.

Las modificaciones metodológicas introducidas en la propuesta tiene directa relación con el patógeno en estudio, ya que cada uno de ellos tiene características propias que hacen imposible realizar siempre la misma metodología de estudio. Estos procedimientos se encuentran muy claramente explicados en el Manual de Técnicas publicados en la página web.

- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad (*se pueden incluir como anexos*).

Se incluye un Manual de Técnicas como anexo de toda esta información.

3. Actividades del Proyecto:

- Carta Gantt o cuadro de actividades comparativos entre la programación planteada en la propuesta original y la real.

Actividades		Año 2013										Año 2014										Año 2015																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
		Trimestre										Trimestre										Trimestre																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
		Abril-Junio			Jul-Sept			Oct-Dic				Ene-Mar			Abril-Jun			Jul-Sept				Oct-Dic			Ene-Mar			Abril-Jun			Jul-Sept				Oct-Dic																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Desarrollo de técnicas diagnósticas especie-específicas basadas en herramientas moleculares	Meta			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

[illegible]

Implementación de un servicio de monitoreo de riesgo por patógeno bacteriano	Meta			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
	Real					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
Realización de 5 Talleres de discusión de técnicas y protocolos diagnósticos	Meta									x				x						x							x					x				
	Real											x						x												x	x		x			
Generación de un Manual de técnicas y protocolos desarrollados por patógeno bacteriano.	Meta															x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
	Real																x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Difusión del Manual para la industria salmonera a través de la plataforma web	Meta																x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
	Real																x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Capacitación de personal de laboratorios que proporcionan el servicio de diagnóstico y otros beneficiarios de la industria acuícola	Meta															x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x			
	Real																x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x		
Capacitación de personal fiscalizador del SERNAPESCA	Meta																x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x			
	Real																	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x		
Realización del test de validación por patógeno con los 11 Laboratorios reconocidos por SERNAPESCA	Meta																											x	x	x	x	x	x	x		
	Real																													x	x	x	x	x	x	x
Implementación de la UICPOA	Meta			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
	Real					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Implementación del LIDPABSA	Meta			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
	Real					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		

- Razones que explican las discrepancias entre las actividades programadas y las efectivamente realizadas.

Las actividades originalmente programadas fueron realizadas de acuerdo a lo esperado, excepto las actividades:

1. Desarrollo de un sistema especie-geográfico de seguimiento de sero-prevalencia en la industria salmonera
2. Desarrollo de un sistema especie-geográfico de seguimiento de geno-prevalencia en la industria salmonera
3. Diseño de una plataforma web con información para seguimiento antigénico y genético de la industria salmonera
4. Diseño de una plataforma web con información para seguimiento de la situación de resistencia antibacteriana por especie de patógeno bacteriano.

Los motivos que justifican que estas 4 actividades no se realizaron se fundamentan en que al momento de permitirse el muestreo de los distintos centros de cultivo de salmónidos, los encargados de las pisciculturas o centros de engorda solicitan la confidencialidad total de los resultados así como la publicación de los mismos. Por tanto, el mantenimiento en secreto de estos antecedentes permitió que distintas empresas facilitaran sus dependencias y material biológico. Por otro lado, los aislados colectados tienen distintos orígenes geográficos, pero en muchos casos existe un representante por centro o están focalizados en algunas áreas geográficas. Todo lo anterior no significa que no se analizara la información obtenida, sino que estos resultados fueron difundidos a Sernapesca y las respectivas empresas mediante talleres cerrados de difusión, pero sin ser estos antecedentes publicados en

La actividad denominada “Realización del test de validación por patógeno con los 11 Laboratorios reconocidos por Sernapesca”, se realizó de manera parcial y no asociada a los test de diagnósticos generados sino los protocolos de susceptibilidad a antimicrobianos. El motivo de esta decisión se fundamenta en que los laboratorios de la red del Sernapesca no tienen la obligatoriedad de realizar este tipo de test y tampoco el Sernapesca puede obligar a realizarlo, por lo que la voluntad depende del laboratorio.

Es importante señalar que inicialmente se consideró en el proyecto la Realización de 5 Talleres de discusión de técnicas y protocolos diagnósticos, sin embargo, el número total de talleres realizados y con participación activa fueron 10. Se incrementó el número de Talleres con el fin de divulgar los resultados de manera cerrada y en algunos casos por propio interés de las empresas muestreadas y unidades regionales del Sernapesca.

Finalmente, no se consideró en la propuesta original la participación de miembros del equipo de proyecto en capacitaciones. Sin embargo, se consideró imprescindible la participación en dos eventos de capacitación teórico-prácticas tituladas: “Herramientas Analíticas para Gestión Sanitaria” que organizó el Centro Tecnológico de Capacitación de Chile, y que se llevó a cabo en el Hotel Patagónico de la ciudad de Puerto Varas (<http://www.mundoacuicola.cl/index.php?cat=3&leermas=1&idnews=60831&especial=>) y el curso

“Introducción al PCR Tiempo Real y sus Aplicaciones: Cualitativas y Cuantitativas” impartido por Thermo Fisher Scientific, en ciudad de México (México) entre los días 20 a 23 de octubre del 2015.

4. Resultados del Proyecto:

- Descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión utilizando gráficos, tablas, esquemas, figuras u otros, que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.

Durante la ejecución del proyecto se desarrollaron y validaron un total de 3 protocolos específicos y sensibles para el diagnóstico molecular para identificar *Vibrio ordalii*, *Flavobacterium psychrophilum* y *Streptococcus phocae*. La técnica diagnóstica desarrollada para la detección de *Vibrio ordalii* es novel y se utilizó la plataforma de qPCR y alternativamente PCR convencional para ser empleados por aquellos laboratorios que no poseen termociclador tiempo real, el cual se publicó en Diseases of Aquatic Organisms 107: 223–234. En el caso de *F. psychrophilum* se desarrolló un novel método de qPCR basado en “Universal Probe Library (UPL)” específico para la detección de este patógeno, al cual es altamente sensible comparado con otras técnicas existentes. En el caso de *S. phocae* se validó el método descrito por Avendaño-Herrera (2008; Diseases of Aquatic Organisms 82: 217–222). Al incluir *R. salmoninarum* en el proyecto se consideró realizar el protocolo de PCR anidada disponible en la normativa de la Organización Mundial de Salud Animal (www.oie.org), siguiendo los procedimientos descritos en http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf/es/2.1.11_Renibacteriosis.pdf.

A nivel serológico, se realizó la estandarización de técnicas de ELISA y Western-blot para los patógenos propuestos. En el caso de *F. psychrophilum* mediante Ac policlonal se ha establecido un test de ELISA estandarizado con diluciones de Ac primario en 1:1000 y secundario 1:10000, revelado por método cromogénico y punto de corte de 0,5 de absorbancia a 450 nm. Complementariamente como método confirmatorio de presencia de *F. psychrophilum*, se diseñó un test basado en técnica de Western-blot con Ac primario polioclonal anti rOmpA utilizando dilución de 1:1000 y revelado por método de quimioluminiscencia. Para el caso de *V. ordalii* se ha diseñado un ELISA que utiliza una dilución de 1:200.000 para el caso del Ac primario, lo que indica un alto grado de especificidad y alta sensibilidad de este método, manteniendo las mismas condiciones de revelado cromogénico que se han establecido para los otros patógenos.

Actualmente, existe una colección de 58 aislados de *F. psychrophilum*, 21, 26 y 11 obtenidos en los años 2013, 2014 y 2015, respectivamente. Asimismo, hemos obtenido 42 aislados de *R. salmoninarum*, 34 durante el 2014 y otros 8 aislados el 2015. Otro número menor de aislados en comparación a la propuesta original fueron obtenidos para los patógenos *V. ordalii* y *S. phocae*, los cuales no provienen de aislamientos en los muestreos realizados sino a partir de colecciones privadas. Aunque no era un objetivo del proyecto, ya que *Piscirickettsia salmonis* por tener un Programa Sanitario Específico de Vigilancia Activo para Enfermedades de Alto Riesgo no fue incluida sino sólo para el estudio de susceptibilidad a antibióticos. Durante la ejecución del proyecto se colectaron 5 aislados de *P. salmonis*.

Con los aislados obtenidos de los muestreos se ha generado un sistema especie-geográfico basado en técnicas moleculares (RAPD, REP-PCR y MLST) para *F. psychrophilum*. También se han realizado análisis de MLST a otros 94 aislados, obtenidos previamente a la adjudicación del proyecto y dicha información se publicó en Veterinary Microbiology 170: 298–306. Nuestros resultados demuestran

la existencia de mayor heterogeneidad genética a la descrita por Valdebenito & Avendaño-Herrera (2009), la cual indicaba un porcentaje de similitud cercana a 95% y que actualmente es aproximadamente 72%. Asimismo, mediante MLST se demostró que esta estructura genética es consecuencia de la condición productiva de la salmonicultura chilena.

Además, se analizaron los aislados de *R. salmoninarum* con las técnicas de RAPD y REP-PCR y se diseñaron 8 pares de partidores que permitieron estandarizar las condiciones óptima de cada gen y genotipificar los aislados de *R. salmoninarum* mediante la técnica de MLST. Todas las técnicas antes señaladas demostrando en todos los casos la existencia de homogeneidad genética en los aislados chilenos de *R. salmoninarum*.

Al analizar los 58 aislados de *F. psychrophilum* mediante las distintas técnicas antigénicas reveló la existencia de heterogeneidad serológica entre los aislados chilenos, identificándose 15 grupos antigénicos más los 4 grupos previamente descritos por Valdebenito & Avendaño-Herrera (2009). Estos resultados han sido difundido mediante distintos la ejecución de distintos Talleres e incluso han sido considerados por una empresa farmacéutica para mejorar su vacuna (<http://www.aqua.cl/2015/11/22/analizan-bacteria-que-afecta-a-la-produccion-de-salmonidos-durante-la-fase-de-agua-dulce/>). En cuanto a *V. ordalii*, se ha generado un sistema de información antigénica y se confirmó la existencia del serotipo O2 como propio para este patógeno. Sin embargo, la incidencia del patógeno ha sido muy menor durante 2013-2014, por lo que se debe continuar la vigilancia para actualizar si fuese necesario el sistema antigénico.

Durante la ejecución del proyecto se determinó la susceptibilidad a florfenicol y oxitetraciclina de todos los aislados chilenos de *F. psychrophilum* y *V. ordalii*. Precisamente, se validó el protocolo de determinación de la CIM para aislados de *V. ordalii* mediante la publicación en Veterinary Microbiology 165: 434–442, mientras que para *S. phocae* se recomendó el seguimiento del procedimiento previamente descrito en Aquaculture 314:44-48. Actualmente, estos protocolos se encuentran montado para generar resultados más rápidos y ayudar a la toma de desiciones de los productores y han sido difundidos a distintos actores de la industria salmonera de manera teórica y práctica.

En *R. salmoninarum* por tratarse de un patógeno intracelular es complejo desarrollar un método de evaluación de CIM. De hecho, la normativa de la Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) no tiene un medio de cultivo estándar para esta bacteria, por lo que durante la ejecución del proyecto evaluado distintos medios y tiempos de incubación usando inicialmente 2 aislados. En la actualidad validamos las condiciones óptima para esta bacteria y esperamos en el segundo semestre del 2016 someter a evaluación el artículo científico que incluya estos protocolos y resultados.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura nos solicitó en la propuesta original del proyecto incluir el estudio de las condiciones más apropiadas para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos de *P. salmonis*. Por tratarse de un patógeno con Programa de Vigilancia Específico se trabajó en colaboración con colegas de la Universidad Austral de Chile esencialmente en desarrollar un medio de cultivo para la determinación de la CIM. Precisamente, uno de los resultados de mayor impacto ha sido la publicación en Journal of Fish Diseases 37: 505-509 del protocolo, el cual ha sido incluido por la CLSI en la nueva normativa VET04-A2—*Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline—Second Edition*.

También se adquirió un dominio para alojar la página web de la Unidad y Laboratorio (www.patosalm.com), la cual contiene la información generada en el proyecto.

Se implementó la UICPOA y el LIDPABSA, pero no se reconoció esta última unidad como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) por parte del Sernapesca. Además, la UICPOA se constituyó como una Sociedad Por Acciones denominada PATOSALM y que se encuentra constituida por los investigadores del proyecto FIA PYT-2013-0014, Sr. Ruben Avendaño Herrera y Sr. Rodolfo Paredes Esparza.

- Razones que explican las discrepancias entre los resultados esperados y los obtenidos.

Dentro de los resultados esperados al finalizar el proyecto se consideraba el ser reconocido como LNR, pero esta situación no fue apoyada por el Sernapesca y sus fundamentos se explicaron en la carta enviada oportunamente al Ejecutivo de Innovación Agraria. Asimismo, la empresa PATOSALM que nos permitiría comercializar distintos servicios comerciales para la industria salmonicultora no puede realizar facturación por los servicios, ya que la Universidad Andrés Bello no permitió concretar esta actividad. El inconveniente tiene relación con la dificultad de generar un spin off al interior de la Universidad, producto que nuestra institución está en pleno proceso de sancionar la normativa que regirá estas iniciativas. Por tanto, la venta de los servicios se está realizando en forma directa desde la Universidad Andrés Bello.

5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

- Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

No aplica.

- Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.

No aplica.

- Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.

No aplica.

- Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

No aplica.

Impactos y Logros del Proyecto:

- Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.
- Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio	0	1	
Producción (<i>por producto</i>)	N/A	N/A	N/A
Costos de producción	N/A	N/A	N/A
Ventas y/o Ingresos	\$ 0		
<i>Nacional</i>	\$ 0	\$ 1.500.000	\$ 1.500.000
<i>Internacional</i>	\$ 0	\$ 0	\$ 0
Convenios comerciales	No	No	No

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual	2	4	2
Nuevos empleos generados	0	2	2
Productores o unidades de negocio replicadas	0	0	0

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	Venta de aislados bacterianos patógenos de la salmonicultura chilena.			
Proceso				
Servicio	- Caracterización genética y antigénica de aislados bacterianos patógenos de la salmonicultura chilena. - Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos usando CIM para aislados bacterianos patógenos de la salmonicultura chilena. - Muestreos para el diagnóstico e identificación de patógenos bacterianos prevalentes de la acuicultura chilena.			Los servicios en ambos casos están dirigidos a las especies bacterianas de <i>F. psychrophilum</i>, <i>V. ordalii</i>, <i>S. phocae</i>, <i>R. salmoninarum</i>, excepto para <i>P. salmonis</i> que sólo considera el servicio de CIM. - El servicio se ofrece no sólo a la industria salmonera sino aquella asociada a la diversificación acuícola.

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes	0	
Solicitudes de patente	0	
Intención de patentar	0	
Secreto industrial	0	
Resultado no patentable	0	
Resultado interés público	0	

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	0	
Generación nuevos proyectos	1	ASESORIA ESPECIALIZADA PARA ESTABLECER INDICADORES DE RIESGO DE FLAVOBACTERIOSIS PARA PROPENDER A SU CONTROL EN AGUA DULCE

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (Citas, título, descripción)
Publicaciones		
<i>Diseases of Aquatic Organism</i>	107:223-224	PCR protocol for detection of <i>Vibrio ordalii</i> by amplification of the <i>vohB</i> (hemolysin) gene. Avendaño R, Maldonado JP, Tapia-Cammas D, Feijóo CG, Calleja F & Toranzo AE
<i>Versión Diferente</i>	22:48-50	Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola. Avendaño-Herrera R.
<i>Salmonxpert</i>	105:38	Presentan estudios de 70 aislados chilenos de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> . Avendaño-Herrera R.
Eventos de divulgación científica	10	A continuación se detallan los eventos realizados durante la ejecución del proyecto y se incluyen los link a noticias publicadas en la prensa, los cuales consideramos también como divulgación científica de los resultados: 25/07/2013 Invitación de Sernapesca a presentar el proyecto, Olmue (35 personas) 05/05/2014 Taller cerrado, Valparaíso (18 personas) 23/01/2014 Taller cerrado para empresa salmonera, Pucón (15 personas) 26/10/2014 Chilean Society for Cell Biology XXVIII Anual Meeting, Puerto Varas (300 personas). 25/11/2014 Taller cerrado DIPLADE, Coyhaique (6 personas) 26/11/2014 Taller cerrado Unidad de Salud de Sernapesca, Aysén (17 personas). 11/03/2015 Taller Teórico-Práctico, Viña del Mar (12 personas). 13/10/2015 Taller Teórico, Viña del Mar (19 personas). 28/10/2015 Taller Teórico a fiscalizadores de Sernapesca, Región de Aysén (12 personas). 25/10/2015 Chilean Society for Cell Biology XXIX Anual Meeting, Puerto Varas (300 personas). 10/12/2015 Seminario de Cierre de Proyecto, Puerto Varas (51 personas). Otros link: http://www.aqua.cl/2015/12/11/unab-base-de-aislados-bacterianos-promete-diagnostico-precoz-de-enfermedades/ http://movil.mundoacuicola.cl/?/2/noticia/61597

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
		http://www.aqua.cl/2015/12/01/en-puerto-varas-se-desarrollara-seminario-sobre-aislados-bacterianos-para-la-industria-del-salmon/ http://www.aqua.cl/2015/11/22/analizan-bacteria-que-afecta-a-la-produccion-de-salmonidos-durante-la-fase-de-agua-dulce/ http://www.mundoacuicola.cl/?/3/61298/analizaran-aislados-chilenos-de-flavobacterium-psychrophilum-para-el-desarrollo-de-medidas-de-prevencion http://www.salmonexpert.cl/?page_id=147&article_id=116238 http://impresa.elmercurio.com/Pages/NewsDetail.aspx?dt=2015-03-22&dtB=23-03-2015%200:00:00&PaginaId=17&bodyid=10 http://www.mundoacuicola.cl/index.php?cat=3&leermas=1&idnews=60344&especial=
Integración a redes de investigación	0	

Impactos en Formación

Logro	Número	Detalle (<i>Título, grado, lugar, institución</i>)
Tesis pregrado	1	Felipe Morán (2015). Diversidad genética y antigénica de aislados chilenos del patógeno de salmónidos <i>Flavobacterium psychrophilum</i> . Biotecnólogo, Universidad de Antofagasta.
Tesis postgrado	0	
Pasantías	0	
Cursos de capacitación	2	Herramientas Analíticas para Gestión Sanitaria” que organizó el Centro Tecnológico de Capacitación de Chile, y que se llevó a cabo en el Hotel Patagónico de la ciudad de Puerto Varas. http://www.mundoacuicola.cl/index.php?cat=3&leermas=1&idnews=60831&especial=) http://www.mundoacuicola.cl/?cat=3&leermas=1&idnews=60837&especial Introducción al PCR Tiempo Real y sus Aplicaciones: Cualitativas y

Logro	Número	Detalle (<i>Título, grado, lugar, institución</i>)
		Cuantitativas impartido por Thermo Fisher Scientific, en ciudad de México (México) entre los días 20 a 23 de octubre del 2015.

6. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- Legales
- Técnicos
- Administrativos
- Gestión
- Medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

Durante la ejecución del proyecto se presentaron algunos problemas, principalmente administrativos y técnicos asociados al patrocinante Sernapesca. Todos estos problemas se indicaron oportunamente en los informes de avances 1, 2, 3 y 4.

Al comienzo del proyecto, la fase de implementación fue mas compleja de lo esperado. Cada paso para la firma final con FIA y la gestión administrativa-económica en la plataforma han requerido de tiempo mayor. Probablemente, el origen es que esta es la primera iniciativa FIA que se aloja en la Universidad Andrés Bello, lo que nos llevó a tener que ser más diligentes y eficientes para concretar de buena forma nuestra propuesta. Es muy importante señalar que la Universidad depositó toda la responsabilidad de los aspectos técnicos del proyecto en el Coordinador y equipo científico de la propuesta, mientras la administración en la Unidad de Gestión de Proyecto de la institución. Por tanto, nos encontramos en el primer año con problemas logísticos y gestión administrativas. Ello debido a que las campañas de muestreos no programados a regiones extremas requieren de más recursos y el tiempo que tardaba la Universidad en proveer los recursos para compra de pasajes y viáticos fue en algunos casos excesivo.

Por otro lado, las remesas que se debían recibir por parte de FIA presentaron retrasos por diversas razones en alguno de los periodos. Es importante señalar que en la mayoría de los casos esta tardanza fue de nuestra responsabilidad, generando pequeñas desviaciones en la compra de insumos y rendiciones económicas que nuestra institución logró coordinar y absorber sin que se afectara el desarrollo y planificación del proyecto.

Otro problema se asoció a Sernapesca, institución que durante los primeros 12 meses de proyecto presentó una alta rotación de personal, el cual se encontraba directamente relacionado con esta propuesta. El hecho dificultó la coordinación general de los muestreos, tomando como medidas correctivas el acercamiento a empresas salmoniculoras en forma directa para soslayar este

inconveniente. Asimismo, hubo un cambio en las autoridades del Servicio y se logró una mejor coordinación de los muestreos, siendo nombrado dentro del Sernapesca un responsable y contacto directo para este fin.

Además, durante la ejecución del último año de proyecto se produjo la renuncia de una de las personas contratadas como personal técnico-profesional, la cual dedicaba sólo parte de su jornada laboral al proyecto. Sin embargo, el cambio en el equipo del proyecto generó no generó inconvenientes y por el contrario fue una oportunidad de contar con un contrato que realizó más actividades al interior del proyecto, debido a que anteriormente este contrato debía cumplir labores administrativas en la Facultad en donde se alojaba, lo que dificultó el avance en el área de inmunodiagnóstico.

Tal como se ha indicado en este informe, uno de los inconvenientes en el aspecto técnico científico de la propuesta es el cambio de la situación sanitaria bacteriana de la industria salmonídea. Por tanto, algunos de los patógenos propuestos no fueron aislados ni estudiados y se han generado la necesidad de incorporar a la especie *Renibacterium salmoninarum*, la cual se justificó por su alta prevalencia. Situación que fue autorizada por la institución financiera de la propuesta.

Uno de los resultados más importantes del proyecto es la generación de servicios comerciales asociados a los productos generados de la propuesta. Sin embargo, la coyuntura política de nuestra institución no permitió realizar el proceso de facturación de estos servicios directamente por parte de la Universidad, motivo por el cual tuvimos las facilidades necesarias de parte de la institución para acceder en noviembre del 2014 a la constitución de una unidad de negocio mediante la formación de PATOSALM SpA. No obstante, al poco tiempo después nuestra universidad sancionó una normativa que rige estas iniciativas que consideran la realización de servicios, por lo que el spin off a la fecha no ha generado ningún servicio sino que la propia Universidad Andrés Bello.

7. Otros Aspectos de Interés

Tal como se señaló anteriormente, uno de los objetivos de la propuesta es generar distintos servicios disponibles para los actores de la industria salmonera. A la fecha de presentación de este informe hemos realizado venta de aislados a laboratorios de diagnóstico para ser usados como controles en sus procedimientos de diagnósticos, caracterizaciones de bacterias patógenas, confirmación de identificaciones bacterianas, estudios de susceptibilidad de patógenos a alternativas a los antibióticos, entre otros. Además, el Sernapesca nos ha solicitado una asesoría para el estudio de riesgo del patógeno *F. psychrophilum*.

Otro aspecto de interés tiene relación con nuestro aporte al estudio de la susceptibilidad de *P. salmonis* a los antimicrobianos más comúnmente empleados en el tratamiento de los peces enfermos con piscirickettsiosis. Nuestros resultados y los obtenidos por otros grupos de investigación de otras universidades o laboratorios de diagnóstico han generado la necesidad de

parte del Servicio y la Subsecretaría de Pesca de realizar el primer ensayo interlaboratorio para establecer un protocolo común en Chile para el estudio de CIM. Nos deja muy contento que aunque el medio de cultivo empleado en este ensayo tiene sutiles diferencias con el propuesto por nuestro equipo de investigación, los procedimientos y condiciones de estudio son las indicadas en nuestra publicación y confirmadas por la CLSI.

En base a todo lo anterior, a nuestro juicio al finalizar la propuesta estamos cumpliendo con creces los resultados esperados.

8. Conclusiones y Recomendaciones:

- Desde el punto de vista:
 - Técnico

El desarrollo del proyecto permitió obtener una colección representativa de los patógenos bacterianos mas prevalentes de la salmonicultura nacional, los cuales se encuentran a disposición de los laboratorios, empresas de cultivos y farmacéuticas así como investigadores mediante la forma de venta. Además, se desarrollaron nuevos métodos de diagnósticos y se validaron otros descritos previamente en la literatura. Asimismo, se evaluaron diferentes protocolos de caracterización genética y antigénicas, de los cuales se validaron aquellos que pueden entregar un conocimiento específico para cada patógeno, considerando resolución y tiempo de análisis. Todos estos métodos se han puesto a disposición en la página web generada en el contexto del proyecto (www.patosalm.com) mediante la publicación de un Manual. Además, se realizaron talleres que permitieron la difusión de estos resultados e insumos generados de la propuesta. También, se han generado nuevos protocolos para la realización de estudios de susceptibilidad, siendo el más importante el propuesto para *P. salmonis*. Finalmente, no menos importante es el hecho que esta iniciativa ha permitido la formación de capital humano y los aislados han sido empleado en otros estudios realizados en el laboratorio.

A nivel de recomendaciones, se puede señalar que se sugiere antes de generar una propuesta que considere muestreos en distintos centros repartidos por todo el centro sur del país, las atribuciones de un patrocinante como Sernapesca. Ello debido a que la propuesta original consideraba el muestreo programado en un número mayor de centros de cultivos, considerando la obligatoriedad ante de la autoridad, situación muy distinta a lo real.

- Económico

La situación económica del proyecto sólo se alteró debido a la multa cursada por el FIA ante el incumplimiento en la fecha de entrega del primer Informe Técnico. Sin embargo, esta situación fue subsanada internamente por el equipo de investigación del proyecto. De hecho, se realizó un nuevo convenio entre el FIA y la Universidad debido a que los recursos empleados en la propuesta fue menor a la adjudicada originalmente.

Se recomienda en el futuro tener el control apropiado de las fechas de entrega de los informes Técnicos así como los Económicos. Además, tal como se señaló anteriormente, la administración económica del proyecto fue realizada por la Unidad de Gestión de Proyecto, por lo que se sugiere en el caso que los recursos no sean administrados directamente por el Coordinador realizar reuniones periódicas con el responsable económico para que se involucre en la ejecución del

proyecto, comprenda sus dificultades y se involucre como parte del equipo. Esto permite acercar al personal administrativo a comprender lo complejo de un proyecto de esta naturaleza, ya que considera muestreos y aspectos propios de terreno.

- De gestión.

La gestión a nivel técnico se circunscribió a lo propuesto en el proyecto original, aunque en algunos ítems ocurrieron desviaciones menores, las cuales han sido señaladas en los ítems anteriores así como las sugerencias para soslayarlas.

III. INFORME DE DIFUSIÓN

- Difusión de los resultados obtenidos **adjuntando** las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

<i>Diseases of Aquatic Organism</i>	107:223-224	PCR protocol for detection of <i>Vibrio ordalii</i> by amplification of the <i>vohB</i> (hemolysin) gene. Avendaño R, Maldonado JP, Tapia-Cammas D, Feijóo CG, Calleja F & Toranzo AE.
<i>Versión Diferente</i>	22:48-50	Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola. Avendaño-Herrera R.
<i>Salmonxpert</i>	105:38	Presentan estudios de 70 aislados chilenos de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> . Avendaño-Herrera R.

- Listado (número y detalle) de actividades por instrumento de difusión, como por ejemplo:
 - Presentaciones en congresos y seminarios

New approach for the detection of different strains of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from freshwater farms in Chile. Hidalgo C, Poblete M, Irgang R, Avendaño-Herrera R, Paredes R. (2014). Chilean Society for Cell Biology XXVIII Annual Meeting, Puerto Varas. Pág. 140-141.

Alternative diagnostic method for the detection of different *Vibrio ordalii* strains isolated from Atlantic salmon farmed in Chile. Muñoz D, Stoore C, Hidalgo C, Poblete M, Irgang R, Avendaño-Herrera R, Paredes R. (2014). Chilean Society for Cell Biology XXIX Annual Meeting, Puerto Varas. Pág. 134

Análisis antigénico y genético de aislados Chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*: una década de estudio y su evolución. Avendaño-Herrera (2015). Seminario enfermedades de agua dulce, Veterquímica, Puerto Varas. <http://www.aqua.cl/2015/11/22/analizan-bacteria-que-afecta-a-la-produccion-de-salmonidos-durante-la-fase-de-agua-dulce/>

- Organización de seminarios y talleres

1) Taller de la Unidad de Salud Animal del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca), Olmue 25 de julio de 2013. Asistencia de 35 fiscalizadores representantes de todas las regiones del país (Se respalda con la invitación realizada mediante correo electrónico).

2) Taller “Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola: un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de salmónidos”. Valparaíso 5 de mayo de 2014.

3) Taller cerrado para la empresa Los Fiordos. Presentación de resultados asociados a los muestreos realizados en las pisciculturas. Pucón 23 enero 2014. Asistencia de 15 personas y no se incluye antecedentes de los participantes debido a la confidencialidad. Sin embargo, en el informe de avance se adjuntaron los respectivos informes asociados a los muestreos.

4) Taller Teórico-Práctico “Técnica para la evaluación de susceptibilidad con estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute”. Viña del Mar 11 de marzo de 2015. Asistencia de 12 personas.

5) Taller Teórico “Análisis antigénico y genético de aislado chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*: implicancias en el desarrollo de medidas de prevención”. Viña del Mar 13 de octubre 2015. Asistencia de 19 personas.

6) Taller Teórico a fiscalizadores de Sernapesca “Análisis antigénico y genético de aislado chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*: implicancias en el desarrollo de medidas de prevención”. Región de Aysén, 28 de octubre 2015. Asistencia de 12 personas.

7) Seminario y cierre “Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola: un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de salmónidos”. Puerto Varas 10 de diciembre 2015. Asistencia de 51 personas, sin considerar expositores.

- Días de campo o reuniones técnicas

1) Charla de difusión a DIPLADE, Coyhaique 25 de noviembre 2014 (6 asistentes).

2) Charla de difusión a Unidad de Salud Animal de Sernapesca, Aysén 26 de noviembre 2014 (17 asistentes).

3) Charla de difusión alumnos de Campus Patagonia Universidad Austral de Chile, Coyhaique 27 de octubre de 2015.

○ Publicaciones científicas

1) PCR protocol for detection of *Vibrio ordalii* by amplification of the *vohB* (hemolysin) gene. Avendaño R, Maldonado JP, Tapia-Cammas D, Feijóo CG, Calleja F & Toranzo AE. Diseases of Aquatic Organisms 107:223-224.

○ Publicaciones divulgativas

1) Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola. Avendaño-Herrera R. Versión Diferente 22:48-50

2) Presentan estudios de 70 aislados chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*. Avendaño-Herrera Avendaño-Herrera R. Salmonxpert 105:38

3) El recrudescimiento de *Flavobacterium psychrophilum*: Un desafío pendiente en agua dulce. Avendaño-Herrera. Mundoacuicola 105: 27-29.

○ Artículos en prensa

Académicos UNAB desarrollan base nacional de bacterias para la industria acuícola. El Mercurio, Domingo 22 de Marzo de 2015.

<http://noticias.unab.cl/unab-en-los-medios/mundo-acuicola-universidad-chilena-implementara-laboratorio-para-estudiar-enfermedades-en-salmones/>

Entrevista en Programa “El Agro” de radio Agricultura realizado el domingo 08 Marzo 2015. Para verificar ingresar a <http://www.radioagricultura.cl/podcast-programas/el-agro/> y buscar el archivo de sonido de la fecha indicada y a partir del minuto 20 .

○ Páginas web

- <http://www.aqua.cl/2015/12/11/unab-base-de-aislados-bacterianos-promete-diagnostico-precoz-de-enfermedades/>
- <http://movil.mundoacuicola.cl/?/2/noticia/61597>
- <http://www.aqua.cl/2015/12/01/en-puerto-varas-se-desarrollara-seminario-sobre-aislados-bacterianos-para-la-industria-del-salmon/>
- <http://www.aqua.cl/2015/11/22/analizan-bacteria-que-afecta-a-la-produccion-de-salmonidos-durante-la-fase-de-agua-dulce/>
- <http://www.mundoacuicola.cl/?/3/61298/analizaran-aislados-chilenos-de-flavobacterium-psychrophilum-para-el-desarrollo-de-medidas-de-prevencion>
- http://www.salmonexpert.cl/?page_id=147&article_id=116238
- <http://impresa.elmercurio.com/Pages/NewsDetail.aspx?dt=2015-03-22&dtB=23-03-2015%200:00:00&PaginaId=17&bodyid=10>
- <http://www.mundoacuicola.cl/index.php?cat=3&leermas=1&idnews=60344&especial=>

IV. ANEXOS

Entregar los antecedentes como fue indicado para los informes técnicos de avance, pero en este caso la información no corresponde sólo a la actualización sino a la histórica. Por ejemplo, cambios en el equipo técnico, se debe adjuntar la ficha de todos los participantes que participaron en alguna de las etapas del proyecto aunque hayan sido reemplazados.

Se incluye como Anexo:

1. Presentación en congresos y seminarios
2. Publicación Avendaño-Herrera et al. (2014)
3. Reuniones de campo
4. Publicaciones divulgativas
5. Artículo de prensa
6. Manual de procedimientos
7. Fichas identificador equipo de proyecto.
8. Tesistas
9. Organización de seminarios y talleres

V. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Avendaño-Herrera R (2008) Simultaneous evaluation of four PCR primers sets for the diagnosis of *Streptococcus phocae* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 82: 217-222.

Avendaño-Herrera R, Houel A, Irgang R, Bernardet J-F, Godoy M, Nicolas P, Duchaud E (2014) Introduction, expansion and coexistence of epidemic *Flavobacterium psychrophilum* lineages in Chilean fish farms. *Veterinary Microbiology* 170: 298-306.

Avendaño-Herrera R, Maldonado JP, Tapia-Cammas D, Feijoó CG, Calleja F, Toranzo AE (2014) PCR protocol for detection of *Vibrio ordalii* by amplification of the *vohB* (hemolysin) gene. *Diseases of Aquatic Organisms* 107: 223-234.

Poblete-Morales M, Irgang R, Henríquez-Núñez H, Toranzo AE, Kronvall G, Avendaño-Herrera R (2013) *Vibrio ordalii* antimicrobial susceptibility testing – Modified culture conditions required and tentative epidemiological disk test cut-off values. *Veterinary Microbiology* 165: 434-442.

CLSI. *Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI document VET04-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline*. CLSI document M42-A (ISBN 1-56238-611-5). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road,

Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline*. CLSI document M49-A [ISBN 1-56238-612-3]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.)

Dice, L.R. (1945) Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26, 297.

Silva-Rubio A, Acevedo C, Magariños B, Jaureguiberry B, Toranzo AE, Avendaño-Herrera R (2008) Antigenic and molecular characterization of *Vibrio ordalii* strains isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* 79: 27-35.

Valdebenito S, Avendaño-Herrera R (2009) Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *Journal of Fish Diseases* 32: 321-333.

Yáñez AJ, Valenzuela K, Matzner C, Olavarria V, Figueroa J, Avendaño-Herrera R, Carcamo JG (2014) Broth microdilution protocol for minimum inhibitory concentration (MIC) determinations of the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* to florfenicol and oxytetracycline. *Journal of Fish Diseases* 37: 505-509.

**CHILEAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY
XXVIII ANNUAL MEETING**

**OCTOBER, 26-30, 2014
PUERTO VARAS**

P R O G R A M

Methods: We investigated the activity and localization of ACE2, in wild type (wt), *mdx* mice and in a model of induced chronic damage by repetitive injections of barium chloride in wt mice.

Results: All dystrophic muscles studied showed higher ACE2 activity than wt. Immunostaining studies suggest that ACE2 was localized at the sarcolemma and, to a lesser extent, associated to interstitial cells. Similar results were observed in the induced chronic damage model. Interestingly, Ang-1-7 infusion resulted in a reduction of ACE2 in dystrophic muscle. Furthermore, we evaluated the effect of ACE2 overexpression in *mdx* TA muscle using an adenovirus containing ACE2 sequence and showed that it reduced the fibrosis associated dystrophic muscle. Moreover, we observed fewer inflammatory cells infiltrating the *mdx* muscle.

Discussion: This is the first evidence supporting ACE2 as an important therapeutic target to improve dystrophic skeletal muscle phenotype.

Fondecyt1110426, CAREPFB12/2007.

(172) Effect of emamectin benzoate, erythromycin, florfenicol and oxytetracycline treatments on CYP3A27 mRNA expression levels in liver and intestine of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*). Cuevas P¹, Arias L¹ and Cárcamo JG^{1,2}. ¹Instituto de Bioquímica y Microbiología, ²Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

Introduction: CYP3A27 plays an important role in biotransformation of xenobiotic in fish. Therefore we evaluate the effect of the antibiotics erythromycin, florfenicol and oxytetracycline and antiparasitic drug emamectin benzoate (EMB) on the expression of CYP3A27 in liver and intestine of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*).

Materials and Methods: Specimens of Rainbow trout of 100 g approximately were fed for a period of 10 days with antibiotics (erythromycin 75 mg/kg, florfenicol 10 mg/kg, oxytetracycline 55 mg/kg of biomass) and 7 days with EMB 50 µg/kg fish. Control and treated fish were slaughtered every 2 days for 45 days and the liver and intestine were removed and put on RNA Safer for further analysis. Real Time PCR was performed to evaluate the transcriptional effect on CYP3A27 gene.

Results: The CYP3A27 expression in intestine and liver was induced after 5 and 17 days of treatment with florfenicol, respectively. EMB and erythromycin positively regulated the expression of CYP3A27 in both tissues in a similar way. Oxytetracycline showed no significant effect after treatment.

Discussion: Individual treatments with EMB and antibiotics affect the expression of detoxification enzyme CYP3A27, mostly by inducing its expression both in liver as intestine. Here we showed that exposure of rainbow trout to different drugs alters the expression of an enzyme involved in biotransformation of xenobiotics, which could produce drug interactions in consecutive treatments with these drugs.

Fondecyt 1120903, Fondef D10I1128 and Fondap 15110027.

(173) New approach for the detection of different strains of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from freshwater farms in Chile. Hidalgo, Christian¹; Poblete, Matías^{2,3}; Irgang, Rute²; Avendaño-Herrera, Ruben^{2,3}; Paredes, Rodolfo¹. ¹Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andrés Bello. ²Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuicola, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello. ³Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Concepción, Chile.

Introduction: *Flavobacterium psychrophilum* (Fp) is the causative agent of Bacterial Cold Water Disease (BCWD). This disease causes substantial economic loss in the salmonid industry worldwide. Several immunoassays have been developed in other countries, while in Chile there is a lack of these diagnostic techniques able to detect native Fp populations to infections in Chilean salmonid farms.

Material and Methods: Microplate wells were coated with Fp proteins (whole cell), extracted from three different Chilean isolates (Fp02, 06 and 13), one European strain (FpJIP) and *Vibrio ordalii* proteins as a negative control. Commercial primary antibody (Mouse-α-Fp) was titrated with checkerboard titration. TMB was used as the chromagen substrate.

Results: Fp02 and Fp06 showed a strong positive immunological reactions, while no reaction with Fp13 nor FpJIP was detected. No reaction with the commercial antibody was detected in the negative control and blank wells. The cutoff value of these assays was an OD of 0.5.

Discussion: We were able to successfully identify two local Fp strains while ignoring wild foreign Fp isolates and other salmonid bacteria. Fp13, a PCR-confirmed Chilean isolate, gave a negative reading, which suggests that the commercial antibody currently used as an IFAT field technique could be missing Fp positive animals.
PYT-2013-0014 supported by Fundación para la Innovación Agraria.

CHILEAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

XXIX ANNUAL MEETING

October, 25 – 29, 2015

Puerto Varas, Chile

SPONSORS

FUNDACION CHILENA PARA BIOLOGIA CELULAR

FUNDACION CIENCIA & VIDA

ADVANCED CENTER FOR CHRONIC DISEASES

CENTRO DE REGULACION DEL GENOMA

INSTITUTO MILENIO BNI

MILLENNIUM NUCLEUS FOR REGENERATIVE BIOLOGY

NETWORK FOR METABOLIC STRESS SIGNALLING

P. UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

EXHIBITORS

ALATHEIA MEDICAL – ANDES IMPORT – ARQUIMED

BIOSCHILE – BIOSONDA – CIENTEC – FERMELO

GALENICA – GENEXPRESS – IB INMUNOBIOMEDICA

LABTEC – LIFE TECHNOLOGIES CHILE – LONCOTEC

MERCK QUIMICA CHILE – SIAL CHILE

148.- Alternative diagnostic method for the detection of different *Vibrio ordalii* strains isolated from Atlantic salmon farmed in Chile. Muñoz D.¹, Stoores C¹, Hidalgo C¹, Poblete M^{2,3}, Irgang, R^{2,3}, Avendaño-Herrera R^{2,3}, Paredes R¹. ¹Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andrés Bello, Chile. ²Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuicola, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Chile. ³Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Concepción, Chile.

Introduction: *Vibrio ordalii* (Vo) is a causative agent of Vibriosis, a serious infectious disease in salmonids, that causes economic loss in the salmonid industry worldwide. Several immunoassays have been developed in other countries, while in Chile diagnostic techniques able to detect native Vo populations affecting Chilean Atlantic salmon farms are lacking.

Material and Methods: Extracted proteins were coated in a 96-well plate using 6 different Vo native isolates (Vo-NS), a Vo (Vo-RS) and *Vibrio anguillarum* (Va) reference strains. Other bacterial pathogens were used as negative controls (NC). Rabbit α -Vo serum and α -rabbit HRP antibody were titred. Cut off values were determined as Mean optical density (O.D.) of NC + 3SD.

Results: Vo-NS optimal antibodies dilution of α -Vo and α -rabbit HRP was 1:250,000 and 1:100,000 respectively, with minimal reaction for Vo-RS/Va. Va/Vo-RS optimal dilution was set at 1:100,000 and 1:20,000 of the same antibodies, having overflow values for Vo-NS. NC had no reactions. Cut off values for Vo-NS and Vo-RS/Va were 0.197 and 0.173 O.D. respectively.

Discussion: α -Vo serum had a stronger reaction with all Vo-NS used compared with Vo-RS/Va allowing us to identify native strains, however we were unable to differentiate between both vibrio species.

Work supported by PYT-2013-0014 Fundación para la Innovación Agraria and CONICYT/FONDAP 15110027.

149.- A functional genomic approach identifies osteoblast-specific enhancers and reveals a highly modular architecture for the collagen 1a1 gene. Muñoz D.¹, Hanna P.¹, Godoy F.¹, Buisine N.², Sach L.² and Marcellini S.¹. Faculty of Biological Sciences, University of Concepcion, Chile¹ and CNRS, Paris, France².

Introduction: Bone formation, and its subsequent biomineralization, required the synthesis of massive amount of collagen protein by osteoblasts. However, the regulatory architecture of the *collagen1a1* gene, and its conservation/divergence between distinct vertebrate species, remains poorly understood.

Material and Methods: Expression patterns of collagen genes were assessed by *in situ* hybridization. ChIP-seq (against H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac and H3K27me3) and RNA-seq were performed with native, uncultured, *Xenopus tropicalis* osteoblasts. Enhancers and promoters were visualized with Gbrowse on the 4.1 X.t. genome version, cloned in GFP expression vectors, and transfected in primary X.t. osteoblast cultures. Mouse and frog *Collagen1a1* genes were compared by BLAST and VISTA.

Results: We detected and assayed five remote enhancers (enriched in H3K4me1 and H3K27ac and depleted in H3K27me3) located in introns or within 100kb upstream of *collagen1a1*. Three of these enhancers were able to drive high GFP expression levels in primary osteoblasts, thereby validating their function. A high degree of intergenic sequence divergence, and the invasion of some X.t. enhancers by amphibian specific genomic repeats account for the absence of conservation between frog and mouse *collagen1a1* enhancers.

Discussion: Different sets of enhancers control *collagen1a1* in frog and mouse. However, as the bone tissue requires high amounts of structural proteins to resist mechanical forces, we propose that a selection pressure acts to maintain a conserved redundant regulatory architecture based on the combination of multiple *collagen1a1* distal enhancers.

Funding: FONDECYT 1151196.

150.- Contribution of NMDA receptors to the acquisition of hippocampal neuronal polarity. Muñoz, Ernesto; Wilson, Carlos and González-Billault, Christian. Laboratorio de Dinámica Celular y Neuronal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Introduction. Glutamate is the main excitatory neurotransmitter at central nervous system. NMDA receptors (NMDAR) are Ca^{2+} channels activated by both glutamate and NMDA that participate in neuronal maturation and synaptic plasticity, regulating several neuronal functions. However, the contribution of NMDAR to neuronal

PCR protocol for detection of *Vibrio ordalii* by amplification of the *vohB* (hemolysin) gene

R. Avendaño-Herrera^{1,2,*}, J. P. Maldonado¹, D. Tapia-Cammas¹, C. G. Feijóo³,
F. Calleja¹, A. E. Toranzo⁴

¹Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuicola, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile

²Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Concepción, Chile

³Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile

⁴Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

ABSTRACT: *Vibrio ordalii* is the causative agent of atypical vibriosis and has the potential to cause severe losses in salmonid aquaculture. To prevent and control outbreaks, a rapid, reproducible, sensitive, and effective diagnostic method is needed. We evaluated a new conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) protocol using a primer set (VohB_Fw–VohB_Rv) designed to amplify a 112 bp fragment flanking the *vohB* gene (coding for hemolysin production), against 24 *V. ordalii* strains isolated from different fish species, the *V. ordalii* type strain, and 42 representative related and unrelated bacterial species. The primer set was species-specific, recognizing all *V. ordalii* strains evaluated, with no cross-reaction with the other bacterial species. A sensitivity of 10^3 copies of the *vohB* gene was obtained with a standard curve. When the VohB_Fw–VohB_Rv qPCR protocol was applied to Atlantic salmon seeded tissues (kidney, liver, spleen, and muscle), the detection limit ranged from 5.27×10^2 to 4.13×10^3 *V. ordalii* CFU ml⁻¹, i.e. 62 to 145 copies of the *vohB* gene, using the previously calculated standard curve. The conventional PCR also detected *V. ordalii*, but the total reaction time was 1 h longer. When the qPCR protocol was applied to naturally infected cage-cultured Atlantic salmon samples, 5 of 8 fish tested positive for *V. ordalii*, but only one of them was diagnosed as positive by direct cultivation on agar. We conclude that the PCR protocol evaluated is fast, specific, and sensitive enough to detect *V. ordalii* in infected tissues and is an important tool for secure diagnosis of atypical vibriosis, and is therefore helpful for the control of the disease through the prompt detection within fish populations.

KEY WORDS: *Vibrio ordalii* · PCR · Atypical vibriosis · Diagnosis · Salmonid fish

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

Coyhaique, 25 de Noviembre de 2014
Sala de Reuniones DIPLADE
Gobierno Regional de Aysén

	NOMBRE	INSTITUCION	CARGO	TELEFONO	CORREO ELECTRONICO
1	Thadeleine Hamann	CIGP	Coordinador Unidad P. Artesanal		
2	Alexander Ruiz	INCAR	Director Regional Aysén		
3	RUBEN BUENDIAÑO	UNAB/INCAR	INV. PRINCIPAL		
4	HERNAN REBOLEDO	SubPESCA.	DIRECTOR ZONAL		
5	Miguel Ruiz	Consejo	Presidente		
6	Pablo Torres Ponce	Litoral SUR	Secretario		
7					
8					

Charla de difusión a Unidad de Salud Animal de Sernapesca, Aysén 26 de noviembre 2014

	NOMBRE	INSTITUCION	CARGO	TELEFONO	CORREO ELECTRONICO
9	Marcelo Maibae	INCAR	—		
10	Alyandra Lafon	INCAR	Directora Regional Aysén		
11	Juan Manuel Estrada	UMIP	Director Sernapesca Acuicultura		
12	Guillermo Hoyer	SERNAPESCA	M.V.		
13	Jorge Hidalgo	SERNAPESCA	M.V.		
14	Cristian Oyarzo	SERNAPESCA	M.V.		
15	Orlando Montaña	Sernapesca	M.V.		
16	Patricio López P.	Aquachile	Jefe de Centro		

	NOMBRE	INSTITUCION	CARGO	TELEFONO	CORREO ELECTRONICO
9	Angela Urquiza	Aquachile SA	Asistente de Piscicultura		
10	Jorge Plancha	Aquachile SA	Jefe de Centro		
11	Macarena Mejías	Aquachile	Asistente Piscicultura		
12	Galina Sauras	Sernapesca	Técnico		
13	Pablo Manríquez	Los Hornos	Técnico		
14	Pablo Manríquez				
15	Marcos Rojas	Los Hornos	Técnico		
16	Daniel Lillo	Los Hornos	Supervisor Piscicultura		

	NOMBRE	INSTITUCION	CARGO	TELEFONO	CORREO ELECTRONICO
9	Deha Arauz	Gerencia Pesca	Médico Veterinario		
10	Marcelo Jovera	Aguachile	Jefe Area		
11					
12					
13					
14					
15					
16					

Charla Alumnos Campus Patagonia Universidad Austral de Chile
Coyhaique 27 de Octubre de 2015

	Nombre	Curso	Alumno/Funcionario	Firma
1	Lisseth Llanos Hernández	4 ^{to} Semestre Tec. Univ. Valdivia	alumno	
2	Daniela Moreno Corrales	4 ^{to} Semestre Tec. Salmonicultura	Alumno	
3	Marilina Tiznado Vázquez	4 ^{to} Semestre Tec. Salmonicultura	ALUMNO	
4	Nicolm González Ruiz	4 ^{to} Semestre Salmonicultura	Alumno	
5	Roberto Roldán Echeverría	4 ^{to} Semestre Salmonicultura	alumno	
6	Alicia Fariña Vidal	4 ^{to} Semestre Salmonicultura	Alumno	
7	CAROL GONZALEZ B.	2 ^{do} Semestre Salmonicultura	Alumna	
8	Karen Ruiz	2 ^{do} Semestre salmonicultura	Alumno	
9	Angela Carrasco M.	2 ^{do} Semestre Salmonicultura	Alumna	
10	Constanza Pizarro Valenzuela	4 ^{to} Semestre Salmonicultura	Alumna	
11	Yasir Velásquez Velásquez	4 ^{to} Semestre "	Alumno	
12	Luis Paredes Alvarez	4 ^{to} "	Alumno	
13	Rodrigo Jiménez Valenzuela	2 ^{do} Semestre Salmo.	Alumno	
14	Jonathan Gallegos Pineda	2 ^{do} Semestre salmonicultura	Alumno	
15	Elvis Carrillo	2 ^{do} semestre	Alumno	
16	José Muñoz	2 ^{do} SEMESTRE	Alumno	

Charla Alumnos Campus Patagonia Universidad Austral de Chile
Coyhaique 27 de Octubre de 2015

	Nombre	Curso	Alumno/Funcionario	Firma
17	Patricia Torres	2 ^{do} Semestre	Alumno	
18	Patricio Arango M.	2 ^{do} Semestre	Alumno	
19	INGRID SAPATA	4 ^{to} Semestre	Alumno	
20	Ricardo de la Fuente A.		Funcionario	
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				

Universidad
Andrés Bello

INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA UNIVERSITARIA

LA FINALIDAD ES GENERAR NUEVAS BARRERAS SANITARIAS:

Académicos UNAB desarrollan base nacional de bacterias para la industria acuícola

La investigación plantea un paquete tecnológico para identificar los principales patógenos que afectan a las especies salmónidas, desarrollar vacunas y disminuir el uso de antibióticos.

Le dicen “el oro salmón” ya que, en pocas décadas, la salmonicultura ha sabido posicionarse en Chile, logrando ser la segunda mayor fuerza exportadora después del cobre. De hecho, los retornos de esta industria alcanzan los 4 mil millones de dólares anuales y, según cifras de SalmonChile, durante el año 2014 la producción superó las 500 mil toneladas.

No obstante, la industria salmonera aún tiene muchos desafíos por delante. De ellos, los más importantes están ligados al ámbito sanitario, ya que, luego de la crisis provocada por el virus ISA entre los años 2007 y 2010, el ojo está puesto en la capacidad de enfrentar enfermedades de alto nivel de contagio, evitando mermas en la producción y reduciendo el uso de medicamentos y antibióticos.

Es con este propósito que el Dr. Rubén Avendaño, académico de la Facultad de Ciencias Biológicas Sede Viña del Mar de la Universidad Andrés Bello e investigador del Centro de Investigación Marina Quintay (CIMARQ), junto al Dr. Rodolfo Paredes, académico y director general de pregrado UNAB, llevan adelante un proyecto de investigación cuya finalidad es crear una base nacional de aislados bacterianos, la cual permita el desarrollo de técnicas de diagnóstico, estudios de susceptibilidad antimicrobiano y genere una colección de cultivos bacterianos que estén al servicio de la producción.

El estudio, que cuenta con el apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y el patrocinio de Sernapesca, propone también el desarrollo de una herramienta tecnológica para identificar tempranamente patógenos bacterianos presentes en los centros de cultivos y así definir tratamientos acordes a cada situación.

FINALIDAD DE DISMINUIR EL USO DE ANTIBIÓTICOS

En este sentido, el Dr. Rubén Avendaño explicó que, para conocer la realidad sanitaria de la producción de salmones en Chile, es necesario llevar a cabo un reconocimiento cabal del tipo de cepas bacterianas existentes, los patógenos que generan y las características con las que se presentan en cada caso.



La industria salmonera tiene aún varios desafíos por delante. Los principales, están ligados al ámbito sanitario.

TRATAMIENTOS MÁS EFICIENTES

El estudio dará origen a pruebas y exámenes que diagnostiquen con precisión la presencia de un patógeno determinado y así definir el tratamiento adecuado para cada situación.

“Con este estudio esperamos definir las diferencias de las bacterias desde el punto de vista antigénico, genético y también tener un conocimiento de la situación de susceptibilidad de los microorganismos a florfenicol y oxitetraciclina, los principales antibióticos empleados en la salmonicultura chilena. Con esta información estaremos contribuyendo al diagnóstico precoz, a disminuir las mortalidades por enfermedades bacterianas, incentivar la formulación de nuevas vacunas y reducir el uso de antibióticos”, subrayó el investigador.

El académico de la Facultad de Ciencias Biológicas, agregó que el proyecto está basado en bacterias que no tienen programa de vigilancia activa. “Por lo tanto, son patógenos de los que el Servicio Nacional de Pesca no hace seguimiento. Así, esta base nacional no sólo permitirá identificar los principales patógenos que atacan a los salmónidos, sino

que también a aquellas de las que se tiene mayor conocimiento.”

Asimismo, el Dr. Rubén Avendaño explicó que al contar con una guía en la que se especifiquen características y manifestaciones de patógenos, la industria tendrá la posibilidad de desarrollar vacunas más eficaces para evitar enfermedades. “La idea es estimular el uso de vacunas que ataquen a aquellas bacterias que realmente representan la realidad sanitaria del país. De esta forma, podremos generar una verdadera barrera de protección y disminuir el uso de antibióticos en los centros de cultivos”, agregó.

MUESTREOS A LO LARGO DEL PAÍS

Como primer paso de este proyecto, los investigadores, junto al biólogo Matías Poblete, iniciaron un riguroso proceso de toma de muestras en diferentes centros de cultivos a lo largo del centro y sur de Chile, los

cuales se hicieron posibles gracias a la colaboración de Sernapesca y de algunas empresas salmoneras.

La realización de estos muestreos tuvo como finalidad definir los diferentes tipos bacterianos en que pueden presentarse los patógenos que afectan a las especies de salmones.

“Un patógeno de una misma bacteria puede presentarse de forma diferente, dependiendo de las condiciones ambientales. Es decir, la enfermedad puede presentarse de forma totalmente distinta en Concepción que en Puerto Montt.”

En este sentido, el investigador del Centro de Investigación Marina Quintay, manifestó que una vez que se hayan aislado las bacterias y se conozcan sus características y diferentes manifestaciones, este estudio también podrá dar origen a pruebas y exámenes específicos que permitan diagnosticar con gran precisión el patógeno que está atacando a una definida la población de salmones. “Gracias al desarrollo de estas nuevas herramientas, será posible hacer un diagnóstico certero en corto tiempo y así conocer el antibiótico y la dosis que se ajuste a las necesidades específicas de cada situación y, así, evitar excesos”, finalizó el Dr. Avendaño.

Agenda



Facultad de Odontología ofrecerá ciclo “Ética en la práctica profesional”

Todos los lunes hasta junio, la Facultad de Odontología de la U. Andrés Bello realizará diversos análisis de la ética desde distintos puntos de vista en la vida profesional. La primera de estas ponencias estará a cargo del Dr. Manfred Seideman.

Cuándo: Todos los lunes desde el 23 de marzo, a las 8:30 AM.

Dónde: Av. República 252, sala 101.

Informaciones: unab.cl.



UNAB inaugura Temporada Cultural

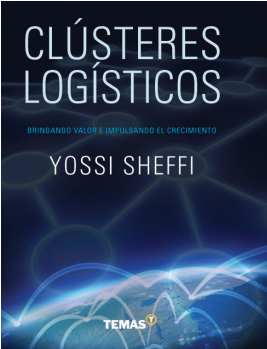
Con el Concierto “La Armonía del Clarinete”, en el que participará el clarinetista austriaco Stefan Nuebauer, la Camerata de la Universidad Andrés Bello inicia la Temporada Cultural 2015. La venta de abonos se realiza a través Atrápalo.cl y en las oficinas de Extensión Cultural.

Cuándo: 29 de marzo a las 19:00 horas.

Dónde: Campus Casona Las Condes (Av. Fernández Concha 700).

Informaciones: cultura@unab.cl o al 26618561.

Experto del MIT lanza libro en Chile



Julio Villalobos, director del Departamento de Transporte y Logística de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Andrés Bello, presentará el libro “Clústeres Logísticos: brindando valor e impulsando el crecimiento”, del Dr. Yossi Sheffi, director del Centro de Logística y Transporte del MIT.

Cuándo: 16 de abril a las 9:00 AM.

Dónde: Campus Casona Las Condes (Av. Fernández Concha 700).

Valor: Entrada liberada.



DIARIO NORTEAMERICANO RECONOCIÓ EL APOORTE A LA MEDICINA REPRODUCTIVA DEL DIRECTOR DEL CIMIS

“Ha escrito o contribuido en más de 300 publicaciones científicas y en más de 60 libros”.

En un extenso artículo, The Huffington Post, el diario online más leído en Estados Unidos, destacó la labor del Dr. Horacio Croxatto, director del Center for Integrative Medicine and Innovative Science (CIMIS) de la Universidad Andrés Bello, por las contribuciones logradas durante su carrera a la medicina reproductiva y planificación familiar.

Bajo el título “Un campeón en el control de la natalidad del que probablemente nunca has oído hablar”, la periodista Laura Stepp, ganadora del Premio Pulitzer de Periodismo, explica que el Dr. Croxatto ha formado parte de la investigación de la mayoría de los productos anticonceptivos existentes. “Ha escrito o contribuido en más de 300 publicaciones científicas y en más de 60 libros. Posee 17 patentes, incluyendo siete en Estados Unidos”.

De la misma forma, la autora del texto agrega que el año 2014, el Dr. Horacio Croxatto recibió el máximo reconocimiento de la Society of Family Planning, organización internacional que fomenta la investigación en áreas de salud reproductiva.

AVANCES EN ANTICONCEPCIÓN

Asimismo, la periodista Laura Stepp destaca como uno de los principales logros del Dr. Horacio Croxatto, la creación de Norplant, el primer anticonceptivo de largo efecto en el mercado mundial.

Este medicamento fue desarrollado en conjunto con el científico estadounidense Dr. Sheldon Segal, y consistía en un dispositivo subcutáneo de silicona que liberaba hormonas anticonceptivas, logrando un efecto por cinco años. Más tarde, ambos investigadores crearían Jadelle, correspondiente a la segunda generación de Norplant.

Finalmente, el artículo publicado por el Huffington Post subraya la relevancia que tuvo la investigación del Dr. Horacio Croxatto en el debate mundial sobre la anticoncepción de emergencia.

“Sus estudios han demostrado que las píldoras que pueden prevenir el embarazo incluso cinco días después de haber sucedido la relación sexual, no son causantes de abortos”.

Por su parte, el Dr. Horacio Croxatto, agradeció el reconocimiento otorgado por este medio de comunicación. “Trabajé toda mi vida en medicina reproductiva, pero nunca lo hice esperando elogios. No obstante, es una gran satisfacción saber que los logros conseguidos en mi laboratorio han trascendido las fronteras e impactado en la vida de tantas personas”.



Las investigaciones aportan en temas relativos a supernovas, vía láctea, transientes y estadísticas.

Con el fin de potenciar la investigación científica en temas relacionados con la astronomía, es que este mes se lanzó oficialmente el nuevo Instituto Milenio de Astrofísica, el cual cuenta con financiamiento de la Iniciativa Científica Milenio del Ministerio de Economía. La Universidad Andrés Bello es una de las siete prestigiosas universidades chilenas que forman este núcleo de investigación y se encuentra representada por los académicos de la Facultad de Ciencias Exactas, Dr. Dante Minniti, quien ocupa el cargo de subdirector; y el Dr. Giuliano Pignata, coordinador del área de supernovas. Además, la UNAB aporta con dos investigadores quienes son la Dra. Patricia Tissera y el Dr. Timo Anguita. Dentro del Instituto Milenio de Astrofísica, se llevan a cabo investigaciones de primer nivel, las cuales aportan avances en cuatro líneas principales: supernovas, vía láctea, transientes y estadísticas.

FUTURO DE LA ASTROFÍSICA EN CHILE

Chile se encuentra en el centro de la comunidad científica, ya que cuenta con los mejores cielos del mundo para la observación astronómica. Prueba de ello, es que numerosos observatorios extranjeros se han instalado en el Norte Chico y Grande y que, según se estima, en los próximos quince años, Chile albergará el 70% de espejos de telescopios ópticos e infrarrojos del mundo. En este sentido, el Dr. Dante Minniti, director del Doctorado en Astrofísica de la Universidad Andrés Bello, explicó que el principal propósito de este Instituto Milenio de Astrofísica es aprovechar el nicho privilegiado que Chile tiene para el desarrollo de la astronomía e impulsar a alumnos de pregrado, posgrado y académicos a avanzar en investigación original y de vanguardia.

Por su parte, el Dr. Giuliano Pignata, académico UNAB, expresó que quieren incentivar la formación de nuevas generaciones de científicos altamente calificados para enfrentar la gran avalancha de información que la astronomía generará en los próximos años.

“Asumimos el desafío de desarrollar herramientas tecnológicas para analizar los datos masivos. Esto significa, lograr sistemas de conectividad, almacenamiento y procesamiento de información. Además, no debemos olvidar que es nuestra responsabilidad difundir los logros y alcances de la astronomía no sólo en grupos científicos, sino que también hacia el público en general; llegando a profesores y colegios”, finalizó el investigador Giuliano Pignata.



2014

MANUAL DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS MOLECULARES Y ANTIGÉNICAS DE BACTERIAS QUE AFECTAN A SALMÓNIDOS DE INTERÉS PRODUCTIVO



**Universidad
Andrés Bello®**

Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de
Ecología y Recursos Naturales
Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y
Biotecnología Acuicola, Facultad de Ciencias
Biológicas

MANUAL DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS MOLECULARES Y ANTIGÉNICAS DE BACTERIAS QUE AFECTAN A SALMÓNIDOS DE INTERÉS PRODUCTIVO

Christian Hidalgo Franco

Matías Poblete

Rute Irgang

Rodolfo Paredes Esparza

Rubén Avendaño-Herrera

Financiado por proyecto PYT-2013-0014 de Fundación para la Innovación Agraria

SANTIAGO - CHILE

2014

ÍNDICE

I. Métodos Moleculares

página 4

- Preparación y tipos de muestras
- Conservación del material genético ADN y ADN en tejidos de peces
- Extracción de ADN a partir de muestras de tejido
- Extracción de ADN a partir de colonias puras
- Análisis de secuencias intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC-PCR)
- Análisis de elementos extragénicos palindrómicos repetitivos (REP-PCR)
- Análisis de amplificaciones aleatorias del ADN (RAPD-PCR)
- Análisis de imágenes de REP-PCR, ERIC-PCR y RAPD-PCR

II. Métodos antigénicos

página 7

- Preparación y tipos de muestras
- Conservación de las muestras de bacterias y tejidos de peces
- Procesamiento de muestras de tejido
- Extracción de proteínas a partir de pellet de bacterias

Protocolos de Diagnóstico de Enfermedades

1. Flavobacteriosis

página 9

- PCR específico para la detección de *Flavobacterium psychrophilum*
- ELISA contra proteínas solubles de *Flavobacterium psychrophilum*
- Western-Blot contra rOmpA específica de *Flavobacterium psychrophilum*

2. Enfermedad Bacteriana del Riñón

página 12

- PCR anidada específica para la detección de *Renibacterium salmoninarum*

3. Vibriosis Atípica

página 14

- PCR específico para la detección de *Vibrio ordalii*
- ELISA contra proteínas solubles *Vibrio ordalii*

4. Estreptococosis

página 17

- PCR específico para la detección de *Streptococcus phocae*

I. MÉTODOS MOLECULARES

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variaciones será empleado como método de diagnóstico para los distintos patógenos. Para ello, es importante el diseño de cebadores y sondas, la utilización de controles positivos y negativos de manera que los resultados obtenidos sean específicos y sensibles (número mínimo de detección del microorganismo a diagnosticar). En ocasiones la PCR puede depender bastante de las condiciones en las que se ejecuta, ya que podría estar muy sujeta a la contaminación del laboratorio por productos de PCR previos, lo cual puede dar lugar a falsos positivos. Siempre que se utilicen técnicas moleculares como la PCR, debe llevarse a cabo con cuidado y prestando especial atención a la utilización de controles positivos y negativos apropiados.

Preparación y tipos de muestras

En el caso de estas técnicas, las muestras a analizar deben prepararse para conservar el material genético del patógeno que se desea diagnosticar. Por tanto, cada muestra destinada a análisis basados en la detección de ácido nucleico debe manipularse y empaquetarse con muchísimo cuidado para minimizar la posible contaminación cruzada entre muestras o que el material se deteriore antes de realizar la prueba diagnóstica. Para prevenir dicha contaminación, quien toma la muestra debe utilizar recipientes nuevos como bolsas de plástico o frascos estériles. Además, dentro de cada recipiente o contenedor debe introducirse una etiqueta impermeable con los datos correspondientes a cada una de las muestras facilitando la trazabilidad de la misma.

Conservación del material genético ADN y ADN en tejidos de peces

Para conservar la muestra de órganos de los ejemplares a muestrear de debe tomar al menos un trozo de 0,25 cm², el cual debe ser sumergido inmediatamente en 10 volúmenes del preservante comercial RNAlater®. Por ejemplo, para 0,1 g de tejido se requiere de 1 ml de RNAlater®, siendo los órganos de selección: porción anterior del riñón, hígado, bazo, branquia y/o músculo con lesiones. Las muestras obtenidas pueden mantenerse a 25°C durante 1 semana, a 4°C durante un mes o indefinidamente a – 20°C o temperaturas inferiores.

Extracción de ADN a partir de muestras de tejido

Para la extracción de ADN, se trituran los tejidos eliminando previamente el RNAlater. Luego se extrae el ADN mediante un protocolo estándar usando el kit comercial TRIzol Reagent, para lo cual es necesario contar con cloroformo, etanol al 75% y 100%, 0,1 M de citrato de sodio en etanol al 10%, NaOH 8 mM y una centrifuga con rotor capaz de alcanzar hasta 12.000 × g.

Para ello, se debe retirar la muestra del tubo con el RNAlater y depositarla en un nuevo tubo, en el cual el tejido se homogeneiza directamente en el TRIzol Reagent. Posteriormente, se debe obtener la fase orgánica y precipitar el ADN con 300 µl de etanol absoluto mezclándolo cuidadosamente por inversión del tubo con la muestra. A continuación se debe dejar reposar la muestra a temperatura ambiente por 3 min y se centrifuga a 2.000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante corresponde a la capa de fenol-cloroformo que debe ser removido y desechado, mientras que el precipitado se lava dos veces con 1 ml de citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10% (en cada lavado se deja reposar 30

min a temperatura ambiente y se mezcla periódicamente). Luego se centrifuga la muestra a 2.000 rpm por 5 min a 4°C. Posteriormente, se resuspende el precipitado en 2 ml de etanol al 75% y se deja reposar por 20 min a temperatura ambiente (mezclando periódicamente) para finalmente centrifugar a 2.000 rpm por 5 min a 4°C y dejar secar por 15 min para resuspender el precipitado con en 50 µl de NaOH 8 mM.

Extracción de ADN a partir de colonias puras

En el caso de la extracción de ADN a partir de colonias bacterianas se empleará el kit comercial InstaGene Matrix® y se requiere contar con un vortex, un termoblock, una centrifuga con rotor capaz de alcanzar hasta 12.000 rpm y tubos de microcentrífuga de polipropileno.

Para la extracción del ADN con InstaGene Matrix®, se debe suspender una a tres colonias bacterianas en 500 µl de tampón fosfato salino estéril (PBS), el cual será empleado para lavar las bacterias mediante centrifugación por 5 min a 12.000 rpm. Luego, se elimina el sobrenadante y se le adicionan al precipitado 200 µl de InstaGene Matrix®, siendo recomendable emplear una punta estéril por cada muestra para disminuir las posibilidades de contaminación. Es importante que previo a la adición del InstaGene Matrix®, el frasco que lo contiene debe ser dispuesto en un agitador magnético o agitar de forma suave por 2 a 5 min a temperatura ambiente. Las muestras deben ser incubadas a 56°C por 15 a 30 min y transcurrido ese periodo los tubos se deben agitar suavemente por 10 seg e incubar nuevamente a 100°C por 8 min. Una vez finalizado el procedimiento, las muestras pueden ser almacenadas a -20°C hasta su uso. Como control negativo en cada ronda de extracción se debe incluir agua destilada estéril, la cual debe ser manipulada en idénticas condiciones que las señaladas anteriormente. Para los análisis por PCR, cada tubo Eppendorf conteniendo el ADN bacteriano y las bolitas magnéticas del InstaGene Matrix® se centrifugará por 5 min a 10.000 rpm, siendo empleado para la PCR la fracción del sobrenadante.

Análisis de secuencias intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC-PCR)

La amplificación de los fragmentos ERIC-PCR se realiza con el sistema comercial Ready-To-Go™ PCR beads, los cuales contienen todos los reactivos requeridos con la excepción del ADN y los partidores ERIC 1 (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') y ERIC 2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'). La reacción se realiza en un volumen final de 25 µl en tubos de microcentrífuga de 0,2 mL. En estos tubos se deposita cuidadosamente las micro esferas que contiene el sistema comercial Ready-To-Go™ PCR beads, 22 µL de agua calidad PCR, 1 µl de cada partidor en una concentración 10 µM y 1 µL de ADN con una concentración de 200 ng.

El programa de ciclado corresponde a: Desnaturación inicial a 95°C durante 5 min; 35 ciclos con desnaturación a 92°C durante 45 seg; hibridación a 52°C durante 1 min y extensión a 70°C durante 10 min y una extensión final a 70°C durante 20 min. Se debe incluir un control negativo, el cual corresponde a la mezcla de reacción sin ADN.

Los productos obtenidos se separaron utilizando electroforesis horizontal (100 V) en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (Tris 0,04 M, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) y GelRed® y se fotografiaron bajo luz UV, siendo las imágenes almacenadas para su posterior análisis.

Análisis de elementos extragénicos palindrómicos repetitivos (REP-PCR)

El mismo sistema comercial Ready-To-Go™ PCR beads se utiliza para las amplificaciones REP, utilizando los siguientes partidores REP 1D (5'-NNNRCGYCGNCATCMGGC-3') y REP 2D (5'-RCGYCTTATCMGGCCTAC-3') en donde M es A o C; R es A o G; Y es C o T y N es cualquier nucleótido.

La reacción de PCR se lleva a cabo en 25 µL de volumen final, en tubos de microcentrífuga de 0,2 mL a los cuales se le agrega las micro esferas, 22 µL de agua calidad PCR, 1 µL de cada partidor en una concentración 10 µM y 1 µL de ADN con una concentración de 200 ng.

El programa de ciclado consiste de una desnaturación inicial a 95°C durante 7 min; 35 ciclos con una desnaturación a 92°C durante 45 seg, alineamiento a 40°C durante 1 min y extensión a 70°C durante 8 min y una extensión final a 72°C durante 15 min. El control negativo consiste en la mezcla de reacción sin ADN.

Los productos obtenidos se separaron utilizando electroforesis horizontal (100 V) en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (Tris 0,04 M, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) y GelRed® y se fotografiaron bajo luz UV, siendo las imágenes almacenadas para su posterior análisis.

Análisis de amplificaciones aleatorias del ADN (RAPD-PCR)

Las amplificaciones aleatorias del ADN se realizan usando el kit comercial Ready-to-Go RAPD Beads como describe Avendaño-Herrera y col. (2004; Journal of Applied Microbiology 96: 871 – 877). Este producto contiene todos los componentes necesarios para la reacción de PCR, excepto el ADN y los partidores, estos últimos están incluidos en el kit. En este estudio se evaluaron los partidores: P1 (GGTGCGGAA), P2 (GTTTCGCTCC), P3 (GTAGACCCGT), P4 (AAGAGCCCGT), P5 (AACGCGCAAC) y P6 (CCCGTCAGCA). Cada reacción de RAPD incluye 1 µL de ADN purificado (20-30 ng) y 25 µmol de cada partidor, en un volumen total de reacción de 25 µL.

El programa de ciclado se inicia con un ciclo de denaturación inicial de 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de: 95°C por 1 min, 35°C por 1 min y 72°C por 2 min, para terminar con una etapa de extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos obtenidos se separaron utilizando electroforesis horizontal (100 V) en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (Tris 0,04 M, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) y GelRed® y se fotografiaron bajo luz UV, siendo las imágenes almacenadas para su posterior análisis.

Análisis de imágenes de REP-PCR, ERIC-PCR y RAPD-PCR

En cada gel se incluyeron marcadores moleculares y el análisis se lleva a cabo con el programa computacional GelCompar II (Applied Math), con el cual se compara la similitud entre los perfiles obtenidos usando la fórmula de Dice (1945) ($Sd = 2 A / (2 A + B + C) \times 100$). Donde A es el número de bandas iguales y B y C son el número de bandas presentes en una cepa, pero no en la otra. Finalmente, los valores obtenidos se utilizaron para la confección de los correspondientes dendogramas.

II. MÉTODOS ANTIGÉNICOS

Los métodos antigénicos están fundamentados en la especificidad que existe en la reacción entre antígeno y anticuerpo, junto con la posibilidad de amplificar las señales producidas por esta reacción. La combinación de estas 2 características permite detectar pequeñas cantidades de agentes bacterianos de forma sensible y específica. Los métodos antigénicos nos permitirán desarrollar un diagnóstico presuntivo en primera instancia con el método del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA por sus siglas en inglés), y luego diagnóstico confirmatorio por las técnicas de Western-Blot e Inmunohistoquímica.

Preparación y tipos de muestras

Para las muestras destinadas a los ensayos de Western-Blot y ELISA, se necesita contar con muestras de bacterias. Para esto, se debe recibir un pellet de bacterias sin sobrenadante. En caso de recibir el cultivo líquido de bacterias, centrifugar a 6.000xG por 10 minutos. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante. Estas muestras deben ser transportadas a 4°C en tubos de 1,5 mL.

Para las muestras destinadas a los ensayos de Inmunohistoquímica, se necesita contar con muestras de tejido de peces siendo los órganos de selección: porción anterior del riñón, hígado, bazo, branquia y/o músculo con lesiones. Las muestras de órganos se deben recibir en recipientes herméticos rotulados con el origen de las muestras. El fijador a utilizar es Shandon Glyo-Fixx®. El volumen de fijador debe ser 10 veces el volumen de la muestra de tejido.

Conservación de las muestras de bacterias y tejidos de peces

Las muestras de bacterias deben ser procesadas inmediatamente para la extracción de proteínas solubles. Las proteínas solubles luego pueden ser almacenadas a -20°C o -80°C de forma indefinida.

Las muestras de tejido se deben procesar dentro de 48 horas una vez que han tomado contacto con el fijador Glyo-Fixx®. Los bloques de parafina con los tejidos y las láminas de cortes histológicos se almacenan a temperatura ambiente y tienen duración indefinida.

Procesamiento de muestras de tejido

Las muestras de tejido se cortan con un bisturí en secciones de 50x50 mm y se introducen en casetes para biopsia, rotulados para cada órgano y origen. Los casetes se procesan en un procesador automático de tejidos con el siguiente protocolo: 0:45 hrs Etanol 50%, 1:00 hr Etanol 70%, 1:00 hr Etanol 95%, 1:00 hr Etanol 95%, 1:00 hr Etanol 100%, 1:00 hr Etanol 100%, 1:00 hr Etanol 100%, 0:45 hrs Neo Clear®, 1:00 hr Neo Clear®, 1:00 hr Neo Clear®, 1:30 hrs Parafina (Paraplast Plus®), 1:30 hrs Parafina (Paraplast Plus®). Cada casete luego se transfiere a un centro de inclusión en donde se transforma en un bloque de parafina. Cada bloque de parafina se inserta en un micrótopo y se obtienen 5 láminas con 2 cortes de 5µm cada una. Para la obtención de los cortes histológicos, es necesario utilizar portaobjetos con carga positiva (+).

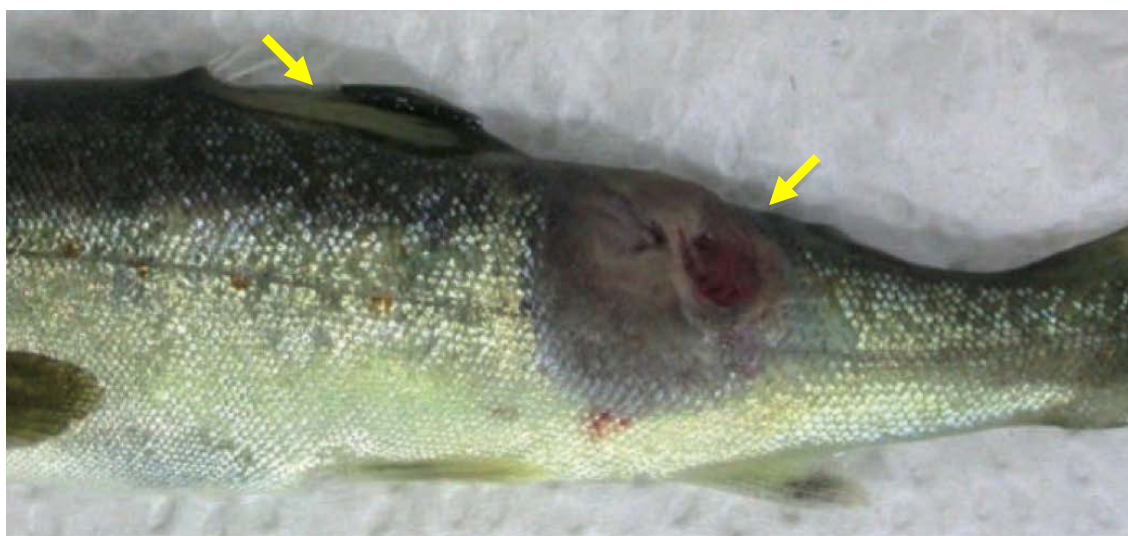
Extracción de proteínas a partir de pellet de bacterias

Para obtener las proteínas solubles desde las muestras de bacterias, se debe resuspender el pellet en una razón de 1:3 con Tris-HCl 40 mM. Luego hay que sonicar cada tubo 4 veces a máxima potencia: pulsos de 30 segundos con descanso de 1:30 minutos. El sonicado debe hacerse con las muestras en agua hielo. Una vez sonicadas las muestras, se deben centrifugar a 17.000xG por 15 minutos, el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se determina la concentración de proteínas utilizando kit Pierce BCA para cuantificación de proteínas.

1. FLAVOBACTERIOSIS

Flavobacteriosis es el nombre genérico que recibe la enfermedad causada por *Flavobacterium psychrophilum* en centros ubicados en agua dulce. Suele presentarse cuando la temperatura del agua se encuentra entre los 4 y 10°C, la severidad del brote depende del estado de desarrollo del pez, especialmente por el efecto de los niveles de inmunocompetencia entre individuos de diferentes tamaños. A nivel mundial, otros dos son los nombres comúnmente empleados para la misma patología “bacterial cold water disease” (BCWD) y “rainbow trout fry síndrome” (RTFS), dependiendo directamente de los signos clínicos en los peces y condiciones ambientales en la que se presenta el patógeno, el cual es capaz de prevalecer en invierno hasta primavera cuando las temperaturas son inferiores a los 10°C.

El diagnóstico presuntivo se basa en la observación de las lesiones erosivas y necróticas de la piel, el cual usualmente es realizado en terreno mediante la observación microscópica de raspados obtenidos desde la punta de las aletas lesionadas o desde el material blanquecino en el borde de las mismas. También se puede realizar examinando impresiones obtenidas desde el bazo de peces afectados, que son secadas al aire y teñidas con safranina, observándose células con la morfología típica de la bacteria. El aislamiento bacteriano debería realizarse a partir de las lesiones externas o muestras de bazo, riñón y en ocasiones, desde el cerebro sembradas en medio de cultivo Triptona Extracto de Levadura y Sales (TYES). La confirmación del diagnóstico se realiza mediante diversos métodos de PCR sensibles y específicos usando células de la bacteria obtenidas a partir de los brotes o directamente del tejido infectado. Otros métodos empleados se sustentan en la reacción antígeno-anticuerpo como IFAT o Inmunohistoquímica.



Avendaño-Herrera R., Enfermedades infecciosas del cultivo de salmónidos en Chile y el mundo, ISBN: 978-956-8861-01-8, Editorial: Niva, Chile, 2011, 508. (Gentileza Dr. R. Avendaño-Herrera).

Métodos moleculares para el diagnóstico de Flavobacteriosis

PCR específico para la detección de *Flavobacterium psychrophilum*:

El diagnóstico de PCR para *F. psychrophilum* se realizará empleando el kit comercial GoTaq® Green Master Mix 2X, el cual incluye todos los componentes necesarios para la reacción de PCR, siendo necesario contar con partidores específicos, agua DEPC y un termociclador.

Para la amplificación por PCR, se utiliza los partidores específicos Fp1 (5'-GTT AGT TGG CAT CAA CAC-3') y Fp2 (5'-TCG ATC CTA CTT GCG TAG-3') diseñados por Urdaci y col. (1998; Research in Microbiology 149: 519-530), que amplifican un fragmento de aproximadamente 1088 pb del gen 16S ARNr.

La reacción de PCR se realiza en 25 µl, que contiene 12,5µl de GoTaq® Green Master Mix 2X, 1 µl cada partidor (Fp1 y Fp2) a una concentración de 10 µM cada uno, 1 a 5 µl de ADN bacteriano con una concentración superior a 250 ng y se afora con agua DEPC.

El protocolo de amplificación consiste de un paso de denaturalización inicial de 95°C por 5 min y 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°C por 1 min, 72°C por 1 min y un paso de extensión final de 72°C por 10 min.

Los productos de amplificación obtenidos con la PCR serán analizados utilizando electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Tris 0,04 M, EDTA 0,1 mM, pH 8,0), con marcadores de peso molecular y teñidos con 1 µL de GelRed® por cada 10 ml de tampón. Las muestras de ADN serán cargadas en los carriles de cada gel y sometidos a 70 Volt por 60 min. Cuando se observe que las muestras han recorrido ¾ partes del gel, la electroforesis debe ser detenida y visualizada bajo luz UV, siendo el fragmento esperado de 1088 pares de base (pb).

Métodos antigénicos para el diagnóstico de Flavobacteriosis

ELISA contra proteínas solubles de *Flavobacterium psychrophilum*:

Se deben utilizar placas de 96 pocillos Immunoplate®, Flat bottom, Maxibinding de SPL Life Sciences. Se prepara 1 mL de proteínas solubles de bacterias en Coating Buffer (NaHCO₃/Na₂CO₃ 0,05M) a una concentración final de 20 µg/mL. Se debe agrega 100 µL de solución por pocillo (2 µg de proteínas por pocillo) A1 al A5 y B1 al B5. La placa se incuba a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se debe lavar 5 veces con 200 µL de ELISA Wash Solution (EWS) por pocillo (Tris 50 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,05%, pH 8,0); al finalizar el último lavado, se bloquean los sitios inespecíficos por 30 minutos con EWS (se utiliza como solución de bloqueo y lavado). Finalizado el bloqueo, se debe agrega a los pocillos A1 y B1, 100 µL de Anticuerpo Primario Conejo-α-Flavo. El anticuerpo se debe preparar en una dilución 1:1000 en EWS. Como control negativo, se agregan 100 µL de EWS en los pocillos A2 y B2. La incubación del anticuerpo primario se realiza por 2 horas a temperatura ambiente. Luego, la placa se debe lavar 5 veces con 200 µL de EWS. Se debe agregar en los pocillos A1, A2, B1 y B2; 100 µL de Anticuerpo Secundario Cabra-α-Conejo conjugado a HRP.

El anticuerpo se debe preparar en una dilución 1:10.000 en EWS. El anticuerpo secundario se incubará 1 hora a temperatura ambiente. Para evitar señales inespecíficas, se realiza un último lavado, 5 veces con 200 µL de EWS. Se agrega a los pocillos A1 al A4 y B1 al B4, 100 µL de TMB One Solution (Promega®, #G7431). La placa se debe incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción se detiene agregando 100 µL de HCl 1M a cada pocillo. Inmediatamente, las placas se introducen a un lector de placas y se lee 450 nm. Una lectura de absorbancia sobre 0,5 en los pocillos A1 y B1 se considera positiva. Los pocillos A2, B2 son el control negativo de la técnica y A3 y B3 es el blanco. Los pocillos A4, B4, A5 y B5 permiten repetir el ensayo una vez más.

Western-Blot contra rOmpA específica de *Flavobacterium psychrophilum*:

Para realizar el diagnóstico confirmativo de *Flavobacterium psychrophilum* se deben cargar 20 µg de proteínas solubles por carril, en un SDS-PAGE al 10%; el gel se debe correr a 150V por 1:30 hrs. Finalizada la electroforesis, las proteínas se deben transferir a una membrana de PDVF a 100V por 1:00 hr. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se deben bloquear los sitios inespecíficos por 1 hora con Leche descremada al 0,5% en TBS-Tween 0,05%. Terminado el bloqueo, la membrana se incubará durante la noche con Anticuerpo primario α-rOmpA (Rata-α-rOmpA), en una dilución de 1:1000 en 5 mL de Leche descremada al 1% en TBS-Tween 0,05%. Para evitar marcas inespecíficas, la membrana se debe lavar 3 veces con TBS-Tween 0,05% y posteriormente se debe incubar por 1 hr con Anticuerpo secundario Cabra-α-Rata+HRP (ImmPRESS Reagent Kit, Vector, 10 µL en 4990 µL de Leche 1% en TBS-T 0,05%). Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se debe lavar la membrana 4 veces con TBS-Tween 0,05%.

Para visualizar la reacción específica, se debe revelar con 10 mL totales Pierce ECL®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se fotografían en un equipo GBOX de Syngene® utilizando el software propietario; la imagen se debe obtener con el modo de Quimioluminiscencia, 3 fotos con intervalos de 30 segundos de exposición cada una.

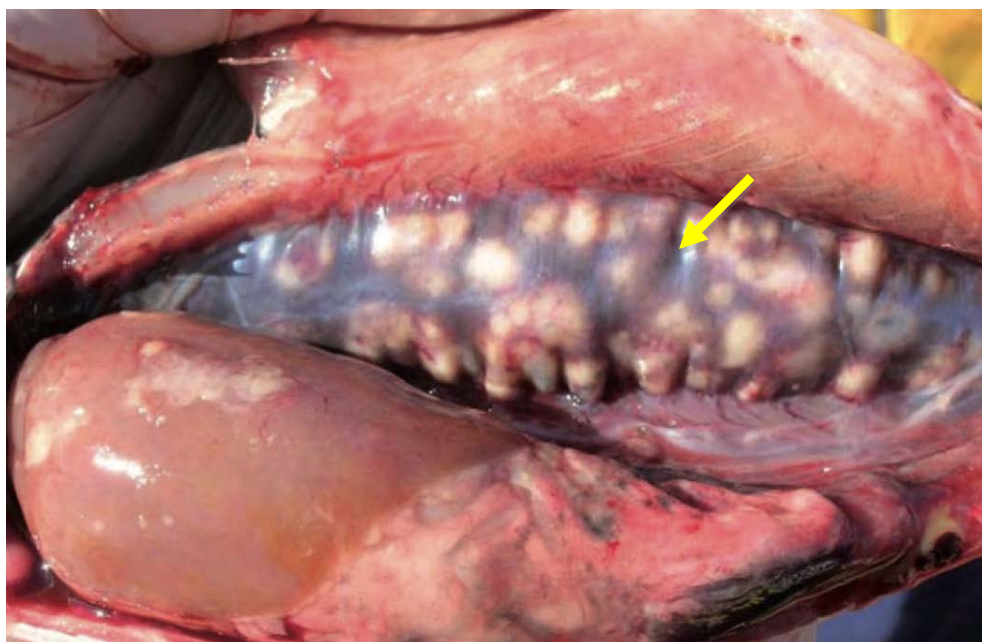
ENFERMEDAD BACTERIANA DEL RIÑÓN

Enfermedad bacteriana provocada por *Renibacterium salmoninarum*, un diplobacilo Gram- positivo, pequeño e inmóvil de entre 0,3 a 0,1 μm de ancho y 1,0 a 1,5 μm de largo. La enfermedad se encuentra presente en salmones silvestres y salmones de cultivo, afectando a peces tanto en fase de agua dulce como agua de mar, la cual ha sido descrita en Norteamérica, Europa, Japón, Islandia y Chile.

La signología externa que se presenta con mayor frecuencia son peces letárgicos nadando en superficie, branquias pálidas, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, distensión abdominal, hemorragias sub-operculares y hemorragias en base de las aletas

Internamente, se evidencia la presencia de nódulos multifocales en órganos internos tales como riñón, bazo e hígado. En casos más severos se evidencian nódulos difusos en grasa peri pilórica, también se observa la presencia de congestión y hemorragias en grasa visceral, ascitis en cavidad abdominal.

El diagnóstico se puede realizar mediante la signología clínica característica de esta enfermedad, especialmente la presencia de nódulos a nivel renal, hepático y esplénico, todo esto complementado con técnicas diagnósticas como tinción Gram, inmunofluorescencia, ELISA y PCR. Además, se recomienda confirmar mediante el aislamiento de la bacteria a partir de la siembra de muestras del riñón sobre el medio de cultivo KMD-2, siendo incubadas las placas a 18°C por hasta 12 semanas



Avendaño-Herrera R., Enfermedades infecciosas del cultivo de salmónidos en Chile y el mundo, ISBN: 978-956-8861-01-8, Editorial: Niva, Chile, 2011, 508. (Gentileza Dr. Marcelo Vera)

Métodos moleculares para el diagnóstico de la Enfermedad Bacteriana del Riñón

PCR anidada específica para la detección de *Renibacterium salmoninarum*:

En el protocolo de PCR anidada se usan dos pares de partidores oligonucleotídicos. Los partidores utilizados en la primera ronda corresponde P3 (5'-AGC TTC GCA AGG TGA AGGG-3'; P3) y M21 (5'-GCA-ACA-GGT-TTA-TTT-GCC- GGG-3'), mientras que lo partidores utilizados en la segunda ronda de amplificación corresponden a P4 (5'- ATT CTT CCA CTT CAA CAG TAC AAG G-3') y M38 (5'-CAT TAT CGT TAC ACC CGA AAC C-3').

La reacción de la primera ronda se realiza en 25 µl, que contiene 12,5µl de GoTaq® Green Master Mix 2X, 1 µl cada partidor (P3 y M21) a una concentración de 0,2 mM cada uno, 1 a 5 µl de ADN bacteriano con una concentración superior a 250 ng y se afora con agua DEPC.

El termociclador se programa a 30 ciclos como sigue: desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 60°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min.

La preparación de la mezcla de reacción para la segunda ronda de PCR se realiza en 25 µl, ésta incluye 1 µl del ADN amplificado en la primera ronda como ADN molde. Se usa la misma mezcla de reacción que en la primera ronda excepto que se emplean los cebadores P4 y M38.

El termociclador se programa a 30 ciclos como sigue: desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 60°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min.

Los productos de amplificación obtenidos con la PCR serán analizados utilizando electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (Tris 0,04 M, EDTA 0,1 mM, pH 8,0), con marcadores de peso molecular y teñidos con 1 µL de GelRed™ por cada 10 ml de tampón. Las muestras de ADN serán cargadas en los carriles de cada gel y sometidos a 70 Volt por 60 min. Cuando se observe que las muestras han recorrido ¾ partes del gel, la electroforesis debe ser detenida y visualizada bajo luz UV, siendo el fragmento esperado de 320 pb.

VIBRIOSIS ATÍPICA

La vibriosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Vibrio*, tiene una distribución mundial y con mayor prevalencia en peces, aunque también afecta a otros grupos de organismos como crustáceos y moluscos. En Chile, a partir del 2003 se ha descrito la presencia de *Vibrio ordalii* en el cultivo de salmón del Atlántico, trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Pacífico.

Los signos clínicos característicos de *V. ordalii* son grandes lesiones ulcerativas que comprometen piel y músculo, al mismo tiempo que en la periferia de las lesiones están tumefactas. También, es posible evidenciar abscesos con contenido sanguinolento viscoso, edema de piel en el pedúnculo, eritemas en zona ventral, hemorragias peri oculares, hemorragia en aletas y en la cara interna del opérculo y ano.

Internamente se observa congestión y hemorragias petequiales en hígado, grasa visceral y vejiga natatoria. El hígado y bazo se presentan pálidos con aumento de tamaño, mientras que el riñón se observa inflamado. Además, es posible observar ascitis sero- sanguinolenta y en algunos casos nódulos blanquecinos en hígado, riñón y bazo.

El diagnóstico se realiza principalmente por técnicas de inmunohistoquímica. Sin embargo, se requiere confirmar el diagnóstico mediante el aislamiento del agente causal de las mortalidades usando medios microbiológicos generales como el agar de Tripticasa de Soya suplementado con cloruro de sodio (1 a 2%), siendo incubadas las placas a 18°C por 48 a 72 h.



Avendaño-Herrera R., Enfermedades infecciosas del cultivo de salmónidos en Chile y el mundo, ISBN: 978-956-8861-01-8, Editorial: Niva, Chile, 2011, 508. (Gentileza Dr. Marcelo Vera)

Métodos moleculares para el diagnóstico de la Vibriosis atípica

PCR específico para la detección de *Vibrio ordalii*:

El diagnóstico de PCR para *V. ordalii* se realizará empleando el kit comercial GoTaq® Green Master Mix 2X, el cual incluye todos los componentes necesarios para la reacción de PCR, siendo necesario contar con partidores específicos, agua DEPC y un termociclador.

Para la amplificación por PCR, se utiliza los partidores específicos VohB_Fw (5'-CCT TGC CAC TAT TCG AGT CAT-3') y VohB_Rv (5'-CGT ACA GAA TAT GGG CAT CG-3') diseñados por Avendaño-Herrera y col. (2014; Diseases of Aquatic Organisms 107: 223-234), que amplifican un fragmento de 112 pb del gen vohB.

La reacción de PCR se realiza en 25 µl, que contiene 12,5µl de GoTaq® Green Master Mix 2X, 1 µl cada partidador (VohB_Fw y VohB_Rv) a una concentración de 10 µM cada uno, 1 a 5 µl de ADN bacteriano con una concentración superior a 250 ng y se afora con agua DEPC.

El protocolo de amplificación consiste de un paso de denaturalización inicial de 95°C por 10 min y 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 15 seg, 72°C por 15 seg y un paso de extensión final de 72°C por 5 min.

Los productos de amplificación obtenidos con la PCR serán analizados utilizando electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (Tris 0,04 M, EDTA 0,1 mM, pH 8,0), con marcadores de peso molecular y teñidos con 1 µl de GelRed™ por cada 10 mL de tampón. Las muestras de ADN serán cargadas en los carriles de cada gel y sometidos a 70 Volt por 90 min. Cuando se observe que las muestras han recorrido ¾ partes del gel, la electroforesis debe ser detenida y visualizada bajo luz UV, siendo el fragmento esperado de 112 pares de base.

Métodos antigénicos para el diagnóstico de la Vibriosis atípica

ELISA contra proteínas solubles *Vibrio ordalii*:

Se deben utilizar placas de 96 pocillos Immunoplate®, Flat bottom, Maxibinding de SPL Life Sciences. Se prepara 1 mL de proteínas solubles de bacterias en Coating Buffer (NaHCO₃/Na₂CO₃ 0,05M) a una concentración final de 20 µg/mL. Se debe agregar 100 µL de solución por pocillo (2 µg de proteínas por pocillo) A1 al A5 y B1 al B5. La placa se incuba a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se debe lavar 5 veces con 200 µL de ELISA Wash Solution (EWS) por pocillo (Tris 50 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,05%, pH 8,0); al finalizar el último lavado, se bloquean los sitios inespecíficos por 30 minutos con EWS (se utiliza como solución de bloqueo y lavado). Finalizado el bloqueo, se debe agregar a los pocillos A1 y B1, 100 µL de Anticuerpo Primario Conejo-α-Vibrio. El anticuerpo se debe preparar en una dilución 1:200.000 en EWS. Como control negativo, se agregan 100 µL de EWS en los pocillos A2 y B2. La incubación del anticuerpo primario se realiza por 2 horas a temperatura ambiente. Luego, la placa se debe lavar 5 veces con 200 µL de EWS. Se debe agregar en los pocillos A1, A2, B1 y B2; 100 µL de Anticuerpo Secundario Cabra-α-Conejo conjugado a HRP. El anticuerpo se debe preparar en una dilución 1:10.000 en EWS. El anticuerpo secundario se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Para evitar señales inespecíficas, se realiza un último lavado, 5 veces con 200 µL de EWS. Se agrega a los pocillos A1 al A4 y B1 al B4, 100 µL de TMB One Solution

(Promega®, #G7431). La placa se debe incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción se detiene agregando 100 µL de HCl 1M a cada pocillo. Inmediatamente, las placas se introducen a un lector de placas y se lee 450 nm. Una lectura de absorbancia sobre 0,5 en los pocillos A1 y B1 se considera positiva. Los pocillos A2, B2 son el control negativo de la técnica y A3 y B3 es el blanco. Los pocillos A4, B4, A5 y B5 permiten repetir el ensayo una vez más.

ESTREPTOCOCOSIS

Es una enfermedad causada por *Streptococcus phocae*, una bacteria cocoide, Gram-positiva, no móvil, beta-hemolítico y que puede formar cadenas, la cual inicialmente se aisló en el noroeste de Europa, a partir de órganos internos de mamíferos marinos; mientras que en peces sólo ha sido aislada en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cultivado en Chile. En nuestro país, la estreptococosis se observó por primera vez en salmónidos durante el verano del año 1999, en un centro de cultivo ubicado en el Estuario de Reloncaví y en la actualidad se han reportado casos en distintas regiones de Chile. Inicialmente, la enfermedad se presentó a temperaturas superiores a los 15°C (meses de verano), siendo considerada como una estreptococosis de aguas cálidas, pero recientemente se han reportado casos en Magallanes a menos de 10°C.

Los principales signos macroscópicos son lesiones en la superficie de los peces, como hemorragias en piel y sobre la base de las aletas, pronunciada exoftalmia con hemorragia y un aumento en el volumen abdominal producido por la acumulación de un fluido serosanguinolento. En los casos más severos se observa la presencia de tumores y abscesos, incluso los peces que superviven a brotes de estreptococosis el músculo queda con marcas del proceso infectivo. Las lesiones internas incluyen petequias en la pared interna ventral y en el tejido adiposo peri-visceral, un tamaño anormal del hígado (hepatomegalia), palidez del tejido hepático y presencia de pseudomembranas, inflamación del bazo (esplenomegalia) y acumulación de fluido blanquecino en el pericardio.

El diagnóstico definitivo es por aislamiento de la bacteria en Tripticasa de Soya suplementada con 5% de sangre, donde crecen colonias puntiformes y convexas después de 48 h a 22°C. La confirmación del agente puede realizarse a partir del aislado usando pruebas bioquímicas y PCR o sin aislamiento usando el tejido infectado y PCR.



Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 33, 2, ISSN: 0108-0288, Editorial: EAAP Bulletin, 2013, 58-63.

Métodos moleculares para el diagnóstico de la Estreptococosis

PCR específico para la detección de *Streptococcus phocae*:

El diagnóstico de PCR para *S. phocae* se realizará empleando el kit comercial GoTaq® Green Master Mix 2X, el cual incluye todos los componentes necesarios para la reacción de PCR, siendo necesario contar con partidores específicos, agua DEPC y un termociclador.

Para la amplificación por PCR, se utiliza los partidores específicos PX1 (5'- GCT AAT ACC GCA TAA GAA GAG-3') y PXVQ2 (5'-CAC CCT GTC ACT TCT GCT C-3') descritos por Avendaño-Herrera (2008; Diseases of Aquatic Organisms 82: 217–222), que amplifican un fragmento de 900 pb del gen 16S ARNr.

La reacción de PCR se realiza en 25 µl, que contiene 12,5µl de GoTaq® Green Master Mix 2X, 1 µl cada partidor (Fp1 y Fp2) a una concentración de 10 µM cada uno, 1 a 5 µl de ADN bacteriano con una concentración superior a 250 ng y se afora con agua DEPC.

El protocolo de amplificación consiste de un paso de denaturalización inicial de 94°C por 5 min y 35 ciclos de 94°C por 90 seg, 60°C por 90 seg, 72°C por 90 seg y un paso de extensión final de 72°C por 5 min.

Los productos de amplificación obtenidos con la PCR serán analizados utilizando electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Tris 0,04 M, EDTA 0,1 mM, pH 8,0), con marcadores de peso molecular y teñidos con 1 µL de GelRed™ por cada 10 ml de tampón. Las muestras de ADN serán cargadas en los carriles de cada gel y sometidos a 70 Volt por 60 min. Cuando se observe que las muestras han recorrido ¾ partes del gel, la electroforesis debe ser detenida y visualizada bajo luz UV, siendo el fragmento esperado de 900 pb.

Anexo 2. Ficha identificación del ejecutor

Nombre completo o razón social	Universidad Nacional Andrés Bello	
Giro / Actividad	Educación Superior	
RUT		
Tipo de organización	Empresas	
	Personas naturales	
	Universidades	X
	Otras (especificar)	
Banco y número de cuenta para depósito de aportes FIA		
Ventas en el mercado nacional, último año tributario (UF)		
Exportaciones, último año tributario (US\$)		
Número total de trabajadores		
Usuario INDAP (sí / no)		
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)		
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Dirección Web	www.unab.cl	
Nombre completo representante legal	Carlos eduardo Mujica Rojas	
RUT del representante legal		
Cargo o actividad que desarrolla el representante legal en la organización postulante	Vicerrector Académico	
Firma representante legal		

Anexo 3. Ficha identificación del asociado del proyecto.

Nombre completo o razón social	Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA)	
Giro / Actividad	Administración Pública	
RUT		
Tipo de organización	Empresas	
	Personas naturales	
	Universidades	
	Otras (especificar)	Servicio Público
Ventas en el mercado nacional, último año tributario (UF)		
Exportaciones, último año tributario (US\$)		
Número total de trabajadores		
Usuario INDAP (sí / no)		
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)		
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Dirección Web	www.sernapesca.cl	
Nombre completo representante legal	Juan Luis Ansoleaga Bengoechea	
RUT del representante legal		
Cargo o actividad que desarrolla el representante legal en la organización postulante	Director Nacional	
Firma representante legal		

Anexo 4. Ficha identificación coordinador principal.

Nombre completo	Ruben Esteban Avendaño Herrera
RUT	
Profesión	Ingeniero en Acuicultura
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad Nacional Andrés Bello
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Anexo 4. Ficha identificación coordinador alterno.

Nombre completo	Rodolfo José Paredes Esparza
RUT	
Profesión	Médico Veterinario
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad Nacional Andrés Bello
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Anexo 4. Ficha identificación equipo técnico 1.

Nombre completo	Rute Irgang
RUT	
Profesión	Ingeniero Agrónomo
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Anexo 4. Ficha identificación equipo técnico 2.

Nombre completo	Christian Andrés Hidalgo Franco
RUT	
Profesión	Médico Veterinario
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad Nacional Andrés Bello
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Anexo 4. Ficha identificación equipo técnico 3.

Nombre completo	Alicia Lorena Gallardo Lagno
RUT	
Profesión	Médico Veterinario
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Anexo 4. Ficha identificación equipo técnico 4.

Nombre completo	Pamela Andrea Ruiz Merino
RUT	
Profesión	Ingeniero en Biotecnología Marina y Acuicultura
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad Andrés Bello
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Anexo 4. Ficha identificación equipo técnico 5.

Nombre completo	Víctor Eduardo Sierra Lucero
RUT	
Profesión	Ingeniero Forestal
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad Nacional Andrés Bello
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Anexo 4. Ficha identificación equipo técnico 6.

Nombre completo	Caroll Didi Stooré Pérez
RUT	
Profesión	Médico Veterinario
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad Andrés Bello
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Nombre completo	Matías Raúl Poblete Morales
RUT	
Profesión	Biólogo
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad Andres Bello
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y DE RECURSOS BIOLÓGICOS

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



“Diversidad genética y antigénica de aislados chilenos del patógeno de salmónidos *Flavobacterium psychrophilum*”.

Informe de Memoria para optar el Título de Biotecnólogo

Felipe Ignacio Morán Berríos
Licenciado en Biotecnología

Dr. Ruben Avendaño-Herrera
Profesor Tutor

Dr. Rubén Araya Valencia
Profesor Patrocinante

Antofagasta
2015

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento otorgado por el proyecto FONDAP 15110027 de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) de Chile, así como del Proyecto Núcleo DI-447-13/N de la Universidad Andrés Bello y el Proyecto PYT-2013-0014 de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).



INVITACIÓN

El director del Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola de la Universidad Andrés Bello, Rubén Avendaño, tiene el agrado de invitar a Ud., al primer taller de información del proyecto "Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola: un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de salmónidos", iniciativa que es apoyada por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y patrocinada por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA).

La actividad se realizará el día lunes 5 de mayo, a las 11 horas, en las Oficinas de SERNAPESCA ubicadas en Valparaíso.

Se solicita confirmar su asistencia



Servicio Nacional de
Pesca y Acuicultura
(SERNAPESCA)

Fundación para la Innovación
para Innovación Agraria (FIA)



TALLER DE INFORMACIÓN PROYECTO
“Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola:
un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención
de enfermedades de salmónidos”, código PYT-0014-2013

Iniciativa financiada por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA)

SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA
Valparaíso, Chile

05 DE MAYO, 11:00-13:30

AGENDA

11:00-11:05 Bienvenida a Taller. MV. Marcela Lara, Jefa Unidad Salud Animal,.

11:05-11:35 Presentación Proyecto FIA PYT-0014-2013. Dr. Rodolfo Paredes E.
Coordinador Alterno, Universidad Andrés Bello.

11:35-12:05 Avances en el desarrollo de técnicas diagnósticas para *Vibrio ordalii*. Dr.
Ruben Avendaño-Herrera, Coordinador, Universidad Andrés Bello.

12:05-12:35 Avances en el estudio genético y epidemiológico de *Flavobacterium*
psychrophilum. Ruben Avendaño-Herrera, Coordinador, Universidad Andrés Bello.

12:35 Discusión abierta: Análisis de resultados y propuestas.

13:30 Cierre de Taller.

Nota 1: El Café será servido durante la reunión.

REUNIÓN DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO

Valparaíso, 5 de mayo de 2014

[illegible]



INVITACIÓN

El director ejecutivo de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Héctor Echeverría y el director del Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola de la Universidad Andrés Bello, Rubén Avendaño, invitan a usted al primer taller Teórico-Práctico "Técnicas para la evaluación de susceptibilidad con estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute®", en el marco del proyecto FIA "Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola: un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de salmónidos".

La actividad se realizará el miércoles 11 de marzo, a las 9 horas, en las dependencias de la Universidad Andrés Bello ubicada en Viña del Mar, Región de Valparaíso.

Confirmar asistencia



TALLER TEÓRICO-PRÁCTICO
**“Técnicas para la evaluación de susceptibilidad con estándares del Clinical
and Laboratory Standards Institute®”**

Universidad Andrés Bello

Viña del Mar

11 de marzo, 2015

I. AGENDA

✓ 9:00 - 9:05	Bienvenida a Taller ✓ Rubén Avendaño-Herrera. Director de Proyecto.
✓ 9:05 - 10:00	Charla: “Actualización de técnicas para la evaluación de susceptibilidad en condiciones in Vitro con estándares CLSI” ✓ Matías Poblete-Morales, Licenciado en Biología.
✓ 10:00 - 10:25	Café
✓ 10:25 - 11:00	Presentación de resultados de susceptibilidad a antimicrobiano en patógenos bacterianos ✓ Rubén Avendaño-Herrera.
✓ 11:15 - 13:15	Actividades prácticas y experimentales de susceptibilidad (antibiograma y MIC) con estándares CLSI
✓ 13:30	Cierre de Taller

II. LISTA DE ASISTENTES

- Representantes Laboratorio ADL
- Representantes laboratorio Aquagestión
- Representantes laboratorio Antares
- Representantes laboratorio Diagnostec
- Representantes laboratorio Etecma
- Representante Laboratorio IFOP
- Representante de Los Fiordos
- Representantes de SERNAPESCA



TALLER TEÓRICO-PRÁCTICO

"Técnicas para la evaluación de susceptibilidad con estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute®"

ASISTENTES

NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO (e-mail – teléfono)
Marco Mancilla	ADL Diagnostic Chile Ltda.	
Pedro Ilardi L.	Veterquímica S.A.	
Roxana Ramírez M.	ETECMA	
Mauricio Labraña	Los Fiordos Ltda.	
Miguel Jara	SERNAPESCA	
Carla Aguilar	SERNAPESCA	
Patricia Led	SERNAPESCA	
Katya Poblete	UNAB	
Joan Bethke R.	UNAB	



INVITACIÓN

El director ejecutivo de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Héctor Echeverría y el director del Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola de la Universidad Andrés Bello, Ruben Avendaño, invitan a usted al segundo taller Teórico "Análisis antigénico y genético de aislados chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*: implicancias en el desarrollo de medidas de prevención", en el marco del proyecto FIA "Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola: un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de salmónidos".

La actividad se realizará el martes 13 de octubre, a las 9 horas, en las dependencias de la Universidad Andrés Bello ubicada en Viña del Mar, Región de Valparaíso.

Confirmar asistencia



TALLER TEÓRICO

“Análisis antigénico y genético de aislados chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*: implicancias en el desarrollo de medidas de prevención”

Universidad Andrés Bello

Viña del Mar

13 de octubre, 2015

I. AGENDA

✓ 9:00 - 9:15	Bienvenida a Taller ✓ Rubén Avendaño-Herrera. Director de Proyecto.
✓ 9:20 - 10:00	Charla: Presentación Proyecto FIA PYT-0014-2013. Dr. Rodolfo Paredes E. Coordinador Alterno, Universidad Andrés Bello.
✓ 10:00 - 10:25	Café
✓ 10:25 - 11:00	Presentación de resultados antigénicos de aislados de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> . ✓ Rubén Avendaño-Herrera.
✓ 11:15 - 12:00	Presentación de resultados genéticos de aislados de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> . ✓ Rubén Avendaño-Herrera.
✓ 12:15 - 12:45	Discusión
✓ 12:50	Cierre de Taller



1

TALLER TEÓRICO

"Análisis antigénico y genético de aislados chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*: implicancias en el desarrollo de medidas de prevención"

Universidad Andrés Bello
Quillota 980, Auditorio Amarillo, Viña del Mar
13 de octubre, 2015

ASISTENTES

NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO (e-mail – teléfono)
Karen Montecinos	Senapesca	
Caroll Shapiro	UNAB	
Pedro Pablo Lardizábal	FAV SA	
Sabrina Saiz B.	UNAB	
José Balthazar	UNAB	
Hector Levison	UNAB	
Jennifer Carocca	PUCV	
Jaime Rojas D	PUCV	



2

NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO (e-mail – teléfono)
Mariana Leal	Senapesca	
Diana Jara C.	Senapesca	
Patricio Rodríguez M	UNAB	
FELIX ROSA BERNARDI	UNAB	
Rute Irgang	UNAB	
Mónica Casas Graña	VETERQUÍMICA	
Katherine Fuentes G	Veterquímica	
Harold Blazquez	''	
Samuel Valdebenito	''	
KATHERINE SILVA	KUNDO ACUICOLA	
Amorinda Arancibia L.	PUCV	



TALLER TEÓRICO

“Análisis antigénico y genético de aislados chilenos de *Flavobacterium psychrophilum*: implicancias en el desarrollo de medidas de prevención”

SERNAPESCA Región de Aysén
28 de Octubre de 2015

ASISTENTES

NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO (e-mail – teléfono)
Jorge Tabares	Sernapesca	
PABLO AGUIRRE IRIARTE	SERNAPESCA	
Camila San Martín	Sernapesca	
Lydia Barrios G.	Sernapesca.	
Jorge Morales	SERNAPESCA	
Christian Meyer	SERNAPESCA	
Cristian Oyarzo	SERNAPESCA	
Orion Montoya P.	Sernapesca.	

[illegible]



Confirmar asistencia



Seminario de Difusión y Cierre del proyecto cofinanciado por FIA

“Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola: un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de salmónidos”

Puerto Varas, Hotel Cumbres, jueves 10 de diciembre, 2015

AGENDA

9:30 - 10:30	Registro participantes
10:30 - 10:40	Palabras de bienvenida Dr. Víctor Sierra. Director de Innovación y Transferencia Tecnológica, Vicerrectoría de Investigación y Doctorado.
10:40 - 11:00	Presentación Proyecto FIA PYT-0014-2013. Dr. Rodolfo Paredes E. Coordinador Alterno, Universidad Andrés Bello.
11:00 - 11:45	Presentación Control de uso de antimicrobiano en la acuicultura. Sra. Alicia Gallardo Lagno, Subdirectora de Acuicultura, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.
11:45 - 12:15	Presentación de resultados antigénicos de aislados de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> . Dr. Rubén Avendaño-Herrera.
12:15 - 12:45	Presentación de manual de técnicas diagnósticas moleculares y antigénicas de bacterias que afectan a salmónidos de interés productivo. Dr. Rodolfo Paredes.
12:45 - 13:45	Coctel de cierre
13:45	Cierre de Taller



1

Seminario de Difusión y Cierre del proyecto cofinanciado por FIA

“Base nacional de aislados bacterianos para la industria acuícola: un nuevo servicio para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de salmónidos”

Hotel Cumbres, Puerto Varas

Jueves 10 de diciembre, 2015

ASISTENTES

	NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO (e-mail – teléfono)	FIRMA
1	Alejandra Morales	DIAGNOTEC		
2	Alejandro Poblete	Bayer		
3	Alejandro Yañez	UACH-INCAR		
4	Alexis Martínez	ALAB		
5	Andrea Peña	PHATOVET		
6	Cristian Alvial	Periodista Acuicultura y Pesca		



2

7	Cristian Sayeg	MarineHarvest Chile		
8	Cristian Uribe	SERMAQ Chile S.A		
9	Cristina Baranda Tobar	Veterquímica		
10	Cristina Winkler	SERMAQ Chile S.A		
11	Henrique Madrid	FAV		
12	Ignacio Flores	SERNAPESCA		
13	Jaime Figueroa	UACH-INCAR		
14	Juan Pablo López	ELANCO		
15	Julián Briones	ELANCO		
16	Karla Meza	AVS Chile		
17	Marcela Lara	SERNAPESCA		
18	Mary Ann Hausdorf	AVS Chile		
19	Maureen Alcayaga	SUBPESCA		

	Godoy		
20	Paola Olmos I	IFOP	
21	Patricio Feest	SalmonExpert	
22	Paulina Moreno	Veterquímica	
23	Pedro Barra	Mundo Acuicola	
24	Rodrigo Cuevas Gajardo	Salmones Austral	
25	Roxana Ramírez	ETECMA	
26	Sandra Arcos Peña	Centrovét	
27	Sandra Bravo	UACH	
28	Sandra Oyanedel	Fundación Chile	
29	Sergio Contreras	IFOP	
30	Sergio Vásquez	MSD Salud Animal	
31	Verónica Díaz	Fundación Chile	
32	Vicente Castro	AVS Chile	

	NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO (e-mail – teléfono)	FIRMA
38	Angélica Lisperguer	PHATOVET		
39	Carolina Senn	PHATOVET		
36	Daniel Suarez	Salmones Austral		
41	Eva Jacob	ELANCO		
35	Francisco Gallardo	DIAGNOTEC		
42	Hernán Velázquez	ELANCO		
34	José Manríquez Sanhueza	DIAGNOTEC		
33	Loreto Ruz Loaiza	DIAGNOTEC		
40	Marcela Escobar	PHATOVET		
37	Viviana Soto	Tracelab S.A		

NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO (e-mail – teléfono)	FIRMA
Raúl Torres	Fish Vet Group Sp		
Elena Contreras	Fish Vet Group SA		
Roberto León	S. Aquatril		
Somnath Vaidyanathan	Veterinarios		
Manuel Salas W	ADL Diagnostic		
Carlos Sandoval	Veterinarios		
Miguel Lora	ELANCO		
Carlos Macías	ADL Diagnostic		
Ximena Garziz	ADL		
HERNÁN VILLASO	ELANCO		
Denise Hassmann	UACH		
Paulo Alarcón	Novus feed		
Roberto León	SERAPESCA		

NOMBRE	INSTITUCIÓN	CONTACTO (e-mail – teléfono)	
Raúl Húnez	Aquainnovo		
Marcela Oyarzún	Aquainnovo		
Carlos Rivas	Aquainnovo		
Alexandro Huisan	Multixport		
Franco Ariza B	Agrogestión		
DIEGO BRAVO A	Agrogestión		
Therese Grandin	ADL Diagnostic		
José Miguel	ADL Diagnostic		
Maykel Hdez	ADL Diagnostic		
CAROLINA	S. Bumar		
José Quintero	AUSTALIS		
OSCAR SANCHEZ	SERAPESCA		



Universidad
Andrés Bello

7

[illegible]