



# MANUAL OPERATIVO Y ESTANDARIZADO CON LOS PROCEDIMIENTOS PARA EL AISLAMIENTO, CRECIMIENTO Y MANTENCIÓN DE *PISCIRICKETTSIA SALMONIS* EN LABORATORIO.

Proyecto FIE V014  
“PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA”  
SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA

BASES TÉCNICAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN CEPARIO NACIONAL DE  
*PISCIRICKETTSIA SALMONIS* DEBIDAMENTE CARACTERIZADO





**Proyecto FIE V014**

**“PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA CUICULTURA”**

**SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA**

**BASES TECNICAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN CEPARIO NACIONAL DE  
*PISCIRICKETTSIA SALMONIS* DEBIDAMENTE CARACTERIZADO**

**MANUAL OPERATIVO Y ESTANDARIZADO CON LOS PROCEDIMIENTOS  
PARA EL AISLAMIENTO, CRECIMIENTO Y MANTENCIÓN DE  
*PISCIRICKETTSIA SALMONIS* EN LABORATORIO.**

## Índice

Objetivo .....	3
I. Muestreo .....	3
1. Personal .....	3
2. Materiales .....	4
3. Bioseguridad .....	5
4. Procedimiento de Muestreo.....	5
1.4. Selección del centro de cultivo.....	5
1.5. Selección de peces.....	6
1.6. Necropsia .....	7
1.7. Extracción de Órganos .....	7
1.8. Número de muestras a extraer.....	8
1.9. Conservación y traslado de las muestras al laboratorio.....	8
II. Aislamiento de <i>P. salmonis</i> .....	9
1. A partir de peces.....	9
2. A partir de muestras de tejido.....	10
2.1. Inoculación de líneas celulares .....	11
2.2. Siembra en medios de cultivo.....	11
III. Mantenición de <i>P. salmonis</i> en Laboratorio.....	13
1. Criopreservación.....	13
2. Recuperación de <i>P. salmonis</i> criopreservada .....	15
a. En líneas celulares.....	15
b. En medios sólidos libres de células.....	16
c. En medios líquidos libre de células.....	17
4. Liofilización .....	17
IV. Anexos .....	18
1. Protocolo Agar <i>P. salmonis</i> IFOP.....	18
2. Protocolo Caldo <i>P. salmonis</i> IFOP.....	18



## Objetivo

El presente manual tiene por objeto:

- Establecer procedimientos estandarizados que deberán ser aplicados para la extracción, manipulación y obtención de peces, órganos y/o fluidos de peces que serán utilizados como muestras biológicas para el aislamiento de *Piscirickettsia salmonis*.
- Establecer protocolos de técnicas estandarizadas para el aislamiento, crecimiento y mantención de aislados de *Piscirickettsia salmonis*.
- Establecer las medidas de bioseguridad del lugar en el que se realice el muestreo, aislamiento y del personal involucrado.

## I. Muestreo

### 1. Personal

Este manual establece los procedimientos técnicos necesarios para realizar una correcta toma de muestras para el aislamiento de *P. salmonis* y podrá ser utilizado por cualquier profesional del área en forma transversal.

Se tomará como guía los procedimientos establecidos por la LABD/NT1 del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca), sin embargo, algunos aspectos serán modificados.

## 2. Materiales

El muestreador deberá contar con los materiales necesarios para la extracción de las muestras, conforme a la situación e infraestructura disponible para realizar la tarea, poniendo especial énfasis en los materiales necesarios para una correcta trazabilidad, conservación y prevención de la contaminación cruzada de las muestras.

- Materiales para disección
  - a. Guantes desechables
  - b. Pinzas anatómicas y quirúrgicas con dientes de ratón estériles.
  - c. Tijeras romas y con puntas estériles.
  - d. Mangos de bisturíes estériles.
  - e. Hojas de bisturí desechables.
  - f. Bolsas de basura para retiro de material orgánico e inorgánico.
  - g. Bolsas plásticas.
  - h. Alcohol 70°.
  - i. Papel absorbente desechable.
  - j. Depósito con agua limpia.
  - k. Depósito para desechos cortopunzantes.
  - l. Aspersores con desinfectante.
  
- Materiales para la toma, el transporte y mantención de muestras
  - a. Tubos con medio de cultivo.
  - b. Placas con agar.
  - c. Hielera o caja de polietileno.
  - d. Hielo o Gelpack (previamente congelados y desinfectados).
  - e. Gradillas para tubos o láminas de polietileno.
  - f. Cinta adhesiva.
  - g. Bolsas plásticas.
  - h. Asas de siembra desechables o Tómulas de algodón estériles.
  - i. Papel absorbente desechable.
  - j. Depósito con agua limpia.
  
- Materiales para identificación de las muestras
  - a. Plumón de tinta indeleble.
  - b. Cinta adhesiva de papel.
  - c. Baja lengua desechable.

### 3. Bioseguridad

Al momento de realizar un muestreo, el muestreador deberá cumplir con todos los filtros sanitarios dispuestos por el centro de cultivo y solicitar el cumplimiento de las medidas de bioseguridad adecuadas entre una y otra jaula o unidad epidemiológica, tales como desinfección de quiñe, lances, buzos, quechas entre otros.

Si en el centro de cultivo se solicita como medida de bioseguridad, que en la toma de muestras no se utilicen materiales externos al centro externos al centro (bolsas, hielera, etc.), se deberá acceder a tal petición, siempre y cuando éste proporcione los materiales adecuados.



### 4. Procedimiento de Muestreo

#### 1.4. Selección del centro de cultivo.

Para que un centro de cultivo sea objeto de interés para un muestreo de aislamiento de *Piscirickettsia salmonis*, este debe cumplir con algunos requisitos como condición obligatoria y otros requisitos prescindibles.

#### Requisitos obligatorios:

- a. El centro de cultivo debe estar registrado y autorizado por Sernapesca y las autoridades correspondientes.
- b. Debe tener un diagnóstico clínico de piscirickettsiosis y estar corroborado por los resultados de los análisis de algún laboratorio perteneciente a la red de laboratorios de diagnóstico registrados por Sernapesca y autorizado para realizar análisis en el marco del Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-Piscirickettsiosis).

#### Requisitos prescindibles:

- a. El centro de cultivo debe estar relativamente cercano a la ubicación del laboratorio, ya que esto facilita la logística e involucra menor tiempo y dificultad de transporte.
- b. El centro debe contar con la infraestructura y equipamiento adecuado para realizar una buena toma de muestra.
- c. El centro de cultivo debe tener implementado una estrategia de bioseguridad que permita diferenciar distintas unidades epidemiológicas.
- d. En el ideal de los casos los peces a muestrear no deben estar bajo tratamiento antibiótico, pero de ser así el centro de cultivo debe tener identificadas las unidades epidemiológicas que estén recibiendo algún tipo de tratamiento y las fechas de inicio de este.
- e. El centro de cultivo debe estar dispuesto a entregar un mínimo de información epidemiológica para tener los antecedentes de cada aislado que se logre.

#### **1.5. Selección de peces.**

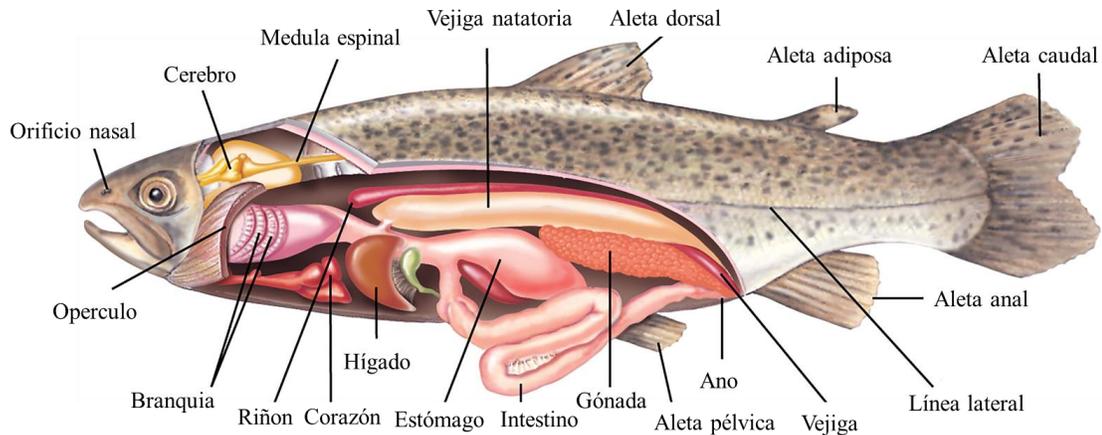
Previo a la selección de los ejemplares de la muestra, se deberá recopilar antecedentes productivos y sanitarios necesarios para la planificación del muestreo y la elección de las jaulas o unidades epidemiológicas. Se deben tomar en cuenta, entre otros, el tipo de centro (engorda o reproductores), las especies cultivadas en él, los porcentajes de mortalidad por unidad epidemiológica o jaula de cultivo en las últimas semanas.

Se deben seleccionar un mínimo de 3 pooles por centro, entre los cuales se privilegiará la extracción de peces orillados, moribundos y desorientados. Si el número requerido de ejemplares no se completa con peces en tales condiciones, se deberá completar la muestra con peces elegidos al azar.

Los peces extraídos deben ser dispuestos en bolsas plásticas debidamente cerradas y rotuladas, con la respectiva identificación de jaula o unidad epidemiológica en forma clara y permanente, asegurando la trazabilidad de las muestras hasta el momento de la extracción de órganos.

## 1.6. Necropsia

Para el procedimiento de necropsia de debe considerar una revisión inicial de las tres regiones corporales: cefálica, caudal y corporal. Además, se incluirá un análisis macroscópico del tegumento, disposición de aletas, cavidad oral, orificios naturales y opérculos. Los órganos internos deberán ser estudiados en forma descriptiva y topográfica (Figura 1). Adicionalmente se realizará un estudio de la región cefálica realizando un corte sagital a nivel del cráneo.

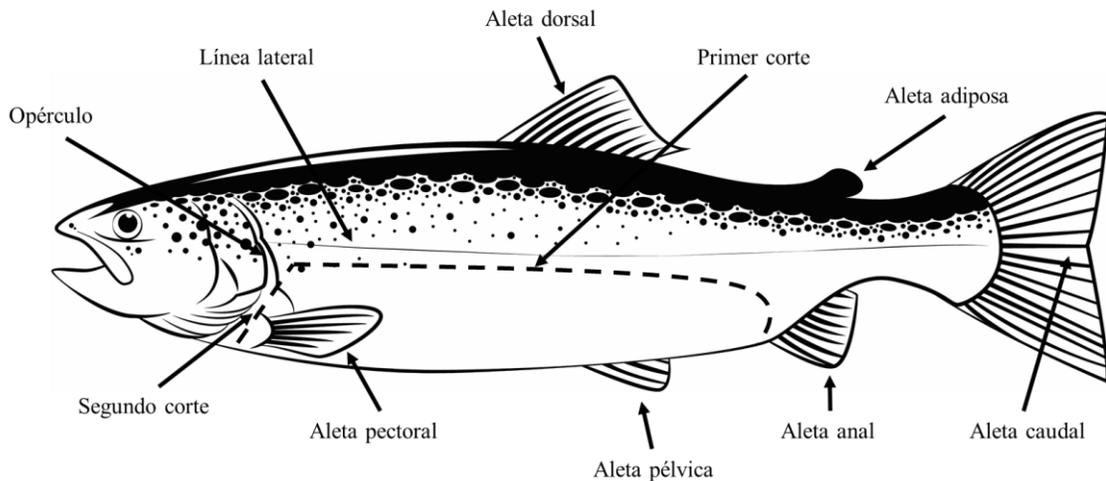


**Figura 1.** Anatomía interna de un pez óseo.

## 1.7. Extracción de Órganos

Una vez seleccionados los peces según las características definidas en los puntos previos, deben ser enviados al laboratorio, lo cual en el ideal de los casos deben ser peces enteros, si esto no es posible, se recomienda que las muestras sean extraídas conforme las siguientes especificaciones. Es obligatorio el uso de guantes durante todo el proceso.

Se debe depositar al ejemplar sobre una superficie desinfectada limpia que contenga un papel absorbente desechable, seco y antideslizante. A continuación, realizar con el bisturí un corte en la zona lateral, paralela a la línea media ventral, desde craneal a caudal; luego realizar un segundo corte desde las branquias hacia la línea media ventral (Figura 2). La muestra de encéfalo será extraída tras cortar la cabeza al nivel del borde posterior del opérculo y apretar lateralmente. En el caso de las cavernas musculares se deberá diseccionar directamente el musculo lesionado hasta los bordes sanos (trozos de 5mm<sup>3</sup>) y si la lesión es muy extensa deberá seleccionarse una región representativa de la lesión observada, en los casos en que estas lesiones presenten exudado sanguinopurulento se deberá, con ayuda de una jeringa hipodérmica sin aguja, tomar al menos 1 ml de exudado y depositarlo junto a la muestra de musculo.



**Figura 2.** Esquema del ingreso a la cavidad abdominal (línea discontinua) para análisis anatomopatológico en un pez con simetría bilateral.

Entre muestras de distintas jaulas o estanques se debe proceder a cambiar todo el material desechable (papel absorbente, guantes, hojas de bisturí, etc.) y limpiar y desinfectar la superficie y el material y el material reutilizable (pinzas, mango de bisturí, etc.)

Si es que no se realiza en el momento el aislamiento directo de *P. salmonis*, se deberá extraer por pez un trozo de hígado, cerebro y musculatura (en el caso de existir lesiones) de 1 cm x 1 cm aproximadamente y depositarlos en un tubo estéril que contenga 5 ml de medio de cultivo sin antibióticos totalmente translucido (que no presente turbidez o flóculos). Las muestras de tejidos deben conservarse a 4 °C o en hielo mientras se procesan y no deben congelarse.

Los restos de peces que queden de la toma de muestra, se debe adicionar al tratamiento de mortalidad del centro o disponer como desecho biológico en el laboratorio.

### **1.8. Número de muestras a extraer**

El número de peces a extraer en cada centro de cultivo deberán considerar un mínimo de 10, pero el número exacto debe definirse de acuerdo a la presentación de la enfermedad en cada centro de cultivo, tomando las precauciones necesarias para asegurar el aislamiento de *P. salmonis* en cada uno de los muestreos.

### **1.9. Conservación y traslado de las muestras al laboratorio**

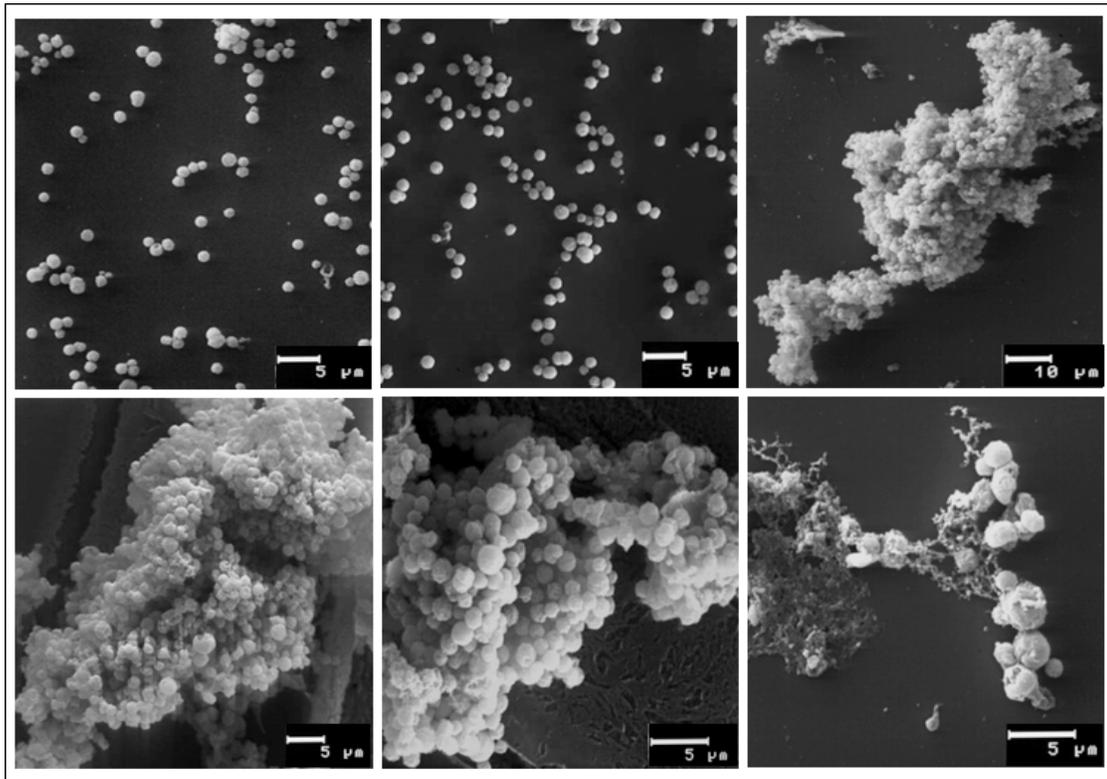
En los casos en que el tiempo que medie entre la toma de muestra y su llegada al laboratorio no supere las 24 horas, las muestras deberán ser mantenidas en condiciones de refrigeración

(4 °C  $\pm$  0.5 °C o inferior) en contenedores adecuados, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío.

Cuando el tiempo que medie entre la toma de muestra y la llegada al laboratorio supere las 24 horas, ya sea en el laboratorio, centro de cultivo o bien en un lugar especialmente habilitado para ello, se extraerán los órganos, con instrumental de disección, y se introducirán en recipientes con medios de cultivo adecuados en las proporciones antes mencionadas y deberán mantenerse refrigerados a 4 °C hasta su llegada al laboratorio.

Las muestras deben ser enviadas de forma tal de asegurar su identificación y dispuestas en un doble contenedor (muestras en bolsas y las bolsas dentro de cajas de polietileno). Los contenedores deberán ser debidamente sellados para evitar su alteración o manipulación, lo que deberá ser minuciosamente chequeado a la llegada al laboratorio.

## II. Aislamiento de *P. salmonis*



### 1. A partir de peces

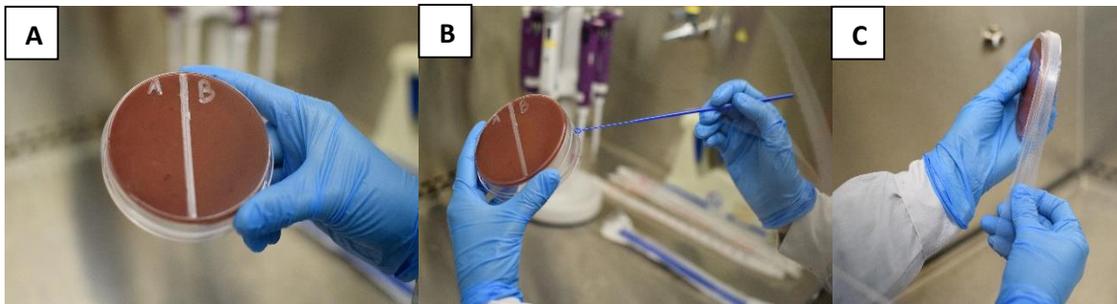
Se debe depositar al ejemplar sobre una superficie desinfectada y limpia que contenga un papel absorbente desechable, seco y antideslizante. A continuación, realizar con un bisturí estéril un

corte en la zona lateral, paralela a la línea media ventral, desde craneal a caudal; luego realizar un segundo corte desde las branquias hacia la línea media ventral (Figura 2).

Los órganos de interés son: hígado, riñón posterior y cerebro. Adicionalmente las lesiones detectables en la musculatura de los peces con sintomatología o de los provenientes de mortalidad fresca. Una vez expuestos los órganos blanco del pez se debe hacer, con una nueva hoja de bisturí, un corte profundo en el tejido y rotar la hoja del bisturí sin retirarla a objeto de formar un pequeño espacio en el cual se introduce el asa de cultivo, rápidamente se elimina el exceso de sangre y se frota sobre la placa de cultivo.

Las muestras deberán ser sembrada usando una técnica aséptica, para ello se deberá tomar la placa con medio y dividir en su parte inferior con un marcador (figura 3A) según el número de órganos que se muestreará por pez, luego de ello y utilizando la técnica de siembra invertida, es decir, tapa hacia abajo y agar hacia arriba, con la menor apertura de la tapa posible ya sea en mechero o en cabina de seguridad biológica se deberá frotar sobre la superficie de la placa con el medio de cultivo (figura 3B), considerar una división de la placa por cada órgano). Luego se deberá sellar la placa con parafilm o en su defecto con huincha aisladora (figura 3C).

El procedimiento anterior es aplicable tanto a medios de cultivo solidos como líquidos libres de células. En este último caso simplemente se sumerge el asa con el inóculo obtenido del órgano blanco y se homogeniza. Posteriormente se descarta el asa en la bolsa de material contaminado.



**Figura 3.** Procedimiento de siembra en placa.

Las placas deben ser correctamente rotuladas, indicando el centro al cual pertenecen, si corresponde a pez con sintomatología o mortalidad fresca y la fecha de muestreo y siembra.

## **2. A partir de muestras de tejido**

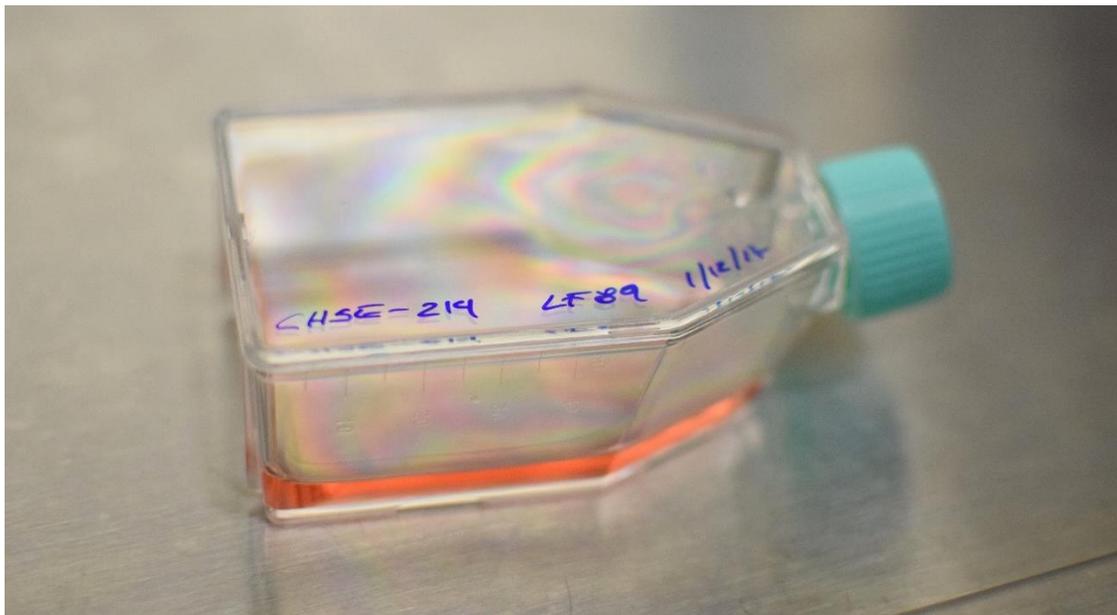
En laboratorio, bajo condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar, el tejido se debe homogeneizar totalmente en una proporción de 1/20 en solución salina equilibrada (PBS) y libre de antibiótico, luego sin centrifugar, diluir nuevamente en 1/5 y 1/50 de PBS libre de antibiótico para inoculación en cultivos celulares.

## 2.1. Inoculación de líneas celulares

Para el aislamiento en cultivos celulares de *P. salmonis* la recomendación a utilizar son las líneas SHK-1 (ECACC 97111106) y CHSE-214 (ECACC 91041114).

Las diluciones finales a usar deben ser de  $10^{-2}$  y una  $10^{-3}$  del órgano homogeneizado, las que deben inocularse directamente (0,1 ml/cultivo) en el medio de cultivo libre de antibiótico recubriendo las células.

Los cultivos deben incubarse a 18 °C durante al menos 10 días para observarse la aparición del efecto citopático (ECP). El ECP de *P. salmonis* consiste en una formación de placas o células redondeadas. Con el tiempo, el ECP avanza hasta destruir por completo las células. Si el ECP no ocurre (excepto en controles positivos) a los 28 días, los cultivos deben incubarse a 18°C durante un período adicional de 14 días.



## 2.2. Siembra en medios de cultivo

Para aislar *P. salmonis* en medios libres de células se debe usar un conjunto de medios disponibles. Para medios sólidos se recomienda el uso de los siguientes:

- Austral-Fe (Yañez et al., 2013. Two novel blood-free solid media for the culture of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Journal of Fish Diseases 36: 587–591)
- Austral-He (Yañez et al., 2013. Two novel blood-free solid media for the culture of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Journal of Fish Diseases 36: 587–591)

- Agar sangre o BCG (Mauel et al., 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. J. Vet. Diag. Invest. 20: 213-214)
- Agar *P. salmonis* desarrollado por IFOP (Anexo 1)

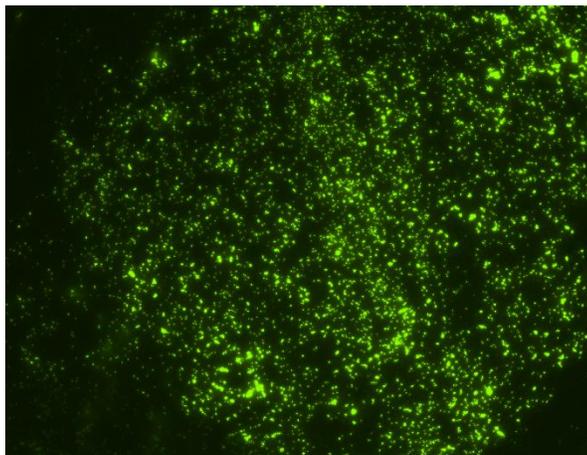
Para los medios líquidos se recomienda el uso de cualquiera de los siguientes:

- BM3 (Henriquez et al., 2013. A Novel Liquid Medium for the Efficient Growth of the Salmonid Pathogen *Piscirickettsia salmonis* and Optimization of Culture Conditions. PLoS ONE 8(9): e71830)
- AUSTRAL-SRS (Yañez et al., 2012. Broth medium for the successful culture of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Dis Aquat Org 97:197-205)
- Caldo *P. salmonis* según la receta que entregó el IFOP a los laboratorios participantes del Ring Test de CIM a antibióticos (Anexo 2)

El tejido se debe homogeneizar a 1/20 en solución salina equilibrada (PBS) y libre de antibiótico, luego sin centrifugar, se toma una alícuota para sembrar por diseminación placas de medios sólidos con asa de Drigalski. En el caso de medios líquidos se toma una alícuota de 1 ml y se agrega a 10 ml de medio.

Las placas deben incubarse a 18 °C durante 72 horas y observar la aparición de colonias que cumplan con tipología de *P. salmonis* (pequeñas, blancas grisáceas con aspecto mucoide). Para el caso de los medios líquidos deben ser incubados durante 72 horas en agitación constante a 100 rpm manteniendo una temperatura de 18 °C, y después repetir la dilución 1/10 en medio fresco, finalmente incubar nuevamente por 72 horas y verificar por espectrofotometría el aumento en la densidad óptica (D.O.) a 600 nm.

En ambos casos el diagnostico debe validarse por medio de métodos de detección (PCR, qPCR o IFAT).



### III. Mantención de *P. salmonis* en Laboratorio

Para la mantención de *P. salmonis* en el laboratorio se debe trabajar siempre en condiciones de asepsia, dentro de una cabina de flujo laminar, procediendo de la siguiente manera dependiendo del caso:

#### 1. Criopreservación



Para criopreservar *P. salmonis* se debe mantener la bacteria en medio líquido (Austral-SRS, BM3 o IFOP) y utilizarla cuando se encuentre en etapa exponencial de crecimiento, según su O.D. a 600 nm entre 0.5 y 0.8. Centrifugar de 3 a 5 ml de bacteria a 4000xg por 10 minutos, eliminar el medio líquido y resuspender el pellet en 930  $\mu$ l de medio L-15 frío<sup>1</sup> suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF) (el cual debe ser preparado en el momento) en un criovial estéril, para luego agregar finalmente 7  $\mu$ l de DMSO frío<sup>2</sup>. Esta solución debe ser inmediatamente almacenada a -20 °C entre 2-3 horas, para luego ser trasladada a -80 °C o a nitrógeno líquido.

Otras alternativas de criopreservación que no requieren centrifugación y se pueden trabajar directamente desde el medio líquido a elección, son el uso de:

---

<sup>1</sup> Se recomienda mantener el medio L-15 suplementado.

<sup>2</sup> Se recomienda mantener el DMSO en hielo durante el proceso, teniendo la precaución de que el DMSO tiene una alta temperatura de congelación.

- DMSO al 10% y SBF al 20%
- Glicerol al 20% y SBF al 20%.

Para lo anterior es necesario obtener cultivos de crecimiento en fase exponencial con D.O. de 0.5 o que sean mayores o iguales a 1 en la escala Macfarland, que corresponde a  $3 \times 10^8$  células por ml aproximadamente, y antes de realizar el procedimiento se deben llevar los cultivos a 4 °C por 20 minutos para estabilizar la temperatura, ya que al momento de finalizar la adición de reactivos para criopreservación se debe dejar inmediatamente el criovial a -20°C *overnight* para posteriormente almacenar en -80°C o nitrógeno líquido.

Para el caso de la utilización de DMSO se depositan 700 µl del cultivo líquido en el criovial y se agregan 200 µl de SBF y 100 µl de DMSO. Y para el uso de glicerol, se depositan en el criovial 600 µl del cultivo líquido y se agregan 200 µl de SBF y 200 µl de glicerol.

Como forma de control de calidad, un mes más tarde uno de los crioviales es descongelado con precaución sobre hielo, se introduce un asa calibrada desechable de 10 µl y se siembra en medio sólido realizando una estría central que divide la placa de cultivo sólido en dos y se realizan estrías simultáneas en forma perpendicular, con la finalidad de poder cuantificar lo obtenido del criovial en unidades formadoras de colonias (Figura 4). A partir del contenido restante del criovial, se agregan 500 µl a 3 ml del medio líquido a elección en un tubo de 50 ml tapa rosca, y se incuba a 18 °C en agitación; los 500 µl finales que quedan en el criovial, son inoculados en botellas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (SHK-1 o CHSE-214 con 80 a 90% de confluencia) donde se deja incubando a 18°C en condiciones estáticas y se monitorea la aparición de efecto citopático diariamente.

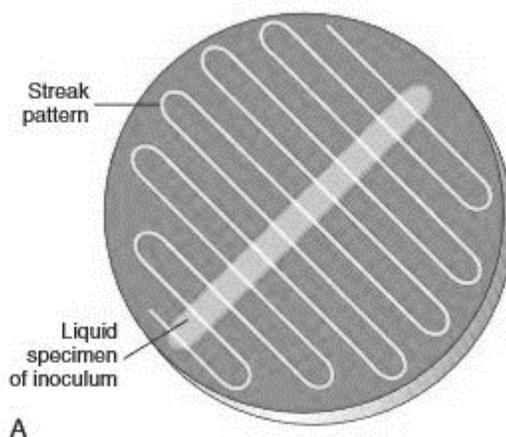


Figura 4. Siembra cuantitativa en medio sólido, con el uso de asa calibrada.

## 2. Recuperación de *P. salmonis* criopreservada



### a. En líneas celulares

Para evaluar el grado de virulencia de la *P. salmonis* criopreservada se debe recuperar en líneas celulares de peces para asegurarse que despierte patogénicamente la bacteria.

Previo al proceso, se debe tener una botella pequeña (25 cm<sup>2</sup>) con la línea celular SHK-1 o CHSE-214 al 80% de confluencia. Descongelar el criovial a utilizar en hielo, sin agitar durante el proceso y depositar todo el contenido en la botella con células a infectar, la que debe tener el mayor volumen de medio permitido.

Dependiendo del grado de patogenicidad de la cepa utilizada, el tiempo que haya estado en -80 °C, la línea celular y la rigurosidad al criopreservar, se debe esperar de 10 a 30 días antes de observar efecto citopático. Durante la espera observar periódicamente las botellas y buscar la presencia de vacuolas con bacterias en movimiento al interior, lo que es un signo de que el protocolo fue realizado correctamente.

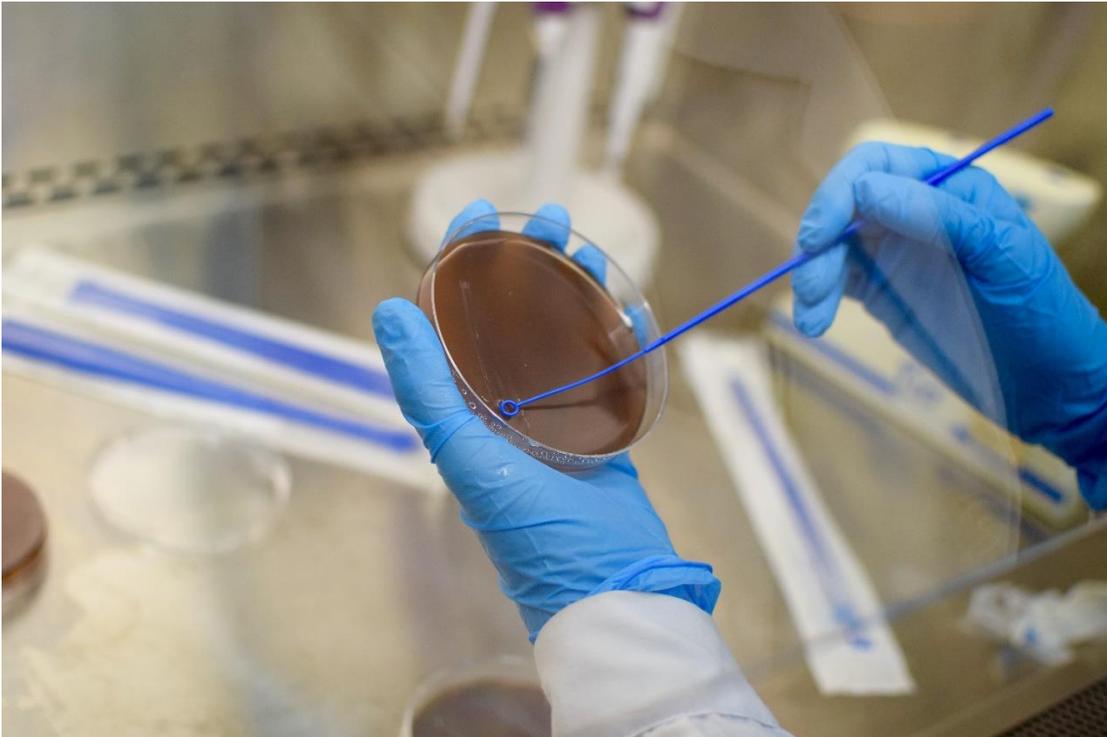
Finalmente, luego de la muerte total de la línea celular, rescatar 1/3 del volumen de la botella, centrifugarlo a 400xg por 10 minutos, eliminar sobrenadante y agregarlos a 5 ml de medio líquido (se recomienda el mínimo) y dejarlo en agitación a 18 °C, debiéndose esperar turbidez de 4 a 10 días. Si esto no sucede volver a rescatar más volumen de la botella con efecto citopático, teniendo la precaución de agregar una pequeña porción de la bacteria a otra botella

para evitar perder todo el proceso. Luego de obtener crecimiento en medio líquido, verificar por Gram e IFAT, un cultivo puro de *P. salmonis*.

**b. En medios sólidos libres de células**

Para recuperar cultivos de *P. salmonis* criopreservados, se debe tomar el criovial y depositarlo inmediatamente en hielo para un descongelamiento controlado, lo que debe ocurrir en pocos minutos. Luego se debe tomar completo el contenido del tubo e inocularlo sobre la placa con agar que se escoja utilizar (agar sangre, agar IFOP, Austral-Fe o Austral-He) y realizar una siembra homogénea usando un asa de Drigalski estéril. Mantener la placa un poco abierta hasta que se observe seca y cerrarla con Parafilm. Incubar a 18 °C por 10 a 14 días, si no se observa crecimiento se debe repetir el proceso.

Para obtener colonias en los cultivos sólidos se debe realizar una siembra en estrías por agotamiento, con un asa de loop estéril, la que puede ser desechable para ser usada dentro de la cabina de flujo laminar, cerrar la placa con Parafilm e incubar a 18 °C. En un periodo de 3 a 5 días de incubación dependiendo de la cepa usada se deben obtener resultados, sin embargo, hasta 10 días post siembra puede haber crecimiento.



### c. En medios líquidos libre de células

Para recuperar aislados de *P. salmonis* criopreservados a medio líquido, se debe proceder de la misma forma anteriormente descrita, pero inoculando completamente el contenido del vial a 10 ml del medio libre de células a usar (Austral-SRS, BM3 o IFOP), e incubar a 18 °C con agitación constante a 100 rpm, manteniendo el tubo de manera horizontal, durante 10 días.

Para obtener cultivos líquidos de *P. salmonis* desde placas de agar, se debe tomar en condiciones de asepsia, con asa de loop estéril una sola colonia o en su defecto una medida del asa (10 µl), e inocular en 3 ml de medio líquido en un tubo de 15 ml, sumergiendo y moviendo el asa hasta homogeneizar. Incubar el tubo de manera horizontal a 18 °C y con agitación a 100 rpm durante 3 días. Luego se puede tomar ese inóculo y escalar en matraces hasta el volumen necesario.



## 4. Liofilización

De acuerdo a las metodologías relacionadas a liofilización, basadas en cambios físicos relacionados a temperatura y presión, evidenciaron no ser favorables para lograr la correcta estandarización de almacenamiento en estado sólido de *P. salmonis*, en donde como consecuencia del procedimiento resultaba en la pérdida del aislado en estudio o la no viabilidad post tratamiento.

## IV. Anexos

### 1. Protocolo Agar *P. salmonis* IFOP

<b>Agar <i>P. salmonis</i> IFOP</b>		
Componentes	1. Agar soya tripticasa 2. Cloruro de sodio 3. D-Glucosa 4. L-cisteína 5. Suero fetal bovino 6. Sangre de cordero desfibrinada 7. Agua destilada	40 g 15 g 10 g 1 g 50 ml 50 ml 900 ml
Preparación	Disolver los ingredientes 1 y 2 en 900 ml de agua destilada, esterilizar por autoclave, dejar enfriar a temperatura ambiente hasta 45°C aprox., agregar la sangre y calentar en microondas, agitando suavemente, hasta obtener un color "chocolate", luego agregar asépticamente los ingredientes 3 al 5.	
Esterilización	121°C / 15 min	
pH final	7,3 ± 0,2	
Almacenamiento y dosificación	En placas petri estériles (25 ml aprox.) a temperatura de refrigeración, hasta su uso. Tiempo máximo de duración: 15 días	

### 2. Protocolo Caldo *P. salmonis* IFOP

<b>Caldo <i>P. salmonis</i> IFOP</b>		
Componentes	1. Caldo soya tripticasa (Merck) 2. Cloruro de sodio 3. D-Glucosa Anhydrous 4. L-cisteína Hidrochloride Anhydrous 5. Suero fetal bovino 6. Agua destilada	25 g 15 g 10 g 1 g 50 ml 950 ml
Preparación	Disolver los ingredientes 1 y 2 en 950 ml de agua destilada, esterilizar por autoclave, dejar enfriar a temperatura ambiente hasta 45 °C aprox. y agregar asépticamente (bajo cámara) los ingredientes 3 al 5.	
Esterilización	121°C / 15 min	
pH final	6,8 ± 0,2	
Almacenamiento	En frascos de vidrio con tapa, a temperatura de refrigeración (4 a 8°C), hasta su uso. Tiempo máximo de duración: 10 días	