

ANEXO Capítulo 1

**“Manual de procedimientos experimentales para
pesquisar fagos contra *Piscirickettsia salmonis*: ¿Cómo
generar una fagoteca?”**

27 de diciembre 2018

Protocolo 1.

Enriquecimiento bacteriófagos de *P.salmonis* en muestras

A) Enriquecimiento de Fagos desde muestras de agua

1. Centrifugar la muestra de agua a 10000 g por 10 min, a temperatura ambiente.
2. Filtrar a través de filtro pirinola 0,2 um de tamaño de poro.
3. Agregar 3,3 mL de muestra de agua filtrada en tubo falcon de 50 mL.
4. Añadir 1,7 mL de medio SRS-Austral 3X.
5. Inocular con 500 uL, de un cultivo saturado de la cepa de *P.salmonis* que se desea encontrar fagos.
6. Incubar con agitación (100 rpm) a 18° C por siete días
7. Centrifugar a 10000 x g por 10 min.
8. Tomar el sobrenadante del cultivo cuidadosamente, y filtrar a través de filtros pirinola 0,2 um de tamaño de poro.
9. Guardar el sobrenadante a 4 °C.

B) Enriquecimiento de Fagos desde muestras de tejidos

1. Hacer macerado con los tejidos de órganos (hígado, bazo, riñón, branquias) en mortero
2. Se transfirieren las muestras maceradas a 5 ml de Buffer SM
3. homogeneizar por vórtex por 30 minutos a 18 °C
4. Centrifugar la muestra a 10000 g por 10 min, a 18°C
5. Filtrar a través de filtros pirinola 0,2 um de tamaño de poro.
6. Agregar 2 mL de muestra filtrada en tubo falcon de 50 mL.
7. Añadir 1 mL de medio SRS-Austral 3X
8. Inocular con 300 uL, de un cultivo saturado de la cepa de *P.salmonis* que se desea encontrar fagos.
10. Incubar con agitación (100 rpm) a 18° C por siete días
11. Centrifugar a 10000 x g por 10 min.
12. Tomar el sobrenadante del cultivo cuidadosamente, y filtrar a través de filtros pirinola 0,2 um de tamaño de poro.
13. Guardar el sobrenadante a 4 °C.

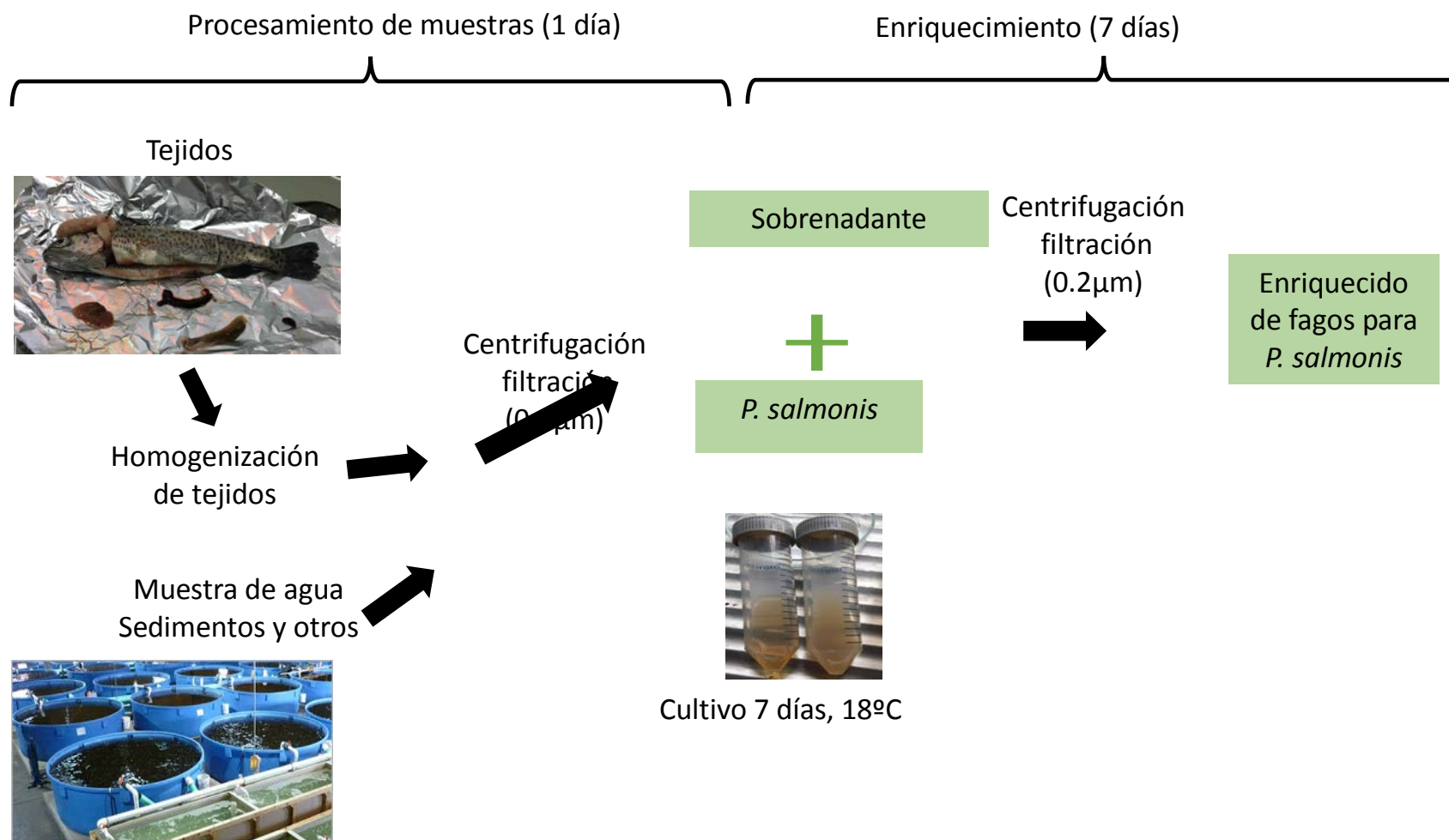


Figura 1. Esquema de procesamiento de muestra y enriquecimiento

Protocolo 2.

Detección de bacteriófagos de *P.salmonis*

A. Detección de fagos por microgota en doble agar

- Agregar en una proporción de 1:1 de un cultivo bien crecido de la cepa hospedera ($OD_{600nm} > 1$) a 2 mL agar blando SRS-Austral (0.7-0.4 %) mantenido a 29° C y mezclar bien (vortex)
- Esparcir sobre placa con agar de base SRS-Austral
- Dejar gelificar por 30 min
- Agregar 5 μ L del enriquecido sobre el agar
- Incubar a 18° C por 7 días

B. Detección de fagos por ensayo de spot

- Se centrifugan 5 ml de Cultivo de *P. salmonis* ($OD_{600nm} > 1$) 4000g x 10 min y se resuspende el pellet en 500 μ l de medio.
- Agregar los 500 μ l de cultivo concentrado *P. salmonis* sobre medio Agar IFOP y espacir uniformemente para formar un césped.
- Dejar secar por 30 min el cultivo sobre la placa
- Agregar 5 μ l del enriquecido sobre el agar

Laboratorio de Biotecnología en Alimentos
Fono: +56 22 9781427
Av. El Líbano 5524 Macul, Stgo.

Protocolo 3.

Aislamiento bacteriófagos de *P.salmonis*

A. Aislamiento de placas de lisis del enriquecimiento

1. Picar con pipeta pasteur una placa de lisis bien aislada y resuspender en 100 μ L de medio SRS-Austral(tubo eppendorf) (Figura 2)
2. Dejar difundir 16 horas a 4° C
3. Centrifugar a 10000 g por 10 min.
4. Tomar sobrenadante y realizar diluciones seriadas
5. Agregar 10 μ L de cada dilución sobre el doble agar
6. Incubar a 18° C, de 7 días
7. Picar con pipeta pasteur una placa de lisis bien aislada y resuspender en 100 μ L de medio SRS-Austral(tubo eppendorf)
8. Repetir desde el paso 2.

B. Aislamiento de fagos por titulación con gota

1. Agregar 1,5 mL de un cultivo bien crecido de la cepa hospedera a 1,5 mL agar blando SRS Austral (0.4 %) mantenido a 29° C (vortex)
2. Esparcir sobre placa con agar de base
3. Dejar gelificar por 30 min.
4. Hacer dilución seriada del enriquecido del fago
5. Agregar 10 μ L de cada dilución sobre el agar
6. Incubar a 18° C, de 7 días
7. Picar con pipeta Pasteur una placa de lisis bien aislada y resuspender en 100 μ L de SRS-Austral (tubo eppendorf)
8. Vortex y dejar difundir 2 horas a 4° C.
9. Centrifugar a 10000 g por 10 min.
10. Repetir desde el paso 1.
11. A 5 mL de medio SRS-Austral inocular con 500 μ L de cepa hospedera e infectar con 500 μ L de sobrenadante obtenido en paso 9 (
12. Incubar con agitación (100 rpm) a 18° C por 7 días
13. Centrifugar 5 mL de los cultivos a 10000g por 10 min.
14. Filtrar el medo a través de una membrana de 0.2 μ m
15. Guardar el sobrenadante del concentrado de fago a 4 °C.

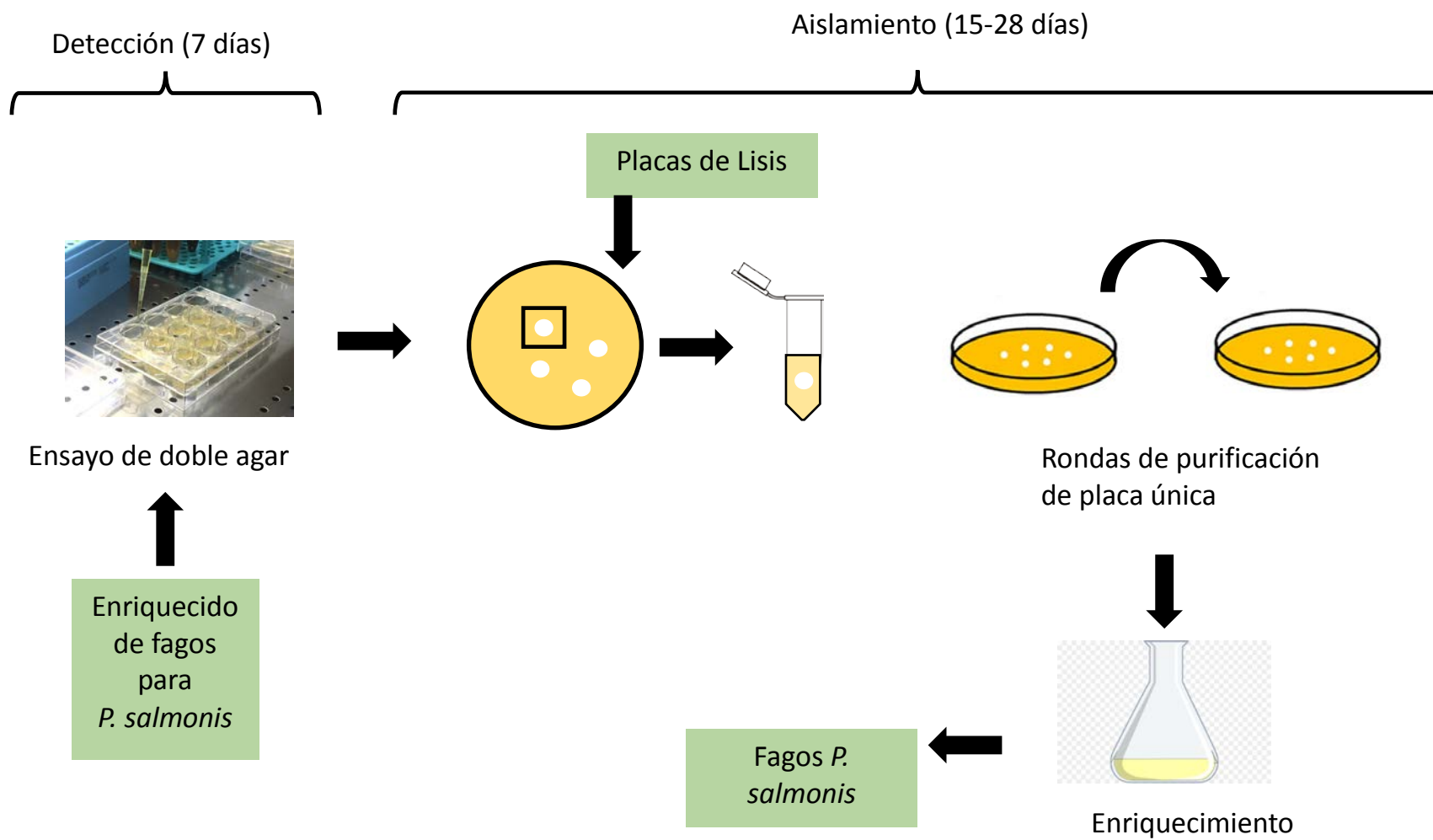


Figura 2. Esquema de detección y aislamiento de fagos de *P. salmonis*

Protocolo 4.

Medios de cultivo *P. salmonis*

Medio Austral SRS Líquido (1 L)

- | | |
|---|-------|
| 1. Caldo triptona de soja | 30 g |
| 2. NaCl | 15 g |
| 3. FeCl ₃ *6H ₂ O | 10 mg |
| 4. L-cisteína | 1 g |
| 5. Suero fetal bovino | 25 ml |

Disolver los ingredientes 1-3 en 900 ml de agua destilada, y esterilizar por autoclave durante 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a temperatura ambiente hasta 45°C aprox. Luego agregar asépticamente los ingredientes 4 y 5.

Medio Austral SRS Sólido

- | | |
|---|-------|
| 1. Caldo triptona de soja | 30 g |
| 2. NaCl | 15 g |
| 3. Agar | 15 g |
| 4. FeCl ₃ *6H ₂ O | 10 mg |
| 5. L-cisteína | 1 g |
| 6. Suero fetal bovino | 25 ml |

Disolver los ingredientes 1-4 en 900 ml de agua destilada, y esterilizar por autoclave durante 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta 45°C aproximadamente y adicionar asépticamente los ingredientes 5 y 6. Luego agregar el agar en porciones de aproximadamente 25 ml a placas de agar estériles vacías. Almacenar placas selladas a temperatura de refrigeración, hasta su uso.

Medio Austral SRS Semi-Sólido

- | | |
|---|------------------|
| 1. Caldo triptona de soja | 30 g |
| 2. NaCl | 15 g |
| 3. Agarosa Low Melting Point | 7,5 g |
| 4. FeCl ₃ *6H ₂ O | 10 mg |
| 5. L-cisteína | 3,5 mg por tubo |
| 6. Suero fetal bovino | 87,5 ul por tubo |

Disolver los ingredientes 1-4 en 900 ml de agua destilada, y esterilizar por autoclave durante 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta 45°C aproximadamente, alicuotar 3 ml en tubos de 15 ml. Mantener tubo a 30°C para evitar gelificación cuando se vaya a utilizar adicionar asépticamente los ingredientes 5 y 6 por tubo.

Protocolo 5.

Detección específica de *Piscirickettsia salmonis* por 16S rRNA PCR-RFLP

1. Amplificación 16s rDNA por PCR

1.1. Extracción del ADN genómico

1.2. Para amplificar el 16S rDNA, se utilizan los primers 27F/1492R.

Nombre Primer	Secuencia (5'→3')	Referencia
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Jiang et al., 2006
1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT	

1.3. Preparar el mix para reacciones de PCR en un volumen final de 25 µl.

Mix Reacción de PCR

GoTaq mix (Promega)	12,5	µl
dNTPs 10 mM c/u	1	µl
partidor 27F µM	1	µl
partidor 1492R µM	1	µl
ADN templado 200 ng aprox	~4	µl
<u>Agua grado PCR</u>	<u>5,5</u>	<u>µl</u>
Volumen final	25	µl

1.4. Amplificar en un termociclador ocupando el siguiente programa:

	Temperatura	Tiempo	
Denaturación inicial	95°C	10 min	
Denaturación	95°C	60 s	
Alineamiento	58°C	30 s	30 ciclos
Extensión	72°C	60 s	
Extensión final	72°C	10 min	

1.5. Los productos de PCR se mantienen a 4°C hasta su uso.

1.6. Los productos de PCR se visualizan en electroforesis en gel de poliacrilamida (8%) y la tinción se lleva a cabo utilizando nitrato de plata.

2. Ensayo PCR-RFLP utilizando HaeIII

1. Se utilizan 1 μl de producto de amplificación de rDNA 16S usando los partidores 27F / 1492R para la digestión usando la enzima de restricción HaeIII (ThermoFisher, Massachusetts, Estados Unidos) durante 2 horas a 37°C.
2. Preparar el mix para reacciones de en un volumen final de 20 μl .

Mix de digestión

Buffer 10X	2	μl
Agua libre de nucleasas	16	μl
HaeIII	0,5-2	μl
ADN templado (0,5 – 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	~1	μl
Volumen final	20	μl

3. Posteriormente se le adiciona 5 μl proteinasa K (1 mg/ml) y se incuba a 37°C durante 30 min
4. Luego para verificar la digestión y comparar los diferentes patrones de bandas, se analizan los fragmentos de restricción cargando 10 μl en un gel de poliacrilamida.

Protocolo para solicitar los depósitos

- Los pedidos se deberán realizar por correo electrónico a la dirección asignada por la colección. En este caso se recomienda akorzen@iitd.pan.wroc.pl utilizando el formulario de petición de cepas, que se presenta al final de este texto. Una vez que haya enviado el formulario, debiera recibirse una notificación por e-mail confirmando que hemos recibido su pedido.
- Se debe comprobar la existencia de la cepa en el Catálogo. Además de las cepas habituales, la colección dispone de Cepas Certificadas y de una selección de cepas a precio reducido con aplicación docente en prácticas de microbiología y para controles de calidad.
- Se debe consultar los Requisitos y Restricciones para el envío de las cepas. Además de acordar el Tipo de Presentación y formularios, de acuerdo a las legislaciones vigentes para el transporte de las mismas. Algunos microorganismos pueden requerir Permiso de la autoridad competente. Por ejemplo, algunos microorganismos comúnmente restringidos son cepas de *Vibrio cholerae*; *Clostridium botulinum*; *Salmonella entérica subsp. enterica serovar Typhi*; *Escherichia coli*.

Formulario de solicitud de cepas/fagos

Laboratorio de Biotecnología – **Informe N° 3** “Desarrollo e implementación de un tratamiento por fagoterapia para el control del patógeno de salmones *Piscirickettsia salmonis*”



UNIVERSIDAD DE CHILE
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos
Doctor Fernando Monckeberg Barros

Identificación de Solicitante/Institución	Date
Dirección	Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAI PAN* ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław 071/ 337 11 72. wew. 353, 372
Teléfono	
ZIP CODE	
REGION	
Objeto de la solicitud	
Nombre de la cepa	
Declaro que tengo las condiciones para trabajar de manera segura con la cepa bacteriana obtenida	
Nombre	Firma

Laboratorio de Biotecnología en Alimentos
Fono: +56 22 9781427
Av. El Líbano 5524 Macul, Stgo.

ANEXO Capítulo 2

“Protocolo para administración de fagos en salmónidos”

Protocolo redactado para administración de fagos en salmónidos: Protocolos para diferentes vías de administración.

A continuación se explicitan los protocolos de administración de fagos. Se evalúa la dispersión y distribución del fago CHOED en la trucha arco iris después de tres métodos de administración diferentes.

Protocolo 1:

Administración de fagos por inyección intracelómico

1. Dividir los peces aleatoriamente en grupos, cada uno compuesto al menos por 24 peces, y mantener en tanques de 60 litros.
2. Los peces con previo ayuno de 24 horas serán anestesiados con MS-222 previo a la inyección.
3. Preparar y mantener el agua del estanque de anestesia bien oxigenada y con una temperatura igual ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) a la temperatura del estanque de donde provienen los peces.
4. Se debe esperar que se haga evidente el efecto del anestésico para luego proceder a la inyección de los peces.
5. Se preparan las jeringas (1 ml) con 200 μl del stock de fago titulado, asegurándose de eliminar las burbujas.
6. Se realiza la inyección intracelómica o forma intraperitoneal, insertando la aguja en la línea medio ventral, un largo de aleta anterior a las aletas pélvicas, con un ángulo de inyección de 90° respecto del vientre del pez. En cada tratamiento, se inyecta un total de 200 μl en la cavidad peritoneal del pez. Se añade el bacteriófago en un título previamente determinado (p.e., 10^8 ufp/pez).
7. Cada pez es transferido de inmediato al tanque original después de la inyección del fago y se mantienen los peces con aireación y recirculación del agua.
- 8.- Durante el experimento la alimentación se mantiene en un orden del 1% del peso diario.

Muestreo

Durante el experimento, se toman 3 peces vivos de cada estanque (controles y tratados). Los tiempos de muestreo comienzan a las 3 h (después de la inyección del fago) y continúan luego 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, días después de la adición del fago. Los peces se sacrifican con una

sobredosis de MS-222 para su posterior análisis.

Protocolo 2:

Administración de fagos por baño

1. Dividir los peces aleatoriamente en grupos, cada uno compuesto al menos por 24 peces, y mantener en tanques de 60 litros.
2. Los peces con previo ayuno de 24 horas serán manipulados sin anestesia.
3. Preparar y mantener el agua de los estanques en los cuales se realiza la inmersión (exposición a fagos) la cual de estar bien oxigenada y con una temperatura igual ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) a la temperatura del estanque de donde provienen los peces.
4. Se trasladan los peces al estanque con bacteriófagos. Los peces serán expuestos a un baño durante 1 hora en 20 litros de agua que contiene bacteriófagos a una concentración previamente titulada (p.e. 10^8 PFU/ml).
7. Transcurrido el periodo del baño, los peces se transfieren de vuelta a sus tanques originales y se mantienen los peces con aireación y recirculación del agua.
- 8.- Durante el experimento la alimentación se mantiene en un orden del 1% del peso diario.

Muestreo

Durante el experimento, se toman peces vivos de cada estanque (controles y tratados). Los tiempos de muestreo comienzan a las 3 h (después del baño) y continúan luego 1, 2, y 3 días. Los peces se sacrifican con una sobredosis de MS-222 para su posterior análisis.

Protocolo 3:

Administración de fagos mediante de alimentación recubiertos con fagos

1. Dividir los peces aleatoriamente en grupos, cada uno compuesto al menos por 24 peces, y mantener en tanques de 60 litros.
2. Alimentar los peces con los alimentos con fagos por los días que dure el ensayo. La alimentación se proporciona en base pesada (ración). Esta ración se agrega al estanque a medida que los peces la van consumiendo.
- 3.- Durante el experimento la alimentación se mantiene en un orden del 5% del peso diario.

Muestreo

Durante el experimento, se toman 3 peces vivos de cada estanque (controles y tratados). Los tiempos de muestreo comienzan a las 3 h después de primera alimentación con fago) y continúan luego 24 y 48 h. Los peces se sacrifican con una sobredosis de MS-222 para su posterior análisis.

A continuación se explicitan los protocolos complementarios relacionados con el procesamiento de las muestras.

Procesamiento de peces y órganos

1. Las muestras de sangre se deben tomar inmediatamente después de ser anestesiados, mediante punción caudal con jeringas con heparina. Para esto se toma 1ml de heparina (5000 UI/mL) con la jeringa y luego se bota para quede impregnada en las paredes. Luego agregar la sangre en tubo eppendorf y agregar 1:50 heparina y buffer SM.
2. Posteriormente, se procede a la disección donde las muestras de órganos (hígado, branquias, bazo, riñón e intestino) se transfieren a tubos eppendorf previamente pesados que contienen 300 µl de tampón SM. Las muestras de los órganos se pesan para permitir una cuantificación del fago.
3. Cada muestra de órgano se muele con un pistilo para Eppendorf, luego se homogeniza en vortex por 10 min.
4. Todas las muestras (sangre, agua y órganos) se centrifugan a 13000 g durante 10 minutos, se toma el sobrenadante con precaución y este se almacena a 4°C hasta su uso.

Detección cuantitativa de bacteriófagos en órganos de peces.

1. El examen cualitativo para la presencia de fagos CHOED en el intestino, bazo, branquias, riñón, hígado y contenido intestinal se lleva a cabo mediante el ensayo de microgota.
2. Se prepararan placas LB-AMS con un césped bacteriano de la cepa hospedera *Vibrio anguillarum*, añadiendo 300 µl de cultivo de *V. anguillarum* en fase de crecimiento exponencial (densidad óptica a 600 nm [OD600], 0,3) a 3,5 ml de agar blando a 45°C (LB-AMS con agar al 0,7%), y la mezcla se vierte inmediatamente en una placa de agar LB-AMS y se deja solidificar por 30 min.
3. Las muestras correspondientes a los órganos homogenizados se centrifugan a 15.000 g durante 5 minutos, y se diluyen de forma seriada con un factor de dilución de diez. Luego 10 ul del sobrenadante y diluciones se añade en duplicado para cada muestra sobre las placas preparadas anteriormente y se incuban a 18 ° C. Las pruebas se consideraran positivas si se observa lisis total o placas únicas en el sitio de la gota en una o más de las muestras por triplicado. El número de placas se cuenta entonces a partir de la dilución donde se pueden contar entre 1 a 30 fagos por muestra de 10 ul.