

PROYECTO FIE V014

“PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA”

SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA

INFORME FINAL

**“BASES TÉCNICAS PARA LA CONSOLIDACIÓN DE UN CEPARIO
NACIONAL DE *PISCIRICKETTSIA SALMONIS* DEBIDAMENTE
CARACTERIZADO”**

LABORATORIO DE REFERENCIA OIE PARA EL VIRUS ISA

LABORATORIO DE REFERENCIA NACIONAL PARA *P. SALMONIS*

LABORATORIO DE GENÉTICA E INMUNOLOGÍA MOLECULAR

LABORATORIO DE PATÓGENOS ACUÍCOLAS

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

Valparaíso, diciembre de 2018

1. Índice

1. Índice	2
2. Resumen Ejecutivo	3
3. Executive Summary	4
4. Introducción	6
5. Objetivos	6
6. Materiales y Métodos.	7
7. Resultados y discusión	9
1. Informe actualizado que señale disponibilidad de cepas de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	9
Tabla 2. Cronograma de recuperación de cepas desde crioviales (PUCV).....	12
Tabla 3. Cronograma de recuperación de cepas desde crioviales (UACH).....	19
Solicitudes de cepas procesadas	22
2. Informe que dé cuenta de muestreos y aislamientos exitosos de nuevos aislados de campo (al menos 10 nuevos aislados).	24
3. Actualización de variantes/cepas con genomas cerrados.	25
Análisis de aislados y cepas de <i>P. salmonis</i> por Multilocus Sequence Typing (MLST)	27
Análisis filogenéticos, metagenómicos, genómicos y estado actual de la información respecto a los tipos de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	40
4. Taller de cierre y difusión de resultados.	63
8. Conclusiones.....	64
9. Anexos	65

2. Resumen Ejecutivo.

Este proyecto se enmarca dentro del Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura dirigido por el Servicio Nacional de Pesca y tuvo una duración de 14 meses, finalizando el 31 de diciembre de 2018. Su principal objetivo, el que fue logrado cabalmente, fue el de consolidar una plataforma confiable y sustentable para una operación eficiente del Cepario Oficial de *Piscirickettsia salmonis*, previamente establecido, con las principales variantes/cepas recuperadas de las tres especies salmónidas cultivadas en Chile (Salmón del Atlántico, Salmón Coho y Trucha Arcoíris). Con ello, se podrá favorecer una investigación fundamental y aplicada sobre su biología, epidemiología y comportamiento ambiental, de manera de promover nuevas estrategias que favorezcan un control eficiente de la enfermedad que ella genera y así robustecer la gestión sanitaria de la salmonicultura nacional. Para lograrlo, nos propusimos tres objetivos específicos, que complementaban lo ya logrado en los tres proyectos anteriores que dieron pie a la constitución del Cepario Nacional. Ellos fueron la caracterización, en primera instancia, de 34 nuevas variantes de *P. salmonis* mediante la secuenciación masiva y cierre de sus genomas, gracias a los correspondientes análisis filogenéticos y metagenómicos, que nos permitieron interpretar y validar la información acumulada de los genomas analizados hasta el momento de nuestra parte y de los existentes en las bases de datos públicas, que claramente indicaban la existencia de una gran variabilidad en las secuencias de los diferentes aislados procesados, un claro indicador de que la bacteria en nuestro ambiente acuático, está en plena evolución y con una tendencia a la especiación en más de una modalidad. Como complemento, y en segunda instancia, para comprobar si esta tendencia tenía sentido, requeriáramos abarcar un mayor número de aislados frescos, por los que nos propusimos conseguir a lo menos 10 nuevas variantes de la bacteria durante el año 2018, provenientes idealmente de diferentes áreas geográficas y que abarcaran las tres especies salmónidas de cultivo prioritario en Chile. En tercera instancia, con los dos objetivos anteriores debidamente cumplidos, nos permitiría mantener en operación continua un robusto Cepario Nacional de la bacteria, como una confiable fuente de variantes de la bacteria debidamente caracterizadas, no solo para realizar estudios de su comportamiento en laboratorio y en campo a nivel nacional, sino también proyectado a estudios potenciales del ámbito internacional, donde este agente patógeno también constituye una amenaza para la sustentabilidad del cultivo confinado de peces salmónidos.

Obtuvimos la secuenciación y cierre de las 34 variantes bacterianas comprometidas mediante la plataforma Pac-Bio y complementada mediante la plataforma Illumina, sinergia procesal que nos aseguraba en cierre eficiente de los genomas blanco. Establecimos convenios con diferentes laboratorios afiliados a la red establecida por Sernapesca para la obtención de las nuevas variantes de la bacteria durante el año 2018, complementado con un fuerte nexo con Intesal y sus asociados, que nos mantuvieron informados de la aparición de nuevos brotes de la enfermedad, lo que contribuyó a que cumpliésemos con el objetivo. Adicionalmente, y como Laboratorio de Referencia Nacional de Sernapesca para el agente, tuvimos acceso directo al Listado de Centros Alerta y CAD del PSEVC-*Piscirickettsiosis* información que, al actualizarse semanalmente, nos permitió tener una visión en tiempo real de la situación de la enfermedad en los diferentes centros de cultivo durante 2018 y con esto gestionar las autorizaciones para realizar los correspondientes muestreos. Finalmente, aunque no estaba establecido como un objetivo específico, pero si como parte del Convenio, realizamos el análisis de 152 variantes contenidas en el Cepario, por el método de MLST

(Multi Locus Sequence Typing) como una alternativa de caracterización de los aislados, basado en la selección de genes de importancia en la patogénesis/virulencia por su impacto en el desarrollo de la enfermedad.

Así, concluimos nuestro proyecto con un 100% de los objetivos cumplidos. Adicionalmente, comprende un plan operacional del Cepario Nacional en sus dos unidades espejo (PUCV y UACH) que incluye una planificación y ejecución de búsqueda de muestras variantes geo-referenciadas; mecanismos de laboratorio validados para la criopreservación y posterior recuperación de las variantes de la bacteria tipificadas en el Cepario, y un mecanismo administrativo definido para su eventual entrega de las variantes a los diferentes investigadores y/o estamentos interesados en su obtención con propósitos investigativos o para eventuales aplicaciones diferentes.

3. Executive Summary

This project is enclosed in the “Program for Sanitary Management in Aquaculture” directed by the National Fisheries Service (Sernapesca) and lasted for 14 months, ending on December 31, 2018. Its main objective, which was fully achieved, was that of consolidate a reliable and sustainable platform for an efficient operation of the official Strain Collection of *Piscirickettsia salmonis* (Cepario), previously established, with the main variants / strains recovered from the three salmonid species cultivated in Chile (Atlantic Salmon, Coho Salmon and Rainbow Trout). With this in hand, it would be possible to favor a fundamental and applied research on the biology, epidemiology and environmental behavior of the bacteria, in order to promote new strategies to achieve an efficient control of the disease that it generates, and thus strengthen the sanitary management of the national salmon industry. To do so, we proposed three specific objectives, which complemented what had already been achieved in the three previous projects that led to the creation of the National Strain Collection. They were the characterization, in the first instance, of 34 new variants of *P. salmonis* through massive sequencing and closure of their genomes, thanks to the corresponding phylogenetic and metagenomics analyzes, which allowed us to interpret and validate the accumulated information of the already analyzed genomes by us as well as by others. existing in the public databases, which clearly indicated the existence of a great variability in the sequences of the different processed isolates, a clear indicator that the bacteria in our aquatic environment is in full evolution and with a tendency to speciation in more than one modality. As a complement, and in the second instance, to verify if this trend made sense, we needed to cover a greater number of fresh isolates, for which we proposed to obtain at least 10 new variants of the bacteria during 2018, ideally from different areas. geographical areas and that would cover the three priority salmon farming species in Chile. In the third instance, with the two previous objectives duly met, it would allow us to maintain in continuous operation a robust National Strain Collection of the bacteria, as a reliable source of duly characterized variants, not only to carry out studies of its behavior in the laboratory and in field at the national level, but also projected to potential studies of the international scope, where this pathogenic agent also constitutes a threat to the sustainability of confined culture of salmonid fish elsewhere.

We obtained the sequencing and closing of the 34 bacterial variants compromised by the Pac-Bio platform and complemented by the Illumina platform, a procedural synergy that assured efficient closing of the target genomes. We established agreements with different laboratories affiliated to the network established by Sernapesca to obtain the new variants of the bacterium during 2018, complemented with a strong link with Intesal and its associates, who kept us informed of the appearance of new outbreaks of the disease, which contributed to our accomplishing the goal. Additionally, and as Sernapesca National Reference Laboratory for the agent, we had direct access to the List of Warning and CAD Centers of the PSEVC-Piscirickettsiosis "information that, updated weekly, allowed us to have a real-time view of the disease situation in the different cultivation centers during 2018 and with this manage the authorizations to carry out the corresponding samplings. Finally, although it was not established as a specific objective, but as part of the Agreement, we performed the analysis of 152 variants contained in the Cepario, by the MLST method (Multilocus Sequence Typing), as an alternative characterization of isolates, based in the selection of genes of importance in the pathogenesis / virulence for its impact on the development of the disease. Thus, we conclude our project with 100% of the objectives met. Additionally, it includes an operational plan of the National Cepario in its two mirror units (PUCV and UACH) that includes a planning and execution of search for geo-referenced variant samples; validated laboratory mechanisms for the cryopreservation and subsequent recovery of variants of the bacteria typified in the National Strain Collection, and an administrative mechanism defined for their eventual delivery of the variants to the different researchers and / or estates interested in obtaining them for investigative purposes or for possible different applications.

4. Introducción

El presente informe refleja el trabajo realizado para cumplir con los objetivos del contrato de prestación de asesoría estratégica “**Bases técnicas para la consolidación de un cepario nacional de *Piscirickettsia salmonis* debidamente caracterizado**” en el marco del uno de los proyectos del Fondo de Inversión Estratégica (FIE) del Ministerio de Economía nacional, orientado a superar brechas que amenazan el desarrollo sustentable de la industria acuícola chilena, preferencialmente representada por la salmicultura. De hecho, el espíritu detrás de este programa, amalgama, por primera vez, un esfuerzo público-privado que tiene como objetivo mediano mejorar la gestión sanitaria del rubro, generando conocimiento estratégico mediante la construcción de una plataforma gestora sanitaria que permita, en forma natural y con un enfoque multidisciplinario, proveer sustentabilidad al sector, y con ello, aumentar la competitividad internacional de la acuicultura chilena. Uno de los atractivos innovadores de éste y de los otros proyectos vigentes del FIE, es que promueve la consolidación de consorcios de investigación entre investigadores calificados del país, propiciando trabajos asociativos que aseguren productividad, sinergia e innovación. En nuestro caso, uniendo esfuerzos entre las Universidades Pontificia Católica de Valparaíso, Austral de Chile y Andrés Bello.

Reportamos acá los resultados parciales de la eventual definición de una plataforma operativa que permita la consolidación de un cepario oficial de *P. salmonis*, confiable y sustentable, que contenga las principales variantes/cepas recuperadas de las tres especies salmonídeas cultivadas en Chile como base para la aplicación de una gestión sanitaria eficaz. La recuperación de estas variantes/cepas, nos está permitiendo realizar investigación fundamental sobre sus eventuales diferencias, para definir parámetros moleculares distintivos asociados al comportamiento biológico de la bacteria y relacionados con el desarrollo de la enfermedad para diseñar estrategias que permitan su control en campo.

5. Objetivos

1. General.

Consolidar una plataforma confiable y sustentable para una operación eficiente del Cepario Oficial de *Piscirickettsia salmonis*, con las principales variantes/cepas recuperadas de las tres especies salmonídeas, Salmón del Atlántico, Salmón Coho y Trucha Arcoíris, cultivadas en Chile para favorecer su investigación y de esta manera promover el control de la enfermedad y robustecer la gestión sanitaria nacional de las actividades de acuicultura.

2. Específicos.

- Caracterización de 34 nuevas variantes de *P. salmonis* mediante secuenciación masiva y análisis filogenético y metagenómico.
- Aislamiento de nuevas variantes de *P. salmonis* por área geográfica y especie, año 2018.
- Mantener en operación el Cepario Nacional de *P. salmonis* en sus dos unidades espejo.

6. Materiales y Métodos.

A continuación, se presenta un cuadro que describe la metodología (haciendo referencia al TTR) asociada a su actividad y está a su respectivo objetivo específico.

Objetivo Especifico	Actividad	Metodología
Caracterización de 34 nuevas variantes de <i>P. salmonis</i> mediante secuenciación masiva y análisis filogenético y metagenómicos.	Obtención y preparación de material genético de 34 nuevas variantes de <i>P. salmonis</i> .	Descrita en TTR
	Secuenciación masiva de las variantes de <i>P. salmonis</i> , mediante la plataforma Pac-Bio.	Descrita en TTR
	Secuenciación de variantes de <i>P. salmonis</i> , mediante la plataforma Illumina y Análisis bioinformáticos, ensamblaje y cierre de genomas.	Descrita en TTR
Aislamiento de nuevas variantes de <i>P. salmonis</i> por área geográfica y especie, año 2018.	Búsqueda y elección del laboratorio que realizará la obtención de las distintas muestras definidas por zona geográfica.	<p>Descrita en TTR, sin embargo, a esta se le incorporaron una serie de estrategia con la finalidad de aumentar la eficiencia del proceso:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Se ratificó el convenio previamente establecido con el laboratorio Antares, desde el cual hemos obtenido los 2 aislados de campo de este año. 2. Se estableció un nuevo convenio de muestreo con el laboratorio Pathovet, con el cual aumentamos el número de empresas y centros de cultivo que serán sujeto de muestreo en el marco de este proyecto. 3. Se estableció un nexo fuerte con Intesal, el cual comprometió a interceder por nuestro laboratorio ante sus asociados para, en primera instancia nos den aviso de la ocurrencia de brotes y, en segunda instancia nos autoricen a muestrear. 4. Se solicitó formalmente a Sernapesca incluírnos en la distribución del “Listado de Centros Alerta y CAD del PSEVC-Piscirickettsiosis” información que se actualiza semanalmente y nos permitirá tener una visión en tiempo real de la situación de la enfermedad en los diferentes centros de cultivo y con esto gestionar las autorizaciones para realizar muestreos.

	Planificación y ejecución de la búsqueda de muestras georreferenciadas, de acuerdo a los procedimientos previamente definidos.	Descrita en TTR
Mantener en operación el Cepario Nacional de <i>P. salmonis</i> en sus dos unidades espejo.	Criopreservación del <i>P. salmonis</i> desde Cultivo Libre de Células.	Descrita en TTR
	Recuperación de <i>P. salmonis</i> criopreservada en líneas celulares.	Descrita en TTR
	Recuperación de <i>P. salmonis</i> criopreservada en medios libres de células.	Descrita en TTR a esto se le incorporó el Procedimiento ante solicitud de cepas.

7. Resultados y discusión

1. Informe actualizado que señale disponibilidad de cepas de *Piscirickettsia salmonis*.

Durante el periodo de ejecución del proyecto (fines de 2017 y 2018) logramos incluir 120 nuevos aislados agregados a la colección del cepario, los cuales se encuentran debidamente caracterizados. Es importante destacar que estos aislados tienen diferentes orígenes, tanto geográficos, como de especies (gráfico 1) y años, lo que nos asegura una diversidad genómica importante para los análisis filogenéticos. Las fuentes de estos aislados las podemos resumir como se muestra en la siguiente tabla:

Numero de Aislados	Origen	Fecha de recepción	Rango de fechas de aislamiento	Especies	Región o zona
29	IFOP	Diciembre 2017	2011 – 2012	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmo Salar</i> • <i>Oncorhynchus mykiss</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • X • XI
2	PUCV	Enero 2018	2012	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmo Salar</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • X
1	Noruega	Enero 2018	S/I	<ul style="list-style-type: none"> • S/I 	<ul style="list-style-type: none"> • S/I
2	ALAB	Marzo 2018	2018	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Oncorhynchus mykiss</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • X
25	ADL	Junio 2018	2010 – 2015	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Oncorhynchus kisutch</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • X
25	ADL	Julio 2018	2010 – 2015	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Oncorhynchus mykiss</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • X • XI
26	ADL	Agosto 2018	2010 – 2018	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmo Salar</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • X • XI
2	ALAB	Agosto 2018	2018	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Oncorhynchus kisutch</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • X
8	Pathovet	Diciembre 2018	2018	<ul style="list-style-type: none"> • S/I 	<ul style="list-style-type: none"> • X

Tabla 1. Origen y datos asociados a la recepción de los aislados en el periodo.

Cabe mencionar que una vez recibidas en nuestro laboratorio cada uno de estos aislados fueron repicadas para enviar una copia al cepario espejo de la UCh y luego guardadas de acuerdo al “Manual Operativo y estandarizado con los procedimientos para el aislamiento, crecimiento y mantención de *Piscirickettsia salmonis* en laboratorio”.

En específico, y para todas las cepas recibidas en el cepario, primero se analizó la información correspondiente a esta, integrando el código de procedencia con el código asignado al cepario. Posteriormente se tomó una colonia de cada placa y se realiza Tinción de Gram, observándose cocos Gram (-) pleomórficos, posteriormente se procedió a realizar IFAT, verificando la presencia de *P. salmonis* con la observación de fluorescencia y así confirmar que se trata de un cultivo puro de la

bacteria. Finalmente se realizó PCR confirmatorio para *P. salmonis*. Luego de ello o muchas veces en paralelo se inoculó en 3 ml de medio líquido y para obtener crecimiento incubando a 18°C con una agitación de 100 rpm por un periodo de 3 a 5 días dependiendo del aislado. Del material crecido, se tomó 2 ml para ser usados en la extracción de ADN genómico y 1ml para crecer en un volumen de 10 ml para crío preservación.

Para extraer el ADN genómico los aislados se cultivaron de acuerdo a las condiciones ya descritas, luego la bacteria se sedimentó por centrifugación a 5000xg por 10 minutos, eliminándose el sobrenadante. El ADN genómico fue aislado desde el pellet bacteriano y para ello se usa el kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

El DNA purificado se cuantifica midiendo la absorbancia a 260nm, usando un equipo nanodrop-1000. Con esta metodología de purificación se obtienen concentraciones del orden de 100ng/μL para todos los aislados. Si corresponde, una vez que estos cumplen con los requisitos mínimos, se envían a Secuenciación al DSMZ.

En definitiva, el Cepario Oficial de *P. salmonis* al día de hoy cuenta con 194 cepas/aislados, los cuales físicamente se encuentran distribuidas entre la PUCV (194) y UACH (185). Cabe mencionar que estas 194 cepas/aislados se encuentran en diferentes estados de caracterización (anexo 1).



Gráfico 1. Representación de especies salmónidas en la colección de cepas.

Como puede observarse en el anexo 1 (base de datos completa en archivo Excel) la disponibilidad de cepas varía levemente entre el laboratorio de la PUCV y de la UACH en términos de disponibilidad, sin embargo, esto no es impedimento para el funcionamiento del cepario. Por otra parte, en la misma base de datos se da cuenta del avance y nivel de caracterización de cada cepa, considerando entre otros, el Gram, IFAT, PCR convencional (PUCV) y PCR anidado (UACH), crecimientos en diferentes medios, análisis de MLST y la secuenciación y cierre de genomas. Finalmente, y como información adicional, ya que no es parte de este proyecto, se incluyen algunos resultados preliminares de los análisis de Concentración mínima inhibitoria (CIM) para los antibióticos actualmente más utilizados en la salmicultura nacional, esto es Florfenicol y Oxitetraciclina.

Recuperación de Cepas desde Crioviales

Antes de presentar los resultados de esta actividad es importante tener en cuenta los siguientes antecedentes:

- *Piscirickettsia salmonis* es considerada una bacteria “fastidiosa” debido a los complejos requerimientos nutricionales que posee, lo que se traduce en múltiples dificultades para cultivarla en medios de cultivos artificiales, ya sea en presencia de células como en medios libres de ellas.
- La recuperación de bacterias de este tipo es compleja y la eficiencia de este proceso es relativa según los datos publicados por la American Type Culture Collection (ATCC) en su “Guía de criopreservación”.
- Específicamente para *P. salmonis* no hay datos publicados y validados al respecto y, nuestro equipo de investigación es pionero a nivel mundial en esta área.
- El porcentaje de eficiencia en la recuperación desde la criopreservación aumenta con los repetidos intentos. Respecto a ello es muy difícil estimar un porcentaje dado que depende del aislado o cepa del que se trate.
- Otro factor a analizar es las fechas de congelamiento de las cepas (antigüedad) y las condiciones y medios de congelamiento. Al respecto, los protocolos establecidos por el proyecto para el congelamiento de cepas han permitido que las cepas sometidas han sido guardadas en crioviales con la nueva fórmula, permiten que la tasa de recuperación sea cercana al 100%, al menos cuando las cepas están congeladas no más de un año. Según esto, el tiempo venidero permitirá evaluar concretamente que ocurre con el medio en uso a través de tiempos más prolongado de congelamiento a -80°C.

Con la finalidad de mantener en buenas condiciones los aislados depositados en nuestro cepario es necesario que cada cierto tiempo (al menos cada 12 meses) cada aislado sea recuperado desde el frízer de -80 o desde nitrógeno líquido y cultivado en placas de agar y luego almacenado nuevamente. Esta actividad requiere gran dedicación y un gasto importante en reactivos y recurso humano y es realizada tanto en el laboratorio de la PUCV como en el laboratorio de la UACH (tabla 2 PUCV y 3 UACH).

Tabla 2. Cronograma de recuperación de cepas desde crioviales (PUCV).

N°	Código	Aislado	Fecha Descongelación	Fecha de Congelación	Medio de Congelación*	SHK1	Medio Líquido	Medio Sólido	Fecha de Crecimiento	% de Recuperación por grupo
1	Psal-002	EM90	19-02-2018	04-12-2017	1	No	no	Si	26-02-2018	100%
2	Psal-001	LF89	19-02-2018	04-12-2017	1	No	no	Si	26-02-2018	
3	Psal-003	TGIM11	19-02-2018	15-12-2017	1	No	no	Si	26-02-2018	
4	Psal-004	SGIM12	19-02-2018	15-12-2017	1	No	no	Si	26-02-2018	
5	Psal-103	8465	19-02-2018	04-12-2017	1	No	no	Si	26-02-2018	
6	Psal-104	8670	19-02-2018	04-12-2017	1	No	no	Si	26-02-2018	
7	Psal-008	AUS008	19-02-2018	02-04-2018	2	No	no	Si	26-02-2018	
8	Psal-072	AUS110	19-02-2018	18-07-2016	2	No	no	Si	26-02-2018	
9	Psal-078	A9	19-03-2018	12-01-2018	2	No	no	Si	09-04-2018	100%
10	Psal-088	A20	19-03-2018	12-01-2018	2	No	no	Si	09-04-2018	
11	Psal-091	A23	19-03-2018	19-01-2018	1	No	no	Si	09-04-2018	
12	Psal-099	A33	19-03-2018	12-01-2018	2	No	no	Si	09-04-2018	
13	Psal-010	AUS007	12-04-2018	31-05-2016	2	No	si	Si	23-04-2018	100%
14	Psal-012	AUS043	12-04-2018	31-05-2016	2	No	si	Si	23-04-2018	
15	Psal-016	AUS056	12-04-2018	10-06-2016	2	No	si	Si	23-04-2018	
16	Psal-017	AUS071	12-04-2018	18-07-2016	2	No	si	Si	23-04-2018	
17	Psal-018	AUS072	12-04-2018	18-07-2016	2	No	si	Si	23-04-2018	

18	Psal-078	A9	18-05-2018	12-01-2018	2	No	si	Si	29-05-2018
19	Psal-086	A18	18-05-2018	19-01-2018	1	No	si	Si	29-05-2018
20	Psal-087	A19	18-05-2018	19-01-2018	1	No	si	Si	29-05-2018
21	Psal-096	A29	18-05-2018	12-01-2018	2	No	si	Si	29-05-2018
22	Psal-097	A31	18-05-2018	12-01-2018	2	No	si	Si	29-05-2018
23	Psal-004	SGIM12	18-05-2018	15-12-2017	1	No	si	Si	29-05-2018
24	Psal-003	TGIM11	18-05-2018	15-12-2017	1	No	si	Si	29-05-2018
25	Psal-040	Alab014	18-05-2018	30-11-2016	2	No	si	Si	29-05-2018
26	Psal-041	Alab015	18-05-2018	30-11-2016	2	No	si	Si	29-05-2018
27	Psal-018	AUS 072	18-05-2018	30-11-2016	2	No	si	Si	29-05-2018
28	Psal-026	CA5	18-05-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	29-05-2018
29	Psal-068	GIMP12	18-05-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	29-05-2018
30	Psal-051	C11	18-05-2018	15-12-2017	1	No	si	Si	29-05-2018
31	Psal-072	AUS110	18-05-2018	18-07-2016	2	No	si	Si	29-05-2018
32	Psal-011	AUS 041	18-05-2018	31-05-2016	2	No	si	Si	29-05-2018
33	Psal-002	EM90	18-05-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	29-05-2018
34	Psal-103	8465	18-05-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	29-05-2018
35	Psal-104	8670	18-05-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	29-05-2018
36	Psal-025	AUS 005	18-05-2018	11-11-2016	2	No	si	Si	Sin crec
37	Psal-027	CA8	18-05-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	Sin crec
38	Psal-094	A27	18-05-2018	12-01-2018	2	No	si	Si	Sin crec
39	Psal-088	A20	18-05-2018	12-01-2018	2	No	si	Si	Sin crec
40	Psal-080	A11	18-05-2018	12-01-2018	2	No	si	Si	Sin crec
41	Psal-077	A8	18-05-2018	12-01-2018	2	No	si	Si	Sin crec

75%

42	Psal-005	AUS 040	31-05-2018	31-05-2018	2	No	si	Si	08-06-2018	83%
43	Psal-006	AUS 042	31-05-2018	31-05-2016	2	No	si	Si	08-06-2018	
44	Psal-008	AUS 008	31-05-2018	02-04-2018	2	No	si	Si	11-06-2018	
45	Psal-009	AUS 025	31-05-2018	31-05-2016	2	No	si	Si	11-06-2018	
46	Psal-010	AUS 007	31-05-2018	31-05-2016	2	No	si	Si	08-06-2018	
47	Psal-011	AUS 041	31-05-2018	31-05-2016	2	No	si	Si	08-06-2018	
48	Psal-013	AUS 044	31-05-2018	10-06-2016	2	No	si	Si	Sin crec	
49	Psal-014	AUS 045	31-05-2018	10-06-2016	2	No	si	Si	Contaminación	
50	Psal-025	AUS 005	31-05-2018	11-11-2016	2	No	si	Si	08-06-2018	
51	Psal-027	CA8	31-05-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	11-06-2018	
52	Psal-105	5692	31-05-2018	04-12-2017	2	No	si	Si	11-06-2018	
53	Psal-017	AUS 071	31-05-2018	18-07-2016	2	No	si	Si	11-06-2018	
54	Psal-021	AUS 048	12-06-2018	17-07-2017	2	No	si	Si	19-08-2018	
55	Psal-028	Ps_alab_001	12-06-2018	02-06-2016	2	No	si	Si	19-08-2018	
56	Psal-029	Ps_alab_002	12-06-2018	02-06-2016	2	No	si	Si	Sin crec	
57	Psal-030	Ps_alab_003	12-06-2018	02-06-2016	2	No	si	Si	Sin crec	
58	Psal-031	Ps_alab_004	12-06-2018	02-06-2016	2	No	si	Si	Sin crec	
59	Psal-032	Ps_alab_005	12-06-2018	02-06-2016	2	No	si	Si	Sin crec	
60	Psal-033	Ps_alab_006	12-06-2018	02-06-2016	2	No	si	Si	Sin crec	
61	Psal-045	C04	12-06-2018	17-07-2017	1	No	si	Si	Sin crec	
62	Psal-046	C05	12-06-2018	17-07-2017	1	No	si	Si	Sin crec	
63	Psal-048	C07	12-06-2018	17-07-2017	1	No	si	Si	Sin crec	
64	Psal-056	C20	12-06-2018	17-07-2017	1	No	si	Si	Sin crec	
65	Psal-061	C25	12-06-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	Sin crec	
66	Psal-079	A10	12-06-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	Sin crec	
67	Psal-081	A13	12-06-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	22-06-2018	
68	Psal-083	A15	12-06-2018	19-01-2018	1	No	si	Si	22-06-2018	

69	Psal-095	A28	12-06-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	Sin crec	
70	Psal-098	A32	12-06-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	Sin crec	
71	Psal-099	A33	12-06-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	Sin crec	
72	Psal-102	A39	12-06-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	22-06-2018	
73	Psal-009	AUS025	12-06-2018	31-05-2016	2	No	si	Si	22-06-2018	
74	Psal-105	5692	19-06-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	27-06-2018	100%
75	Psal-103	8465	19-06-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	27-06-2018	
76	Psal-104	8670	19-06-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	27-06-2018	
77	Psal-045	C04	04-07-2018	17-07-2017	1	No	si	Si	18-07-2018	100%
78	Psal-048	C07	04-07-2018	17-07-2017	1	No	si	Si	18-07-2018	
79	Psal-056	C20	04-07-2018	19-07-2017	1	No	si	Si	18-07-2018	
80	Psal-061	C25	04-07-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	10-07-2018	
81	Psal-095	A28	04-07-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	10-07-2018	
82	Psal-098	A32	04-07-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	18-07-2018	
83	Psal-099	A33	04-07-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	18-07-2018	
84	Psal-079	A10	04-07-2018	12-01-2018	1	No	si	Si	Sin crec	
85	Psal-065	C33	04-07-2018	17-07-2017	1	No	si	Si	Sin crec	
86	Psal-013	AUS044	06-07-2018	10-06-2016	1	No	si	Si	16-07-2018	50%
87	Psal-014	AUS045	06-07-2018	10-06-2016	1	No	si	Si	Sin crec	
88	Psal-045	C04	20-07-2018	17-07-2017	1	No	si	Si	30-07-2018	100%
89	Psal-051	C11	20-07-2018	15-12-2017	1	No	si	Si	30-07-2018	
90	Psal-002	EM90	20-07-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	31-07-2018	
91	Psal-003	TGIM11	14-08-2018	15-12-2017	1	No	si	Si	24-08-2018	100%
92	Psal-004	SGIM12	14-08-2018	15-12-2017	1	No	si	Si	24-08-2018	
93	Psal-014	AUS 045	14-08-2018	10-06-2016	2	No	si	Si	24-08-2018	
94	Psal-026	CA5	14-08-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	14-09-2018	
95	Psal-027	CA8	14-08-2018	04-12-2017	1	No	si	Si	14-09-2018	

96	Psal-008	AUS 008 - IBM 008	13-09-2018	02-04-2018	1	No	Si	Si	29-09-2018	100%
97	Psal-069	AUS 023	13-09-2018	04-12-2017	1	No	Si	Si	30-09-2018	
98	Psal-002	EM-90	13-09-2018	04-12-2017	1	No	Si	Si	01-10-2018	
99	Psal-081	A13	13-09-2018	12-01-2018	1	No	Si	Si	02-10-2018	
100	Psal-051	C-11-H2	13-09-2018	15-12-2017	1	No	Si	Si	03-10-2018	
101	Psal-015	AUS 055 - IBM 036	14-09-2018	31-05-2016	1	No	si	Si	27-09-2018	100%
102	Psal-007	AUS 061	14-09-2018	10-06-2016	1	No	Si	Si	27-09-2018	
103	Psal-011	AUS 041 - IBM 014	14-09-2018	31-05-2016	1	No	Si	Si	28-09-2018	
104	Psal-025	AUS 005	08-10-2018	11-11-2016	1	No	SI	Si	18-10-2018	100%
105	Psal-103	8465	16-10-2018	04-12-2017	2	No	Si	Si	25-10-2018	80%
106	Psal-104	8670	16-10-2018	04-12-2017	2	No	Si	Si	25-10-2018	
107	Psal-186	PS_ALAB_021	16-10-2018	03-08-2018	1	No	Si	Si	Sin crec	
108	Psal-187	PS_ALAB_022	16-10-2018	03-08-2018	1	No	Si	Si	05-11-2018	
109	Psal-142	PS-OM-10	16-10-2018	04-12-2017	1	No	Si	Si	05-11-2018	
110	Psal-041	PS_ALAB_015	26-10-2018	30-11-2016	1	No	Si	Si	05-11-2018	78%
111	Psal-068	GIMP12	26-10-2018	04-12-2017	2	No	Si	Si	05-11-2018	
112	Psal-004	SGIM-12	26-10-2018	15-12-2017	1	No	Si	Si	05-11-2018	
113	Psal-014	AUS 045	26-10-2018	10-06-2016	1	No	Si	Si	Contaminación	
114	Psal-011	AUS 041	26-10-2018	31-05-2016	1	No	Si	Si	Contaminación	
115	Psal-040	PS_ALAB_014	26-10-2018	30-11-2016	1	No	Si	Si	08-11-2018	
116	Psal-009	AUS 025	26-10-2018	10-06-2016	1	No	Si	Si	13-11-2018	
117	Psal-028	PS_ALAB_001	26-10-2018	26-10-2018	1	No	Si	Si	13-11-2018	
118	Psal-142	PS-OM-10	26-10-2018	28-08-2018	1	No	Si	Si	05-11-2018	

119	Psal 072	AUS 110	09-11-2018	04-12-2017	1	No	Si	Si	26-11-2018	80%
120	Psal-028	PS_ALAB_001	09-11-2018	26-10-2018	1	No	Si	Si	26-11-2018	
121	Psal-013	AUS 044	09-11-2018	10-06-2016	1	No	Si	Si	26-11-2018	
122	Psal-011	AUS 041	09-11-2018	26-10-2018	1	No	Si	Si	26-11-2018	
123	Psal-186	PS_ALAB_021	09-11-2018	03-08-2018	1	No	Si	Si	sin crec	
124	Psal-112	PS OK 05	20-11-2018	19-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	100%
125	Psal-113	PS OK 06	20-11-2018	19-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
126	Psal-114	PS OK 07	20-11-2018	19-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
127	Psal-115	PS OK 08	20-11-2018	19-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
128	Psal-116	PS OK 09	20-11-2018	19-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
129	Psal-117	PS OK 10	20-11-2018	19-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
130	Psal-134	PS OM 02	20-11-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	27-11-2018	
131	Psal-135	PS OM 03	20-11-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	27-11-2018	
132	Psal-136	PS OM 04	20-11-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	27-11-2018	
133	Psal-137	PS OM 05	20-11-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
134	Psal-138	PS OM 06	20-11-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
135	Psal-139	PS OM 07	20-11-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
136	Psal-162	PS SS 05	20-11-2018	03-08-2018	1	No	Si	Si	27-11-2018	
137	Psal-163	PS SS 06	20-11-2018	03-08-2018	1	No	Si	Si	27-11-2018	
138	Psal-164	PS SS 07	20-11-2018	03-08-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	
139	Psal-172	PS SS 15	20-11-2018	03-08-2018	2	No	Si	Si	03-12-2018	
140	Psal-186	PS_ALAB_021	20-11-2018	03-08-2018	2	No	Si	Si	03-12-2018	
141	Psal-187	PS_ALAB_022	20-11-2018	03-08-2018	1	No	Si	Si	03-12-2018	

142	Psal-098	A32	12-12-2018	12-01-2018	1	No	Si	Si	cont	82%
143	Psal-099	A33	12-12-2018	12-01-2018	1	No	Si	Si	cont	
144	Psal-105	5265	12-12-2018	10-01-2018	2	No	Si	Si	21-12-2018	
145	Psal-070	AUS 100	12-12-2018	04-12-2017	1	No	Si	Si	21-12-2018	
146	Psal-071	AUS 109	12-12-2018	04-12-2017	1	No	Si	Si	21-12-2018	
147	Psal-014	AUS 045	12-12-2018	10-06-2016	1	No	Si	Si	21-12-2018	
148	Psal-143	PS OM 11	13-12-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	21-12-2018	
149	Psal-145	PS OM 13	14-12-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	21-12-2018	
150	Psal-148	PS OM 16	15-12-2018	27-07-2018	1	No	Si	Si	21-12-2018	
151	Psal-118	PS OK 11	16-12-2018	19-07-2018	1	No	Si	Si	21-12-2018	
152	Psal-119	PS OK 12	17-12-2018	19-07-2018	1	No	Si	Si	21-12-2018	

* Medio de congelación 1: L15 + 20%SFB + 10% DMSO y 2: Criobolas.

Tabla 3. Cronograma de recuperación de cepas desde crioviales (UACH).

N°	Código	Aislado	Fecha Descongelación	Fecha congelación	Medio congelación*	SHK-1	Medio líquido	Medio sólido	Resultado	Fecha de crecimiento	% de Recuperación por grupo
1	S/cod psal	-	23-04-2018	13-03-2017	1	No	Si	Si	Positivo	02-05-2018	91%
2	Psal 026	-	23-04-2018	28-06-2017	1	No	Si	Si	Positivo	02-05-2018	
3	Psal 011	-	26-04-2018	13-02-2017	1	No	Si	Si	Positivo	10-05-2018	
4	Psal 038	-	26-04-2018	10-06-2017	1	No	Si	Si	Positivo	10-05-2018	
5	Psal 069	-	26-04-2018	23-11-2017	1	No	Si	Si	Positivo	02-05-2018	
6	Psal 039	-	26-04-2018	14-11-2016	2	No	Si	Si	Positivo	02-05-2018	
7	Psal 037	-	04-05-2018	02-09-2017	2	No	Si	Si	Negativo	Sin Crec.	
8	Psal 070	-	04-05-2018	06-12-2017	1	No	Si	Si	Positivo	10-05-2018	
9	Psal 018	-	04-05-2018	28-06-2017	1	No	Si	Si	Positivo	10-05-2018	
10	S/cod psal	-	04-05-2018	12-08-2017	1	No	Si	Si	Positivo	10-05-2018	
11	Psal 008	-	04-05-2018	06-12-2017	1	No	Si	Si	Positivo	10-05-2018	
12	Psal 001	-	13-06-2018	17-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	20-06-2018	100%
13	Psal 013	-	13-06-2018	17-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	20-06-2018	
14	Psal 013	-	13-06-2018	20-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	20-06-2018	
15	Psal 011	-	13-06-2018	15-03-2018	1	No	Si	Si	Positivo	20-06-2018	
16	Psal 009	-	13-06-2018	17-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	20-06-2018	
17	Psal 010	-	13-06-2018	17-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	20-06-2018	
18	Psal 005	-	13-06-2018	31-01-2018	1	No	Si	Si	Positivo	20-06-2018	
19	Psal 006	-	19-06-2018	17-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	25-06-2018	
20	Psal 026	-	19-06-2018	21-04-2017	1	No	Si	Si	Positivo	25-06-2018	

21	Psal 069	-	26-06-2018	?	1	No	Si	Si	Positivo	02-07-2018	89%
22	S/cod psal	-	26-06-2018	26-04-2016	2	No	Si	Si	Contaminación	Contaminación	
23	S/cod psal	-	26-06-2018	12-08-2017	1	No	Si	Si	Positivo	04-07-2018	
24	S/cod psal	-	26-06-2018	11-01-2018	1	No	Si	Si	Positivo	04-07-2018	
25	S/cod psal	-	26-06-2018	11-01-2018	1	No	Si	Si	Positivo	04-07-2018	
26	Psal 071	-	26-06-2018	oct-17	1	No	Si	Si	Positivo	04-07-2018	
27	Psal 072	-	26-06-2018	11-01-2018	1	No	Si	Si	Positivo	04-07-2018	
28	S/cod psal	-	26-06-2018	11-01-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-07-2018	
29	Psal 000	-	01-10-2018	10-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	100%
30	Psal 005	-	01-10-2018	20-04-2018	1	No	Si	Si	Contaminación	Contaminación	
31	Psal 014	-	01-10-2018	22-06-2018	1	No	Si	Si	Contaminación	Contaminación	
32	Psal 014	-	05-10-2018	20-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	
33	Psal 103	-	01-10-2018	13-07-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	
34	Psal 104	-	01-10-2018	13-07-2018	1	No	Si	Si	Contaminación	CONTAMINADA	
35	Psal 009	-	01-10-2018	27-06-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	
36	Psal 013	-	01-10-2018	02-02-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	
37	Psal 010	-	01-10-2018	11-01-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	
38	Psal 006	-	01-10-2018	02-02-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	
39	Psal 011	-	01-10-2018	02-02-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	
40	Psal 069	-	01-10-2018	31-08-2018	1	No	Si	Si	Positivo	05-10-2018	

41	Psal 000	-	05-11-2018	17-04-2018	1	No	Si	Si	Positivo	12-11-2018	100%
42	Psal 010	-	05-11-2018	02-02-2018	1	No	Si	Si	Positivo	12-11-2018	
43	Psal 006	-	05-11-2018	02-02-2018	1	No	Si	Si	Positivo	12-11-2018	
44	Psal 011	-	05-11-2018	02-02-2018	1	No	Si	Si	Positivo	09-11-2018	
45	Psal 001	-	05-11-2018	21-08-2018	1	No	Si	Si	Positivo	12-11-2018	
46	Psal 013	-	05-11-2018	02-02-2018	1	No	Si	Si	Positivo	09-11-2018	
47	Psal 014	-	05-11-2018	27-06-2018	1	No	Si	Si	Positivo	09-11-2018	
48	Psal 009	-	05-11-2018	27-06-2018	1	No	Si	Si	Positivo	09-11-2018	
49	Psal 005	-	05-11-2018	31-01-2018	1	No	Si	Si	Positivo	12-11-2018	
50	Psal 069	-	05-11-2018	31-08-2018	1	No	Si	Si	Positivo	12-11-2018	
51	Psal 103	-	05-11-2018	13-07-2018	1	No	Si	Si	Positivo	12-11-2018	
52	Psal 104	-	05-11-2018	13-07-2018	1	No	Si	Si	Positivo	12-11-2018	

* Medio de congelación 1: L15 + 20%SFB + 10% DMSO y 2: Glicerol 20%.

Es importante mencionar que la eficiencia de recuperación obtenida en la UACH con el medio de congelación 1 es de 93.88% (46/49), mientras que la eficiencia obtenida con el medio de congelación 2 es del 33.33% (1/3).

Solicitudes de cepas procesadas

Procedimiento ante solicitud de cepas.

En primer lugar, cuando se solicita un aislado al cepario se debe diferenciar si esta solicitud tiene fines comerciales o de investigación, debido a que en el caso de tener fines comerciales incluye un costo asociado, el cual no se realiza al tener fines investigativos.

Una vez teniendo claro cuál es el objetivo de la solicitud se envía por correo electrónico el Formulario para la solicitud de Aislados (anexo 2) y una copia del catálogo de cepas actualizado (anexo 1) y se solicita el envío de este completo con los datos reales y debidamente firmado por el responsable de la solicitud.

Una vez recibidos los documentos comienza el trabajo en el laboratorio para “despertar” las cepas/aislados solicitados.

Al cierre del presente informe el Cepario Nacional de *Piscirickettsia salmonis* ha recibido dieciséis solicitudes de aislados, seis en el laboratorio de la PUCV (anexos 3a al 3f) y diez en el laboratorio de la UACH (anexos 4a al 4j). Todas estas solicitudes se enmarcan en proyectos de investigación y por tanto no se han generado cobros.

Cabe mencionar que en todas las oportunidades en que han sido solicitadas cepas/aislados, independientemente haya sido en la PUCV o UACH, las solicitudes se han tramitado, gestionado y concretado sin mayores dificultades, completando hasta el momento la transferencia exitosa de 64 cepas, sin embargo, es necesario indicar que en el caso de la solicitud del Dr. Jaime Romero del INTA, por tratarse de un número alto de aislados y con la finalidad de facilitar el manejo práctico dentro del laboratorio, se dividió en dos tandas el crecimiento y entrega de las cepas solicitadas, habiéndose concretado con éxito ambas tandas de transferencia.

En la tabla 4, puede observarse un resumen de las solicitudes antes mencionadas, incluyendo la información de la persona solicitante y la empresa correspondiente. Asimismo, se muestra la fecha de la solicitud realizada y la unidad espejo del cepario con la cual se realizó el pedido. Para más detalle de cada solicitud ver anexos 3 y 4.

N°	Solicitante	Empresa	Numero de Aislados	Fecha	Unidad
1	Derie Fuentes	Fraunhofer	4	07-05-2018	UACH
2	Alex Romero	UACH	4	07-05-2018	UACH
3	Derie Fuentes	Fraunhofer	5	14-05-2018	UACH
4	Derie Fuentes	Fraunhofer	3	04-06-2018	UACH
5	Jaime Romero	INTA-UChile	15	08-06-2018	PUCV
6	Marcos Rozas	Pathovet	3	12-06-2018	PUCV
7	Derie Fuentes	Fraunhofer	3	20-06-2018	UACH
8	Rubén Avendaño	UNAB	2	03-07-2018	PUCV
9	Derie Fuentes	Fraunhofer	2	04-07-2018	UACH
10	Jaime Romero	INTA-UChile	5	08-08-2018	PUCV
11	Rubén Avendaño	UNAB	1	13-08-2018	UACH
12	Javier Barros	MicBiotech Ltda	5	26-09-2018	UACH
13	Alejandro Yañez	UACH	3	08-10-2018	UACH
14	Carolina Asencio	Epivet	3	12-11-2018	PUCV
15	Carolina Asencio	Epivet	4	05-12-2018	PUCV
16	Carolina Asencio	Epivet	2	26-12-2018	PUCV
Total			64		

Tabla 4. Resumen de solicitudes de cepas recibidas durante el periodo de ejecución del proyecto.

2. Informe que dé cuenta de muestreos y aislamientos exitosos de nuevos aislados de campo (al menos 10 nuevos aislados).

La situación sanitaria en relación al patógeno a nivel nacional ha fue de relativa calma durante el año 2018 respecto a años anteriores, no habiéndose presentado brotes significativos del agente en los centros de cultivo. Esto sumado a la rápida acción de las empresas para comenzar los tratamientos antibióticos, en primera instancia, se tradujo en un bajo número de muestreos, de los cuales se logró recuperar 4 aislados (Psal-106, Psal-107, Psal-182, Psal-183). Sin embargo y para sobreponernos al problema anterior y cumplir de buena manera con los objetivos impuestos en el proyecto, se hizo una actualización en nuestra estrategia para conseguir muestras, abriendo nuevas posibilidades de obtención de estas en varios frentes:

1. Se ratificó el convenio previamente establecido con el laboratorio Antares, desde el cual hemos obtenido los 2 aislados de campo de este año.
2. Se estableció un nuevo convenio de muestreo con el laboratorio Pathovet, con el cual aumentamos el número de empresas y centros de cultivo que serán sujeto de muestreo en el marco de este proyecto.
3. Se estableció un nexo fuerte con Intesal, el cual comprometió a interceder por nuestro laboratorio ante sus asociados para, en primera instancia nos den aviso de la ocurrencia de brotes y, en segunda instancia nos autoricen a muestrear.
4. Se solicitó formalmente a Sernapesca incluirnos en la distribución del “Listado de Centros Alerta y CAD del PSEVC-Piscirickettsiosis” información que se actualiza semanalmente y nos permitirá tener una visión en tiempo real de la situación de la enfermedad en los diferentes centros de cultivo y con esto gestionar las autorizaciones para realizar muestreos.

Con esta nueva estrategia de gestión de muestreos fuimos capaces de revertir la situación y logramos cumplir con el objetivo de tener 10 nuevos aislados durante 2018 (Psal-106, Psal-107, Psal-182, Psal-183, Psal-184, Psal-185, Psa-186, Psal-187, Psal-188 y Psal-189), los que actualmente ya se encuentran debidamente caracterizados (anexo 1 destacados en amarillo). Cabe mencionar que al cierre del presente informe recibimos nuevos aislados del año 2018 (Psal-190, Psal-191, Psal-192 y Psal-193) los que se encuentran en proceso de caracterización y con los cuales superamos el numero comprometido inicialmente.

3. Actualización de variantes/cepas con genomas cerrados.

Este trabajo es realizado en conjunto con el laboratorio del Profesor Dr. Jörg Overmann en Alemania (DSMZ), nuestro asesor internacional del proyecto.

Nuestro papel es la obtención de los aislados desde otros laboratorios o desde brotes de campo, situación que se da preferentemente en las temporadas de primavera y verano debido a la temperatura del agua. Cada aislado recuperado de órganos de peces naturalmente infectados debe ser sembrados en placas de agar para recuperar colonias individuales, proceso que no siempre es exitoso, pues lo que es recuperado de *in vivo* no necesariamente crece *in vitro*, y esta situación es muy común en *Piscirickettsia salmonis*. El material sembrado, de ser exitoso, permite recuperar colonias individuales. De cada colonia se inicia un cultivo líquido que en aproximadamente 10 días nos permite recuperar una biomasa bacteriana para someterla a un proceso de purificación de su material genético (ADN) para su secuenciación y cierre genómico.

Cabe mencionar que el convenio firmado con el Laboratorio del Dr. Overmann, considera la secuenciación y cierre de 50 aislados de *P. salmonis* (anexo 5). El número, superior al que se comprometió para el proyecto (34), se debe a que en muchos casos hay que re-secuenciar, y así cubrimos este eventual problema técnico.

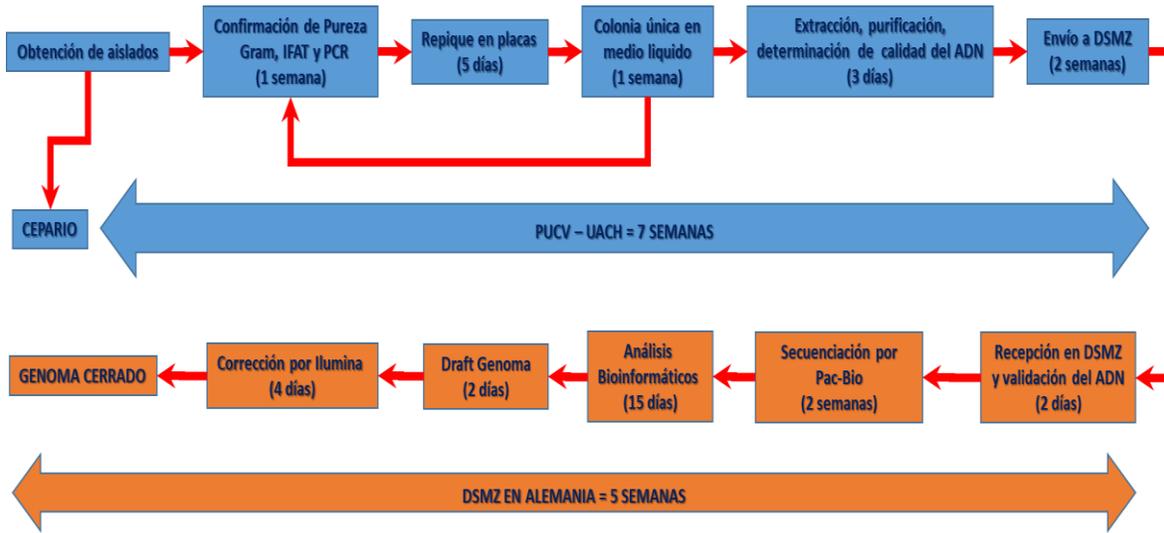
Al día de hoy, la totalidad de los genomas comprometidos (34) se encuentran secuenciados y cerrados, cuyas secuencias se encuentran en los anexos 6 al 39. Estos al parecer presentan hallazgos bastante interesantes, de los cuales, algunos se encuentran en los resultados de los análisis posteriores y otros en etapa de confirmación.

Asimismo, en el esquema 1 podemos observar el periodo mínimo necesario para secuenciar y cerrar el genoma de cada aislado de *P. salmonis*, considerando que todos los procesos y análisis necesarios obtienen los resultados esperados.

A continuación, en la tabla 5 se presenta un resumen de los números de secuencias comprometidos y el estado actual del proceso en el que se encuentran.

Año	N° de aislados comprometidos	N° de Aislados enviados	N° de Aislados listos para enviar	N° Aislados en proceso de secuenciación	N° de genomas en Draft	N° de genomas cerrados
2017	20	24	0	0	3	21
2018	34	34	0	0	0	34
NCBI						19
Total	54	48			3	55

Tabla 5: Numero de secuencias comprometidas y su estado actual en el proceso.



TEMPORALIDAD PROMEDIO DE 12 SEMANAS REQUERIDO PARA SECUENCIAR Y CERRAR EL GENOMA DE CADA AISLADO DE *P. salmonis*.

Esquema 1: Periodo necesario para secuenciar y cerrar el genoma de cada aislado de *P. salmonis*

Es importante destacar el hecho que este proyecto no incluye el análisis de los datos producto de la secuenciación y cierre de genomas, dado que este es un trabajo que llevará un periodo de análisis que se extenderá por más tiempo que el del presente proyecto. Sin perjuicio de lo anterior, creemos que es de suma importancia reportar los resultados que hemos obtenido al menos en los análisis preliminares de esta información.

Análisis de aislados y cepas de *P. salmonis* por Multilocus Sequence Typing (MLST)

Resumen:

Esta actividad tiene como objetivo desarrollar un sistema de diferenciación de genogrupos para aislados y cepas de *P. salmonis* a través de MLST, sin la necesidad de realizar la secuenciación completa del genoma. Para ello se seleccionaron 5 genes (*rpoB*, *gyrB*, *gyrA*, *parC* y *mfd*), los que daban la mayor reproducibilidad entre sí para poder distinguir entre los genogrupos EM-90 y LF-89.

De los análisis realizados se pudo determinar que la mayoría de los aislados caracterizados pertenecen al genogrupo EM-90, determinándose a su vez que en este genogrupo hay dos subgrupos. Por su parte, en el genogrupo LF-89 no se observó la presencia de subgrupos al menos con las 152 cepas analizadas.

Materiales y métodos:

Selección de genes blanco y diseño de Primers:

Para la selección de los genes blanco, se utilizaron 10 genomas completos de *P. salmonis* presentes en la base de datos del NCBI (GenBank), 5 de los cuales pertenecían al genogrupo LF-89 y 5 al EM-90. Los genomas fueron anotados en el servidor RAST (Aziz et al., 2008). Posteriormente los genomas cargados en el programa CLC Main Workbench (Quiagen) para realizar los posteriores análisis. Se realizó una búsqueda de genes que tuvieran relación con algún evento fisiológico de la bacteria, por lo cual se realizó una búsqueda de genes que pudieran tener relación con resistencia a antibióticos, para lo cual se usó el servidor CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (<https://card.mcmaster.ca/>). Finalmente se seleccionaron aquellos genes que estuvieran presentes en todas las cepas y cuya relación con resistencia a antibióticos se debiera a una mutación o cambio de bases, que le entregaría la resistencia a la bacteria.

Una vez seleccionados los genes, se procedió al diseño de primers para lo cual se realizó un alineamiento múltiple de secuencias para cada gen, seleccionando las regiones que permitieran discriminar entre genogrupos (zonas más conservadas para un genogrupo u otro), para lo que se utilizó el programa CLC Main Workbench. Posteriormente, los primers fueron diseñados con el programa Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) y las propiedades de éstos fueron validadas con la herramienta OligoCalculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Finalmente, los primers fueron enviados a síntesis a MacroGen Inc. (Corea).

Extracción de ADN de *P. salmonis* y amplificación de los genes blanco:

para la extracción de ADN, los diferentes aislados de *P. salmonis* fueron cultivados en 5 ml de caldo SRS-Austral a 18°C hasta que alcanzaran una OD₆₀₀ de 1,0 - 1,2 (2-3 días). Los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm por 15 min a 4°C y el pellet resultante fue procesado con el kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo-Fischer). El DNA fue visualizado en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed (Biotium) y su concentración fue cuantificada por espectrofotometría (Nanodrop-1000).

Para la amplificación por PCR se llevó a cabo en reacciones de 50µl usando el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega), utilizando las siguientes condiciones de amplificación: denaturación Inicial a 94°C por 60 segundos, a continuación 35 ciclos de denaturación de 94°C por 30 segundos, alineación de los primers a 60°C por 30 y luego la elongación a 72°C por 1 min; finalmente se realiza una extensión final a 72° C por 5 min. Los primers utilizados están detallados en la tabla 6. Todos los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed.

Secuenciación, análisis Bioinformáticos y MLST:

Una vez realizado el PCR y chequeada la amplificación por electroforesis, el producto restante (45µl) fue sometido a purificación utilizando el kit E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron enviados a secuenciación a MacroGen Inc (Corea). La secuenciación se realizó en ambas direcciones para cada gen, utilizando sus respectivos primer Forward (For) y Reverse (Rev), con la finalidad de descartar errores en el proceso de secuenciación.

Las secuencias obtenidas de la secuenciación fueron procesadas con el software CLC Main Workbench, realizando el alineamiento y comparación entre la secuenciación For y Rev de cada gen, para generar una secuencia consenso. Cada secuencia de gen obtenido fue comparado a través de la herramienta Clustal-Omega (Sievers *et al*, 2011) y dichos datos analizados a través del software Jalview 2.0 (Waterhouse *et al*, 2009). Finalmente, los análisis finales de similitud y los árboles filogenéticos, utilizando el método de máxima verosimilitud con el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Resultados:

Selección de genes blanco y diseño de Primers:

Mediante diferentes análisis (CARD y Alineamientos) a los genomas obtenidos desde Genbank se seleccionaron 5 genes: *rpoB*, *gyrB*, *gyrA*, *parC* y *mfd*. Cada uno de estos genes tiene importantes funciones en la bacteria, principalmente en la replicación del ADN y transcripción del ARN. La tabla 6 muestra un resumen de la función de cada gen seleccionado, así como también la secuencia de los primers generados y el tamaño del amplicón esperado.

Gen	Secuencia del primer	Tamaño Amplicón	Función del Gen
<i>rpoB</i>	For: 5'-GTG AGA GAG TGT CGA ATT CGT GGC ATC -3'	550 bp	Subunidad beta de la ARN Polimerasa
	Rev: 5'- GGC CGC CGC AAC AAT TTC ACC ATC-3'		
<i>gyrB</i>	For: 5'-CGT CAG CAC ACC ATA CTC TTT CGA AG-3'	550 bp	Subunidad B de la ADN girasa
	Rev: 5'-GCA GAA GTT GGC ACG CTG ATT ACA GC-3'		
<i>parC</i>	For: 5'-CGT TTG GGT AAA GTG GAT GAG CGC-3'	500 bp	Subunidad IV de la DNA topoisomerasa
	Rev: 5'-GTT ACC GGC GCT AAT ACC TTG GCC-3'		
<i>gyrA</i>	For: 5'-GGC CAG TTG TAG GTA TTT GGT TTA C-3'	1250 bp	Subunidad A de la ADN girasa
	Rev: 5'-GTT AAG CTT TCA AAC CAT ATT GAG ACA GTT-3		
<i>mfd</i>	For: 5'-CGC TTC ATT ATT TAG GTA CAG AGC-3	450 bp	Factor de acoplamiento y reparación de la Transcripción
	Rev: 5'-GTT ACC GGC GCT AAT ACC TTG GCC-3		

Tabla 6: Genes blanco y primers seleccionados para el MLST

Amplificación de los genes blanco:

En todos los casos se obtuvo la correcta amplificación de los genes blanco, con los tamaños esperados y señalados en la tabla 6. Las figuras 1, 2, 3, 4 y 5 muestran como referencia la amplificación de los genes *gyrB*, *parC*, *rpoB*, *mfd* y *gyrA* para algunos de los aislados analizados.

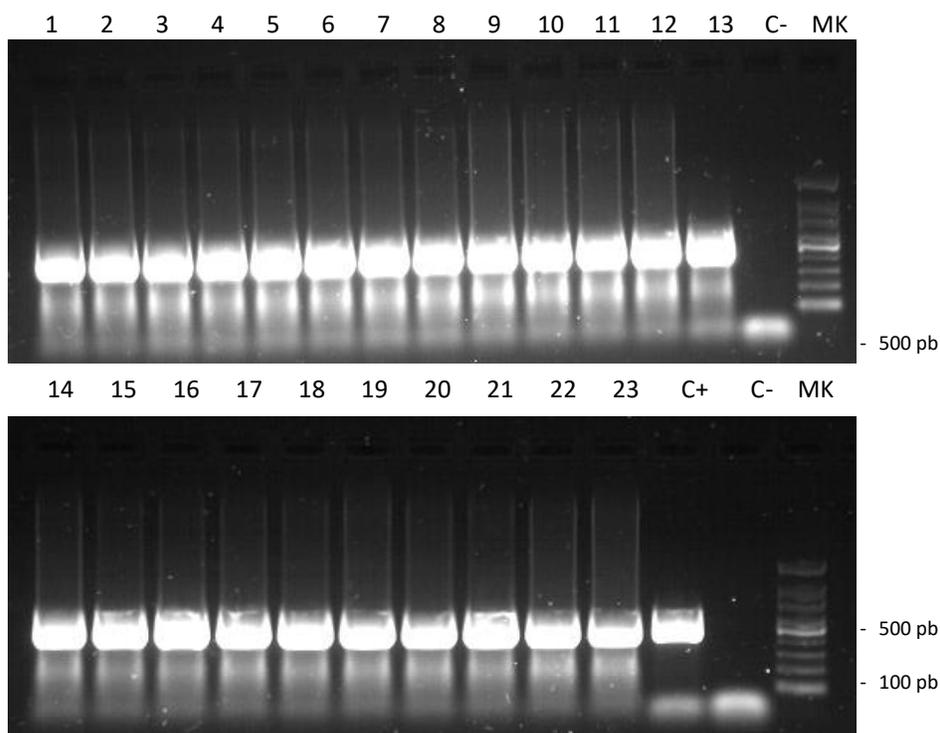


Figura 1: Gel Agarosa 1% de la amplificación del gen *gyrB*.

MK: marcador de 100 pb; **C+:** control positivo de PCR (ADN cepa LF-89 ATCC); **C-:** Blanco de PCR (control negativo); **1:** Psal-074; **2:** Psal-076; **3:** Psal-077; **4:** Psal-083; **5:** Psal-085; **6:** Psal-085; **7:** Psal-086; **8:** Psal-087; **9:** Psal-089; **10:** Psal-090; **11:** Psal-091; **12:** Psal-092; **13:** Psal-093; **14:** Psal-094; **15:** Psal-095; **16:** Psal-096; **17:** Psal-097; **18:** Psal-098; **19:** Psal-099; **20:** Psal-100; **21:** Psal-101; **22:**

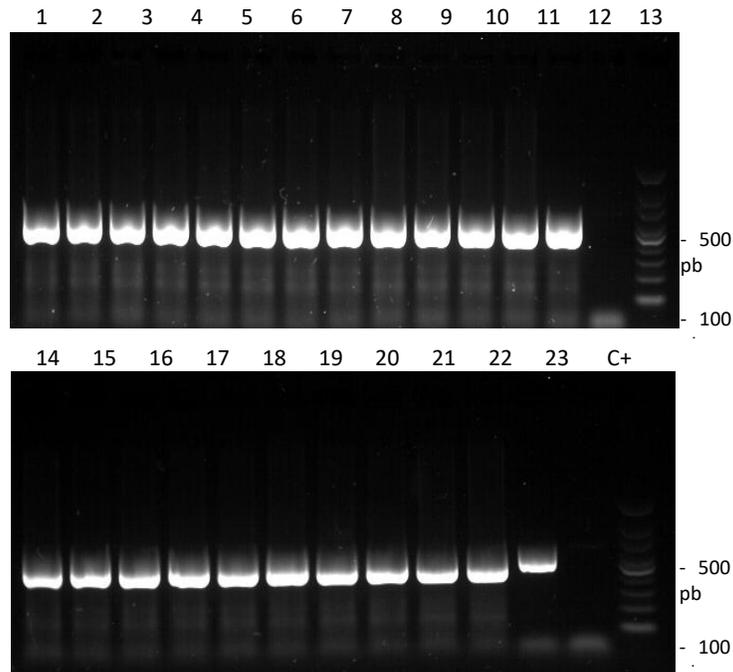


Figura 2: Gel Agarosa 1% de la amplificación del gen *rpoB*.

MK: marcador de 100 pb; **C+:** control positivo de PCR (ADN cepa LF-89 ATCC); **C-:** Blanco de PCR (control negativo); **1:** Psal-074; **2:** Psal-076; **3:** Psal-077; **4:** Psal-080; **5:** Psal-083; **6:** Psal-085; **7:** Psal-086; **8:** Psal-087; **9:** Psal-089; **10:** Psal-090; **11:** Psal-091; **12:** Psal-092; **13:** Psal-093; **14:** Psal-094; **15:** Psa-095; **16:** Psal-096; **17:** Psal-097; **18:** Psal-098; **19:** Psal-099; **20:** Psal-100; **21:** Psal-101; **22:**

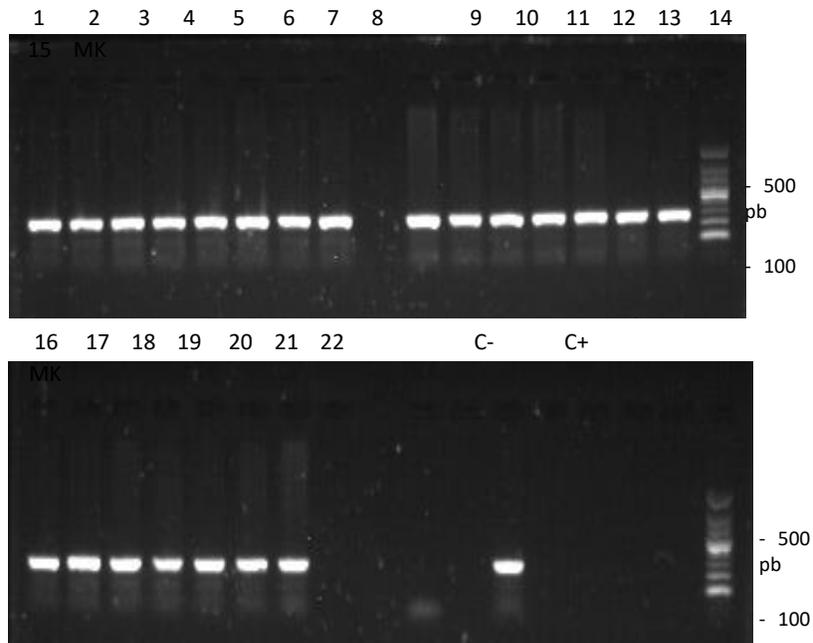


Figura 3: Gel Agarosa 1% de la amplificación del gen *mfd*.

MK: marcador de 100 pb; **C+:** control positivo de PCR (ADN cepa LF-89 ATCC); **C-:** Blanco de PCR (control negativo); **1:** PsaI-074; **2:** PsaI-076; **3:** PsaI-077; **4:** PsaI-080; **5:** PsaI-083; **6:** PsaI-085; **7:** PsaI-086; **8:** PsaI-087; **9:** PsaI-089; **10:** PsaI-090; **11:** PsaI-091; **12:** PsaI-092; **13:** PsaI-093; **14:** PsaI-094; **15:** PsaI-095; **16:** PsaI-096; **17:** PsaI-097; **18:** PsaI-098; **19:** PsaI-099; **20:** PsaI-100; **21:** PsaI-101; **22:** PsaI-

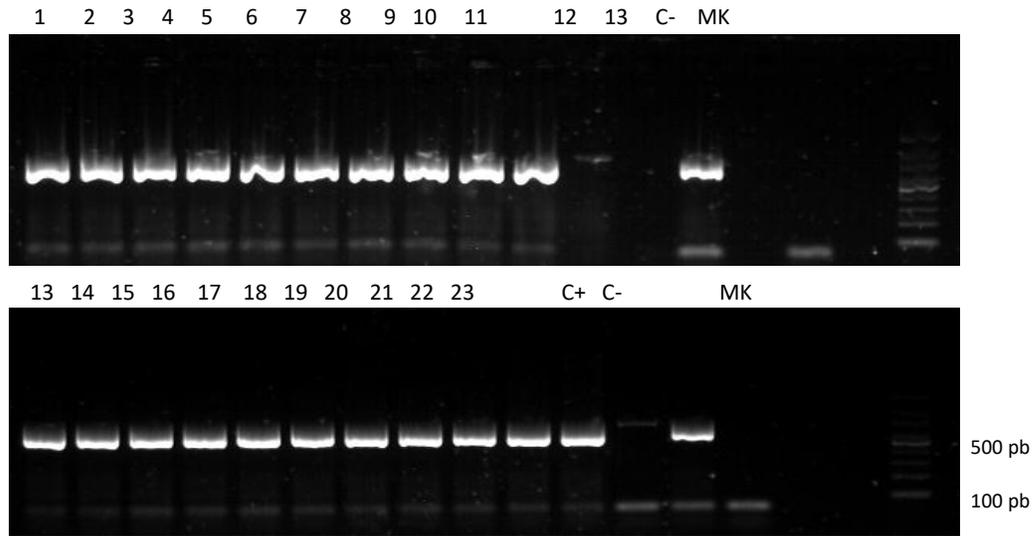


Figura 4: Gel Agarosa 1% de la amplificación del gen *parC*.

MK: marcador de 100 pb; **C+:** control positivo de PCR (ADN cepa LF-89 ATCC); **C-:** Blanco de PCR (control negativo); **1:** Psa-074; **2:** Psa-076; **3:** Psa-077; **4:** Psa-080; **5:** Psa-083; **6:** Psa-085; **7:** Psa-086; **8:** Psa-087; **9:** Psa-089; **10:** Psa-090; **11:** Psa-091; **12:** Psa-092; **13:** Psa-093; **14:** Psa-094; **15:** Psa-095; **16:** Psa-096; **17:** Psa-097; **18:** Psa-098; **19:** Psa-099; **20:** Psa-100; **21:** Psa-101; **22:** Psa-102; **23:** Psa-105

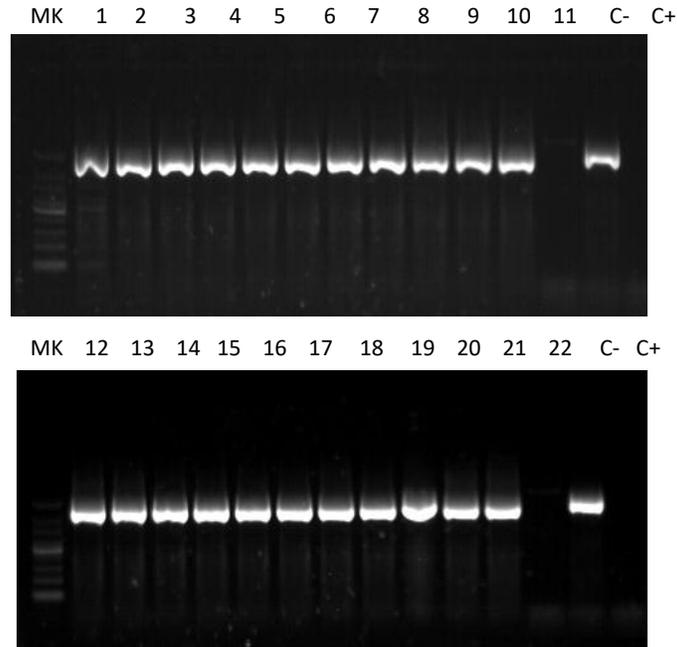


Figura 5: Gel Agarosa 1% de la amplificación del gen *gyrA*.

MK: marcador de 100 pb; **C+:** control positivo de PCR (ADN cepa LF-89 ATCC); **C-:** Blanco de PCR (control negativo); **1:** Psal-074; **2:** Psal-076; **3:** Psal-077; **4:** Psal-080; **5:** Psal-083; **6:** Psal-085; **7:** Psal-086; **8:** Psal-087; **9:** Psal-089; **10:** Psal-090; **11:** Psal-091; **12:** Psal-092; **13:** Psal-093; **14:** Psal-094; **15:** Psa-095; **16:** Psal-096; **17:** Psal-097; **18:** Psal-098; **19:** Psal-099; **20:** Psal-100; **21:** Psal-101; **22:** Psal-102.

Secuenciación, análisis Bioinformáticos y MLST:

La secuenciación obtenida permitió realizar los alineamientos respectivos para el posterior MLSA y luego MLST. Para cada uno de los genes los árboles filogenéticos generados muestran la misma tendencia: para el genogrupo EM-90 se observa la presencia de 2 subgrupos (a excepción del gen *mfd*), no así para LF-89 donde solo se ve un solo gran grupo. Por otro lado, para el aislado Psal-105 del cepario, el que proviene de Noruega, se puede observar en todos los casos que queda fuera de ambos genogrupos, lo que sugiere que en Noruega pudiera existir un genogrupo o línea genética diferente al de las cepas de *P. salmonis* chilenas (figuras 6, 7, 8, 9 y 10).

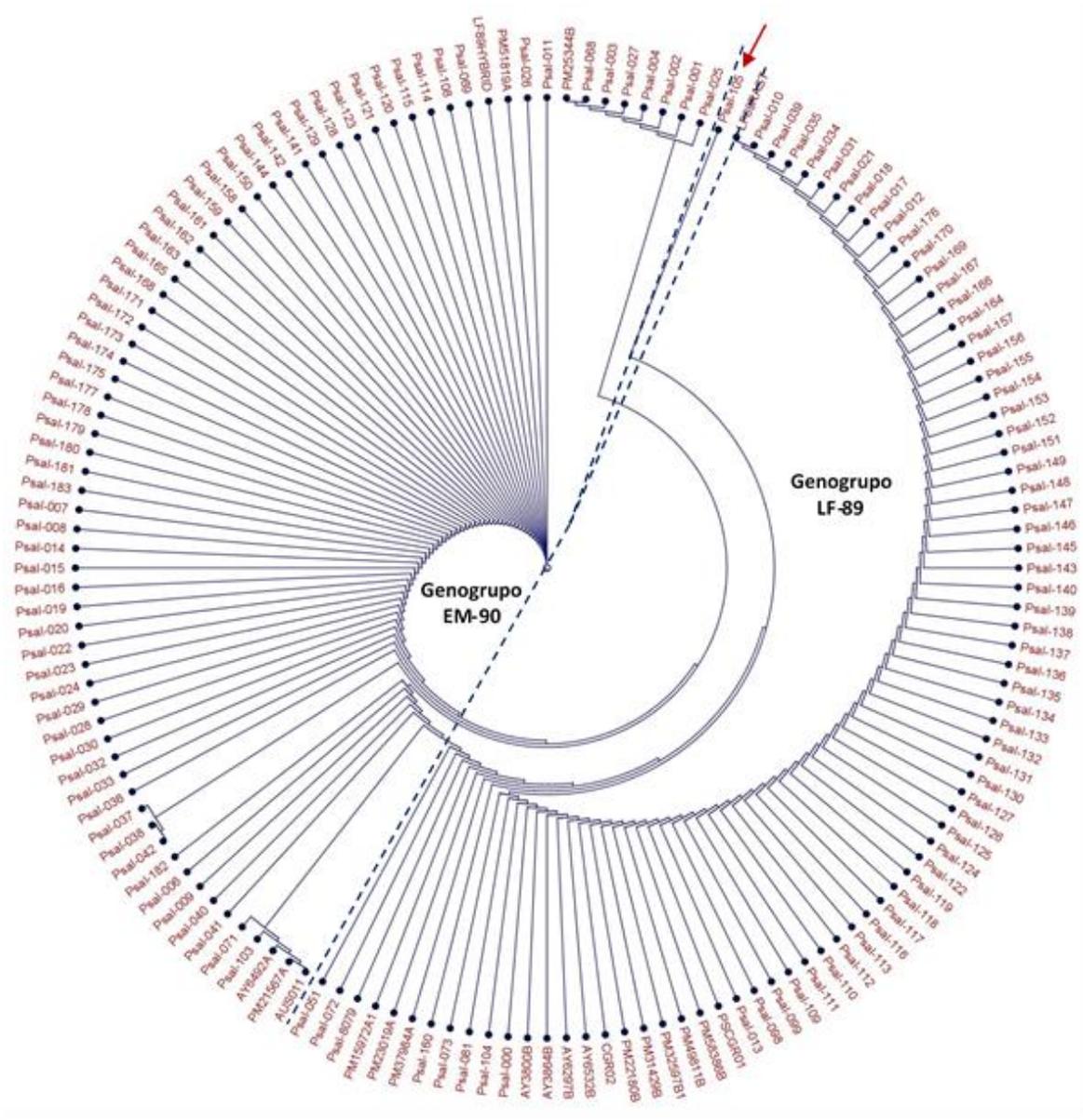


Figura 6: Árbol de máxima verosimilitud del gen *rpoB*.

La flecha roja indica al aislado Psal-105 que queda en una rama separada de los genogrupos EM-90 y LF-89. La línea discontinua muestra la separación entre genogrupos.

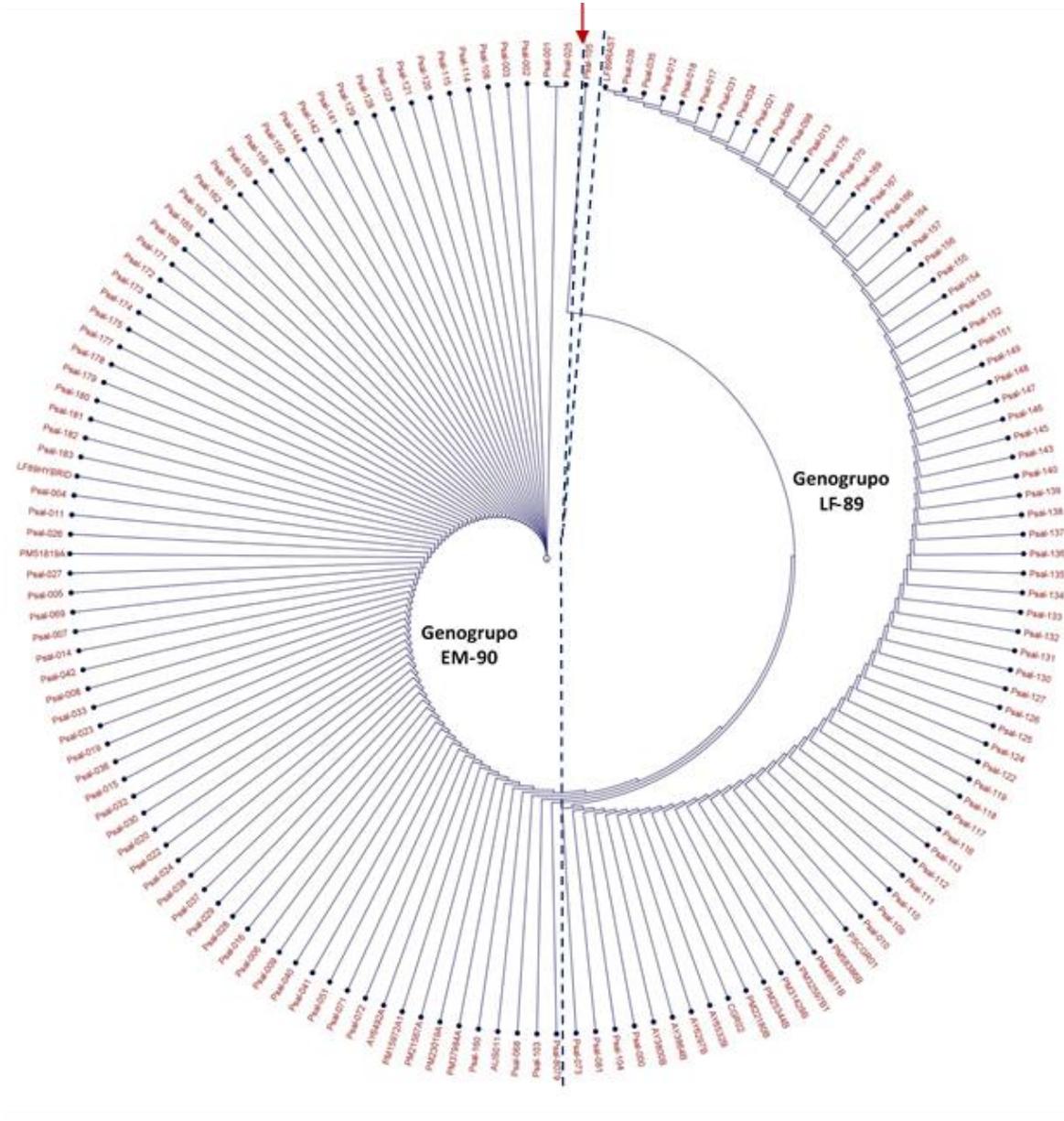


Figura 7: Árbol de máxima verosimilitud del gen *gyrB*.

La flecha roja indica al aislado Psal-105 que queda en una rama separada de los genogrupos EM-90 y LF-89. La línea discontinua muestra la separación entre genogrupos.

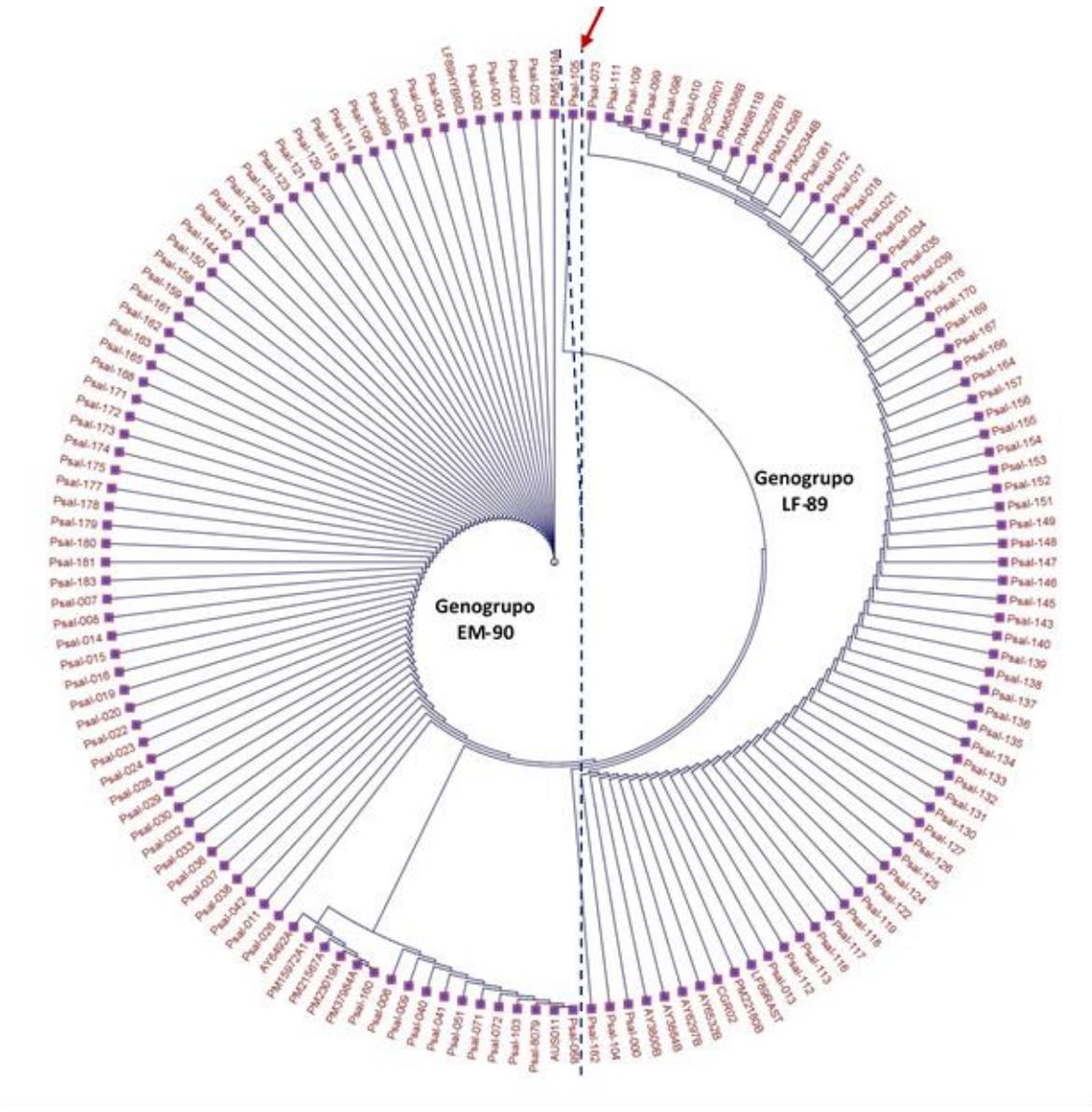


Figura 8: Árbol de máxima verosimilitud del gen *gyrA*.

La flecha roja indica al aislado PsaI-105 que queda en una rama separada de los genogrupos EM-90 y LF-89. La línea discontinua muestra la separación entre genogrupos.

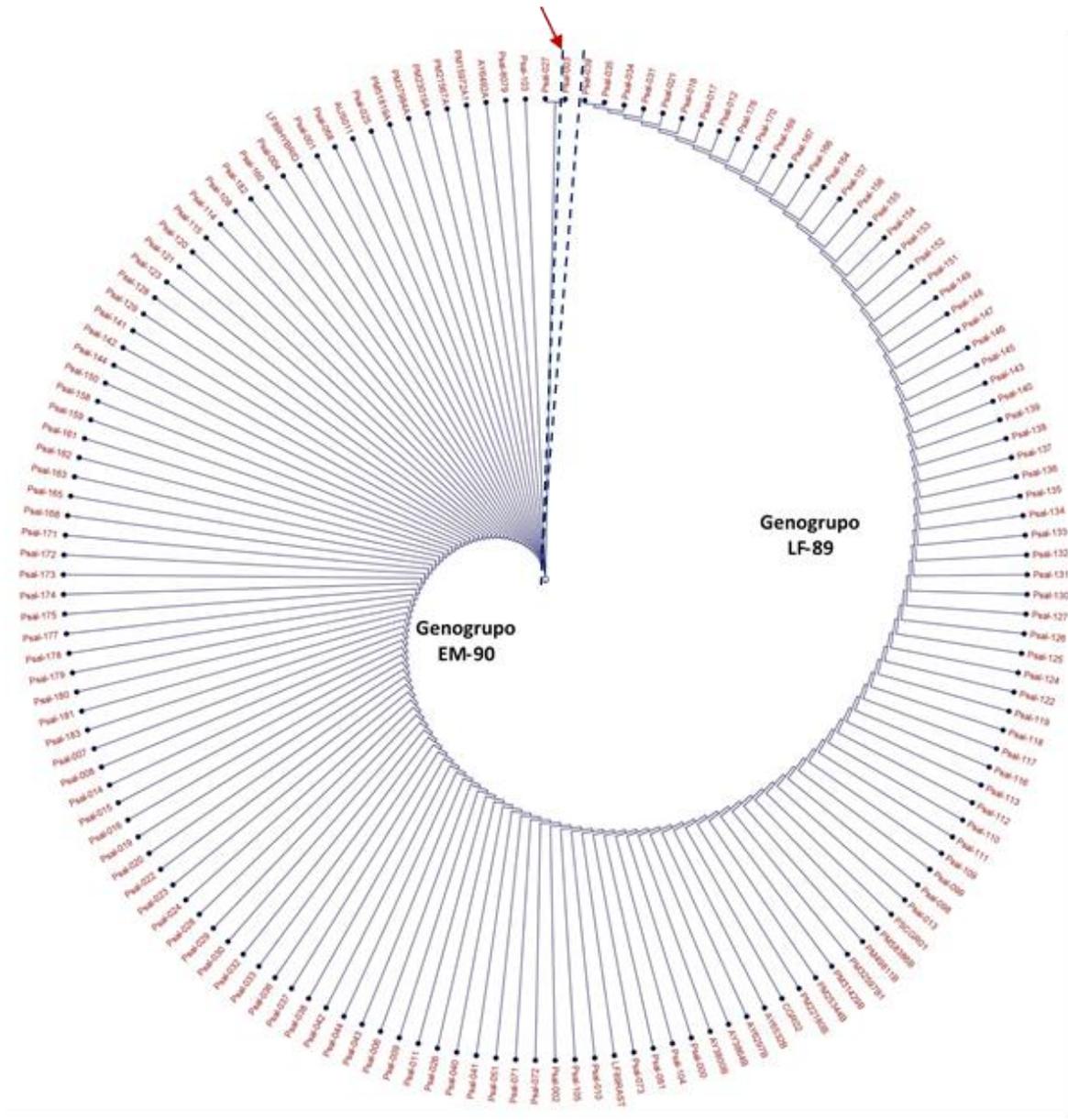


Figura 9: Árbol de máxima verosimilitud del gen *parC*.

La flecha roja indica al aislado Psal-105 que queda en una rama separada de los genogrupos EM-90 y LF-89. La línea discontinua muestra la separación entre genogrupos.

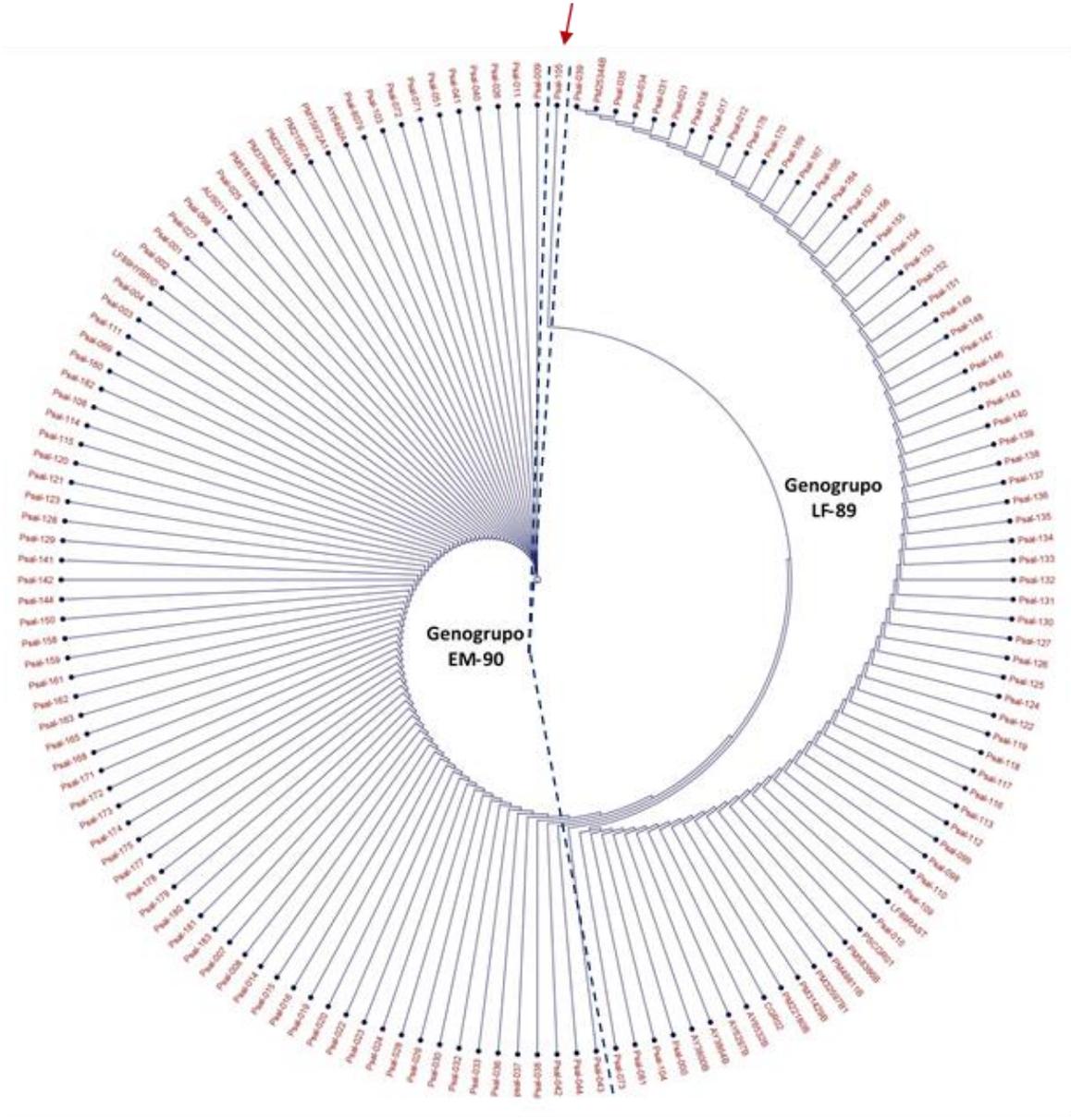


Figura 10: Árbol de máxima verosimilitud del gen *mfd*.

La flecha roja indica al aislado Psal-105 que queda en una rama separada de los genogrupos EM-90 y LF-89. La línea discontinua muestra la separación entre genogrupos.

Análisis filogenéticos, metagenómicos, genómicos y estado actual de la información respecto a los tipos de *Piscirickettsia salmonis*.

Un análisis inicial respecto a la información disponible en este momento sobre los genomas de la bacteria puede verse resumida en la figura 11. En la base de datos GenBank del NCBI hasta 2017 se podían encontrar 19 genomas cerrados, y 5 genomas incompletos de diferentes aislados. A partir del trabajo iniciado para este proyecto se tienen en este momento 22 genomas cerrados y 22 en proceso.

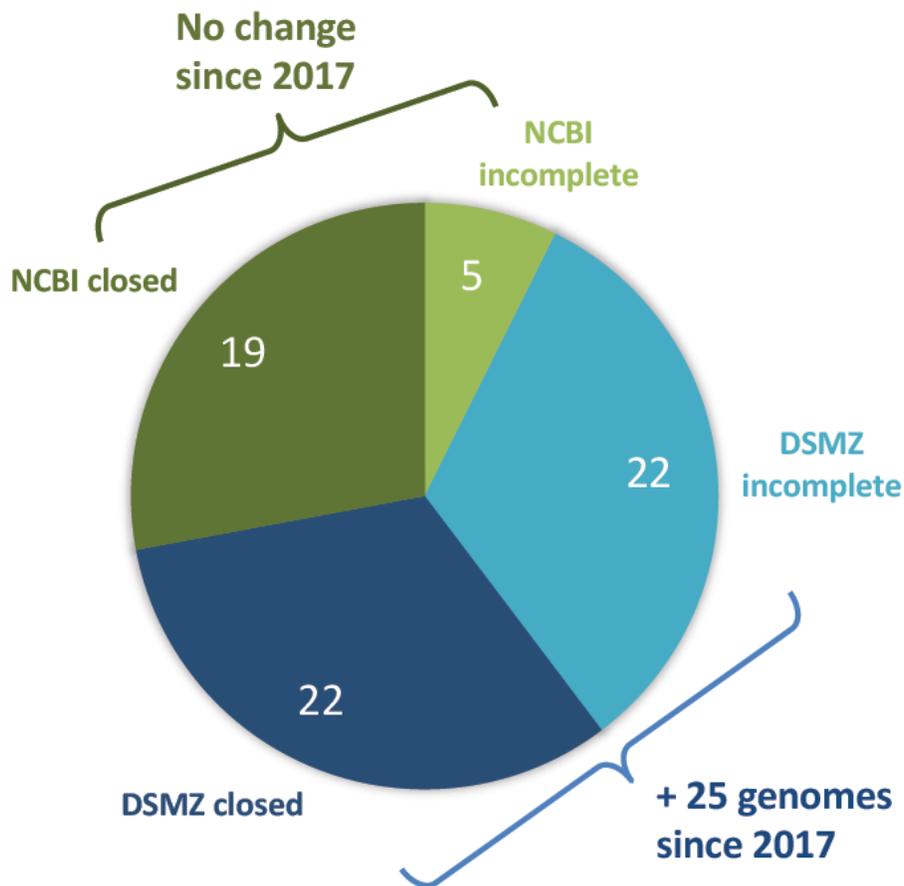


Figura 11. Información disponible de los genomas de *Piscirickettsia salmonis*.

En la siguiente tabla (tabla7) podemos observar un análisis de 50 secuencias correspondientes a cepas con genoma cerrado, 31 obtenidos del cepario y 19 obtenidas desde la base de datos (NCBI). En ella se muestra el número y tamaño en KB del cromosoma bacteriano, así como el número y tamaño de cada plásmido. Finalmente, también se muestra el origen de cada secuencia.

N	Aislado	Número de Cromosomas	Tamaño del Cromosoma	Número de Plásmidos	Tamaño de plásmidos	Fuente
1	Psal-001	1	3,1 Mb	4	150kb, 80kb, 35kb, 23kb	Cepario
2	Psal-002	1	3,1 Mb	4	153kb, 80kb, 32kb, 24kb	Cepario
3	Psal-003	1	3,1 Mb	4	109kb, 80kb, 35kb, 23kb	Cepario
4	Psal-004	1	3,1 Mb	4	108kb, 80kb, 35kb, 24kb	Cepario
5	Psal-005	1	3,1 Mb	1	158kb	Cepario
6	Psal-006	1	3,1 Mb	4	188kb, 57kb, 40kb, 33kb	Cepario
7	Psal-009	1	3,1 Mb	4	90kb, 58kb, 38kb, 33kb	Cepario
8	Psal-010	1	3,1 Mb	5	108kb, 80kb, 41kb, 38kb, 35kb	Cepario
9	Psal-011	1	3,1 Mb	4	158kb, 78kb, 34kb, 13kb	Cepario
10	Psal-013	1	3,1 Mb	4	159kb, 53kb, 33kb, 26kb	Cepario
11	Psal-025	1	3,1 Mb	4	225kb, 80kb, 38kb, 24kb	Cepario
12	Psal-026	1	3,1 Mb	4	110kb, 80kb, 36kb, 24kb	Cepario
13	Psal-027	1	3,1 Mb	4	153kb, 79kb, 32kb, 23kb	Cepario
14	Psal-040	1	3,1 Mb	4	194kb, 57kb, 40kb, 33kb	Cepario
15	Psal-041	1	3,1 Mb	4	149kb, 58kb, 38kb, 33kb	Cepario
16	Psal-051	1	3,1 Mb	4	182kb, 58kb, 38kb, 33kb	Cepario
17	Psal-068	1	3,1 Mb	4	150kb, 80kb, 35kb, 24kb	Cepario
18	Psal-069	1	3,1 Mb	3	158kb, 78kb, 13kb.	Cepario
19	Psal-071	1	3,1 Mb	4	168kb, 58kb, 38kb, 33kb	Cepario
20	Psal-072	1	3,1 Mb	5	250kb, 192kb, 58kb, 38kb, 33kb	Cepario
21	Psal-073	1	3,1 Mb	3	208kb, 125kb, 24kb	Cepario
22	Psal-081	1	3,1 Mb	4	179kb, 57kb, 51kb, 33kb	Cepario
23	Psal-098	1	3,1 Mb	4	175kb, 57kb, 50kb, 33kb	Cepario
24	Psal-099	1	3,1 Mb	4	175kb, 57kb, 50kb, 33kb	Cepario
25	Psal-109	1	3,1 Mb	4	176kb, 57kb, 50kb, 33kb	Cepario
26	Psal-111	1	3,1 Mb	4	176kb, 58kb, 50kb, 33kb	Cepario
27	Psal-160	1	3,1 Mb	4	120kb, 82kb, 39kb, 32kb,	Cepario
28	Psal-182	1	3,1 Mb	4	144kb, 53kb, 44kb, 22kb	Cepario
29	Psal-103	1	3,1 Mb	5	171kb, 58kb, 38kb, 33kb, 23kb	Cepario
30	Psal-104	1	3,1 Mb	4	153kb, 80kb, 33kb, 24kb	Cepario
31	Psal-105	1	3,1 Mb	7	137kb, 79kb, 75kb, 53kb, 42kb, 40kb, 19kb	Cepario

32	AY3800B	1	3,1 Mb	4	188kb, 60kb, 45kb, 33kb	Base de datos
33	AY3864B	1	3,1 Mb	4	188kb, 60kb, 45kb, 33kb	Base de datos
34	AY6492A	1	3,0 Mb	4	158kb, 82kb, 39kb, 32kb	Base de datos
35	AY6532B	1	3,1 Mb	4	188kb, 60kb, 33kb, 20kb	Base de datos
36	LF-89 (ATCC VR-1361)	1	3,1 Mb	4	180kb, 57kb, 51kb, 33kb	Base de datos
37	PM15972A1	1	3,0 Mb	4	82kb, 39kb, 31kb, 29kb	Base de datos
38	PM21567A	1	3,0 Mb	4	120kb, 82kb, 39kb, 32kb, 31kb	Base de datos
39	PM23019A	1	3,0 Mb	4	153kb, 36kb, 36kb, 28kb	Base de datos
40	PM25344B	1	3,1 Mb	4	181kb, 57kb, 51kb, 33kb	Base de datos
41	PM31429B	1	3,1 Mb	4	181kb, 57kb, 50kb, 33kb	Base de datos
42	PM49811B	1	3,1 Mb	4	181kb, 57kb, 50kb, 33kb	Base de datos
43	PM51819A	1	3,1 Mb	2	165kb, 122kb	Base de datos
44	PM58386B	1	3,1 Mb	4	181kb, 57kb, 80kb, 33kb	Base de datos
45	PSCGR01	1	3,1 Mb	4	179kb, 57kb, 51kb, 33kb	Base de datos
46	PSCGR02	1	3,2 Mb	3	115kb, 68kb, 33kb	Base de datos
47	AY6297B	1	3,1 Mb	incompleto		Base de datos
48	PM22180B	1	3,1 Mb	incompleto		Base de datos
49	PM32597B1	1	3,1 Mb	incompleto		Base de datos
50	PM37984A	1	3,0 Mb	incompleto		Base de datos

Tabla 7. Cantidad de cromosomas, plásmidos y tamaño de los mismos de 50 aislados analizados, 31 de cepario y 19 disponibles en base de datos.

Un análisis filogenético con base en las secuencias disponibles para el 16s rRNA, de 59 aislados de *P. salmonis* junto con 41 bacterias de otras especies filogenéticamente relacionadas mostró varios hechos que deben tenerse en cuenta:

1. La distancia entre los 16S de *P. salmonis* y otras especies relacionadas filogenéticamente, como *Francisella*, *Candidatus*, *Coxiella*, *Legionella*, *Shigella* y *Escherichia coli*, muestra una distancia (*gap*) demasiado grande que indica que deben existir otras bacterias relacionadas más cercanas y que hasta el momento no conocemos.
2. Los aislados disponibles en este momento representan solo una pequeña fracción de la diversidad de este microorganismo.
3. Existe en este momento solo un aislado que no es chileno.
4. Hay un microorganismo descrito recientemente, que está dentro del mismo grupo filogenético (*Tasmanian rickettsia-like*).
5. Hay al menos 1 genoma reportado en bases de datos que presenta errores en su secuenciación (problemas de ensamblaje) por lo cual no será tomado en cuenta en los análisis subsiguientes (aislado PM25344B, número de acceso CP013821).

6. En los aislados chilenos es posible observar la separación de los dos principales genogrupos: EM y LF.

Se hizo la secuenciación y cierre de 34 genomas de *P. salmonis* como parte del convenio con DSMZ, con el grupo del doctor Jörg Overmann. La secuenciación se realizó por PACBIO y el cierre de los genomas utilizando un flujo de trabajo con herramientas bioinformáticas como se describe a continuación:

El ensamblaje de los genomas secuenciados se hizo utilizando SMRT-Portal (Pacific biosciences). Una vez ensamblados es necesario hacer una curación manual utilizando un conjunto de *scripts* desarrollados por el grupo del doctor Overmann en DSMZ para circularizar y determinar el origen de replicación cromosomal. Posteriormente se realiza un reensamblaje por SMRT-Portal (X5) lo cual minimiza el error aleatorio ocasionado intrínsecamente por la técnica. Los errores de carácter sistemático son corregidos por Illumina HiSeq. Una vez terminado este proceso se procede a la verificación del origen de replicación y a la circularización del genoma para su posterior anotación mediante PROKKA (Seemann, 2014).

Se determinaron los genes ortólogos dentro de pangenoma y coregenoma utilizando para ello el software proteinotho (Lechner et al 2011). Esta clasificación se realizó para todos los aislados en conjunto, así como para cada genogrupo independientemente.

Se utilizó también el software Parsnp incluido en Harvest suite (Treangen et al 2014) para el alineamiento múltiple de los genomas completos y el software Mauve (Darling et al 2004) para la determinación de recombinación y sintenia entre los diferentes genomas.

Se construyeron arboles con Splistree (Huson and Bryant 2006) para determinar recombinación entre los genogrupos o dentro de ellos.

Se definió el coregenoma y pangenoma de *P. salmonis* con base en 53 genomas cerrados, 19 correspondientes a los reportados en bases de datos y 34 nuevos genomas secuenciados y cerrados correspondientes al cepario. Para ver las características del pangenoma y coregenoma de *P. salmonis* se construyeron gráficos de acumulación, para el conjunto completo (figura 12) y para cada genogrupo (figura 13).

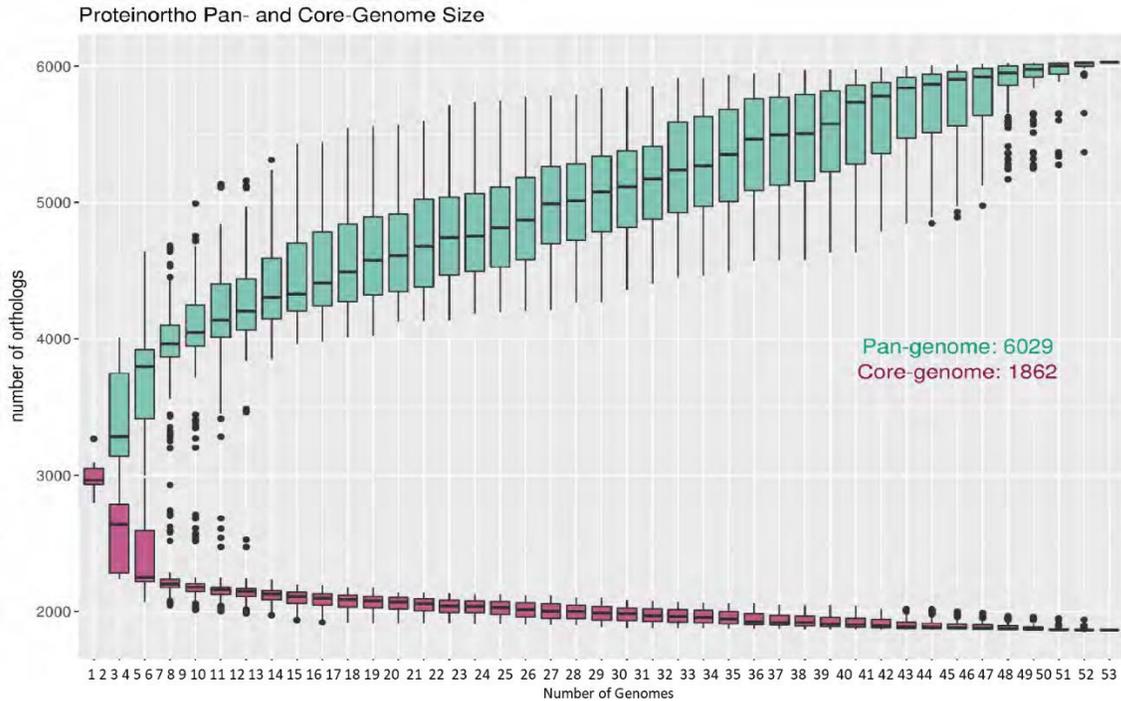


Figura 12. Gráfico de acumulación a partir del análisis realizado con Proteinortho para los 53 genomas cerrados de *P. salmonis*.

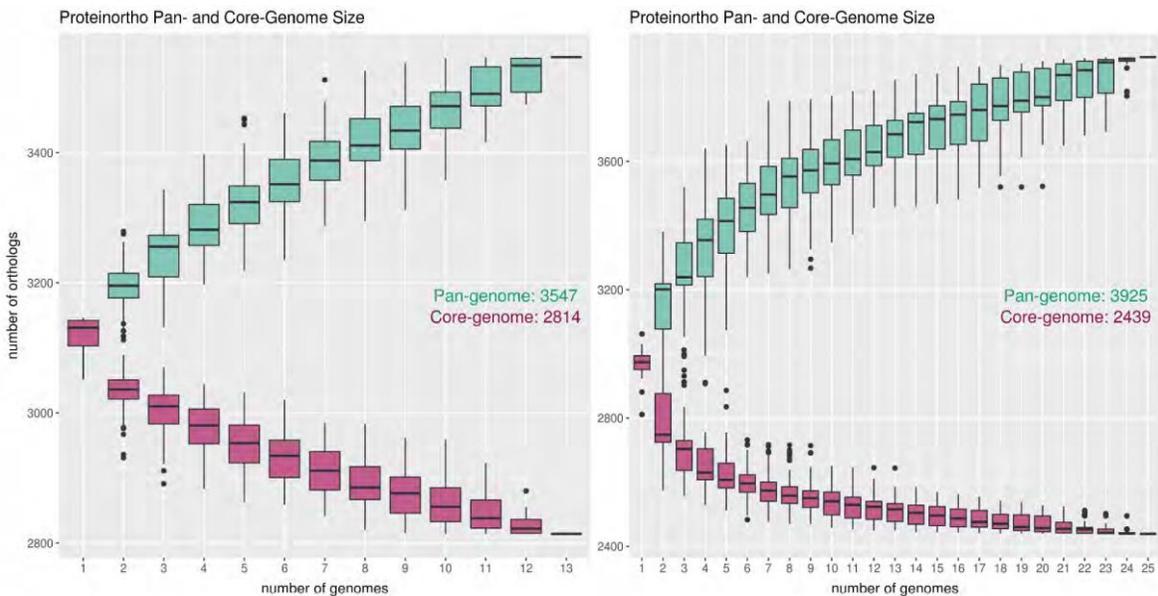


Figura 13. Gráfico de acumulación para cada uno de los genogrupos, al lado izquierdo se muestra el genogrupo LF y al derecho el genogrupo EM.

En los gráficos de acumulación puede observarse que el pangenoma aún se encuentra abierto, pero tendiendo a estabilizarse. En el caso del coregenoma, se ve que para el genogrupo EM, este se encuentra prácticamente completo, mientras que para el genogrupo LF el coregenoma no ha convergido, por lo cual se puede decir que se encuentra incompleto. Debemos notar que hay una diferencia grande entre el número de aislados perteneciente a cada genogrupo, con 35 genomas del grupo EM, versus 19 del grupo LF. Esperamos que con el tiempo aumente el número de aislados y conforme a esto, se podrá evaluar si evidencia mayor estabilización respecto al número mínimo de genes.

Un resumen de las características principales del análisis se presenta en la tabla 8.

Nº de Genes	Total	%	Genogrupo LF	%	Genogrupo EM	%
Pangenoma	6029	100%	3547	100%	3925	100%
Coregenoma	1862	31%	2814	79%	2439	62%
Genes únicos	4167	69%	733	21%	1486	38%

Tabla 8. Resumen del número de genes para pangenoma y coregenoma para todos los aislados y para cada genogrupo.

Se construyó un árbol filogenético con los datos del genoma para los 55 aislados del cepario mas los 19 genomas reportados en la base de datos del NCBI (figura 14) donde se puede observar claramente la separación de los aislados en tres grupos, los dos genogrupos conocidas, EM y LF, y el aislado noruego.

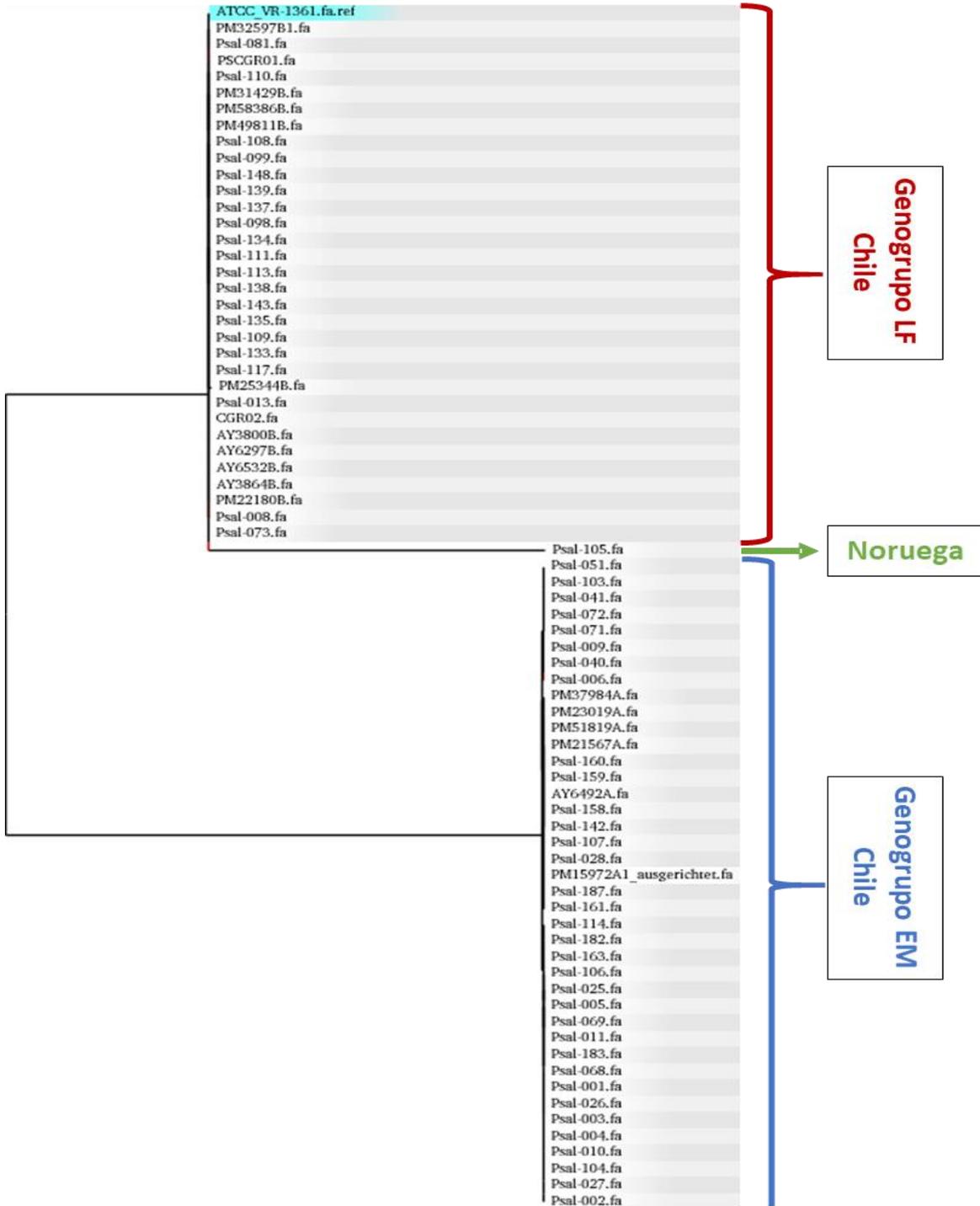


Figura 14. Árbol filogenómico generado con el coregenoma para los 55 aislados secuenciados en DSMZ pertenecientes al cepario más los 19 reportados en la base de datos. Se indican los dos genogrupos y el aislado Psal-105 proveniente de Noruega.

Un análisis detallado, incluidos los 19 genomas reportados en la base de datos del NCBI, muestra que existe divergencia dentro de los genogrupos; en el caso del genogrupo LF se ve claramente el aislado PM25344B por fuera del grupo. El análisis comparativo del genoma indica problemas de secuenciación, ya que se presentan bloques de genes idénticos pero organizados de manera diferente, lo que hace pensar que el ensamblaje del genoma pudo presentar errores. Este aislado fue reportado por un laboratorio privado, (ADL Diagnostic Chile Ltda) con el cual nos comunicamos, desafortunadamente no fue posible conseguir el aislado para confirmar este supuesto, por lo cual se excluirá del análisis. Dentro de este mismo genogrupo el aislado Psal-073 se encuentra en revisión, pues existen algunas diferencias en el ordenamiento de algunos genes (ver análisis de sintenia, figura 17).

En el caso del genogrupo EM se observan al menos tres subgrupos (figura 15B), uno de ellos conformado por aislados reportados anteriormente y cuyos datos de secuencia se encuentran en la base de datos de NCBI.



Figura 15. Árbol filogenómico para el coregenoma de cada uno de los genogrupos. **A.** Genogrupo LF. **B.** Genogrupo EM.

La divergencia observada tanto en el grupo total como en los genogrupos hace pensar en la existencia de diferentes especies, un análisis de la identidad promedio entre nucleótidos haciendo una comparación por pares, entre los diferentes genomas apoya esta hipótesis. Como puede verse en la figura 16 la identidad promedio dentro de cada genogrupo está por sobre el 99,5%. mientras que entre los genogrupos es de 95-96%. El aislado Psal-105, presenta una identidad de nucleótidos mayor con el genogrupo LF (>96%).

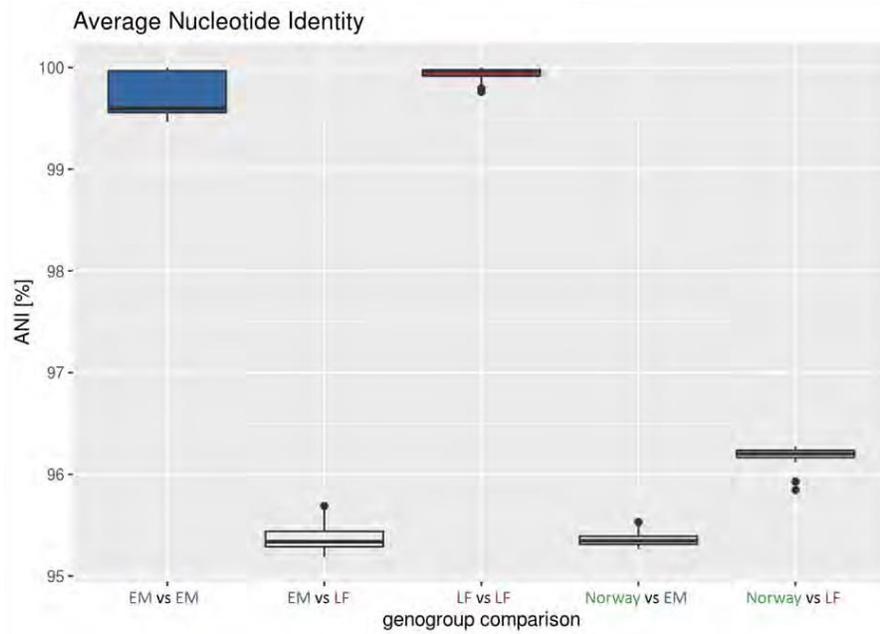


Figura 16 Identidad promedio de nucleótidos (Average Nucleotide Identity) en una comparación por pares entre los diferentes genogrupos.

Un análisis de la sintenia de genes entre los diferentes genogrupos, es otra evidencia de la existencia de las tres especies propuestas. Como puede verse en las figuras 17 y 18 los alineamientos realizados con Mauve (Darling et al 2004) muestran la sintenia dentro de cada genogrupo. En el genogrupo LF se ve claramente la diferencia del aislado noruego Psal-105, así como las diferencias presentadas por el aislado Psal-073; en el genogrupo EM se aprecian los tres subgrupos mencionados anteriormente.

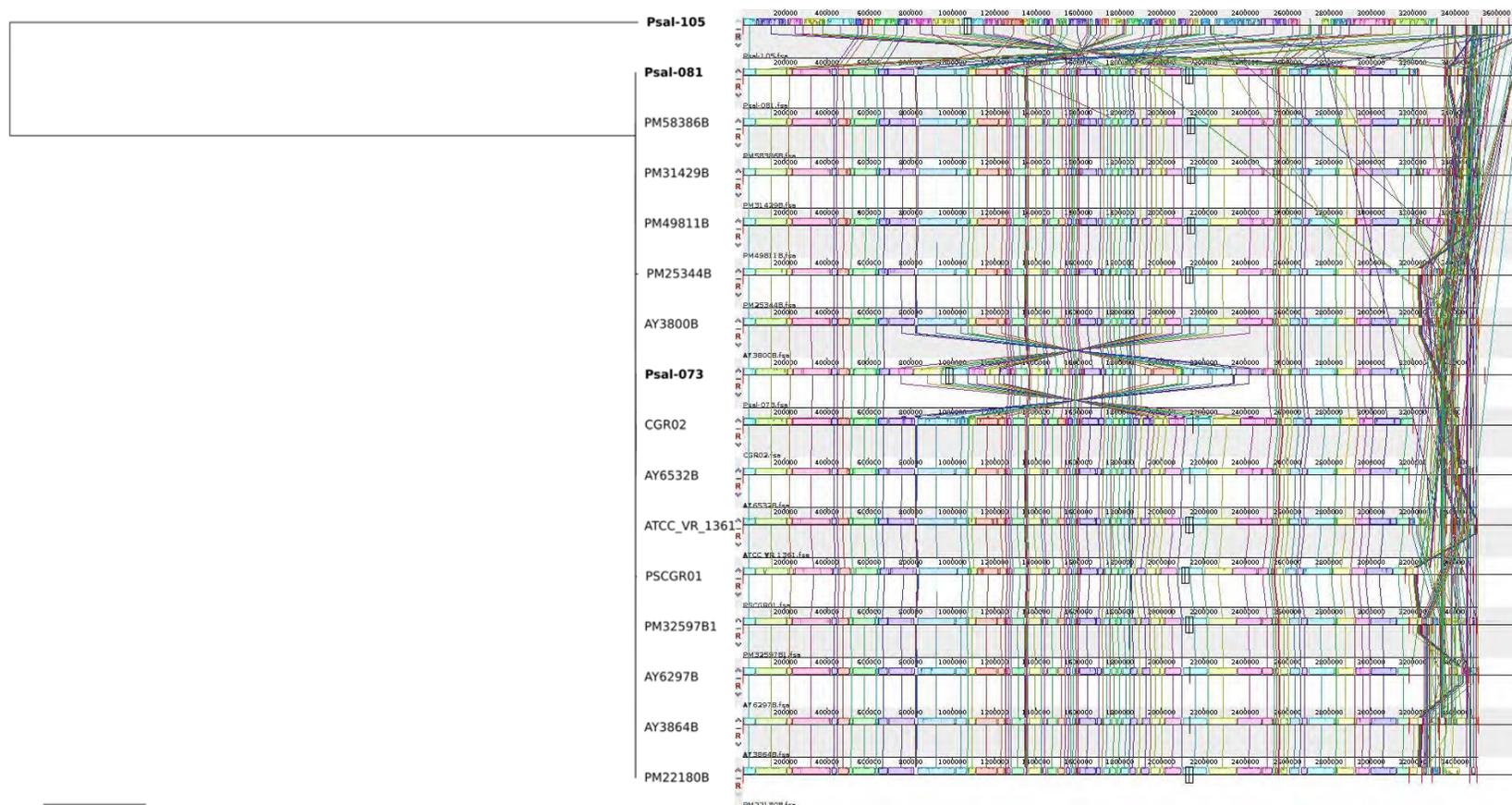


Figura 17. Sintenia de genes del aislado noruego Psal-105 y dentro del genogrupo LF. Alineamiento Múltiple realizado con Mauve.

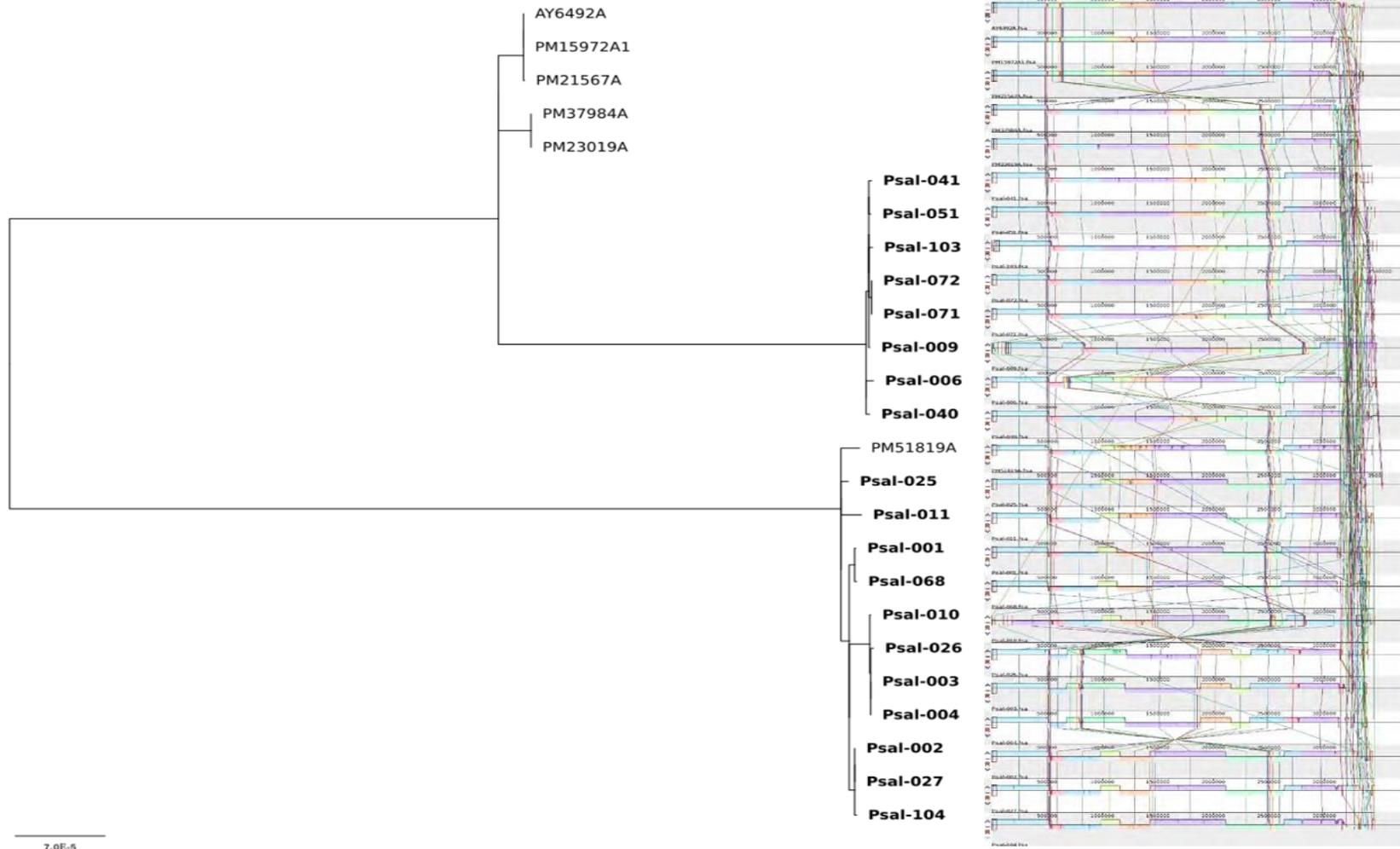
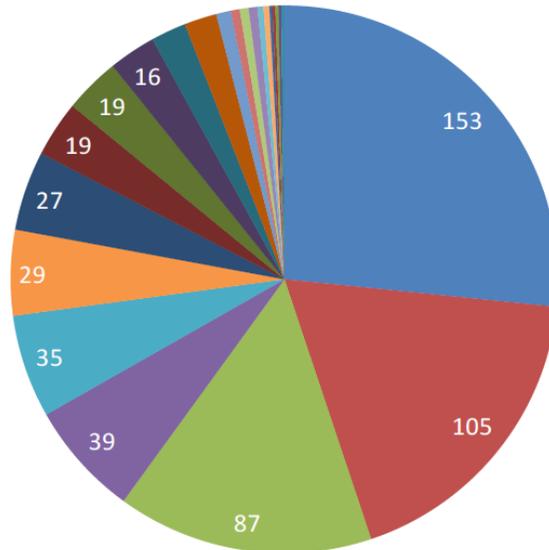


Figura 18. Sintenia de genes dentro del genogrupo EM. Alineamiento Múltiple realizado con Mauve.

El análisis del coregenoma de *P. salmonis* indica la presencia de un alto número de secuencias de transposición, tomando como ejemplo el aislado de referencia ATCC_VR-136, un análisis con Prokka da como resultado 575 transposasas clasificadas en 23 grupos (figura 19), como características particulares, son secuencias bastante similares, con una ubicación bastante conservada dentro de los genogrupos, y que en general llevan genes de función no determinada.



Total: 575

Figura 19. Clasificación de transposasas para el aislado ATCC_VR-1361

La presencia del alto número de transposasas sugiere la posibilidad de recombinación entre aislados, para corroborarlo se realizó un análisis detallado con Splitstree (Huson and Bryant 2006) para ver la estructura interna de cada genogrupo. Se pudo observar que cada genogrupo se conserva internamente y no existe recombinación entre los tres grupos, LF, EM y el aislado noruego; mientras que si existe recombinación al interior de cada grupo. Esto puede observarse en el árbol generado que se encuentra en la parte central de la figura 20, donde los tres genogrupos están claramente separados y no existen interconexiones entre ellos, mientras que al observar la estructura generada para cada subgrupo, observada en cada recuadro que corresponde a una magnificación de las ramas, se ven interconexiones lo que genera un patrón de tridimensionalidad que indica correlaciones entre los diferentes aislados, que a su vez indica recombinación entre ellos. como puede verse la diversidad es mayor en el genogrupo EM, indicando una mayor recombinación dentro de este grupo, lo cual puede deberse también a la diferencia en el número de aislados entre los dos genogrupos.

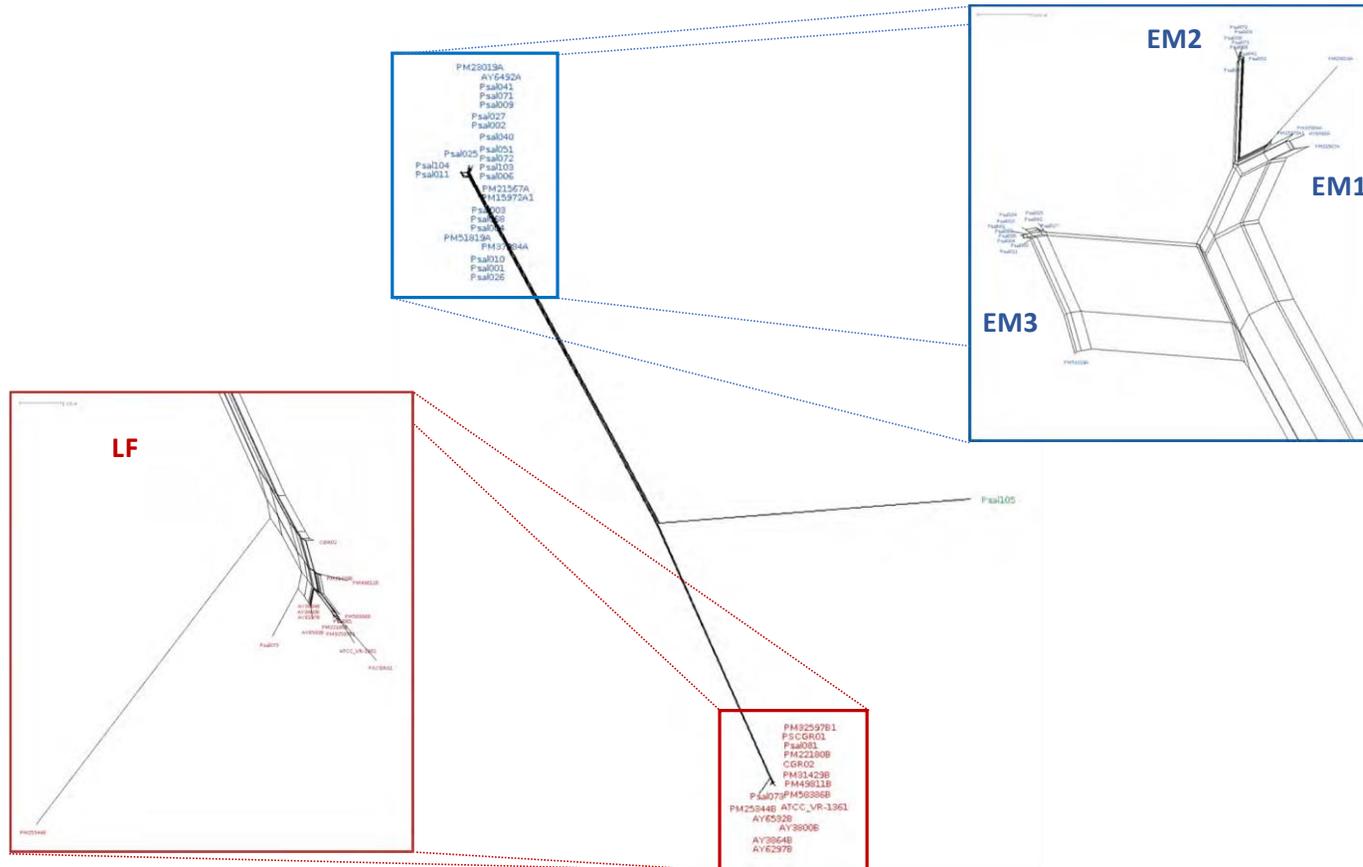


Figura 20. Splitstree generado para los aislados de *P. salmonis*. En el centro está el árbol generado para los tres subgrupos, el aislado noruego (verde), EM (azul), LF (rojo) y los recuadros indican la estructura interna de las ramas correspondientes a EM y LF.

Finalmente se realizó un análisis de acoplamiento estocástico T-distribuido mejor conocido por su nombre en inglés t-distributed stochastic neighbor embedding o t-SNE, para determinar el contenido de genes en cada uno de los grupos y establecer si los grupos generados se deben a correlaciones al azar o no. Como puede observarse en la figura 21, los grupos difieren claramente en el contenido de genes, lo que establece que estos no son grupos formados por correlaciones al azar.

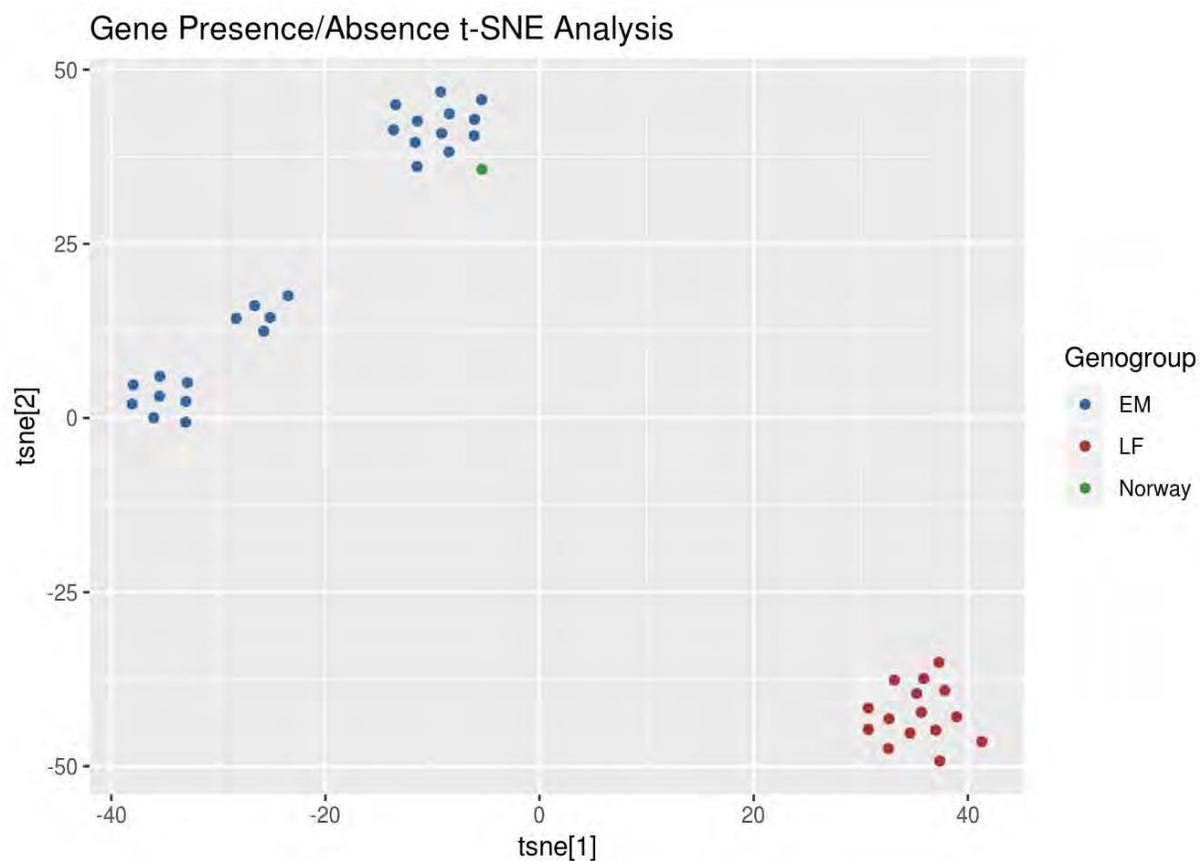


Figura 21. t-SNE Análisis para el contenido de genes dentro de los genogrupos.

Para tratar de establecer los mecanismos responsables de la evolución dentro de estos genogrupos, se realizó un análisis de t-SNE considerando tres parámetros que pudieran ejercer la presión para generar la divergencia:

- A. Localización geográfica de los aislados
- B. Especie hospedera
- C. Año de aislamiento

Según se puede apreciar en la figura 22 ninguno de estos tres parámetros explica la divergencia entre los grupos, o el posible mecanismo evolutivo. Debemos anotar que existen aún varios sesgos en el análisis, el primero de ellos la falta de metadatos para los aislados, el segundo la diferencia en el número de aislados de cada genogrupo, con solamente un aislado no chileno en este momento (Psal-105) y un bajo número de aislados del genogrupo LF.

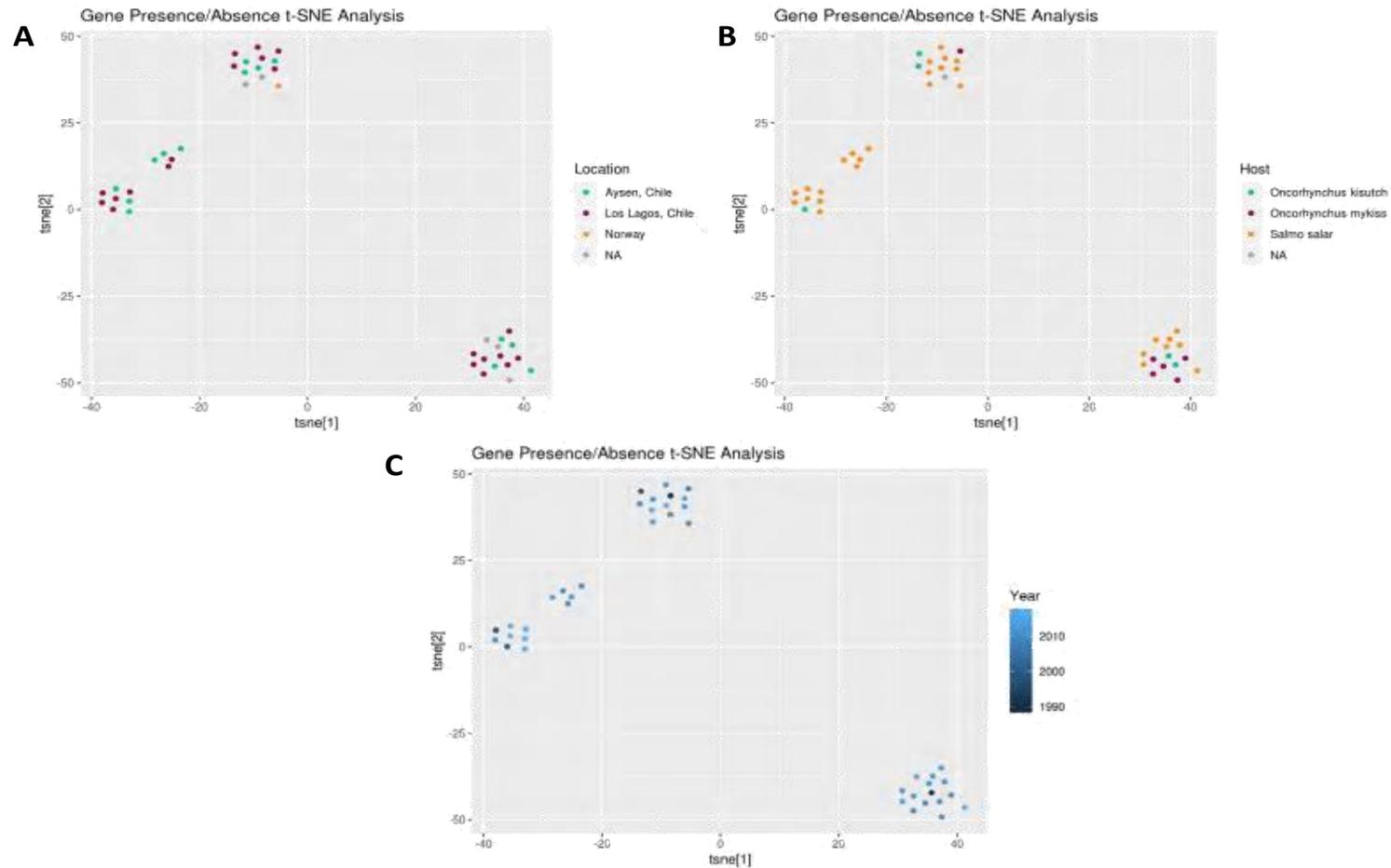


Figura 22. t-SNE análisis del contenido de genes de acuerdo con A. Localización geográfica. B. Especie hospedera y C. Año de aislamiento.

El análisis funcional del genoma se inició utilizando el software proteinotho (Lechner et al 2011) para la determinación de secuencias únicas codificantes y el software desarrollado por el grupo del Doctor Overmann UpSet-Graph para la visualización de los resultados.

El análisis inicial indica grandes diferencias en el número de secuencias codificantes, con el aislado noruego versus los genogrupos EM y LF (figura 23).

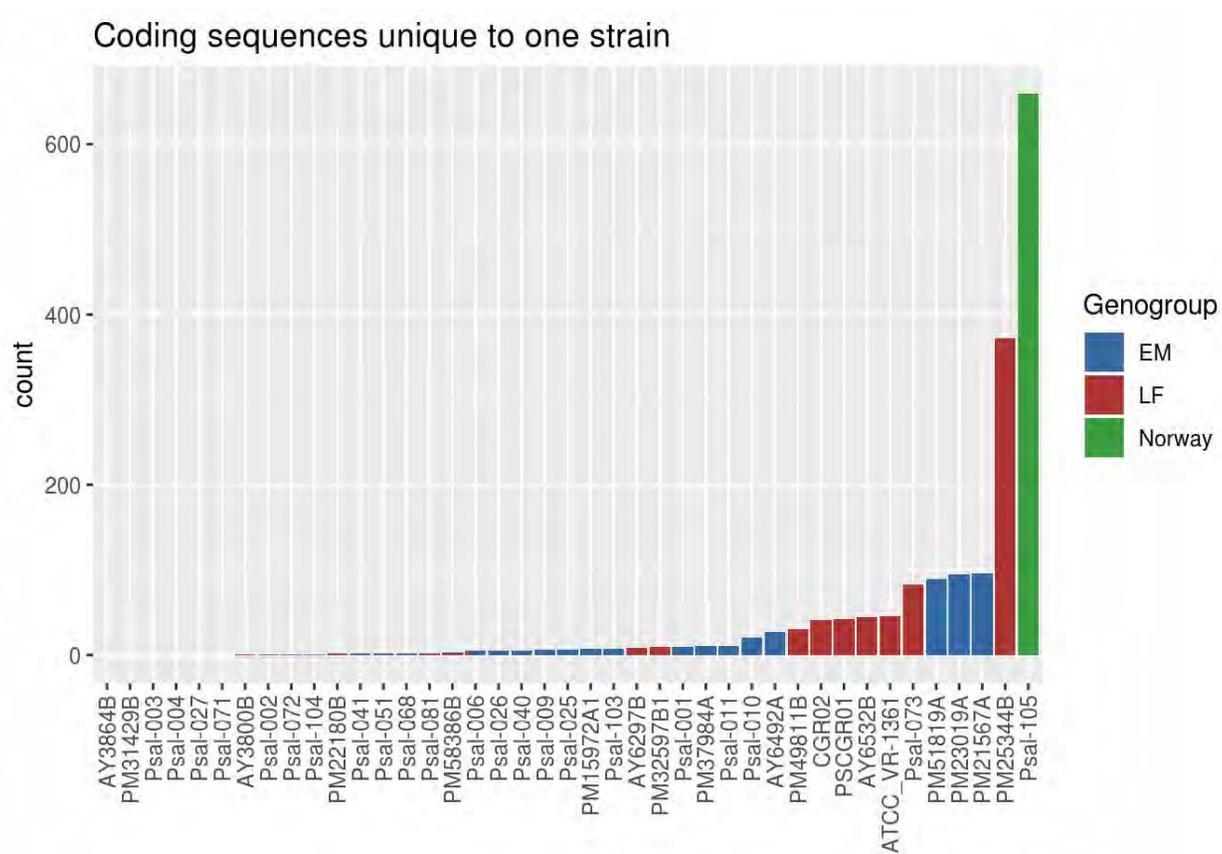


Figura 23. Secuencias codificantes únicas por genogrupos y para cada aislado de los 41 analizados.

En el Upset-Graph cada genogrupo está caracterizado por un color, rojo oscuro para el genogrupo LF, verde para el aislado noruego, y azul para el genogrupo EM. En las gráficas generadas, cada línea identifica un aislado y las columnas indican las proteínas determinadas. La presencia de la proteína se indica por un punto del color correspondiente.

El Upset-Graph obtenido a partir del análisis del coregenoma con proteinortho se puede ver el número total de genes únicos para cada genogrupo, individualizados para cada uno de los aislados (figura 24). Se tiene un coregenoma de 1862 genes, 659 secuencias codificantes únicas para el aislado noruego, 293 secuencias codificantes únicas para el genogrupo LF y 189 para el genogrupo EM. Como ejemplo del nivel de detalle que se logra, en la figura 25 se ven los genes únicos para los tres subgrupos dentro del genogrupo EM, con 80 secuencias únicas para EM3, 52 para EM2 y 19 para EM1.

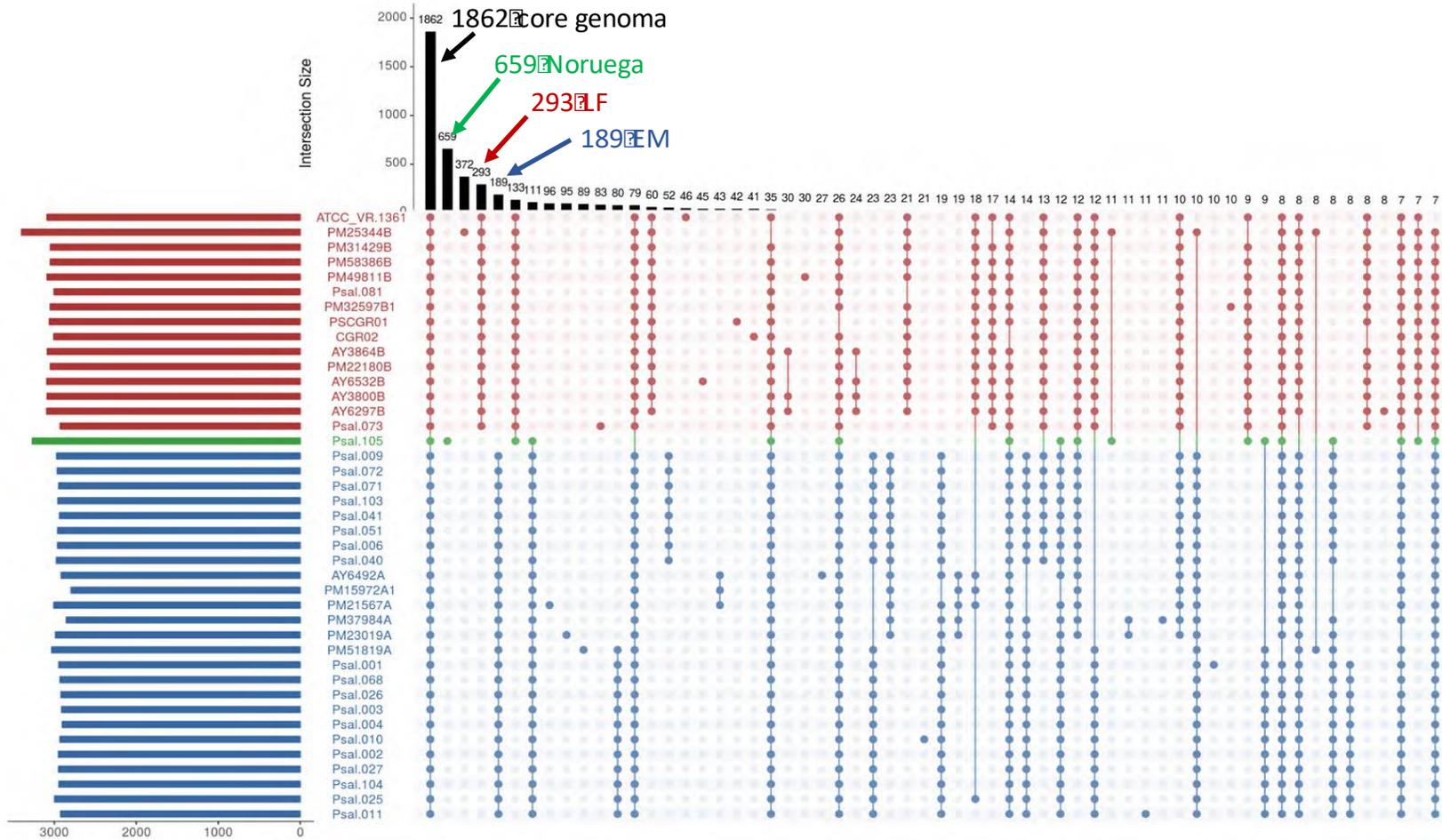


Figura 24. Upset-Graph para las secuencias codificantes de los 41 genomas analizados. Cada línea indica un genoma y cada columna corresponde a una secuencia codificante. La presencia de la secuencia se indica por un punto del color correspondiente a cada genogrupo.

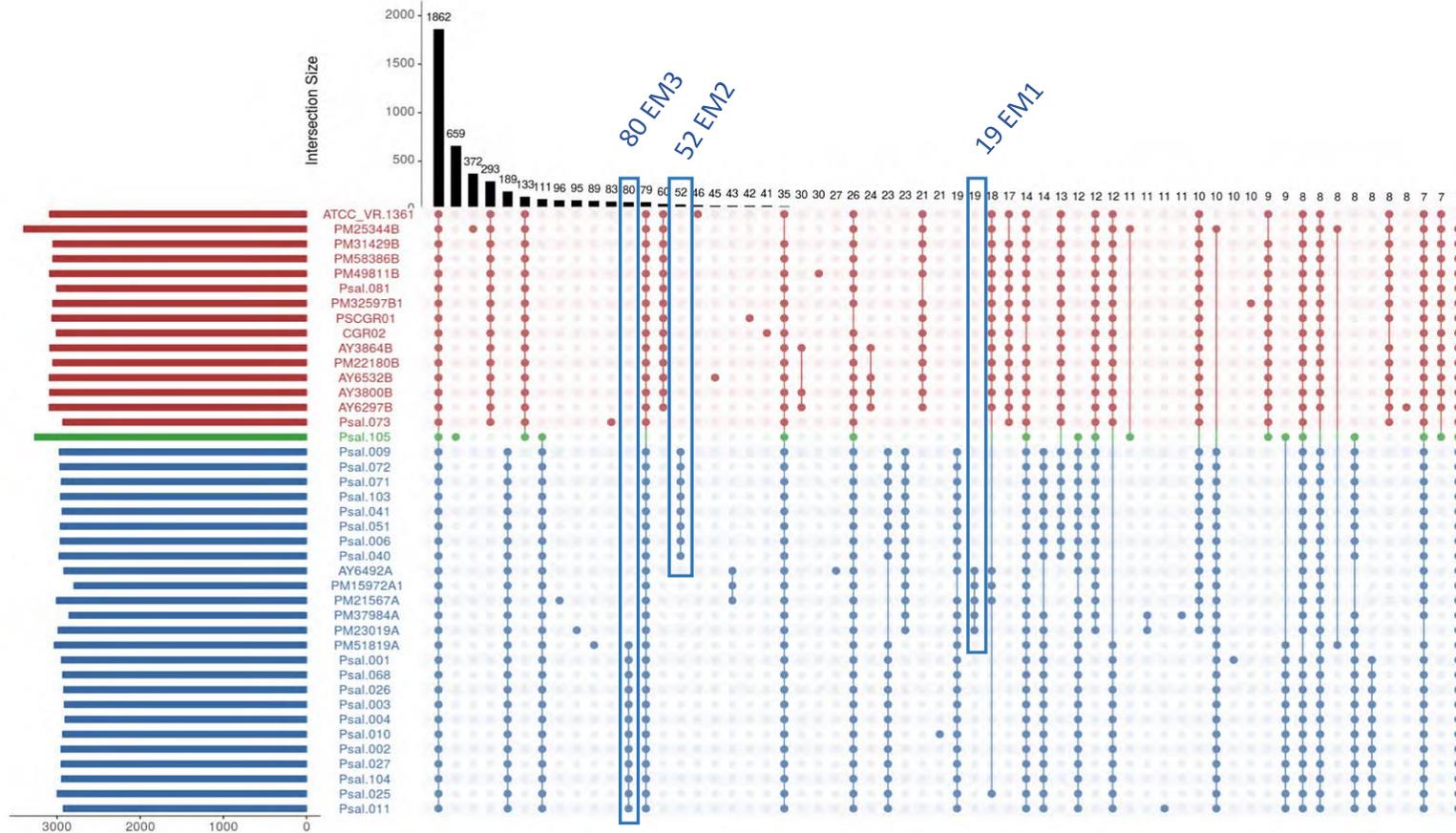


Figura 25. Upset-Graph indicando las secuencias únicas para los tres subgrupos del genogrupo EM.

Adicionalmente los genomas cerrados de los 41 aislados de *P. salmonis* fueron analizados a través de la base de datos VFDB (“Virulence Factors DataBase”) (Liu et al., 2018), para la determinación de los factores de virulencia y patogenicidad. El análisis inicial de los factores de virulencia, arrojó más de 300 coincidencias para cada aislado, con un valor E menor de 1E-30, y una identidad >30%. Para acotar los resultados

se tomaron solo los hits más significativos con identidad mayor del 60%, estos resultados se muestran en las figuras 26 y 27. Como puede verse en todos los aislados se encuentra un número alto de coincidencias, con algunas diferencias entre los tres genogrupos, siendo el genogrupo LF el que presenta mayor número de factores de virulencia (17).

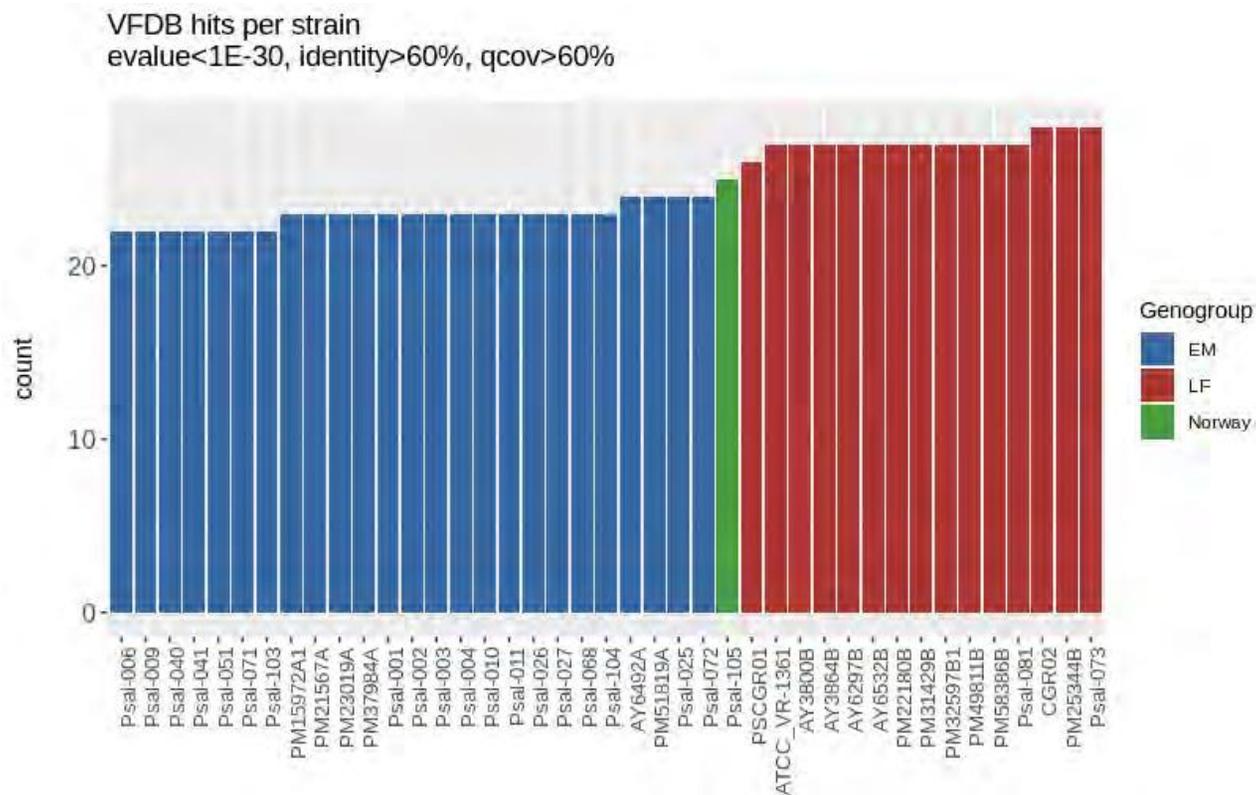


Figura 26. Genes de virulencia determinados en la base de datos VFDB, por cada aislado con una identidad mayor del 60%.

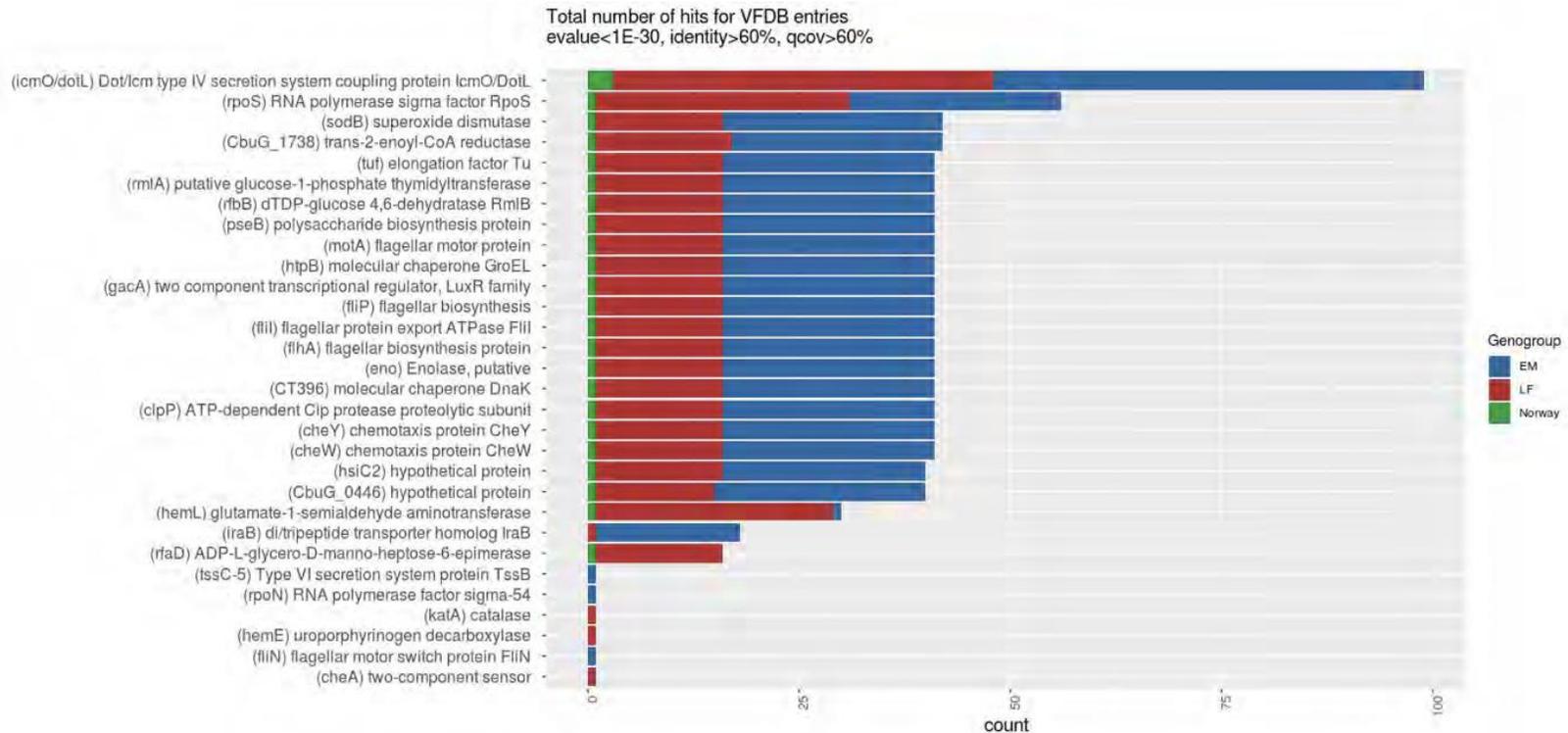


Figura 27. Proteínas de virulencia determinadas en la base de datos VFDB para cada genogrupo.

Dentro de las proteínas determinadas como factores de virulencia, las proteínas relacionadas con el sistema de secreción tipo IV constituyen el grupo principal para los tres genogrupos, específicamente el sistema Dot/Icm (figura 27). Un análisis de este sistema dentro de los genogrupos a través de un árbol filogenético realizado con las secuencias concatenadas de los genes correspondientes (*dotA*, *dotB*, *dotC*, *dotD*, *icmC*, *icmE*, *icmG*, *icmJ*, *icmK*, *icmO*, *icmP*, *icmV*, *icmW*) revela que existe diferencia a este nivel dentro de los tres genogrupos, con la presencia de 2 sistemas de genes *icm/dot* en el genogrupo EM, y 3 sistemas en el genogrupo LF y en el aislado noruego (figura 28).

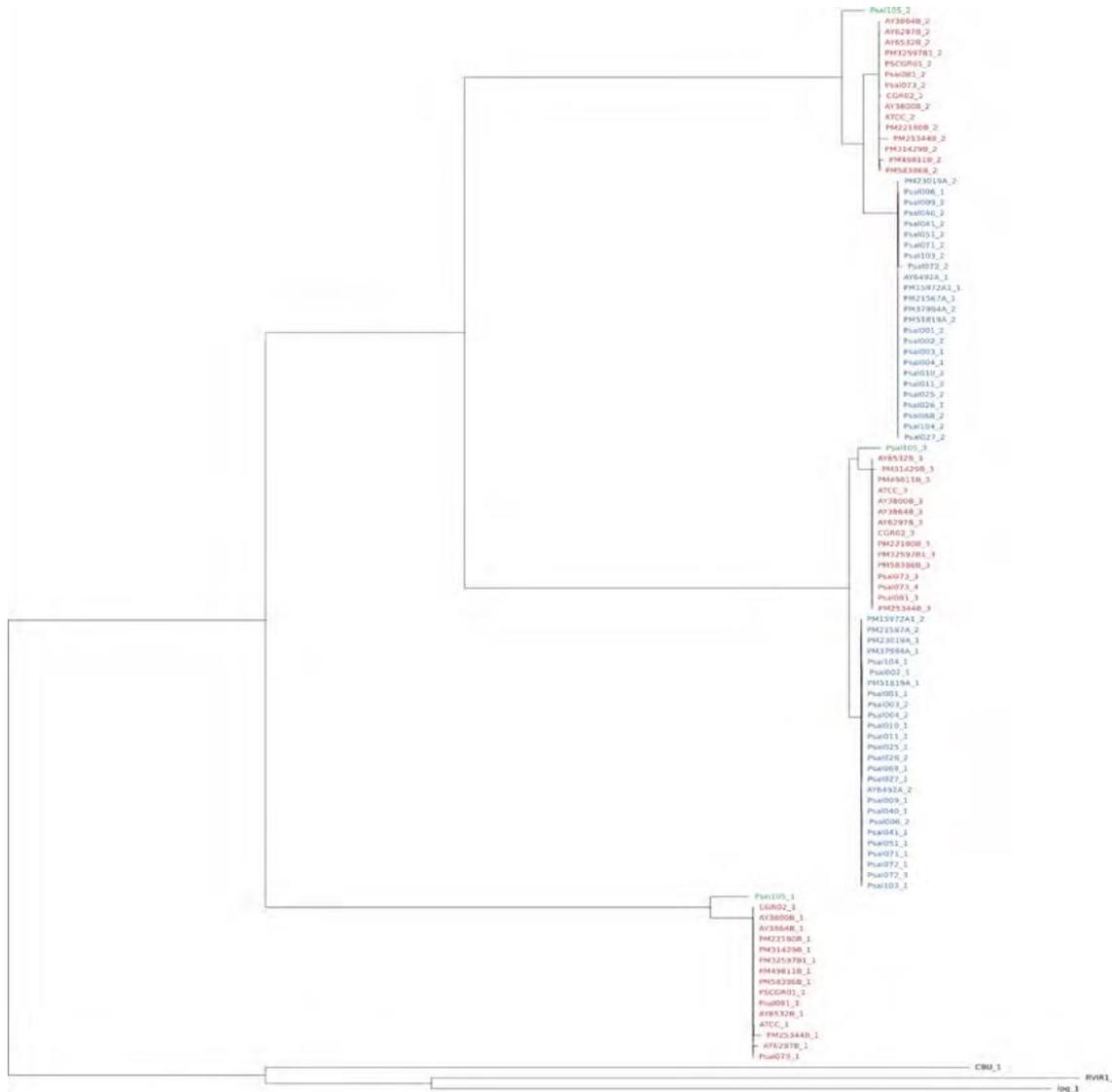


Figura 28 Árbol filogenético de las secuencias concatenadas de los genes del sistema *icm/dot*. En verde se indican los correspondientes al aislado noruego, rojo oscuro genogrupo LF y azul genogrupo EM.

Complementariamente se realizó el análisis del mobiloma, en términos de la presencia de plásmidos en los 41 aislados analizados. Se encontraron en total 166 elementos extracromosomales, la mayoría de estos con tamaños que oscilan entre 3000 a 20000 pares de bases. La mayoría de los aislados poseen 4 elementos extracromosomales, y el aislado noruego presenta 7 elementos extracromosomales.

4. Taller de cierre y difusión de resultados.

Para finalizar el presente estudio se realizó con fecha 06 de diciembre de 2018, en dependencias del Hotel Enjoy, específicamente en el salón Tronador, ubicado en la ciudad de Puerto Varas, un taller de difusión de resultados, el cual contó con la valiosa presencia de nuestro asesor internacional, el Profesor Doctor Jörg Overmann representante del DSMZ, quien dio una charla magistral donde presento los resultados y avances en la caracterización del genoma de *P. salmonis*. Asimismo, asistieron al evento representantes del Estado, a través de Sernapesca, los laboratorios pertenecientes a la Red de Sernapesca, la asociación de salmonicultores INTESAL y la industria.

En dicho taller nuestro laboratorio junto con el laboratorio de la UACH presentó los resultados obtenidos en este proyecto. Asimismo, se dio pie para la discusión de estos resultados y el eventual seguimiento que tiene que realizarse de estos.

A continuación, se muestra la invitación del taller, incluido el programa del mismo.



En el marco del Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura en específico el proyecto FIE 2015-V014 el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura en conjunto con la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso tienen el agrado de invitar a Usted a un taller de difusión de resultados.

WORKSHOP

Difusión de Resultados

Programa Para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura

“BASES TÉCNICAS PARA LA CONSOLIDACIÓN DE UN CEPARIO NACIONAL DE PISCIRICKETTSIA SALMONIS DEBIDAMENTE CARACTERIZADO”

El evento se realizará el jueves 6 de diciembre de 2018, desde las 14:30 horas en el salón Tronador del hotel Enjoy de Puerto Varas, ubicado en KLENNER 349, PUERTO VARAS, CHILE.

Esperamos contar con su valiosa presencia.



Se ruega confirmar asistencia realizando su inscripción en el link incorporado en el correo electrónico

Programa Workshop

14:30 – 14:45	Acreditación
14:45 – 15:00	Palabras de Bienvenida e introducción FIE 2015-V014
15:00 – 15:40	Presentaciones PUCV
15:40 – 16:20	Presentaciones UACH
16:20 – 16:40	Coffe
16:40 – 17:40	Presentación Prof. Dr. Jörg Overmann: “Population genomics of <i>Piscirickettsia salmonis</i> - recent advances, remaining knowledge gaps, and future perspectives”.
17:40 – 18:00	Peguntas y coctel de cierre



8. Conclusiones

Con la información acumulada sobre la diversidad de *P. salmonis*, consideramos que este más que un proyecto con fecha de término, constituye *per se* un Programa que debe subsistir en el tiempo para poder contribuir al conocimiento cabal de la biología y epidemiología de un microorganismo que a todas luces está en pleno proceso de adaptación al medio chileno.

1. Hoy en día el Cepario Oficial lo constituyen 194 aislados disponibles para el público, los cuales en su mayoría se encuentran debidamente caracterizados, incluyendo 55 de ellos que presentan su genoma cerrados.
2. Se cumplió con el compromiso de complementar el cepario con a lo menos 10 nuevos aislados para el año 2018, los que actualmente se encuentran debidamente caracterizados.
3. El Cepario como servicio público, ha comenzado a responder a solicitudes fundamentadas de entrega de aislados, con 16 de ellas concretadas durante el año 2018, totalizando un número de 64 aislados transferidos.
4. La secuenciación obtenida de los aislados mencionados anteriormente nos permitió realizar los respectivos alineamientos genómicos que nos permitieron realizar los análisis de MLSA y luego de MLST para una selección de ellos generando así los correspondientes árboles filogenéticos para cada uno de los genes involucrados, todos ellos demostrando la siguiente tendencia:
 - a. Para el genogrupo EM-90, la clara presencia de 2 subgrupos (a excepción del gen *mfd*), no así para LF-89 donde solo se ve un solo gran grupo.
 - b. Para el aislado Psal-105 proveniente de Noruega, queda fuera absolutamente de los dos genogrupos chilenos, lo que sugiere que en Noruega pudiera existir un genogrupo o línea genética diferente al de las variantes de *P. salmonis* chilenas.
5. El análisis de pan y coregenoma, incluyendo similitud, sintenia, recombinación y contenido de genes entre los aislados analizados, sugiere que existirían a lo menos tres especies (por el momento genogrupos) de *Piscirickettsia salmonis*.
 - a. Dentro del genogrupo EM se observan 3 subgrupos estables a diferencia de lo que se observa en el genogrupo LF, el cual, en primera instancia, pareciese haber un solo grupo, sin embargo, esta definición requiere la inclusión de más aislados para ampliar la diversidad.
6. Lo anterior involucra la necesidad de incluir en el análisis, nuevos aislados provenientes tanto de otras latitudes (no chilenos), como del genogrupo chileno LF, para ampliar la diversidad y realizar un análisis más profundo de los genogrupos, lo que justifica el Programa sugerido en nuestra primera conclusión.
7. Los tres puntos anteriores son un claro indicador que podrían existir especies diferentes entre las variantes de *P. salmonis* a nivel global.

8. Hasta el momento, con la información disponible, consideramos arriesgado establecer un mecanismo que pueda explicar la evolución de *P. salmonis* en nuestro país, incluyendo ubicación geográfica, adaptación a un huésped específico, o evolución en el tiempo.
9. Con las nuevas tecnologías de secuenciación existentes y disponibles hoy en día en términos de precios, rapidez y base de datos ya generadas, y basado en los resultados obtenidos MLSA y MLST que no aportaron información relevante sobre la diversidad del agente, concluimos que la secuenciación completa de nuevos genomas sea la estrategia experimental a seguir.

9. Anexos

1. Catalogo Cepario *Piscirickettsia salmonis* versión diciembre 2018_v2
2. Formulario de Solicitud de Aislado
3. Solicitud de Aislados (PUCV)
 - a. Jaime Romero_1
 - b. Marcos Rozas
 - c. Rubén Avendaño
 - d. Carolina Asencio_1
 - e. Carolina Asencio_2
 - f. Carolina Asencio_3
4. Solicitud de Aislados (UACH)
 - a. Derie Fuentes_1
 - b. Alex Romero
 - c. Derie Fuentes_2
 - d. Derie Fuentes_3
 - e. Derie Fuentes_4
 - f. Derie Fuentes_5
 - g. Jaime Romero_2
 - h. Rubén Avendaño
 - i. Javier Barros
 - j. Alejandro Yañez
5. Convenio DSMZ
6. Genoma cerrado Psal-081
7. Genoma cerrado Psal-098
8. Genoma cerrado Psal-099
9. Genoma cerrado Psal-103
10. Genoma cerrado Psal-104
11. Genoma cerrado Psal-105
12. Genoma cerrado Psal-109
13. Genoma cerrado Psal-111
14. Genoma cerrado Psal-160
15. Genoma cerrado Psal-182
16. Genoma cerrado Psal-008
17. Genoma cerrado Psal-028
18. Genoma cerrado Psal-106
19. Genoma cerrado Psal-107
20. Genoma cerrado Psal-108
21. Genoma cerrado Psal-110
22. Genoma cerrado Psal-113
23. Genoma cerrado Psal-114
24. Genoma cerrado Psal-117
25. Genoma cerrado Psal-133
26. Genoma cerrado Psal-134
27. Genoma cerrado Psal-135
28. Genoma cerrado Psal-137
29. Genoma cerrado Psal-138
30. Genoma cerrado Psal-139
31. Genoma cerrado Psal-142
32. Genoma cerrado Psal-143
33. Genoma cerrado Psal-148
34. Genoma cerrado Psal-158
35. Genoma cerrado Psal-159
36. Genoma cerrado Psal-161
37. Genoma cerrado Psal-163
38. Genoma cerrado Psal-182
39. Genoma cerrado Psal-

