

INFORME FINAL

**“Desarrollo e implementación
de un tratamiento por fagoterapia para el control del
patógeno
de salmones *Piscirickettsia salmonis*”**

27 de diciembre 2018

Índice

Resumen ejecutivo del proyecto	5
Objetivos	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos	8
CAPITULO 1	9
Introducción	10
Ventajas en Acuicultura	10
Diferenciación de Métodos Actuales.....	11
Fagoterapia: contribución a la gestión sanitaria sin antibióticos.	11
Resultados del aislamiento de fagos.....	13
Obtención de enriquecidos de bacteriófagos contra <i>Piscirickettsia salmonis</i>	13
a) Procesamiento de las muestras	13
b) Enriquecimiento por infección de un cultivo de bacteria hospedera en medio líquido ...	13
c) Detección de fagos por placas de lisis mediante el método de doble agar modificado ...	13
Obtención de lisados.....	15
Aislamiento y clasificación de fagos de <i>Piscirickettsia salmonis</i>.	17
Caracterización molecular y estructural de los bacteriófagos.....	18
(a) Determinación de tipo de ácidos nucleicos.....	18
(b) Estimación de tamaño de genomas de fagos	19
(c) Análisis directo del genoma de fagos con enzimas de restricción (DGREA).....	20
(d) Comprobación de presencia de membranas de fagos.	21
(e) Microscopía electrónica para su clasificación.....	21
Determinación de rango de hospedero de los bacteriófagos sobre <i>P. salmonis</i> y bacterias de la microbiota	24
Estabilización y Depósito de los fagos en colección internacional de microorganismos (fagos y lisados).....	25
H.1.3 Hito Listado de fagos aislados (Fagoteca)	26
H.1.4 Hito Lisados con actividad bactericida enviados a depósito	26
H.1.5 Hito Manual de procedimiento ¿cómo generar una fagoteca?.....	26

Conclusiones	27
CAPITULO 2	28
2.1 Avances del uso de bacteriófagos en salmonicultura	29
2.2 Consideraciones iniciales en métodos de administración de fagos en acuicultura	32
2.3. Evaluación de eficacia de los fagos en desafíos de protección	33
2.3.1 Vías de administración.....	33
Referencia	34
2.4 Protocolo de aplicación de bacteriófagos	37
2.4.1 Preparación y análisis de protocolos a ensayar en peces.....	37
2.5 Diseños determinados para administración de fagos: Protocolos para evaluar distribución y cuantificación de fagos en órganos de salmónidos	38
2.6 Resultados pruebas técnicas de tres vías de administración de fagos en truchas arcoíris	39
2.6.1 Protocolos de administración de fagos ensayados.....	39
Pruebas previas.....	40
Ensayo 1.-.....	40
Ensayo 2.-	40
Ensayo 3.-.....	41
2.6.2 Presencia de fago CHOED en los distintos tipos de muestras según vía de administración.....	42
2.6.3 Cuantificación de fago CHOED en los distintos tipos de muestras según vía de administración.....	43
2.6.4 Análisis de distribución del fago CHOED en el tiempo según vía de administración.....	45
Conclusiones	49
CAPITULO 3	50
Compilación y actualización	51
Compilación para conseguir el Registro de productos en base a Bacteriófagos	51
Descripción del producto para fagoterapia contra el SRS	51
Proceso de Registro:.....	52
Certificados requeridos para el proceso:.....	52
Preparación del Expediente de registro (Dossier de registro):.....	53
Actualización de información en cuanto a de productos en base a Bacteriófagos en el área acuicultura	56

¿Por qué debo usar bacteriófagos en mi producción?	57
¿Son los bacteriófagos peligrosos?	57
¿Hay algún efecto secundario?	57
¿Cuál es el modo de acción?	57
¿Pueden los bacteriófagos afectar el medio ambiente?	57
¿Al agregar conscientemente bacteriófagos al agua, le da la oportunidad de controlar las bacterias con las que están desarrollados para combatir?	57
CAPITULO 4	59
<i>Difusión del proyecto y sus resultados</i>	60
<i>Hito 4.2.....</i>	60
Publicación 1.-	60
<i>Hito 4.3.....</i>	62
Hito Workshop Seminario científico-técnico	62
Programa del Workshop	62
Expositores internacionales:.....	63
Instituciones Asistentes	66
Inserción en prensa o medios	67
CAPITULO 5	72
<i>Carta Gantt y avances del proyecto.</i>	73

Resumen ejecutivo del proyecto

El Síndrome Rickettsial del Salmón (SRS), es la enfermedad infecciosa más importante que afecta al cultivo de salmónidos en agua de mar en Chile y es causada por la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis*, constituyéndose en una seria amenaza para la sostenibilidad de esta industria. De las 382,5 ton de antibióticos utilizados en los cultivos de salmones en Chile durante el 2016, 363,4 ton (95%) fueron utilizados en centros marinos para tratar el patógeno *P. salmonis*. En la actualidad, no existen vacunas comerciales de alta eficacia para el control de SRS, por lo que la terapia antibiótica se ha constituido en la única opción para reducir las pérdidas causadas por esta enfermedad, sin embargo, su efectividad ha sido variable. Por lo anterior, los brotes de SRS continuarán siendo el principal problema patológico para la industria salmonicultora chilena y la razón principal para el uso intensivo de antibióticos en esta industria, hasta que no se implementen estrategias alternativas para el control de este patógeno. En este contexto, la fagoterapia aparece como una prometedora alternativa, considerando el rol intracelular de esta especie patogénica. El Objetivo General de la propuesta es “Desarrollar una estrategia basada en el uso de bacteriófagos para reducir las mortalidades causadas por *P. salmonis* en el cultivo de salmones”.

El Plan de Trabajo del proyecto ha incluido las cuatro etapas, coincidentes con los objetivos de mismo, y que han incluido: 1) Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con actividad sobre *P. salmonis*, para lo cual se han recolectado muestras de distintos orígenes y adaptado metodologías para la obtención de lisados y fagos con actividad bactericida sobre *P. salmonis*; 2) Desarrollo de un protocolo estandarizado para la aplicación de terapias con bacteriófagos, el cual ha sido elaborado en base a experiencias prácticas con fago modelo, ensayando distintas vías de administración y ha permitido conocer el alcance de los fagos en los órganos internos de un pez tratado; 3) Levantamiento de información acerca de las regulaciones aplicables tanto a nivel nacional como internacional, que se ha completado gracias a una extensa revisión de los antecedentes disponibles del uso de bacteriófagos en terapias humana y animal; 4) Difusión a través de la realización de actividades dirigidas al sector productivo y científico de los resultados del proyecto, que ha contado con la participación de investigadores extranjeros y la concurrencia del sector público y privado.

Cabe destacar que para la Etapa 1 relativa a la obtención de fagos, se ha articulado una serie de pasos, en cuanto a congregar evidencia que sustente la búsqueda de fagos para este patógeno de características intracelulares. Una de los primeros indicios ha provenido de la examinación de *P. salmonis* y sus plásmidos; en los cuales fue posible observar elementos genéticos asociados a fagos y profagos, por lo cual, a pesar del carácter intracelular de esta especie patogénica, ha señalado la factibilidad de encontrar fagos que

infecten al patógeno. Esta perspectiva ha sido avalada posteriormente por los resultados del proyecto, ya que ha sido posible obtener fagos contra *P. salmonis* y caracterizarlos en sus propiedades básicas. Es importante notar que el nivel de éxito en la detección de actividad bactericida es menor al 1% de las muestras analizadas. De esta forma, se ha establecido que para el aislamiento de este tipo de fagos se ha de requerir la examinación de un elevado número de muestras.

Como resultado general de la ejecución del proyecto, se ha conseguido el objetivo propuesto inicialmente. Específicamente se ha logrado obtener la base de una **colección de bacteriófagos con una actividad bactericida sobre *P. salmonis***; un **protocolo de aplicación en peces salmonídeos de la fagoterapia**, que asegure la implementación de la fagoterapia utilizando una metodología estandarizada que asegure un efecto eficiente y reproducible; un **informe recopilatorio** que incluya los antecedentes disponibles acerca del uso comercial o experimental de bacteriófagos y sus aspectos regulatorios; y **la realización de actividades de divulgación** de los resultados obtenidos, que incluyen publicaciones en revistas de divulgación, presentaciones en evento de lanzamiento y la realización de un seminario dirigido a un auditorio compuesto por representantes relevantes de la academia y el sector productivo asociado.

Estos productos permitirán generar las que el estudio busca el desarrollo de una estrategia de uso de bacteriófagos para la aplicación *in vivo* en salmónidos y sentar las bases para el futuro desarrollo de tratamientos basados en fagoterapia que permitan controlar el desarrollo de brotes de piscirickettsiosis y reducir las mortalidades causadas por esta patología.

Abstract

The Rickettsial Salmon Syndrome (SRS) is the most important infectious disease affecting the culture of salmonids in seawater in Chile. It is caused by the intracellular bacterium *Piscirickettsia salmonis*, the most serious threat to the sustainability of this industry. Of the 382.5 tons of antibiotics used in salmon farming in Chile during 2016, 363.4 tons (95%) were used in marine centers to treat the pathogen *P. salmonis*. Nowadays, there are no commercial vaccines of high efficacy for the control of SRS, so that antibiotic therapy has become the only option to reduce the losses caused by this disease, however, its effectiveness has been variable. Therefore, outbreaks of SRS will continue to be the main problem for the Chilean salmon farming industry and the main reason for the intensive use of antibiotics in this industry. In this context, phage therapy seems to be a promising alternative. The General Objective of the proposal is "To develop a strategy based on the use of bacteriophages to reduce the mortalities caused by *P. salmonis* in salmon aquaculture".

The Work Plan of the project has included the four stages, which have included: 1) Isolation and characterization of bacteriophages with activity on *P. salmonis*, for which

samples from different origins have been collected and methodologies adapted for obtaining lysates and phages with bactericidal activity on *P. salmonis*; 2) Development of a standardized protocol for the application of phage therapy, which has been developed based on practical experiences with a model phage, testing different routes of administration and it has allowed to know the distribution of phages in the internal organs of salmon; 3) Collected information about applicable regulations at national and international level, which has been completed after an extensive review of the available antecedents of the use of bacteriophages in human and animal therapies; 4) Dissemination of the Project and results through activities focused in the private, public and academic sector, which has included the participation of international researchers and the concurrence of the public agencies and industry.

It is worth to notice that several steps have been articulated, in order to obtain evidence to support the search for phages for this intracellular pathogen. One of the first indications has come from the examination of *P. salmonis* genome and plasmids; which revealed genetic elements associated with phages and prophages, that's why, despite the intracellular character of this pathogenic species, it has pointed out the feasibility of finding phages infecting this bacteria. This perspective has been later supported by the results of the project, since it has been possible to obtain phages against *P. salmonis* and characterize their basic properties. It is important to note that the level of success in the detection of bactericidal activity is less than 1% of the samples analyzed. In this way, it has been established that for the isolation of this type of phage the examination of a large number of samples has to be required.

As a general result of the project, the initially proposed objective has been achieved. Specifically, it has been possible to obtain the base of a bacteriophage collection with a bactericidal activity on *P. salmonis*; an application protocol in salmon fish of phage therapy, which ensures the implementation of phage therapy using a standardized methodology that ensures an efficient and reproducible effect; a report that includes the available information about the commercial or experimental use of bacteriophages and their regulatory aspects; and the realization of activities for dissemination of the results obtained, which include publications in magazines, presentations at the launching event and the holding of a seminar addressed to an audience composed of relevant representatives of the academy; public agencies and productive sector.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo de este estudio es desarrollar las bases para una nueva estrategia de control de infecciones por *Piscirickettsia salmonis* en el cultivo de salmónes basada en el uso de bacteriófagos.

Objetivos específicos

1. Evidenciar la existencia de bacteriófagos con actividad bactericida sobre *Piscirickettsia salmonis*.
2. Desarrollar un protocolo estandarizado para la aplicación de terapias con bacteriófagos.
3. Realizar revisión de los antecedentes disponibles acerca del uso de bacteriófagos y sus consideraciones legales y regulatorias.
4. Difusión de resultados

CAPITULO 1

Aislamiento y caracterización de fagos contra *Piscirickettsia salmonis*.

Introducción

La especie patógena *P. salmonis* causa grandes pérdidas en la industria salmonicultora en Chile, tanto por mortalidad como por costos de tratamiento y su control se basa en la aplicación de antibióticos. Debido a que esta patología es causada por una bacteria intracelular presente en el medio marino y que sólo constituye un problema sanitario importante para la industria salmonicultora chilena, la solución a este problema es compleja y será resuelta exclusivamente por una iniciativa nacional. Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan exclusivamente bacterias y por lo tanto, son inofensivos para las células del hospedador eucarionte (peces, humanos), y luego de infectar a la bacteria blanco la destruyen por lisis, permitiendo que se libere la nueva progenie viral, que infectarán más bacterias blanco repitiendo el ciclo lítico, causando una reducción drástica en los niveles bacterianos de esta especie, por lo que la fagoterapia ha sido una alternativa de control bacteriano muy prometedora.

Es incuestionable la necesidad de ejecutar un proyecto de investigación científica y tecnológica para lograr aislar y caracterizar fagos con propiedades líticas contra *P. salmonis* que exhiban características deseables para su uso en los sistemas de cultivo de salmónidos que puedan ser eficientes para controlar brotes de SRS. Lo anterior se sustenta en que se requieren implementar metodologías microbiológicas complejas que permitan construir una colección numerosa de bacteriófagos para tener la posibilidad de aplicar terapias con diferentes grados de especificidad dependiendo de las condiciones microbiológicas de cada cultivo en particular.

Ventajas en Acuicultura

- 1) alta especificidad, pues sólo destruyen las bacterias blanco, *P. salmonis*
- 2) inocuidad, pues no causan ningún efecto negativo para el medio ambiente, humanos y animales tanto de cultivo como silvestres
- 3) sin período de carencia, es decir se pueden cosechar los organismos tratados independiente de cuando fueron aplicados los productos basados en fagos
- 4) menor costo de desarrollo, comparativamente con antibióticos y vacunas;
- 5) son productos naturales, permiten el cultivo de salmónidos bajo sistemas de producción orgánica, en lo que respecta al control de esta patología.
- 6) reemplazo de las terapias con antibióticos, al reemplazar el uso de antibióticos para el control de SRS, la actividad salmonicultora nacional disminuirá drásticamente sus niveles de uso anual de antibióticos. Esto le generará a la industria una mejor reputación internacional y poder acceder a

mercados más importantes con estrictos marcos regulatorios que exigen un uso muy restringido de fármacos en el proceso de producción del salmón.

Diferenciación de Métodos Actuales.

- 1) Los antibióticos son actualmente la principal herramienta para el control de brotes de SRS. La aparición de bacterias resistentes a estos fármacos y la transferencia de esta resistencia entre distintas bacterias y el carácter intracelular de este patógeno han determinado que los antibióticos pierdan su efectividad para controlar esta patología en estos cultivos.
- 2) Los métodos de manejo sanitario del cultivo de salmónidos requieren de un diagnóstico de la patología, para permitir al veterinario poder prescribir la terapia farmacológica a administrar, la cual por lo general se realiza bajo un enfoque ensayo/error pues los ensayos de susceptibilidad antibiótica son poco precisos y requieren de mucho tiempo para su lectura, lo que impide aplicar el tratamiento de manera rápida y eficiente.
- 3) En la actualidad, no existen vacunas comerciales de alta eficacia y suficiente cobertura temporal para el control de los cuadros patológicos causados por *P. salmonis*.

Por lo anterior, en la actualidad ninguna de las alternativas de control sanitario logra, de manera individual o conjunta, controlar el problema de *P. salmonis* en Chile, por lo que en los últimos años han aumentado los episodios de SRS así como el uso excesivo de antibióticos, amenazando la sustentabilidad de esta industria.

Fagoterapia: contribución a la gestión sanitaria sin antibióticos.

Se estima que los bacteriófagos son la entidad biológica más abundante del planeta, por ejemplo, se pueden encontrar en ambientes acuáticos, 10^5 fagos por ml. Dentro de esta abundancia hay también una gran diversidad. Existen bacteriófagos líticos que luego de penetrar una bacteria patógena/objetivo, son capaces de replicarse en su interior y destruirla a través de lisis. Esto permite liberar una nueva progenie de fagos, constituida por cientos o miles de partículas virales que infectarán más bacterias patógenas/objetivo repitiendo el ciclo lítico, lo que permite el uso de estos virus en aplicaciones biotecnológicas para tratamientos profilácticos y terapéuticos de peces, moluscos y en otras áreas productivas. De esta forma y dada su gran capacidad bactericida, los bacteriófagos o fagos surgen como una atractiva estrategia de control de *P. salmonis*.

A pesar de que hasta la fecha no se han descrito fagos contra *P. salmonis*, un análisis detallado de los genomas disponibles muestra que en ellos es posible encontrar

diversos elementos asociados a genes de fagos incluso a evidencias de la existencia de profagos. Además, algunos de éstos se encuentran en elementos genéticos móviles como plásmidos. En la Figura 1 se muestra un esquema del plásmido p2PS5. Este plásmido fue identificado en la cepa PM51819A de *P. salmonis*, aislada desde *Salmo salar* cultivado en Chile. En la secuencia de este plásmido se identificó una región de aproximadamente 18kb (en azul) que concentra genes que codifican para proteínas características de fagos (en naranja), entre ellas, algunas proteínas estructurales como las que conforman la cápside y la cola de los fagos, además de proteínas de ensamblaje, necesarias para la formación de estos.

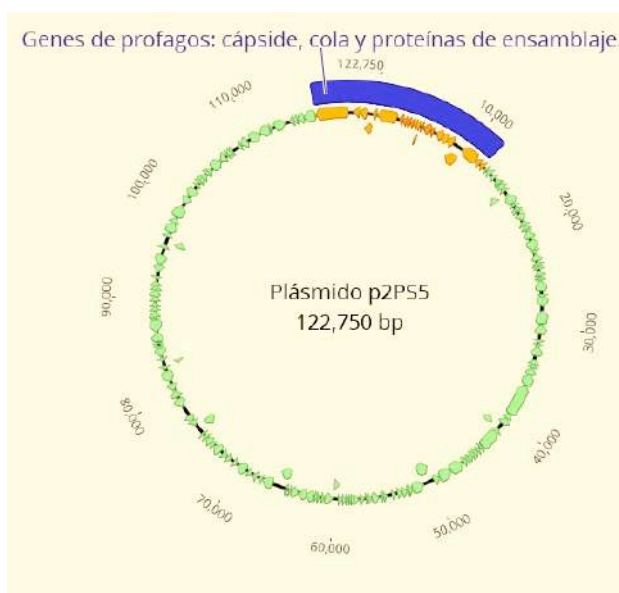


Figura 1. Representación del plásmido p2PS5 que muestra genes de fago en *P. salmonis*.

Estas evidencias moleculares apoyan el desarrollo de la fagoterapia como una alternativa prometedora contra *P. salmonis*. La presencia de elementos de fagos en sus elementos genéticos (plásmidos y cromosomas), a pesar del carácter intracelular de esta especie patógena, señala la factibilidad de encontrar fagos que controlen la enfermedad. También es muy importante hacer notar que el uso de bacteriófagos para el control de esta patología permitiría la aplicación de componentes naturales que no signifiquen un riesgo en salud humana, como tampoco un impacto ambiental negativo en el medio acuático donde se realice esta actividad productiva, no afectando la flora y fauna asociada al cultivo.

Resultados del aislamiento de fagos

Los resultados y actividades comprendidos en el siguiente informe están dirigidos a lograr el Resultado de Producción, que es “Desarrollar las bases para una nueva estrategia de control de infecciones por *Piscirickettsia salmonis* en el cultivo de salmónes basada en el uso de bacteriófagos.” Se ha incorporado todos los resultados de acuerdo con los requerimientos indicados en los términos de referencia.

Obtención de enriquecidos de bacteriófagos contra *Piscirickettsia salmonis*

Como ya se ha descrito, los fagos son muy abundantes y ubicuos en la naturaleza, y es ampliamente aceptado que donde existen poblaciones bacterianas hay fagos asociados a ellas. Para el aislamiento y preservación de los fagos se siguieron los protocolos descritos en el anexo Cap. 1. “Manual de procedimientos experimentales para pesquisar fagos contra *Piscirickettsia salmonis*: ¿Cómo generar una fagoteca?”. Básicamente para este aislamiento, se realizaron en tres pasos experimentales (Figura 2), que incluyeron:

- a) **Procesamiento de las muestras:** Las muestras se obtuvieron de distintas pisciculturas, desde las principales regiones productoras de salmón. Se analizaron tres tipos de muestras: Agua de piscicultura y otros sectores no relacionados al área, órganos de peces sanos y peces desde centros con antecedentes de brotes de SRS. Por último, también se analizaron mariscos desde diferentes puntos del país. Estas muestras fueron recolectadas desde las regiones V, IX y X.
- b) **Enriquecimiento por infección de un cultivo de bacteria hospedera en medio líquido:** El sobrenadante filtrado, proveniente de la muestra (paso a), fue inoculado en un cultivo de la *P. salmonis*. Al crecer la bacteria en el medio de cultivo, cualquier fago presente que pueda infectarla proliferará conjuntamente.
- c) **Detección de fagos por placas de lisis mediante el método de doble agar modificado:** Los fagos en suspensión son posteriormente detectados por su capacidad para lisar las bacterias e impedir su crecimiento. Así cuando se pone en conjunto fagos y bacterias creciendo en agar de cultivo de *P. salmonis* se observó círculos claros denominados zonas de lisis, generados por el crecimiento de al menos un fago. De este punto deriva el concepto de “lisados”

que corresponden a un enriquecido que presenta actividad lítica y que puede contener uno o más fagos (mezcla).

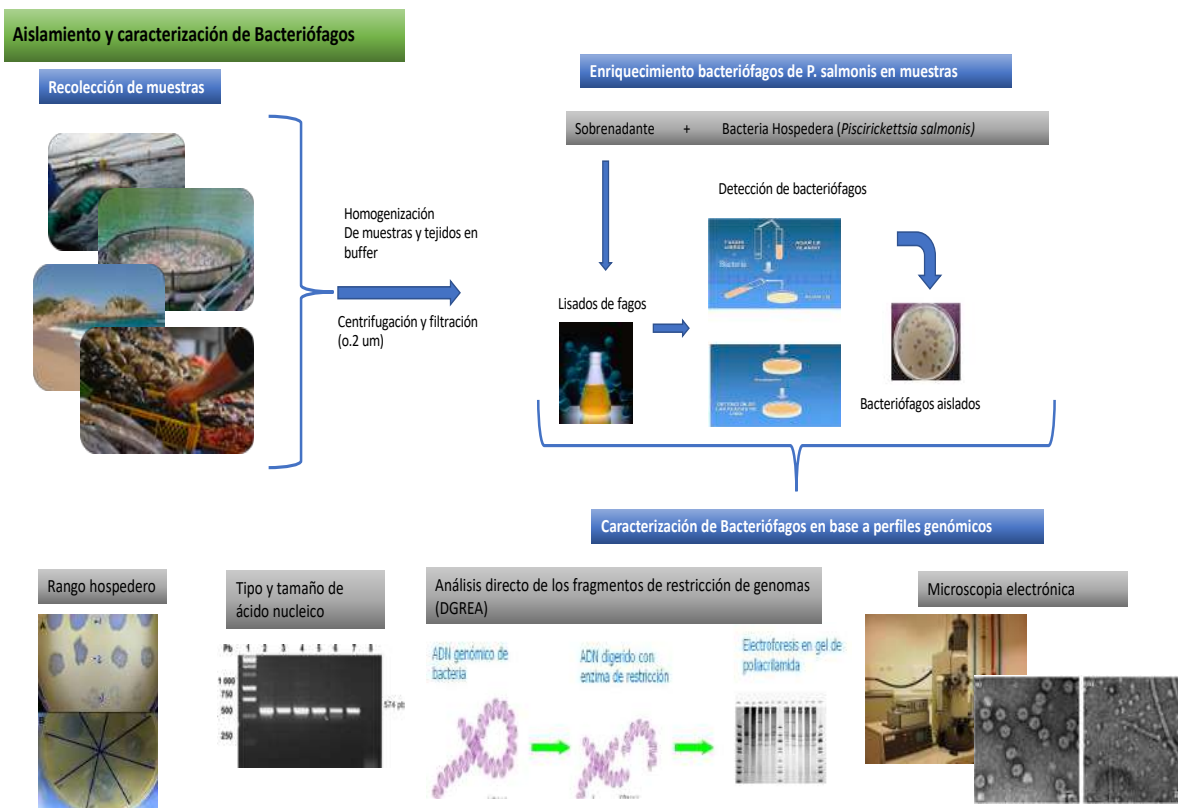


Figura 2. Esquema del aislamiento y caracterización de los fagos de *P. salmonis*.

Las muestras fueron enriquecidas en fagos, cultivando con las distintas *Piscirickettsia salmonis* (Tabla 1). Se logró aislar lisados enriquecidos de fagos en 4,2% de las muestras analizadas.

Tabla 1. Tabla resumen con las muestras analizadas para la detección de bacteriófagos.

Tipo de muestra	Cantidad analizadas	Origen de las muestras	% de actividad lítica (lisados)
Peces sanos	57	Región IX	0
Peces sintomáticos	80	Región X	0,05
Agua de centros de cultivo	72	IV y IX	0
Aguas superficiales	65	IV y V	0
Mariscos	86	IV y V	0,13

Obtención de lisados

Para el aislamiento de un fago se pica una placa de lisis separada de las demás, que se puede asumir que fue generada por una sola partícula viral, de tal manera que todos los fagos originados a partir de esta suspensión provienen de la misma partícula viral y son prácticamente idénticos (clon). Para asegurar la clonalidad se repite el procedimiento.

Se generó una colección de enriquecidos con bacteriófagos que fueron capaces de infectar y destruir cepas de *P. salmonis* incluidas en el cepario. Se almacenaron todos los enriquecimientos que presentaron esta actividad lítica transparente (Figura 3). De las muestras analizadas, se detectó actividad lítica contra *P. salmonis* en un número de 15 de un total de 360 de enriquecidos (Tabla 2).

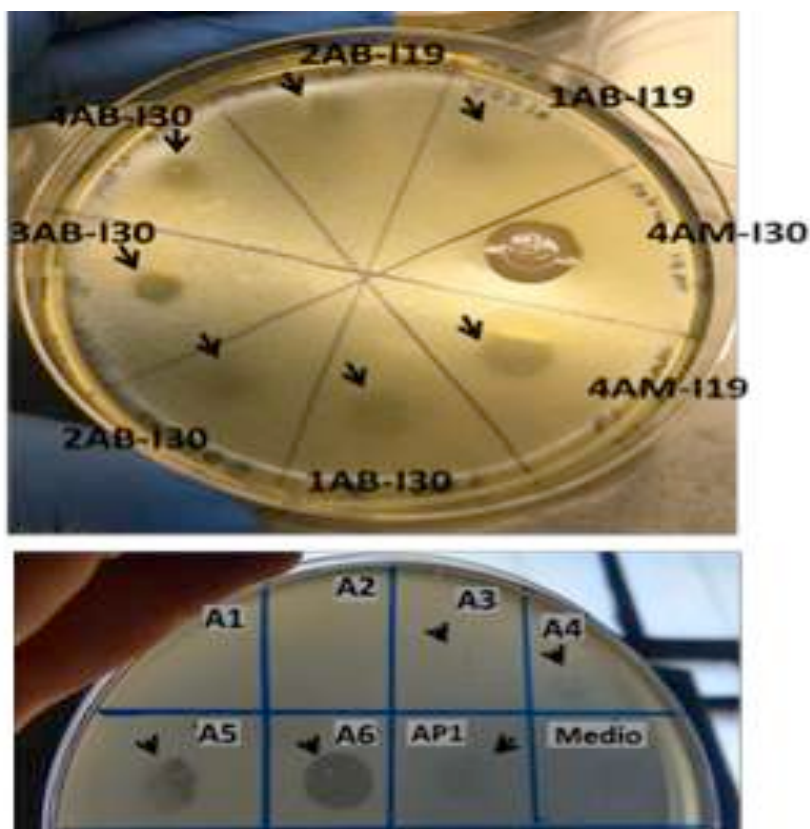


Figura 3. Capacidad lítica de los enriquecidos de bacteriófagos contra *P. salmonis*. Detección de Fagos contra *P. salmonis* en enriquecimientos de muestras de moluscos mediante ensayo de doble agar.

Tabla 2. Colección de 12 lisados con capacidad bactericida sobre *P. salmonis*

Actividad bactericida sobre <i>P. salmonis</i>						
N°	Código lisado	I17	I18	I19	I20	I30
1	AB1-I30	+	+	++	+	++
2	AB2-I30	+	+	++	++	++
3	AB3-I30	+	-	+	+	++
4	AB4-I30	+	-	+	++	++
5	AM1-I20		-	+	+	+
6	AM2-I20	+	+	+	+	++
7	AM3-I20	+	+	++	+	+
8	AM4-I19	+	+	+	++	+
9	AP1-I18	+	+	+	++	+
10	A1-I20	+	++	+	+	+
11	A2-I20	+	++	+	+	+
12	A3-I20	+	++	+++	+	+
13	A4-I20	++	++	+++	+	+
14	A5-I20	++	+++	+	+++	++
15	A6-I20	+++	+++	++	+++	+++

Aislamiento y clasificación de fagos de *Piscirickettsia salmonis*.

Finalmente, se aislaron 3 bacteriófagos que mostraron una fuerte actividad lítica, lo que se manifiesta en halos de lisis completamente translúcida (Figura 4). La procedencia de los tres bacteriófagos aislados se menciona en la Tabla 3.

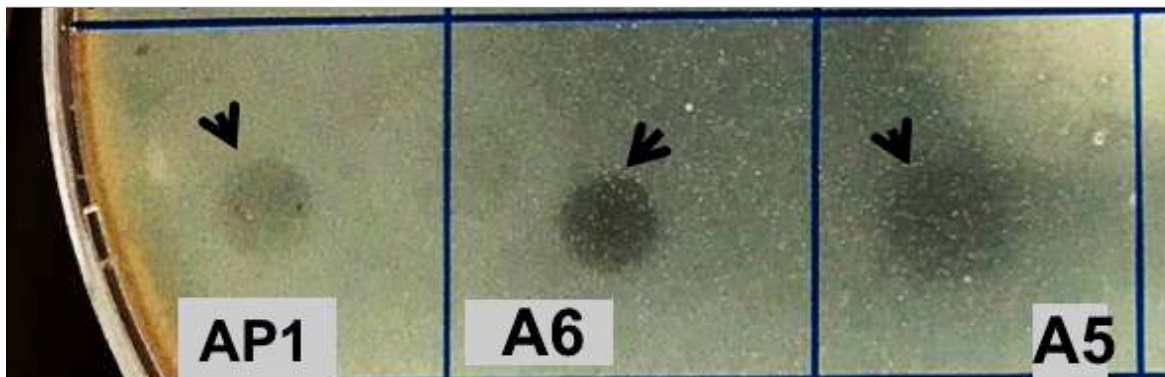


Figura 4. Actividad lítica de los bacteriófagos AP1, A6 y A5 sobre un césped de *P. salmonis*.

Tabla 3. Información general de bacteriófagos aislados contra *P. salmonis*

Nombre	Localidad	Genotipo hospedero
A5	Centro de Cultivo Panamericana, IV Región	LF-89
A6	Centro de Cultivo Panamericana, IV Región	LF-89
AP1	Centro de Cultivo Panamericana, IV Región	LF-89

Caracterización molecular y estructural de los bacteriófagos

Un componente importante de la estrategia para realizar una fagoterapia, consiste en el uso de mezclas de fagos que tengan distintas vías de infección, con el objeto de disminuir la frecuencia de cepas de bacterias resistentes al fago. Fagos muy diferentes tienen normalmente vías de infección diferentes.

Los tres bacteriófagos fueron caracterizados genética y morfológicamente para lograr distinguirlos y tener una mejor definición de su aplicación. Esta caracterización se llevó a cabo mediante los siguientes análisis moleculares y estructurales:

- a) Tipo de ácidos nucleicos
- b) Tamaño de genomas
- c) Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción: Determinación de ácido nucleico (RFLP) de ácidos nucleicos genómicos DGREA
- d) Presencia de membranas
- e) Microscopía electrónica para su clasificación

(a) Determinación de tipo de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos de los bacteriófagos se extrajeron y purificaron, para luego realizar pruebas enzimáticas con deoxi-ribonucleasa y ribonucleasa, y así determinar de esta forma el tipo de genoma que tienen los bacteriófagos. Los tres fagos (5, 6 y AP1) resultaron ser sensibles a la acción de las DNAsas no así a las RNAsas (No mostrado), lo que indica que estos fagos poseen genomas de ADN (Figura 5).

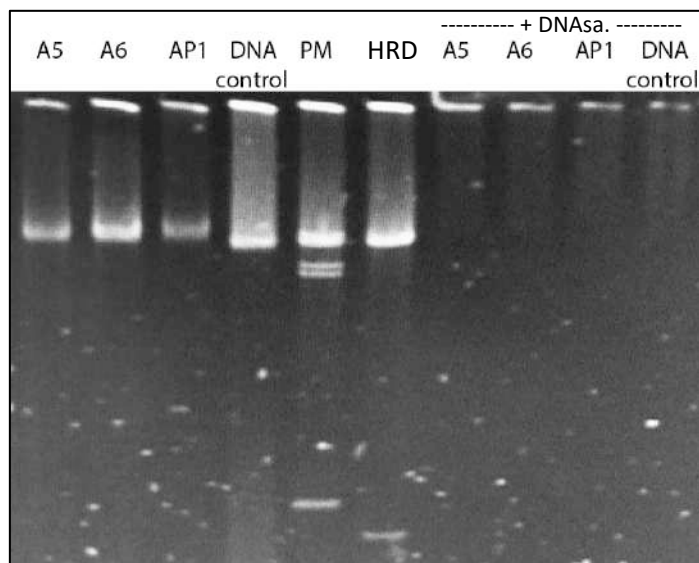


Figura 5. Determinación de tipo de ácido nucleico. La determinación del tipo de ácido nucleico se realizó a través de la exposición de los genomas de fagos a la enzima Dnasa. PM: lambda HindIII; HDR: Marcador alto peso molecular; ADN control: Fago de ADN.

(b) Estimación de tamaño de genomas de fagos

El tamaño de las moléculas de genomas se estimó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 4% usando estándar de alto peso molecular (Figura 6). Todos los fagos tienen un tamaño de entre 28 y 37 Kb aproximadamente.

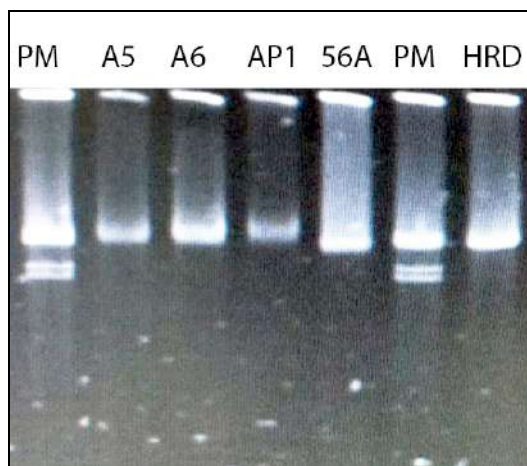


Figura 6. Determinación de tamaño de genomas de fagos líticos. Se determinó por comparación de migración de los genomas de fagos en base a marcadores de peso molecular conocidos. PM: lambda HindIII; HDR: Marcador alto peso molecular; 56a: Fago de ADN control

(c) Análisis directo del genoma de fagos con enzimas de restricción (DGREA).

Para diferenciar los fagos entre ellos, se realizó análisis directo del genoma de fagos con enzimas de restricción (DGREA). Este método permite comparar los fagos en base a las características de su genoma (sitios de restricción). Con estos resultados se determinó si existe relación entre los distintos bacteriófagos aislados. Es importante considerar que estos perfiles moleculares del DGREA funcionan como una huella digital para cada fago, al momento de identificarlos en análisis posteriores, lo que permite su trazabilidad y protección comercial.

La Figura 7 muestra que los fagos 5 y 6 poseen un mismo perfil de digestión (Perfil A) por lo que son indistinguibles entre sí. Por otra parte, el fago AP1 posee un perfil de digestión completamente distinto a los mencionados fagos el cual fue denominado Perfil B.

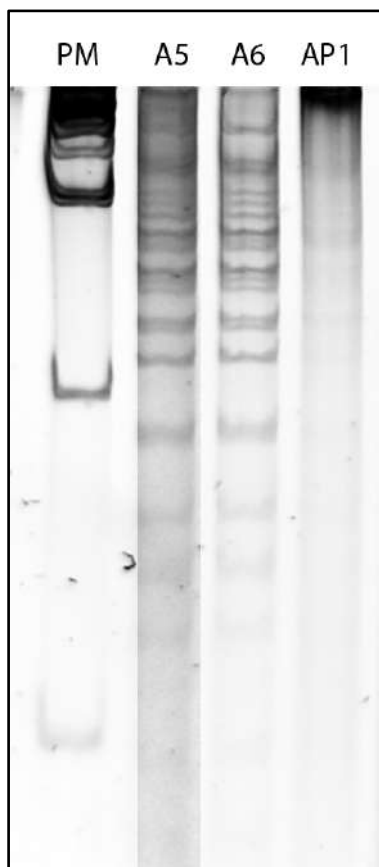


Figura 7. Perfiles de digestión directa de genomas de bacteriófagos (DGREA). Los perfiles se generaron por digestión enzimática con Taq I, y fueron revelados por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Los carriles son. PM: Marcador lambda HindIII, 2: ADN digerido Fago A5, 3: ADN digerido Fago A6, 4: ADN digerido fago AP1.

(d) Comprobación de presencia de membranas de fagos.

Algunos bacteriófagos poseen membranas muy similares a las bacterias. Por lo que se realizó para estos tres fagos la comprobación de la presencia de membrana. Para ello se testea a través de la sensibilidad a solventes orgánico (cloroformo), donde se produce una deficiencia en la infección y por ende se ve reflejado en la disminución la actividad lítica. Para los tres fagos se observó que no se genera una pérdida de la capacidad lítica de los fagos (Figura 8).

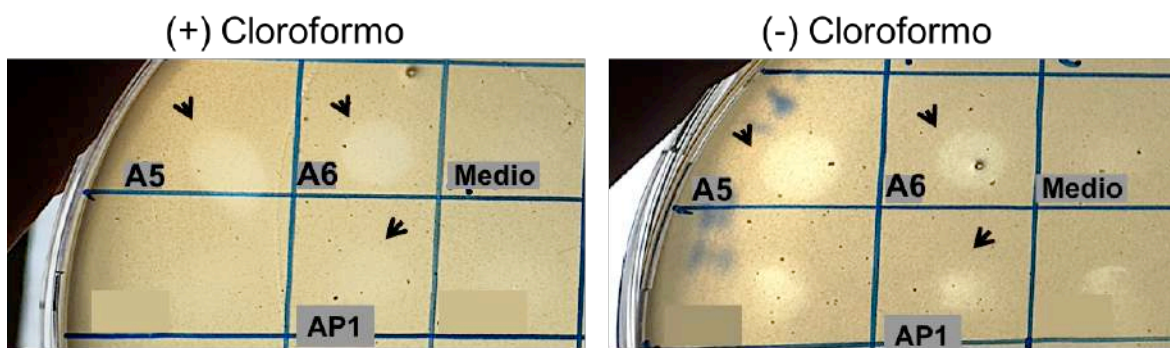
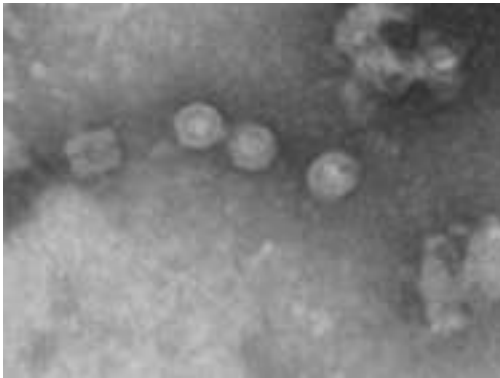


Figura 8. Determinación de presencia de membrana en fagos a través de ensayo con cloroformo.

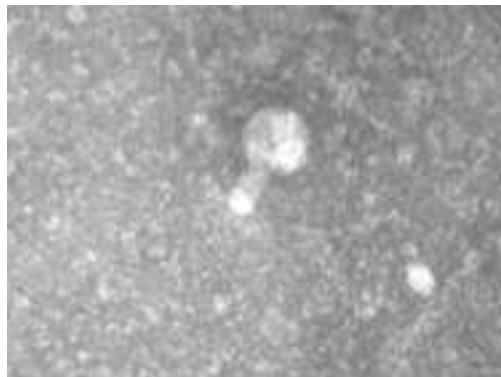
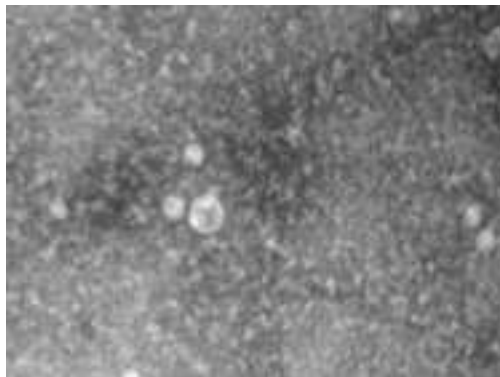
(e) Microscopía electrónica para su clasificación

La microscopía electrónica es esencial para la identificación tradicional de los fagos, es decir, incluir los fagos seleccionados en familias taxonómicas previamente establecidas en la literatura especializada. Esto es fundamental para lograr la protección de la propiedad intelectual, ya que se debe especificar el tipo de fago en la mezcla protectora y además, cada uno se debe depositar en colecciones internacionales, donde se describen sus propiedades y su forma microscópica. Se determinó tamaño y forma de cada bacteriófago, a través de las fotos obtenidas en microscopía electrónica de transmisión (Figura 9). Se observa que el fago A5 y AP1 pertenece a la familia de los *Podoviridae*, el fago A6 a la familia de los *Myoviridae*. Sus principales características se resumen en la Tabla 4.

Fago A5



Fago A6



Fago AP1

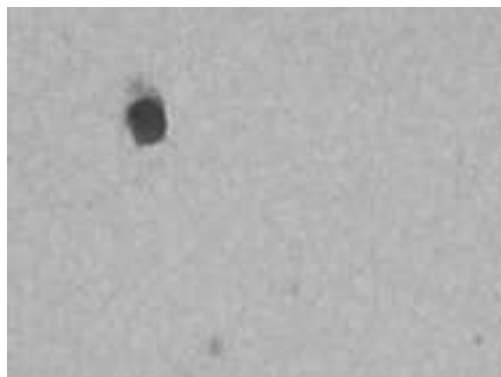
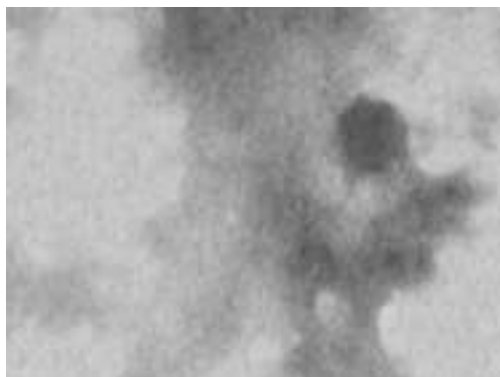


Figura 9. Fotos de microscopia electrónica para los tres fagos de *P. salmonis*.

Tabla 4. Características estructurales de los tres fagos de *P. salmonis*

Nombre	Tamaño de cabeza (nm)	Tamaño de cola (nm)	Familia
A5	30	NO	<i>Podoviridae</i>
A6	54,8	34,2	<i>Myoviridae</i>
AP1	39	NO	<i>Podoviridae</i>

En resumen, se generó una colección de fagos con 3 bacteriófagos líticos aislados, los cuales fueron caracterizados en sus propiedades fundamentales (Tabla 5).

Tabla 5. Lista de propiedades fundamentales de bacteriófagos líticos.

Nombre	DGREA	Tipo de genoma	Tamaño genoma (pb)	Membrana	Microscopia
A5	A	ADN	27990	No	<i>Podoviridae</i>
A6	A	ADN	31490	No	<i>Myoviridae</i>
AP1	B	ADN	36490	No	<i>Podoviridae</i>

Determinación de rango de hospedero de los bacteriófagos sobre *P. salmonis* y bacterias de la microbiota

Se analizó la especificidad de infección de los distintos aislados de fagos a través del método doble agar modificado, sobre las cepas principales cepas de *P. salmonis* del cepario obtenido. Se añadió tres microgotas con fago concentrado sobre un césped de bacteria a probar. Los resultados que se obtuvieron fueron presentados como: placas de lisis con zona clara, placas con zona turbia o sin inhibición del crecimiento, se determinó el diámetro y translucidez de los halos. Con ello se estableció el rango de capacidad lítica de cada fago y lisado sobre los distintos aislados de *P. salmonis* (rango de hospedero). Los resultados se tabularon en la Tabla 6, la cual exhibe el rango de hospedero de todos los fagos líticos en estudio.

Tabla 6. Rango de hospedero contra cepas de *P. salmonis* y la microbiota de salmónidos.

	Cepas	Fagos		
		AP1-I18	A5-I20	A6-I20
Cepas de <i>P. salmonis</i>	I17	++	++	++++
	I18	++	++++	++++
	I19	+	++	++
	I20	+++	++++	++++
	I30	+	++	++++
Bacterias de la Microbiota de salmónidos	<i>Pseudomona</i> P1	-	-	-
	<i>Psycrobacter</i> D13	-	-	-
	<i>Pectobacterium</i> B10	-	-	-
	<i>Aeromona</i> AeHp	-	-	-
	<i>Providencia</i> P1	-	-	-
	<i>Stenotrophomona</i> 103B3	-	-	-
	<i>Lactococcus</i> AOP1-7	-	-	-
<i>Shewanella.</i>	-	-	-	

Nota: Los cruces indican el grado de lisis por parte del fago testeado. +++++: Lisis completa; ++++: Lisis levemente turbia, ++: Lisis turbia; +: Muy baja lisis; -: Sin lisis.

Estabilización y Depósito de los fagos en colección internacional de microorganismos (fagos y lisados).

Los tres fagos caracterizados más 12 lisados enriquecidos en fagos fueron depositados en la colección internacional Polish Collection of Microorganisms del Institute of Immunology and Experimental Therapy, en Polonia. La documentación del depósito se muestra en la Figura 10.

Guía Aérea Internacional
Express. Para los servicios de FedEx a nivel mundial. Paquetes hasta 68 kg, excepto materiales peligrosos. No todos los servicios y opciones están disponibles en todos los destinos.

De Favor de llenar con letra de molde, presionando fuerte. / From Please print and press hard.

Fecha: 12/26/18
Número de cuenta FedEx del remitente: 1653-1978-8
EL REMITENTE

Nombre del remitente: Jaime Romero
Teléfono: 56229781524

Compañía: INTA - U de Chile

Dirección: EL Líbano 5524

Dirección: Mawl

Ciudad: Santiago
Estado/Provincia:

País: Chile
Código Postal:

Dirección de correo electrónico:

Referencia Para su Facturación Interna: LOS PRIMEROS 28 CARACTERES APARECERÁN EN LA FACTURA

A / To: Entregue Residencial
Nombre del destinatario: Agnieszka Korzeniewska, Teléfono: +48 (0)11 337-11-72

Compañía: (PIM) Institute of Immunology and Experimental Therapy

Dirección: ul. Weigla 12
Destino / País:

Ciudad: Wrocław
Estado/Provincia:

País: Poland
Código Postal: 53-114

Dirección de correo electrónico: akorzen@iitd.pan.wroc.pl

Clave/Número de Identificación Fiscal del destinatario para fines de Aduana: RECONSTRUCION/ADR, O SET/IN SE REFINERIA LOCALMENTE

Información Acerca del Embarque / Shipment Information

No. Total de Paquetes (pesos y carga no repetitivos/CAC)	Peso total (lbs. / kg)	Dim (L / A / H)	puñ. / cm
1		DIM	
Descripción del producto: Mineral Samples			
SE REQUIEREN MÁS DETALLES. ESCRIBA EN INGLÉS.			
Código armonizado: CL			
País de fabricación: 2000			
Valor de aduana: US \$ 20.00			

El destinatario para transporte de su mercancía: Valor total de aduana (Indique tipo de moneda)

14 • Rev. Date 11/13 • ©1994-2013 FedEx • PRINTED IN U.S.A. INTA • Guía Aérea Internacional No Negociable

Copia para el remitente

El orden de los servicios ha cambiado en la Sección 4. Opciones de firma se han añadido a la Sección 6.

Para instrucciones para llenar esta Guía Aérea y detalles sobre los servicios y opciones, vea el reverso de la quinta página.

Número de rastreo FedEx: 8124 1863 0317 No. de ID del formulario: 0404

4 Servicio Expreso de Paquetería / Express Package Service
NOTA: El orden de los servicios ha cambiado. Elija con cuidado.
 FedEx International First FedEx International Priority FedEx International Econom

5 Embalaje / Packaging
 FedEx Envelope FedEx Pak FedEx Box FedEx Tube
 FedEx 10kg Box FedEx 25kg Box Otro: Pallet

6 Manejo Especial y Opciones de Entrega con Firma Special Handling and Delivery Signature Options
 RETENER en oficinas de FedEx Entrega en día SÁBADO
 Firma Directa Firma Indirecta

7 Pago / Payment
Cobrar los gastos de transporte a: Remitente (de cubrir el No. de cuenta indicado en Sección 1) Destinatario Tercero Tarjeta de Crédito Efectivo/ Cheque

8 Firma Requerida / Required Signature
Firma del remitente: Jaime Romero 12/26 674

Figura 10. Comprobante de envío de fagos y lisados a colección internacional de microorganismo (Polonia).

H.1.3 Hito Listado de fagos aislados (Fagoteca)

N°	Código FAGO
1	A5
2	A6
3	AP1

H.1.4 Hito Lisados con actividad bactericida enviados a depósito

N°	Código lisado
1	AB1-I30
2	AB2-I30
3	AB3-I30
4	AB4-I30
5	AM1-I20
6	AM2-I20
7	AM3-I20
8	AM4-I19
9	A1-I20
10	A2-I20
11	A3-I20
12	A4-I20

H.1.5 Hito Manual de procedimiento ¿cómo generar una fagoteca?

Este manual ha sido incluido en anexos Capítulo 1, al cual se agregó un protocolo de solicitud de fagos.

Conclusiones

En este proyecto se planteó obtener una colección de fagos con una gran capacidad bactericida sobre cepas de *P. salmonis* aisladas de brotes de SRS en cultivos de salmónidos en Chile. El resultado principal de este proyecto ha sido la obtención de una colección de bacteriófagos nativos para ser utilizados como agentes antibacterianos selectivos contra *P. salmonis*.

Además, el proyecto contribuye con la entrega de protocolos para expandir el uso de la fagoterapia en la acuicultura. Estos protocolos entregan el conocimiento para implementar la construcción de fagotecas que puedan usarse en el combate de brotes de este patógeno. La fagoterapia promueve el control de enfermedades bacterianas sin producir las externalidades negativas de la terapia antibiótica sobre el recurso cultivado, el medio ambiente y el ser humano que labora en el centro de cultivo, su procesamiento o el consumidor final.

En consecuencia, con este proyecto pone a disposición una alternativa amigable con el medio ambiente que permitirá prevenir y controlar brotes infecciosos causados por este patógeno bacteriano en los cultivos de salmónidos en Chile, para así reducir los altos niveles de mortalidad que ocurren en la fase marina de este cultivo. También permitirá reducir o reemplazar el uso de antibióticos en estos cultivos.

CAPITULO 2

Diseños determinados para administración de fagos.

2.1 Avances del uso de bacteriófagos en salmonicultura

El interés del uso de bacteriófagos para controlar infecciones en acuicultura ha tomado un importante interés, como materia de estudio, desde de la década de 2000. Es muy alentador su uso en esta área, dado que el ambiente acuoso genera condiciones naturales óptimas para la infección por parte de los fagos.

Los avances en fagoterapia también apuntan a resolver enfermedades bacterianas en el área de la salmonicultura. A inicios de los años 70 se describieron los primeros fagos contra *Aeromonas salmonicida* causante de furunculosis en salmónidos (2–4), lo que sirvió para fagotipificar y así diferenciar los diversos aislados de *A. salmonicida*, esto se refiere a la determinación de los perfiles de infección de los distintos fagos sobre la bacteria patógena (2). Si bien, en los últimos 40 años hay pocos trabajos que se han realizado sobre fagos que infectan bacterias patógenas de salmónidos y su aplicación (Tabla 7 y 8), los grupos centrados en estos estudios han logrado desarrollar capacidades de aislamiento y caracterización de los fagos, demostrando la factibilidad de encontrar bacteriófagos para diversos agentes etiológicos (Tabla 7).

Recientemente se han descrito los primeros trabajos sobre el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos o profilácticos en salmonicultura (Tabla 8). Los estudios iniciales no fueron alentadores sobre el efecto terapéutico, como es el caso de fagos contra furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), debido a que sólo lograron retrasar el inicio de la enfermedad sin generar diferencias entre los grupos de peces desafiados al final del ensayo, por lo que la protección no fue efectiva (5,6). Posteriormente, el uso del fago PAS-1 logró un incremento en la razón de supervivencia en truchas arco iris cercano al 27% versus 0% de los grupos no tratados (7). Este resultado se logró gracias al uso de un fago altamente lítico que posee un amplio rango de hospedero.

Tabla 7. Trabajos de investigación sobre bacteriófagos que infectan bacterias patógenas de salmónidos.

Bacteria patógena	Número de fagos aislados	Resultados	Ref.
<i>Aeromonas salmonicida</i>	--	Aislamiento y caracterización serológica y morfológica de fagos.	(3)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	35	Estudio de la caracterización de fagos y de uso como tipificación de <i>A. salmonicida</i> . Es destacable que algunos fagos resisten pH 12.	(2)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	18	Incidencia de las diferentes cantidades de liposacáridos en la pared celular bacteriana, en la infección de los bacteriófagos	(8)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1	Aislamiento y caracterización del fago, dentro de las características más destacables es que posee un amplio rango de hospedero. Aislado desde sedimentos de piscicultura coreana.	(7)
<i>Yersinia ruckeri</i>	8	Aislamiento y caracterización. Uno de los fagos se obtuvo a través de inducción con Mitomicina-C. Los bacteriófagos tienen un valor potencial en el entendimiento del diagnóstico de la enfermedad.	(9)
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	2	Descripción de partículas de fagos asociadas a cultivos de <i>P. salmonis</i> .	(10)
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	22	Aislamiento y caracterización, donde se describió la presencia de diversas comunidades de fagos desde pisciculturas danesas. Incluye varios fagos líticos potenciales agentes para fagoterapia.	(11)
<i>Flavobacterium columnare</i>	49	Aislamiento y caracterización de fagos, desde distintas pisciculturas y fuentes de agua dulce Finlandesas.	(12)

A su vez, se evaluó el efecto protector de los bacteriófagos contra otras enfermedades de salmónidos, como lo son flavobacteriosis (*Flavobacterium psychrophilum*) y vibriosis (*Vibrio anguillarum*), obteniendo prometedores resultados para el desarrollo de la fagoterapia. Para flavobacteriosis en salmón del atlántico se logró la reducción de mortalidades en rangos de entre 50-100% y trucha arcoíris 16-67%, para dos fagos ensayados de manera individual (13). En cambio para vibriosis en salmón del atlántico se logró 100% de sobrevivencia en los grupos tratados versus 10% en grupos que no recibieron el fago, en condiciones de laboratorios (14), más aún los resultados fueron consistentes cuando se realizó un posterior desafío en un centro experimental, el cual opera con condiciones similares a los cultivos de estos peces (14).

Tabla 8. Trabajos de investigación en fagoterapia para salmónidos.

Bacteria patógena	Fago utilizado	Especie desafiada	Resultados	Ref.
<i>Aeromona salmonicida</i>	HER 110	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Desafío a través de baño, se aplicó el fago en una multiplicidad de infección (MOI) 1. La adición del bacteriófago HER 110 retrasada por 7 días del inicio de la forunculosis en la trucha de arroyo.	(5)
<i>Aeromona salmonicida</i>	Fago O, Fago R y Fago B	<i>Salmo salar</i>	1.- Desafío a través de inyección intraperitoneal, MOI $1,9 \times 10^5$. La adición de la mezcla de fagos retrasó en 4 días para que alcanzaran un 60% de mortalidad. El resultado final fue 100% de mortalidad para todos los grupos. 2.- Los fagos fueron aplicados vía oral, baño e intraperitoneal. No hubo diferencias significativas en el resultado final (mortalidad) entre grupos tratados y no tratados.	(6)
<i>Aeromona salmonicida</i>	PAS-1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Desafío a través de inyección intramuscular, MOI 1×10^4 . El promedio de sobrevivencia de los grupos tratados con el fago fue de 26,7 % (D.E. 2,9%) versus 0% los no tratados.	(15)
<i>Flavobacterium columnare</i>	FCL-1, FCV-1 y FCL-2	<i>Danio rerio</i> (usado como sistema de modelo)	Desafío realizado a través de baño. Se ensayó la virulencia de distintas cepas de <i>F. columnare</i> resistentes a los bacteriófagos. Tres de ellas no produjeron mortalidad y la cuarta sólo un 12,5%, versus las cepas sensibles a la infección de los fagos donde, dos de ellas registraron mortalidades del 100%, y las restantes 50% y 25% respectivamente.	(16)
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	6H y 1H	<i>Salmo salar</i> y <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Desafío realizado a través de inyección intraperitoneal, MOI de 10. El porcentaje de reducción en mortalidad en presencia del fago fue: Para <i>S. salar</i> 60% y 100% con el fago 1H, y 50% con fago 6H; Para <i>O. mykiss</i> 16% con fago 1H, y 67% y 41% con el fago 6H.	(13)
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	FpV-9	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Desafío realizados a través de inyección intraperitoneal. MOI de 1×10^3 . Se cuantificó la dispersión y destino de los fagos en truchas. La bacteria y fago fueron aislados hasta 10 días posteriores a la inoculación. La mayor persistencia se dio cuando fueron inyectados bacterias y fagos juntos. La mayor frecuencia de aislamientos de fagos se produjo en riñón y bazo, y con una aparición menor en cerebro.	(17)
<i>Vibrio anguillarum</i>	CHOED	<i>Salmo salar</i>	Desafío realizados a través de baños. MOI utilizados 1 y 20. El fago CHOED fue capaz de proteger un 100% con ambos MOI, versus el 10% de sobrevivencia de los grupos no tratados.	(14)

Finalmente, los estudios del uso de bacteriófagos en salmicultura han logrado responder a algunos parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos tales como: efecto de control sobre la bacteria patógena, efecto inocuo sobre los peces, la capacidad de ingreso de los fagos hacia distintos órganos en salmónidos, independiente de la vía de administración; periodos de permanencia en los peces; estabilidad de los fagos a distintas condiciones (pH, temperatura, almacenamiento, etc.); estabilidad del fago posterior a la adición sobre el alimento, entre otras (5,6,11,16,17), que avalan la potencialidad y factibilidad de esta estrategia como tratamiento antibacteriano. Sin embargo, para que la fagoterapia logre ser exitosa en acuicultura se debe considerar a los fagos como un fármaco, por lo tanto estudiar con detalle los procesos de interacción de éstos con los peces, así como absorción, distribución, metabolismo y excreción (Figura 11).

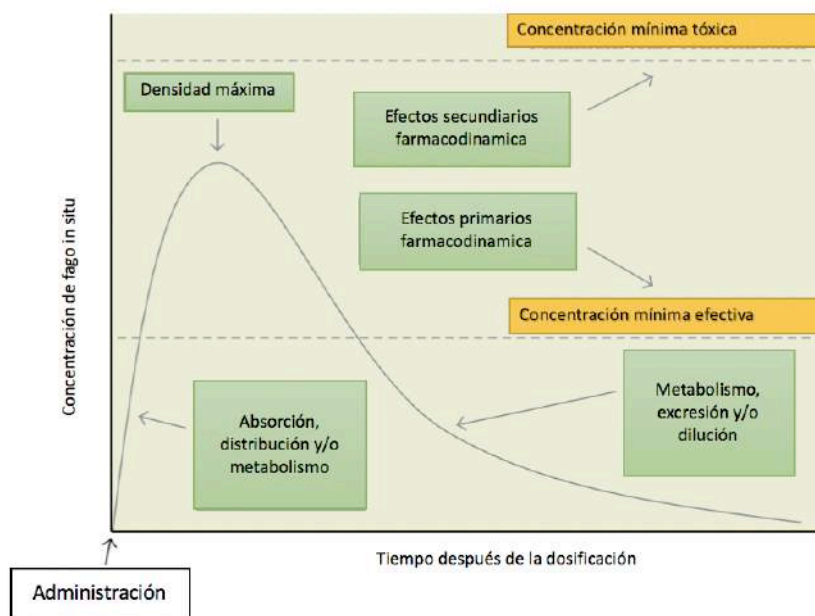


Figura 11. Conceptos básicos de la farmacología de la terapia de fagos (18).

2.2 Consideraciones iniciales en métodos de administración de fagos en acuicultura.

La fagoterapia ha renovado interés en distintas áreas de estudio. Esto se debe, principalmente, a la pérdida de eficacia de los tratamientos actuales para el control de bacterias patógenas (resistencia a antibióticos). Existen muchos estudios que han indicado y afrontado la serie de obstáculos intrínsecos a la fagoterapia en animales, y

estos no difieren en el área de la acuicultura, por ende salmonicultura (19–22). Es por eso que para el desarrollo de este tipo de tratamiento basado en bacteriófagos, se debe tener ciertas consideraciones iniciales para lograr un control efectivo de la enfermedad en peces.

Para que la fagoterapia logre obtener resultados exitosos en su aplicación, se deben estudiar los efectos y procesos a los que los fagos son sometidos a través del paso por el organismo (farmacodinamia y farmacocinética). En farmacología de la terapia con bacteriófagos, la farmacodinamia es un concepto sencillo, por otra parte, debido a la característica única de los fagos para replicar y su alta sensibilidad, la farmacocinética es bastante compleja. Por lo que se debe estudiar estos parámetros en los sistemas de administración para lograr concentraciones terapéuticamente efectivas de fagos en su forma activada (18,23).

2.3. Evaluación de eficacia de los fagos en desafíos de protección.

Como etapa final para un tratamiento con fago o mezcla de éstos es la evaluación de eficacia. No obstante, en el diseño del desafío se debe considerar el modo de infección de la bacteria patógena en los peces, con esta información se escoge la vía de liberación/administración de fagos más adecuada para el control o tratamiento de la enfermedad (alimentación, parenteral o inmersión).

2.3.1 Vías de administración

En la actualidad, tres son las vías de administración principales para la aplicación del tratamiento con fagos: alimentación, inmersión y parenteral. En peces ha sido posible su administración a través de alimentos impregnados (24), y se observó que los fagos se disipan por el cuerpo alcanzando la mayoría de los órganos. No obstante, las etapas avanzadas algunas enfermedades tienen como consecuencia la disminución de la ingesta de alimento, por lo que los fagos podrían no estar alcanzando el foco de la infección y por ende no tener un efecto terapéutico. Se recomienda este tipo de administración en etapas tempranas de la enfermedad o como tratamiento profiláctico.

Por otra parte, administrar los fagos vía inmersión ha mostrado porcentajes de sobrevivencia de 100% en peces al ser desafiados con bacterias patógenas (14). Sin embargo, no se ha logrado establecer si la protección lograda se debe a una disminución de las cargas bacterianas en el agua o que la acción bactericida ocurra sobre los peces contagiados (sangre, mucosas, branquias, piel, etc.).

Por último, la aplicación de bacteriófagos vía parenteral en peces ha mostrado resultados exitosos en desafíos de protección (13,24). Se ha descrito que la administración de fagos en músculo o intraperitonealmente, los cuales se transfieren al torrente sanguíneo, translocándose a distintos órganos (hígados, riñones, cerebro) (25–28). Esto tiene una gran implicancia debido a que los fagos podrían transportarse dentro del cuerpo de los peces alcanzando los focos de infecciones y así ejercer su efecto bactericida. En este caso, la aplicación de inyecciones en un gran número de peces son prácticas costosas y de riesgo, considerando los efectos colaterales que este tipo de método produce en el pez, como lo es el estrés.

En resumen, si bien se ha demostrado la capacidad de los fagos en controlar las infecciones por bacteria patógenas en salmicultura, así como otras especies en acuicultura, se debe establecer el comportamiento de los fagos según vía de administración (Figura 11), y así lograr entender de mejor manera el modo de acción de los fagos utilizados como un fármaco.

Referencia

1. Brussaard CPD. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions. Vol. Volume 1:I, Bacteriophages:Methods and Protocols. 2009. 97-111 p.
2. Popoff M. Study of *Aeromonas salmonicida* II Characterization of the Phages Acting on *Aeromonas salmonicida* and Phage-Typing(1). *Ann Vet Res.* 1971;2(1):33–45.
3. Paterson WD, Douglas RJ, Grinyer I, McDermott LA. Isolation and Preliminary Characterization of Some *Aeromonas salmonicida* Bacteriophages. *J Fish Res Board Canada* [Internet]. NRC Research Press; 1969 Mar 1;26(3):629–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1139/f69-056>
4. Popoff M, Vieu JF. [Bacteriophages and lysotyping of *Aeromonas salmonicida*]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. FRANCE*; 1970 May;18:2219–22.
5. Imbeault S, Parent S, Lagacé M, Uhland CF, Blais JF. Using bacteriophages to prevent furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in farmed brook trout. *J Aquat Anim Health.* 2006;18(3):203–14.
6. Verner-Jeffreys DW, Algoet M, Pond MJ, Virdee HK, Bagwell NJ, Roberts EG. Furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is not readily controllable by bacteriophage therapy. *Aquaculture* [Internet]. 2007;270(1–4):475–84. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848607004553>
7. Kim JH, Son JS, Choi YJ, Choresca CH, Shin SP, Han JE, et al. Isolation and characterization of a lytic Myoviridae bacteriophage PAS-1 with broad infectivity in *Aeromonas salmonicida*. *Curr Microbiol. United States*; 2012 May;64(5):418–26.
8. Rodgers CJ, Pringle JH, McCarthy DH, Austin B. Quantitative and Qualitative Studies of *Aeromonas salmonicida* Bacteriophage. *Microbiology* [Internet]. 1981;125(2):335–45. Available from: <http://mic.sgmjournals.org/content/125/2/335.short>
9. Stevenson RM, Airdrie DW. Isolation of *Yersinia ruckeri* Bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1984;47(6):1201–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articleren>

- der.fcgi?artid=240195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
10. Yuksel SA, Thompson KD, Ellis AE, Adams A. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and associated phage particles. *Dis Aquat Organ*. 2001;44:231–5.
 11. Stenholm AR, Dalsgaard I, Middelboe M. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2008;74(13):4070–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18469131> <http://aem.asm.org/content/74/13/4070.full.pdf>
 12. Laanto E, Sundberg LR, Bamford JKH. Phage specificity of the freshwater fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(21):7868–72.
 13. Castillo D, Higuera G, Villa M, Middelboe M, Dalsgaard I, Madsen L, et al. Diversity of *Flavobacterium psychrophilum* and the potential use of its phages for protection against bacterial cold water disease in salmonids. *J Fish Dis*. 2012;35(3).
 14. Higuera G, Bastías R, Tsertsvadze G, Romero J, Espejo RT. Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 2013;392–395.
 15. Kim JH, Choresca CH, Shin SP, Han JE, Jun JW, Park SC. Biological control of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *aeromonas* phage PAS-1. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2015;62(1):81–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594036>
 16. Laanto E, Bamford JKH, Laakso J, Sundberg L-R. Phage-driven loss of virulence in a fish pathogenic bacterium. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(12):e53157. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3534065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 17. Madsen L, Bertelsen SK, Dalsgaard I, Middelboe M. Dispersal and survival of *Flavobacterium psychrophilum* phages in vivo in rainbow trout and in vitro under laboratory conditions: Implications for their use in phage therapy. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(16):4853–61.
 18. Abedon S. Phage Therapy: Eco-Physiological Pharmacology. *Scientifica* (Cairo) [Internet]. 2014;2014:581639. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4054669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2014/581639/abs/>
 19. Goodridge LD. Designing phage therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010;11(1):15–27.
 20. Letarov V, Golomidova A, Tarasyan KK. Ecological basis for rational phage therapy. *Acta Naturae* [Internet]. 2010;2(1):60–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3347537&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 21. Gu J, Liu X, Li Y, Han W, Lei L, Yang Y, et al. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*. 2012;7(3).
 22. Parracho HM, Burrowes BH, Enright MC, McConville ML, Harper DR. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *J Mol Genet Med* [Internet]. 2012;6:279–86. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3410379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 23. Qadir MI, Mobeen T, Masood A, Qadir MI, Mobeen T, Masood A. Phage therapy: progress in pharmacokinetics. *Brazilian J Pharm Sci* [Internet]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2018 May 14 [cited 2018 Sep 30];54(1). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502018000100402&lng=en&tlng=en
 24. Oliveira J, Castilho F, Cunha A., Pereira MJ. Bacteriophage therapy as a bacterial

- control strategy in aquaculture. *Aquac Int.* 2012;20:879–910.
25. Nakai T, Park SC. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res Microbiol.* 2002;153(1):13–8.
 26. Kawato Y, Nakai T. Infiltration of Bacteriophages from Intestinal Tract to Circulatory System in Goldfish. *Fish Pathol.* 2012;47(3):1–6.
 27. Dabrowska K, Swiatała-Jelen K, Opolski a., Weber-Dabrowska B, Gorski A. A review: Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol.* 2005;98(1):7–13.
 28. Christiansen RH, Dalgaard I, Middelboe M, Lauritsen AH, Madsen L. Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum*-specific bacteriophages In vivo in rainbow trout upon oral administration: Implications for disease control in aquaculture. *Appl Environ Microbiol.* 2014;

2.4 Protocolo de aplicación de bacteriófagos.

El trabajo de esta etapa fue desarrollado de la siguiente manera: diseño de ensayos en peces (truchas arcoíris), estrategias de administración, protocolos de aplicación fagos (pruebas técnicas) y redacción de protocolo estandarizado con potencial aplicación de fagoterapia en acuicultura. El diseño de los ensayos así como la estrategia se discutió y determinó, a través de un panel de expertos en fagos en acuicultura (ver 2.5) y considerando las publicaciones de otros autores (revisión bibliográfica). La estrategia fue utilizar fagos previamente estudiados en el laboratorio, como el fago CHOED que infecta *Vibrio anguillarum* (Higuera et al., 2013; Romero et al., 2014). Este fago fue propuesto como modelo en el proyecto, de modo, de ensayar los tres tipos de administración (oral, baño e inyección). Luego se determinó la presencia del bacteriófago y cuantificó las partículas virales en los distintos órganos a través del tiempo.

2.4.1 Preparación y análisis de protocolos a ensayar en peces.

En esta etapa se procedió a generar los protocolos de administración del fago modelo (CHOED) que permitió evaluar el alcance de las partículas virales en órganos internos en peces, incluyó la administración por inyección intracelómica, inmersión y vía alimento (administración por inyección, baño u oral). Se planteó utilizar un fago modelo CHOED, dado el corto tiempo de ejecución del proyecto, por lo que las actividades para lograr los objetivos propuestos se realizaron en paralelo. Dada estas razones, para adelantar resultados se comenzó con los fagos derivados de estudios previos como CHOED (fago modelo), él cuenta con ventajas de propagación e incluso puede trazarse molecularmente, aunque lo que importa en esta etapa es cuantificar el fago activo en los distintos órganos de los peces. Este grupo de investigación, en estudios previos, demostraron que el fago CHOED tiene una gran capacidad de control de la infección producida por la bacteria patógena *Vibrio anguillarum* (100 % de sobrevida versus 10% del grupo sin fago).

Si bien, diversos estudios han demostrado que los fagos pueden proteger contra infección producidas por bacterias patógenas, existe poca información de cómo se distribuyen los fagos en los órganos de un pez. Se espera que esta información, que no está muy disponible en el ámbito de la acuicultura, sea de gran importancia para acercar la fagoterapia a aplicaciones más concretas en peces. Los diseños iniciales dieron paso a las Pruebas Técnicas (ensayos en peces) y con esta información se procedió a redacción del protocolo final que por tanto, consiste una propuesta validada con resultados experimentales concretos.

2.5 Diseños determinados para administración de fagos: Protocolos para evaluar distribución y cuantificación de fagos en órganos de salmónidos

El diseño de los protocolos que se utilizaron para los ensayos de distribución de los fagos en salmónidos, fue realizado por los grupos de trabajo del proyecto. Estos incluyeron a los académicos Dr. Mathias Middelboe (Universidad de Copenhague), Dr. Roberto Bastías (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso), Dr. Jaime Romero (INTA-Universidad de Chile) y Dr. Gastón Higuera (INTA- Universidad de Chile). Este diseño describió los peces a trabajar, su acondicionamiento previo a la administración de fago modelo; luego se describe el diseño separado para cada ruta de administración (inyección; baño/inmersión, alimento) y finalmente el monitoreo de fagos activos, como una medida de su dispersión, distribución y decaimiento en los órganos de los peces tratados. Estos protocolos son descritos en sección anexos (Cap. 2).

La Figura 12 muestra un esquema del objetivo de este capítulo, desde el diseño de ensayos con peces para las tres de vías administración, hasta la redacción de cada protocolo posterior a resultados de los tres diseños.

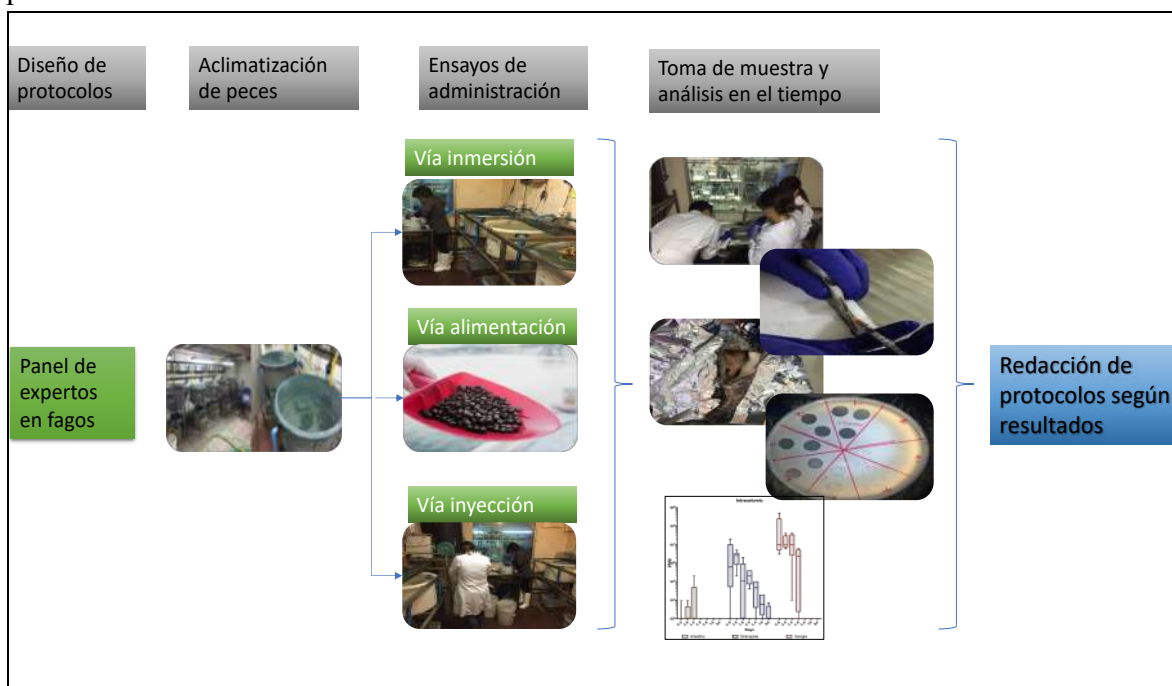


Figura 112. Esquema de estudio de vías de las tres vías de administración con el fago CHOED.

2.6 Resultados pruebas técnicas de tres vías de administración de fagos en truchas arcoíris.

2.6.1 Protocolos de administración de fagos ensayados.

Ensayo para evaluar las tres rutas de administración de fagos de acuerdo a la distribución, cantidad y permanencia de los fagos en los distintos órganos de los peces. Grupos de alevines fueron tratados con fago CHOED mediante tres vías (oral, baño e inyección) para definir la mejor ruta de administración de fago de acuerdo a criterios mencionados anteriormente. Un grupo recibió el fago CHOED mediante inyección intracelómica, se usó una dosis de fago la cual se inyectó en el espacio intestinal. Segundo grupo fue mediante baño, para ello los peces fueron inmersos en agua con fagos por un tiempo de 1 una hora. Finalmente, un tercer grupo recibió el fago mediante alimentación, el fago CHOED fue embebido en el alimento y entregado durante cinco días. Las cantidades se normalizaron por peso de los peces (Tabla 9). Los peces fueron monitoreados por nueve días, y diariamente se analizaron seis peces para determinar cantidades de fago presente en distintos órganos (intestino, bazo, riñón, hígado, branquias y mucus). El diseño implicó ensayo en estanques con 24 peces cada uno.

Tabla 9. Cantidades de fago CHOED aplicados a cada grupo de estudio.

Vías de administración	Cantidad de fago normalizado	Número de dosis
Vía Inyección	$1,6 \times 10^6$ PFU/g	1
Vía alimento	$1,6 \times 10^6$ PFU/g	5 días alimento
Vía inmersión	$1,8 \times 10^6$ PFU/g	1

Las dosis elegidas se basan en bibliografía reportada de estudios previos de grupos colaboradores internacionales como Mathias Middelboe. Estos resultados están expuestos en 2013 y 2014 en la revista Applied and Environmental Microbiology, cuyos identificadores (doi) corresponden a 10.1128/AEM.00509-13 y 10.1128/AEM.02386-14 (referencias 17 y 28 de la sección anterior).

Pruebas previas

Para el ensayo vía de administración alimento, se realizaron pruebas de permanencia del fago CHOED cuando se impregna el pellet, para ello se realizaron dos tipos de estudios:

Ensayo 1.- Se evaluó la cantidad de fago liberado al agua para 1 gramo de pellet sin recubrir en 5 ml de agua durante 60 min. Se observa en la Gráfico 1 que a los cinco minutos prácticamente todo el fago se había resuspendido en el agua desde el pellet.

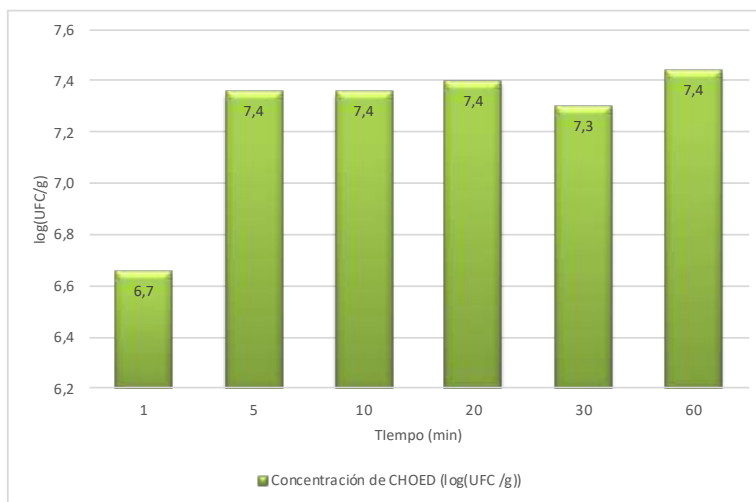


Gráfico 1. Cantidad de fago CHOED liberado en agua de pellet recubierto el tiempo. Total: corresponde a la cantidad de fagos en 25 µl de stock de Fago CHOED.

Ensayo 2.- Posteriormente, se cuantificó la cantidad de fago liberado al agua después de recubrir el pellet con aceite de pescado. El tiempo del ensayo fue de 5 minutos de agregado en agua, debido a que en el ensayo anterior a ese tiempo se había liberado el fago prácticamente completo al agua.

Los pellets (3 mm) se recubrieron con el fago CHOED directamente por aspersión. Se aplicó un volumen de fagos de 2,5 ml (concentración titulada previamente) por cada 100 g de alimento para peces, utilizando una botella de spray y un mezclador manual. Se dejó secar 30 min a temperatura ambiente en campana de flujo y luego se agregó aceite de pescado en distintas cantidades desde 1% a 10% (p/p) mediante spray. El alimento recubierto con fagos se almacenó a 4°C.

Se observa en la Gráfico 2 que a los 5 min el pellet sin el recubrimiento de aceite había liberado Fago CHOED a diferencia de los pellet con el recubrimiento de aceite, que retienen un poco más de fago.

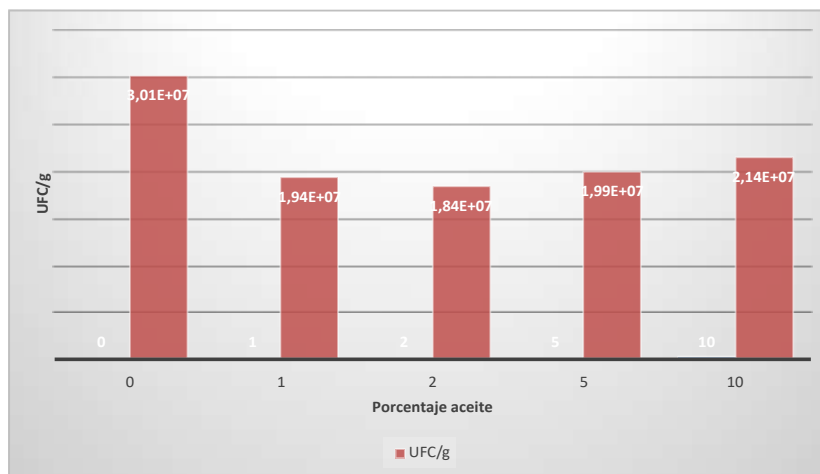


Gráfico 2. Cantidad de fago liberado en agua de pellet recubierto con distintos porcentajes de aceite de pescado. No se superó el 5% de humedad del pellet.

Para estos estudios se utilizó truchas arcoíris, libres de patógenos provenientes de la Piscicultura Rio Blanco de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Las truchas fueron monitoreadas y habituadas en estanques de estadía durante dos semanas. Se emplearon estanques con sistema de recirculación de agua e independientes, y temperatura controlada (Figura 13).



Figura 13. Estanques de estadías para adecuación de peces.

Ensayo 3.- Revisión de los peces y su condición de peso y longitud para distribución en ensayos. La tabla 4 muestra los promedios de pesos y longitudes de las truchas arcoíris utilizadas en los ensayos. Los ensayos de vías de administración, alimento e inmersión, no presentaron diferencias en longitudes.

Tabla 10. Descripción de peso y longitud de los peces utilizados en ensayos.

Variables	Vías de administración		
	Inyección (N=48)	Alimento (N=48)	Inmersión (N=48)
Peso (g)	61,3 (±8,1)	62,4 (±7,5)	46 (±5,8)
Longitud (cm)	18,2 (±1)	17,6 (±0,7)	16,6 (±0,7)

2.6.2 Presencia de fago CHOED en los distintos tipos de muestras según vía de administración.

Para llegar a los resultados de comparar las distintas vías de administración, se analizaron los diferentes tipos de muestras, de modo de determinar la presencia y cuantificar el fago CHOED. El límite de detección de la técnica del doble agar para cuantificación de fagos, permite medir sobre 100 UFP/mL.

La tabla 5 muestra los porcentajes de muestras en las cuales se detectaron fagos para cada vía de administración. Cuando se administró por inyección se observó la presencia del fago en todos los tipos de muestras, donde branquias alcanzó el máximo de presencia del total de peces. Por otra parte, vía alimento tan sólo se observó un 4% de la presencia del fago en hígado. Por último, vía inmersión tan solo en tres tipos de muestra se observó la presencia del fago (sangre, branquias y mucus). Cabe mencionar, que para esta vía se añadió el análisis del mucus debido al tipo de administración, donde queda el pez expuesto al fago directamente.

Tabla 11. Proporción de peces donde se detectan fagos según vía de administración y tipo de muestra.

Tipo de muestra	Vía de administración de fago CHOED		
	Inyección (N=48)	Alimento (N=48)	Inmersión (N=48)
Sangre	13%	0%	17%
Branquias	83%	0%	33%
Mucus	ND	ND	23%
Hígado	50%	4%	0%
Bazo	58%	0%	0%
Intestino	6%	0%	0%
Riñón	75%	0%	0%

Nota: Se consideró como presencia de fagos en un pez, cuando la concentración en la muestra (sangre, branquias, mucus, hígado, bazo, intestino y riñón) superó el límite de detección de la técnica* (1×10^2 UFP/g de muestra) de la técnica (método de doble agar); ND: no determinado.

*Método de doble agar para cuantificación de fagos.

2.6.3 Cuantificación de fago CHOED en los distintos tipos de muestras según vía de administración.

En el gráfico 3 se observa que la administración de fagos, vía inyección, es el único método que logra una concentración detectable de fagos en todos los órganos analizados y en sangre. Cuando la administración de fagos es vía alimentos, solo en el hígado se cuantifican fagos por sobre el límite de detección. Finalmente, cuando la administración de fagos es vía inmersión, se logra una concentración detectable de fagos en sangre, branquias y mucus.

Respecto a las concentraciones de fagos obtenidas en sangre se observa que la mayor concentración se alcanza vía inyección (1×10^7 UFP/mL), la menor la presenta vía inmersión con 1×10^3 UFP/mL. Además, sangre es el tipo de muestra que alcanzó la mayor concentración comparado con los tejidos en las otras vías. Por otra parte, concentraciones de fagos cuantificadas en hígado, son la segunda más alta de todas las muestras en conjunto con mucus, 5.0×10^5 y 2.5×10^5 UFP/g respectivamente.

En la administración de fagos, vía alimento, fue el único órgano que se detectó el fago con una concentración de 3.2×10^3 UFP/g. Las concentraciones de fagos en branquias fueron similares para los tipos de administración inyección e inmersión ($>1 \times 10^4$ UFP/g), en administración vía alimento no se detecta el fago.

Las concentraciones de fagos en riñón, bazo e intestino solo se detectan cuando se aplica vía inyección, superando $>1 \times 10^4$ UFP/g de tejido para las dos primeras y $>1 \times 10^3$ UFP/g. En la tabla 6 se muestra todos los valores de medianas y rango intercuartílicos (RIC), así como los valores mínimos y máximos para cada tipo de muestra según vía de administración.

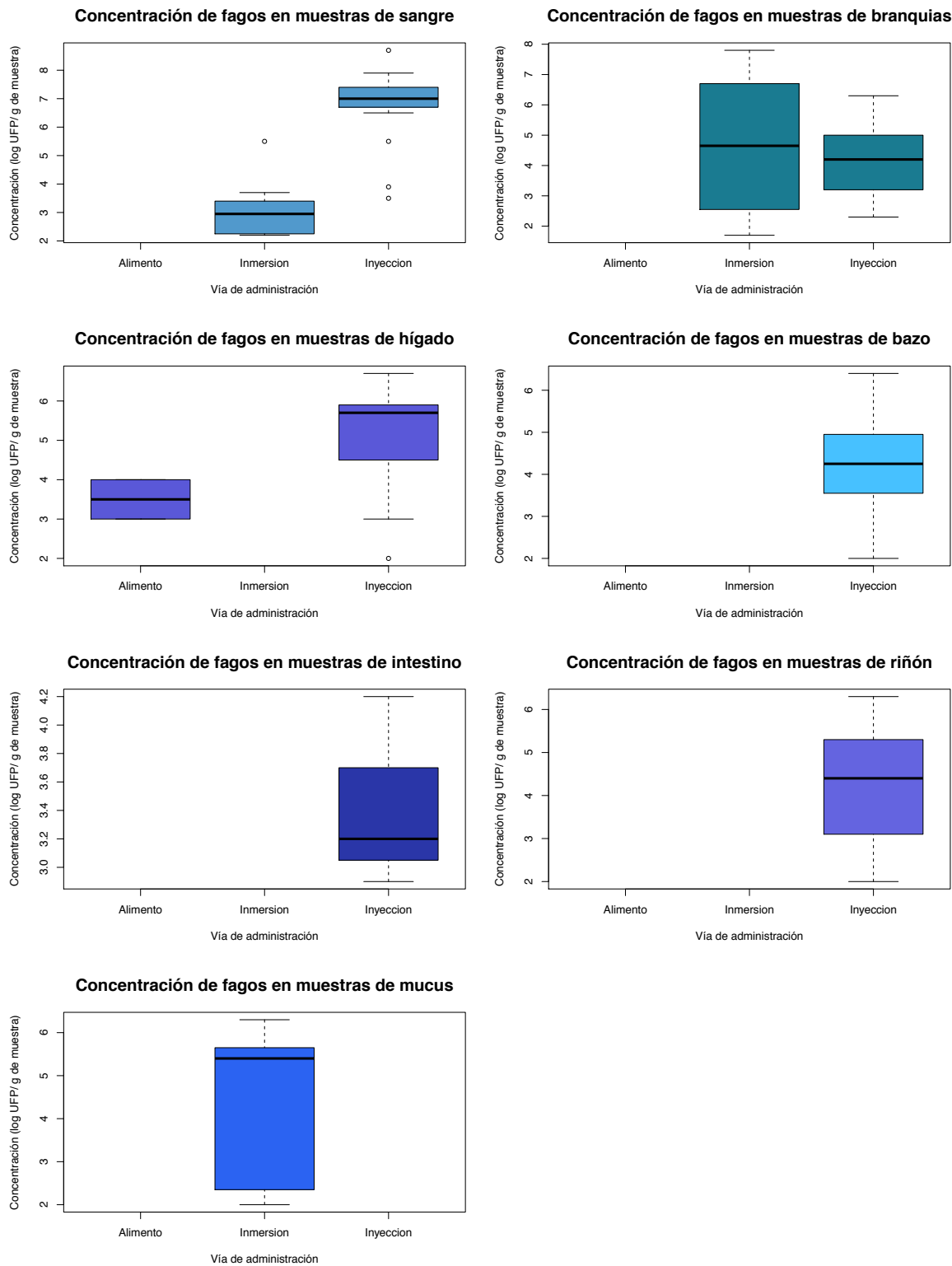


Gráfico 3. Concentraciones de fagos según muestra analizada y vía de administración.

Tabla 12. Descripción de las concentraciones de fagos alcanzadas según tipo de muestra y vía de administración.

Tipo de muestra	Vía Inyección			Vía Alimento			Vía Inmersión		
	Mediana (RIC)	Mín	Máx	Mediana (RIC)	Mín	Máx	Mediana (RIC)	Mín	Máx
Sangre (ufp/mL)	1×10^7 ($5,0 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^7$)	$3,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^8$	0,0	0,0	0,0	1×10^3 ($2,0 \times 10^2$ - $2,0 \times 10^3$)	$1,5 \times 10^2$	$3,2 \times 10^5$
Branquia (ufp/g)	$1,6 \times 10^4$ ($2,0 \times 10^3$ - $1,0 \times 10^5$)	$2,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^6$	0,0	0,0	0,0	$5,0 \times 10^4$ ($4,0 \times 10^2$ - $5,0 \times 10^6$)	$5,0 \times 10^1$	$6,3 \times 10^7$
Mucus (ufp/g)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$2,5 \times 10^5$ ($2,5 \times 10^3$ - $5,0 \times 10^5$)	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^6$
Hígado (ufp/g)	$5,0 \times 10^5$ ($4,0 \times 10^4$ - $7,9 \times 10^5$)	1×10^2	$5,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^3$ ($2,0 \times 10^3$ - $6,3 \times 10^3$)	1×10^3	1×10^4	0,0	0,0	0,0
Bazo (ufp/g)	$2,0 \times 10^4$ ($4,0 \times 10^4$ - $6,3 \times 10^4$)	1×10^2	$2,5 \times 10^6$	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Intestino (ufp/g)	$1,6 \times 10^3$ (1×10^3 - 5×10^3)	$7,9 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Riñón (ufp/g)	$2,5 \times 10^4$ ($1,6 \times 10^3$ - $2,0 \times 10^5$)	1×10^2	2×10^6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

2.6.4 Análisis de distribución del fago CHOED en el tiempo según vía de administración.

El ensayo vía inmersión tuvo un manejo aceptable en la concentración inicial del fago CHOED aplicado a cada pez, debido a que la concentración final de fagos en el agua fue aplicada como una sola dosis por un tiempo de una hora. La primera muestra (6 peces) se realizó a las 3 horas inmersión de fago CHOED (día 0). Solo se pudo detectar y cuantificar el fago CHOED en muestras de branquias, sangre y mucus (gráfico 4). Las branquias tuvieron las más altas concentraciones comparado con el resto de órganos, teniendo el máximo a las 3 horas. Por otra parte, cabe mencionar que la presencia del fago CHOED en el agua siempre estuvo presente con concentraciones superiores a 10^3 a 10^4 ufp/mL.

Phage pfu immersion

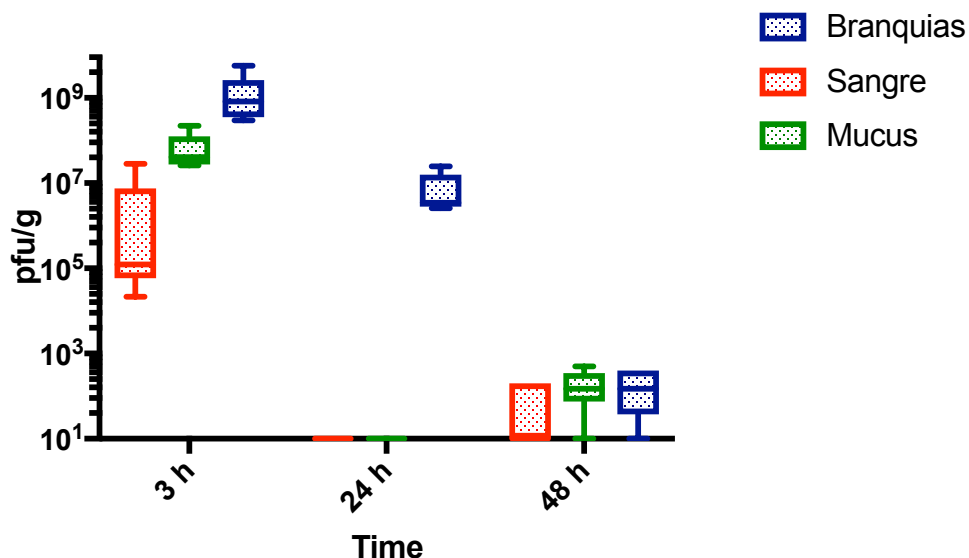


Gráfico 4. Concentraciones del fago CHOED en los tres tipos de muestras positivas de trucha arcoíris, a través de tiempo. Ensayo con tiempo de duración de 9 días.

El ensayo vía alimentación se realizó a través de alimentación diaria por 5 días con pellet impregnados del Fago CHOED. En este ensayo, se analizaron el mismo tipo de muestras mencionados anteriormente, sin embargo, sólo se pudo medir la presencia del fago CHOED, en dos muestras de hígados. Las concentraciones fueron superiores a 1×10^3 UFP/g, en los días 2 y 5.

Con lo que respecta al ensayo vía inyección se encontró rápidamente el fago CHOED a las 3 horas (día 0), y tuvo las más altas concentraciones comparado con el resto de órganos (Gráfico 5), teniendo el máximo al día dos. Por otra parte, en las branquias a las 3 horas alcanza concentraciones superiores al orden de 10^6 ufp/g, y el fago CHOED se mantiene presente en el tejido hasta el día ocho (fin del ensayo), con concentraciones máximas cercanas al orden de 10^4 ufp/g. En las muestras de contenido intestinal se observaron las menores concentraciones comparado con los otros órganos. La mayor cantidad de fago CHOED se detectó a las 3 horas post inyección 10^6 ufp/g (gráfico 5), y se pudo detectar el fago CHOED solo hasta el día 4.

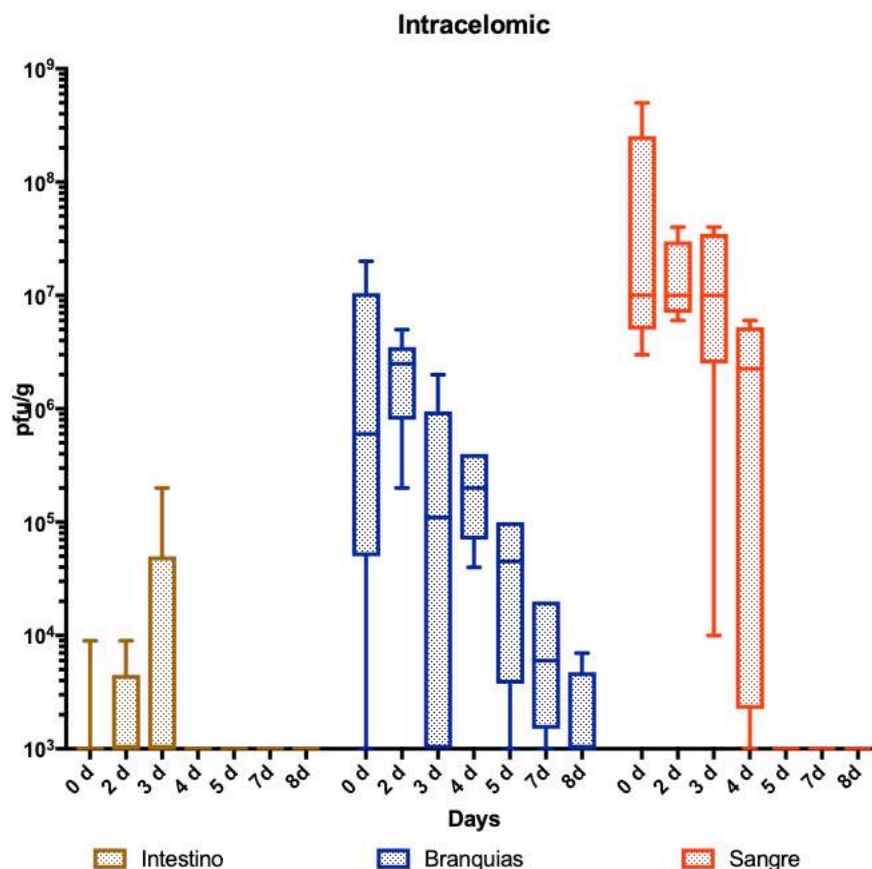


Gráfico 5. Distribución de las concentraciones del fago CHOED en órganos interno, a través de tiempo. Ensayo con tiempo de duración de 8 días.

Las muestras de hígados mostraron que al día 1 se alcanzó la concentración del fago CHOED más alta, del orden de 10^6 ufp/g, y esta se mantuvo hasta el día 4. Al día 7 y 8 ya no se detectó fagos en las muestras (gráfico 6). Las muestras de riñones son el siguiente órgano después de la sangre donde se determinó las más altas concentraciones de fagos CHOED. En los días 1 y 4 se alcanzaron las concentraciones del fago CHOED más altas, en el orden de 10^7 ufp/g. Al día 7 y 8 ya no se detectó fagos en las muestras (gráfico 6). En las muestras de bazo se observaron concentraciones similares hasta segundo día post inyección, en el orden de 10^6 UFP/g. Por otra parte, se pudo detectar el fago CHOED hasta el día 6 similar a la sangre e hígado, sin embargo, la concentración fue superior en 100 y 10 veces respectivamente (10^5 ufp/g).

Intracelomic

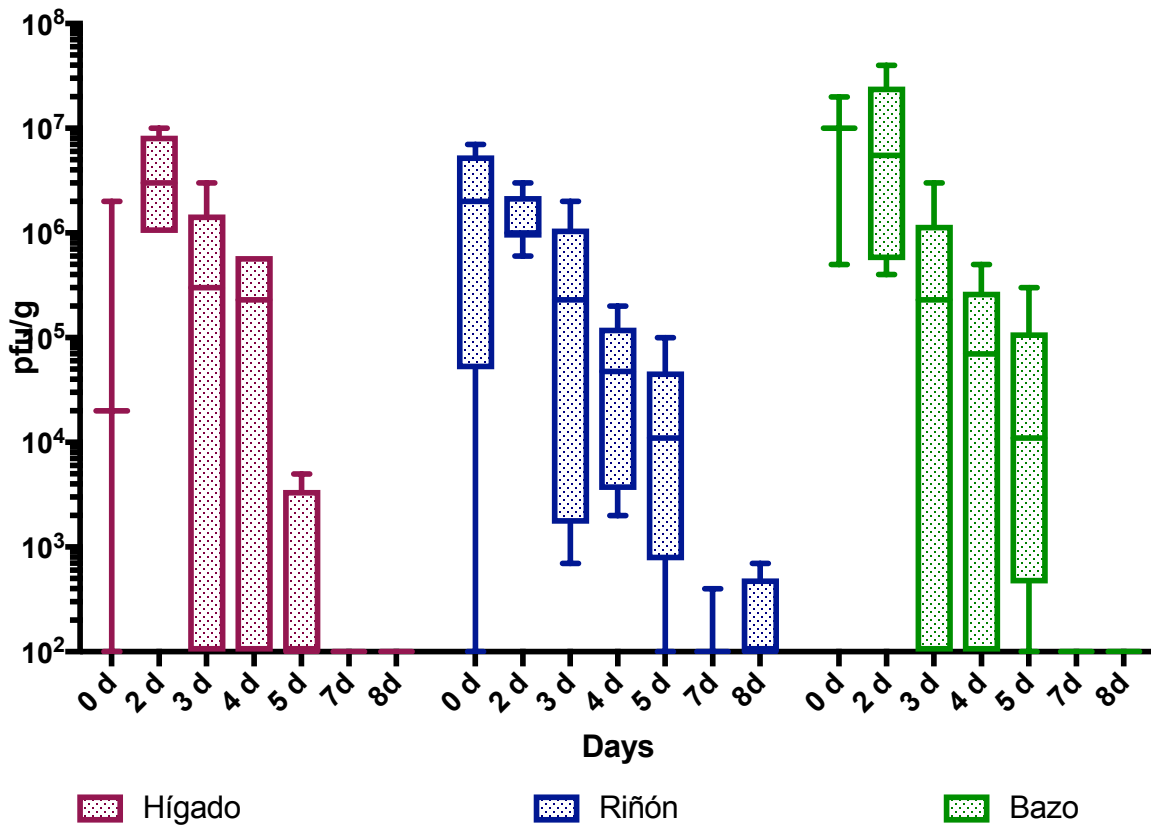


Gráfico 6. Distribución de las concentraciones del fago CHOED en órganos internos, a través de tiempo. Ensayo con tiempo de duración de 8 días.

Conclusiones

Los ensayos de las pruebas técnicas que se realizaron con el fago modelo CHOED vía inyección, inmersión y alimento arrojaron interesantes resultados en cuanto a la capacidad de detectar y cuantificar el fago en diversos órganos/tejidos, entre ellos sangre, hígado, bazo y contenido intestinal. De las tres alternativas de administración, la “vía inyección intracelómica” resultó con la más amplia distribución de fagos en los diferentes tejidos analizados, y la mayor permanencia del fago CHOED durante todo el tiempo de ensayo.

En general, el fago modelo CHOED es capaz de alcanzar todos los tejidos medidos, aunque con diferente concentración, es mayor en sangre y menor en contenido intestinal. En general, el fago es capaz de mantenerse en un nivel alto de concentración durante 4 días, luego de lo cual se observa un decaimiento en todos los tejidos, aunque el fago es detectable entonces por más de 7 días. Cabe destacar, que el fago en dos de los métodos (inyección intracelómica e inmersión) se pudo detectar en branquias de truchas, uno de los principales órganos afectados por el ataque de bacterias patógenas.

CAPITULO 3

Uso de fagoterapia pre-comercial y comercial. Informe compilado y actualizado

Compilación y actualización.

Compilación para conseguir el Registro de productos en base a Bacteriófagos

En Chile los productos farmacéuticos veterinarios, incluyendo los productos de uso acuícola, están regulados por el Ministerio de Agricultura mediante el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG); en base a lo dispuesto en la letra ñ) del Artículo 7° de la LEY 18.755 de 1989 y sus modificaciones propuestas en la Ley 19.283 con especial importancia los Artículos 41° y 42°. En dichos artículos se hace referencia el reglamento de Productos Farmacéuticos de uso Exclusivamente Veterinario el cual fue aprobado mediante el decreto N°25 de 2005. Para efectos de la presente propuesta es importante destacar el Artículo 2 del reglamento (Decreto N° 25) donde se establece que solo se podrá fabricar, importar, exportar, tener, distribuir, transferir a cualquier título productos de uso exclusivamente veterinario productos registrados en el SAG y solo podrá ejercer estas actividades el titular de registro.

No obstante, la función específica del SAG en relación con el registro y control de los productos de uso exclusivamente veterinarios, dentro de los cuales están los productos acuícolas. Existe un convenio de colaboración Interinstitucional con el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca). Institución que tiene la facultad de poder pronunciarse en particular de la pertinencia epidemiológica de los productos de uso acuícola, apoyando al SAG en las materias técnicas que sean requeridas. Esto indica que el proceso de registro y fabricación de productos terapéuticos para fagoterapia acuícola deberán ser presentados y coordinados con el Sernapesca en forma paralela a su registro en el SAG, esto con la idea de aunar criterios para establecer conceptos generales necesarios para el registro de estos productos.

Descripción del producto para fagoterapia contra el SRS

El producto farmacéutico de origen biológico será un tratamiento para la prevención de la Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) o Piscirikettsiosis. El cual corresponderá una suspensión farmacéutica que estará compuesta por un mix de bacteriófagos líticos de *Piscirickettsia salmonis* con un título de 5×10^8 PFU por ml de producto y adyuvantes. La administración del producto en los peces será por vía de inyección, inicialmente propuesta la vía intraperitoneal. La producción de las partículas virales se realizará en biorreactores aeróbicos en medio de cultivo enriquecido para producir crecimiento bacteriano, utilizando 1×10^6 bac/ml para su replicación. La obtención de partículas se realizará mediante filtración tangencial, aunque puede combinarse con otros métodos de precipitación recientemente descritos (John et al 2011; doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00208.x). Posteriormente con las partículas virales desarrollar el envasado del producto en ambientes estériles y excipientes autorizados (sales). El producto será comercializado como una suspensión inyectable en una presentación multidosis, donde serán incorporados fagos líticos contra *Piscirickettsia salmonis*.

En relación con la descripción del producto es posible establecer que en la actualidad la legislación de Chile desarrollada por el SAG no contempla regulaciones claras para este tipo de productos. Debido a que un producto para fagoterapia posee un origen biológico, sin embargo, actúa como un producto farmacológico. De la misma forma, es posible considerar que la actual legislación no contempla con claridad exigencias regulatorias y normativas

para la autorización de laboratorios para la producción de fagos y fabricación de productos para fagoterapia. En este sentido sería necesario establecer una guía de actividades que debe ejecutar el solicitante para la presentación de un expediente de registro de un producto para fagoterapia; trabajo que deberá ser coordinado con el SAG con colaboración de Sernapesca.

El registro de un producto farmacológico o inmunológico tiene como función poder verificar la calidad, eficacia e inocuidad, mediante una exhaustiva evaluación y reconocimiento de los antecedentes por parte del personal calificado del SAG. Un aspecto importante de los productos acuícolas es que adicionalmente es importante establecer riesgos de impacto ambiental, así como también como posibles riesgos de su aplicación en animales de consumo para el hombre; debido a de los productos ya que los compuestos y sus metabolitos, son liberados directamente hacia el agua.

Proceso de Registro:

El procedimiento de registro de producto farmacéutico de uso exclusivamente veterinario debe ser iniciado desde la plataforma del SAG <http://autorizacionproductos-sag.gob.cl>, utilizando una cuenta previamente otorgada por el Servicio. Aunque el registro de un producto puede ser solicitado por cualquier persona natural o jurídica representada y domiciliada en Chile Artículo 4° decreto N° 25, es claro que adicionalmente es necesario solicitar permisos de fabricación del producto en Chile regulación indicada en el Título III Artículo 17°, 18°, 19° y 20° del decreto N°25, siendo especialmente importante a razón de esta propuesta el Artículo 21° el cual trata el tema de la fabricación de Productos biológicos. Adicionalmente el SAG mantiene una Guía con las actividades que debe ejecutar el solicitante para la presentación de un expediente de registro de un producto farmacológico (versión 05- 11/1/2018).

El SAG define el cargo de Director/a Técnico/a como: “Químico farmacéutico, médico veterinario u otro profesional idóneo, el cual es responsable ante el Servicio Agrícola y Ganadero de la información que se presenta en los expedientes de registro y que los productos registrados se comercialicen en conformidad con lo autorizado, además de otras funciones inherentes a su cargo y establecidas en la normativa vigente”.

Certificados requeridos para el proceso:

Los antecedentes básicos para realizar un proceso de registro se encuentran establecidos en el Artículo 5 del Decreto N°25. Inicialmente se establece la presentación de diferentes certificados asociados con la representación de productos de importación, no aplicables directamente a esta propuesta que está proyectando un producto de fabricación nacional. En este sentido, para iniciar un proceso de registro de un producto debe presentarse un certificado de habilitación del laboratorio fabricante y de la misma forma deberá ser entregada una memoria descriptiva del laboratorio fabricante con especial énfasis en registrar al director técnico de la empresa; esto indica que es necesario iniciar las gestiones de autorización de la fábrica previamente a la presentación del dossier de registro del producto. Adicionalmente si el producto será denominado por una marca comercial deberá ser adjuntado el certificado de registro de marca comercial.

Preparación del Expediente de registro (Dossier de registro):

La presente propuesta considera que la comercialización del será realizada en una suspensión inyectable en una presentación en frasco multidosis de 500 ml (2500 dosis) y 1000 ml (5000 dosis). Cada dosis individual es de 0.2 ml conteniendo 1×10^8 UFP.

a) Lo primero que debe contener un registro es la fórmula completa del producto.

Cada 1 ml del producto contiene:

Cepa bacteriófago A	1×10^8 UFP
Cepa bacteriófago B	1×10^8 UFP
Cepa bacteriófago C	1×10^8 UFP
Cepa bacteriófago D	1×10^8 UFP
Cepa bacteriófago E	1×10^8 UFP
Excipientes		
Caseína	1 mg
Ca ²⁺	0,2 ng
Agua	100 ml

UFP: Unidades Formadoras de Placas

En el caso de que el proceso de fabricación no permita obtener una unidad específica de fagos, será necesario establecer la cantidad mínima y máxima en que estos se encuentran en el producto final. Adicionalmente las cepas de fago deberán ser expresadas según lo dispone la nomenclatura taxonómica internacional.

b) Particularidades clínicas:

El producto para fagoterapia está destinado para ser utilizado en especies de salmónidos como: salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón coho (*Oncorhynchus kitsuch*); pudiendo ser administrado desde los 20 g de peso, pero preferentemente para los individuos previamente o durante el cultivo en mar. Se propone una dosis de 1×10^8 UFP por individuo contenida en un volumen de 0,2 ml, la administración de mayor eficacia evaluada en los ensayos preliminares es la vía inyectable. Se deberán señalar las recomendaciones que permitan asegurar un correcto modo de empleo del producto.

El producto para fagoterapia está dirigido para prevenir la infección por *Piscirickettsia salmonis*, el expediente de registro deberá incluir ensayos de eficacia validados estadísticamente que demuestren una protección de la administración del producto.

El expediente de registro deberá contener información clara y precisa con relación a los siguientes puntos: establecer posibles contraindicaciones o efectos adversos del uso de fagos en los peces, precauciones especiales asociadas al producto, período de resguardo, efecto de sobredosis del producto, posibles interacciones con otros productos farmacológicos o inmunológicos, precauciones especiales para el operador si corresponde. Las anteriores exigencias deberán ser evaluadas en diferentes ensayos clínicos de inocuidad y seguridad del producto.

c) Particularidades farmacéuticas:

Este punto dice relación principalmente con establecer el período de eficacia del producto (estabilidad).

Indicar requerimientos de almacenamiento del producto como también las indicaciones para el correcto almacenaje del producto.

En este punto también son necesarios los posibles impactos ambientales, que en el caso del producto propuesto no existen impactos ambientales del tipo tóxico a ninguna especie con excepción de cepas de *Piscirickettsia salmonis*.

Descripción completa de la empresa fabricante del producto.

d) Proyecto de rotulado gráfico:

Dentro del expediente es necesario incluir una propuesta del proyecto de rotulado gráfico que deberá incluir todos los antecedentes anteriormente señalados en las particularidades clínicas y farmacéuticas. También un rotulado del frasco deberá contener las siguientes frases “FRASCO MULTIDOSIS”, “USO VETERINARIO”, “MANTENER FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS”, REG SAG todas estas frases en forma destacada o negrita; adicionalmente la fecha de fabricación y fecha de vencimiento para cada lote de producción.

e) Calidad del producto:

En este capítulo del expediente de registro se deberá nuevamente presentar la fórmula completa del producto, como fue señalado en el punto a). En forma adjunta se deberán señalar los requisitos de calidad de cada componente del producto en este caso de cada cepa de bacteriófago y los adyuvantes; todos deben ser referenciados a una farmacopea o monografía interna. Lo anterior indica que los bacteriófagos recomendados para el producto deberán ser claramente identificados y estudiados con la idea de presentar monografías que establezcan su calidad e identidad para ser evaluada en el producto final.

f) Descripción del método de fabricación:

Deberá ser incorporado en forma detallada y pasó a paso cada etapa del proceso productivo y sus distintos niveles de control del producto en proceso y controles del producto terminado. Identificar el tamaño máximo de una serie normal.

El control de calidad deberá incluir nombre y código del bacteriófago, número de pasajes desde la fecha de aislamiento, descripción del banco de semilla, control del banco de semilla, condiciones de almacenamiento del banco de semilla. En este punto es posible considerar que el producto de fagoterapia puede requerir algunos controles nuevos no contemplados en los productos inmunológicos o farmacéuticos como riesgo de lisogenia del bacteriófago. Las materias primas de origen biológico también deberán ser enumeradas y establecer sus controles de calidad durante el proceso de fabricación. Materiales como envases deberán ser claramente especificados.

Adjuntar la metodología analítica del control de calidad de la fabricación. Es importante considerar que estos desarrollos deben ser fabricados en lugares autorizados para ello, sean estos nacionales o internacionales.

Especificaciones del producto terminado:

Parámetro	Especificación (Criterio de aceptación)	Método de análisis
Esterilidad bacteriana y fúngica		
Pureza		
Identidad		
Patógenos extraños		
Seguridad		
Potencia		
Parámetros físico - químicos		
Otros, según corresponda		

g) Información sobre seguridad y residuos:

Será necesario realizar pruebas de seguridad utilizando las especies de destino, utilizando peces del menor calibre recomendado, para este producto 20 g. Aplicar dosis recomendada, dosis repetida o sobredosis a tres series pilotos o comerciales del producto. Para estos ensayos se deberá intentar utilizar el máximo título propuesto para el producto y para el producto solamente la vía de administración por inyección que es la recomendada. Todas las pruebas deberán ser realizadas en condiciones controladas.

Los estudios de laboratorio deberán corroborarse con estudios de campo, con un número estadísticamente representativo de animales.

Evaluación del riesgo ambiental. Se debe adjuntar esta evaluación. Es probable que una revisión acabada de otras regulaciones pudiera apoyar el uso de fagos.

h) Información sobre eficacia:

La eficacia deberá también demostrarse en tres pruebas pilotos realizada en la especie de destino idealmente salmón del Atlántico para el producto de fagoterapia contra el SRS.

En el caso de los productos combinados la eficacia deberá demostrarse para cada uno de los componentes. El caso del presente producto esto deberá analizarse debido a que, aunque está conformado por diferentes bacteriófagos todo ellos son líticos para la misma bacteria *Piscirickettsia salmonis*.

Deberán presentarse estudios en condiciones controladas de laboratorio como en condición de campo.

Actualización de información en cuanto a de productos en base a Bacteriófagos en el área acuicultura.

Recientemente, nuestra revisión señaló la existencia de un producto en Noruega enfocado en combatir una infección bacteria que afecta la acuicultura, mediante un formulado de fagos. La empresa que ha desarrollado el producto es ACDpharma y el producto corresponde a CUSTUS®YRS. Es una formulación que contiene bacteriófagos que específicamente infectan y matan a la bacteria *Yersinia ruckeri*. CUSTUS®YRS se utiliza para reducir la presión de infección de *Yersinia ruckeri* sin afectar el resto de la microbiota en el agua.



ACDPHARMA
INNOVATIONS IN AQUACULTURE

Home Products ▾ Contact us About ACD

The bacteriophage project

CUSTUS™ YRS

Bacterial infections cause tremendous suffering and great economic loss in aquaculture farms across the globe. New vaccines are developed and farmers become ever more conscious about biocontrol to reduce the risk of disease outbreaks. Still, bacterial infection remains a serious challenge.

There is great need for additional tools to improve the situation, preferably tools which are safe, efficient and friendly to the environment.

Bacteriophages are viruses which specifically infect bacteria. They are natural predators of bacteria, and Nature's own biocontrol tools, efficiently ensuring that no single bacterium becomes too dominant in an environment.

Bacteriophages are present in high abundance in all of the biosphere, including oceans, lakes, soil, food and all living creatures. They are highly adapted to infect specific bacterial hosts, and as a result of this host specificity, only target bacteria are killed during treatment. In other words, bacteriophage based products do not affect the commensal microflora of the patient or aquaculture farm water, which is a common side-effect of broad-range antibacterials.

The ACD bacteriophage project aims at developing bacteriophage based products, as efficient tools to give improved biological control in aquaculture farming. We believe that bacteriophages will be important means of reducing the use of antibiotics in aquaculture industries worldwide. Our target products are safe, natural, efficient and targeted against specific bacterial pathogens, thus leaving minimal environmental footprints.

Our Bacteriophage therapy project was started in 2011 and has seen promising results of phage therapy against many bacterial pathogens common in aquaculture.



Picture shows to bacteria that are infected with a bacteriophage (type: Podoviridae)

La introducción de este producto señala un camino para la fagoterapia en acuicultura, ya que impulsa la adopción de esta tecnología. Es así como muchas de las preguntas más frecuentes en cuanto a los fagos y sus efectos están más cerca de responderse y de ser aceptados por los consumidores y productores.

A continuación, una lista de preguntas frecuentes y sus respuestas en cuanto a fagoterapia basado en la experiencia de Custus.

¿Por qué debo usar bacteriófagos en mi producción?

Los bacteriófagos matan las bacterias, reduciendo la presión de la infección (cantidad de bacterias en el agua) y ayudará a evitar la infección bacteriana en los peces. Esto conduce a un mejor bienestar y producción de los peces.

¿Son los bacteriófagos peligrosos?

No. Solo son peligrosos para las bacterias que están especializadas en infectar y matar.

¿Hay algún efecto secundario?

No. Solo las bacterias objetivo, en este caso, se ven afectadas por el tratamiento del agua. Los bacteriófagos están en todas partes. Todos los organismos vivos, así como el medio ambiente que nos rodea, están constantemente expuestos a los bacteriófagos.

¿Cuál es el modo de acción?

Los bacteriófagos específicos de contra un patógeno, ya están presentes en el agua en los criaderos que tienen problemas con estos patógenos, sin embargo, la concentración de bacteriófagos es demasiado baja para que la bacteria se vea afectada positivamente por su presencia. Al usar bacteriófagos formulados aumentará la concentración de bacteriófagos, lo que aumentará significativamente la probabilidad de infección y la terminación de la bacteria patógena en cuestión.

¿Pueden los bacteriófagos afectar el medio ambiente?

Los bacteriófagos son de la naturaleza y desempeñan un papel importante en el medio ambiente. En la naturaleza, mantienen el número de bacterias en un nivel tolerable para otros organismos en el ambiente.

¿Al agregar conscientemente bacteriófagos al agua, le da la oportunidad de controlar las bacterias con las que están desarrollados para combatir?

La cantidad de bacteriófagos agregados al agua es una parte tan pequeña del contenido total de organismos en el agua y no afectará el medio ambiente fuera del criadero de ninguna manera. Al agregar un formulado de fagos al agua de producción, verá una mayor concentración de los bacteriófagos durante un corto período de tiempo hasta que comience a reemplazar el agua. Pero tiene un impacto insignificante en el número de bacteriófagos que se liberan naturalmente desde el criadero diariamente.

Laboratorio de Biotecnología – **Informe N° 4** “Desarrollo e implementación de un tratamiento por fagoterapia para el control del patógeno de salmones *Piscirickettsia salmonis*”

CAPITULO 4

Difusión del proyecto y sus resultados -

Difusión del proyecto y sus resultados

Esta etapa corresponde a las actividades de difusión de los resultados tanto a la industria, a la academia y al público. Estos tomaron la forma de publicaciones y de workshop internacional. En cuanto a las publicaciones, considerando los resultados, se procedió a la redacción de publicaciones del tipo técnica y otra de tipo científica de modo de abarcar una audiencia amplia desde la industria en medios cercanos a ella hasta la academia, para lo cual sometemos un artículo a revista indexada. Además, con el objetivo de abordar público masivo, se ha marcado presencia en medios masivos como la radio y se han hecho publicaciones en sitios web.

Esta sección comenzará con las publicaciones realizadas y luego se describirán las difusiones logradas en diversos medios.

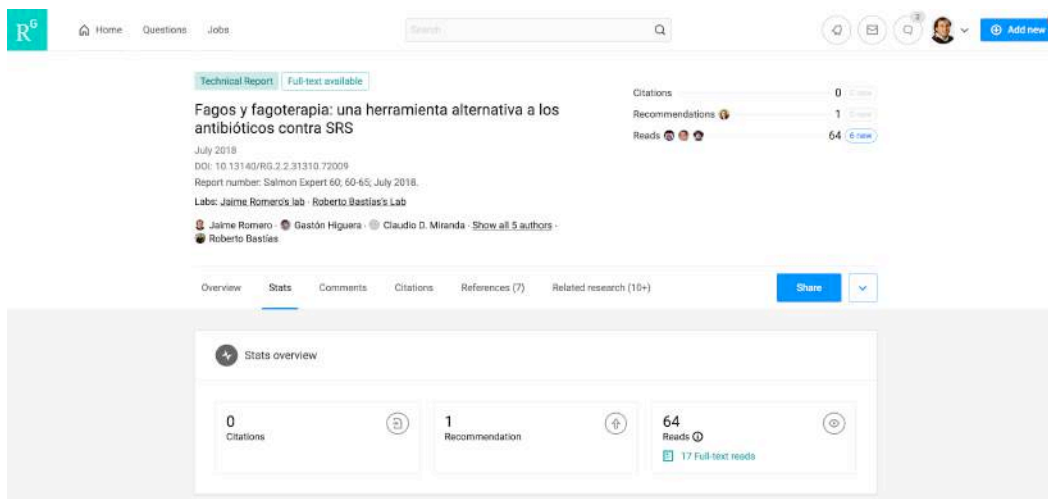
Hito 4.2

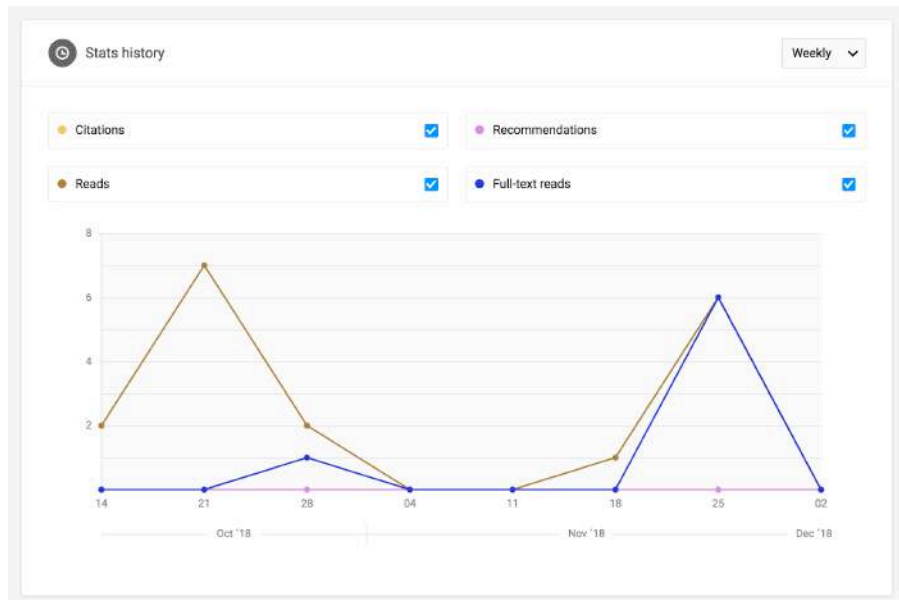
Hito Publicación difusión del proyecto (técnico)

Publicación 1.-

Esta publicación se realizó en la revista técnica Salmonexpert, N°60 correspondiente al mes de Julio de 2018, e incluye las páginas 60-65, bajo el título de “**Fagos y fagoterapia:** una herramienta alternativa a los antibióticos contra SRS”.

Este artículo fue incorporado a la plataforma ResearchGate, asignándole el DOI: 10.13140/RG.2.2.31310.72009. La estadística del seguimiento de este artículo se muestra a continuación, e indica más de 50 lecturas del mismo.





Hito 4.3

Hito Workshop Seminario científico-técnico

Este workshop es un encuentro internacional destinado a difundir los avances de la fagoterapia en el mundo a representantes del sector público, la industria salmonera, los servicios asociados, incluyendo entidades de docencia e investigación. Tiene como objetivo la divulgación de las bases de la fagoterapia y sus aplicaciones en el ámbito de la acuicultura. Se contará con la participación de destacados exponentes extranjeros, más la concurrencia de Sernapesca y la industria salmonicultora.

La realización del seminario ocurrió el lunes 26 de noviembre de 2018 en el hotel Manquehue de Puerto Montt, y es respaldada a continuación con información de las actividades realizadas (registro de asistentes; fotografías; inclusión en prensa).

Invitación: A continuación se muestra la invitación oficial que se envió a los personeros de entidades públicas, académicas y privadas.



Programa del Workshop

A continuación se muestra el programa oficial del workshop entregado a los asistentes al evento.

Programa de Workshop Internacional en Fagoterapia aplicada a la acuicultura.



Este workshop es un encuentro internacional destinado a difundir los avances de la fagoterapia en el mundo a representantes del sector público, la industria salmonera, los servicios asociados, incluyendo entidades de docencia e investigación.

Tiene como objetivo la divulgación de las bases de la fagoterapia y sus aplicaciones en el ámbito de la acuicultura. Se contará con la participación de destacados exponentes extranjeros, más la concurrencia de Sernapesca y la industria salmonicultora.

PROGRAMA	
8.30- 9.30	Registro
9.30- 9.50	Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura (PGSA)
9.50- 11.00	Sesión 1 Daniel Castillo: "Bacteriófagos: su Biología clásica y las nuevas revelaciones desde sus genomas" Mathias Middelboe: "Avances en la fagoterapia: casos de estudio en Dinamarca"
11.00- 11.15	Coffee Break
11.15- 12-30	Sesión 2 Pantelis Katarios: Uso experimental de bacteriófagos contra patógenos de peces: Casos de estudio en Grecia. Gastón Higuera/Jaime Romero: Fagoterapia en acuicultura chilena: Avances de resultados proyecto bacteriófagos contra <i>P. salmonis</i>
12.30	Cóctel de camaradería

Expositores internacionales:

Los expositores internacionales que mostraron los avances en diverso aspectos de la fagoterapia fueron los siguientes:

- Mathias Middelboe: University of Copenhagen: grupo de investigación que logró definir la distribución de los fagos en los distintos tejidos de trucha.
- Pantelis Katharios: Hellenic Center of Marine Research: grupo de investigación que han sido prolíficos y exitosos en probar las aplicaciones de fagos en desafíos contra diversos patógenos bacterianos que afectan la acuicultura en Grecia.
- Daniel Castillo: University of Copenhagen: grupo de investigación que ha lograda obtener los genomas de bacteriófagos para entender su relación con su hospedero (bacteria patógena).

Expositores Nacionales: Jaime Romero que encabeza un amplio grupo de investigadores que incluyen a Gastón Higuera; Roberto Bastías; Claudio Miranda; Andrea Moreno; Sergio Contreras.

Se presentaron los avances de resultados del proyecto bacteriófagos contra *P. salmonis*. El objetivo general del proyecto es desarrollar las bases para una nueva estrategia de control para las infecciones provocadas por el patógeno en salmónes de cultivo. Es así como el Dr. Romero y su equipo, al inicio del proyecto, comenzaron buscando elementos pertenecientes a fagos en los 19 genomas disponibles de *P. salmonis*, así como también en las secuencias de 79 plásmidos. Por tanto, los fagos y *P. salmonis* están interactuando y a pesar de que la

bacteria es un patógeno intracelular, puede ser infectada por fagos, como muestran las evidencias moleculares en sus genomas.

Con este análisis encontraron que un alto porcentaje de genomas y plásmidos tienen elementos de fagos que podrían corresponder, por ejemplo, a genes codificando proteínas estructurales de estos virus. Esto significa que los bacteriófagos han estado presentes y dejan su huella en estos elementos moleculares.

Con estos resultados, el equipo está enfocado en aislar y purificar los fagos específicos que infectan a *P. salmonis* mediante la técnica de recuperación en placas de lisis.



Dr. Katharios (Grecia, HCMR) durante exposición.



Asistentes al workshop representando sector público y privado.

Instituciones Asistentes

- Entidades privadas
- Cargill
- Salmo food
- Multiexport Foods
- Salmon Austral
- Centrovét
- Abbott
- Pathovet
- Europharma
- Aquagestion
- Elanco
- Instituto Tecnológico del Salmón (Intesal)
- Salmon expert

- Entidades públicas
- Sernapesca
- Ifop
- CCTA Subsecretaría de Pesca y Acuicultura

- Entidades académicas
- University Copenhagen
- Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)
- Universidad Católica del Norte
- HELLENIC CENTRE FOR MARINE RESEARCH
- Universidad de los Lagos
- Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



Inserción en prensa o medios

A continuación se muestra el reportaje que realizó el medio Salmonexpert al seminario y que incluye los principales temas tratados en el mismo.

Seminario analizó avances en la fagoterapia contra *Piscirickettsia* ...

<https://www.salmonexpert.cl/article/seminario-analiz-avances-en-la...>



salmonexpert

Buscar  Iniciar sesión Menú

Biología Comunidad Diversificación Acuícola Empresas I+D+i Mori



En **Hendrix Genetics** Chile creemos en el valor de la sana **competencia**...

Un actor independiente de clase mundial para industria Chilena

HENDRIX GENETICS



Inicio I+D+i Seminario analizó avances en la fagoterapia contra *Piscirickettsia salmonis*

Seminario analizó avances en la fagoterapia contra *Piscirickettsia salmonis*

Seminario analizó avances en la fagoterapia contra *Piscirickettsia* ...

<https://www.salmonexpert.cl/article/seminario-analiz-avances-en-la...>



Asistentes al workshop. Foto: Francisco Soto, Salmonexpert.

Chile: Dentro de los avances se encuentra la identificación de secuencias genéticas de fagos en el genoma y plásmido de la bacteria, y su distribución y duración en los distintos órganos del pez.

Por Francisco Soto

Seminario analizó avances en la fagoterapia contra *Piscirickettsia* ...

<https://www.salmonexpert.cl/article/seminario-analiz-avances-en-la...>

El día de ayer, en el hotel Manquehue, se realizó el “workshop internacional en fagoterapia aplicada a la acuicultura”, instancia que reunió a investigadores nacionales e internacionales a discutir los avances de la fagoterapia en el mundo, con énfasis en el patógeno *Piscirickettsia salmonis*.



Justamente sobre esta bacteria estuvo enfocada la presentación del Dr. Jaime Romero, investigador del Instituto de Nutrición y tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, quien presentó los avances de resultados del proyecto bacteriófagos contra *P. salmonis*.



El objetivo general del proyecto es desarrollar las bases para una nueva estrategia de control para las infecciones provocadas por el patógeno en salmónes de cultivo



Es así como el Dr. Romero y su equipo, al inicio del proyecto, comenzaron buscando elementos pertenecientes a fagos en los 19 genomas disponibles de *P. salmonis*, así como también en las secuencias de 79 plásmidos.

*Sin duda, los fagos y *P. salmonis* están interactuando y a pesar de que la bacteria es un patógeno intracelular, lo pueden infectar*

— Dr. Jaime Romero.

Seminario analizó avances en la fagoterapia contra *Piscirickettsia* ...

<https://www.salmonexpert.cl/article/seminario-analiz-avances-en-la...>

Con este análisis encontraron que el 50% de los genomas y el 80 % de los plásmidos tienen elementos de fagos que podrían corresponder, por ejemplo, a proteínas de estos virus. “Esto significa que los bacteriófagos estuvieron presentes y dejaron su huella. Sin duda, los fagos y *P. salmonis* están interactuando y a pesar de que la bacteria es un patógeno intracelular, lo pueden infectar” enfatizó el investigador del INTA.



Dr. Jaime Romero. Foto: Francisco Soto, Salmonexpert.

Con estos resultados, ahora se encuentran en la etapa de poder aislar y purificar los fagos específicos que infectan a *P. salmonis* mediante la técnica de recuperación en placas de lisis.

“Pretendemos obtener fagos purificados que luego se llevarán a un depósito público internacional donde cualquier persona podrá utilizarlos” señaló el Dr. Romero.

La última etapa corresponde a ensayos de inyección de los virus para analizar su distribución y duración en los distintos tejidos del pez, donde los investigadores han observado que alcanza altos títulos en órganos como hígado, riñón y bazo durante cinco días, y en branquias por hasta 8 días.

“Esto significa que se puede tener una protección de hasta una semana con fagos activos dependiendo del órgano” finalizó el investigador.

En el encuentro también se presentaron estudios y avances relacionados con la fagoterapia en Dinamarca y Grecia.

Objetivos específicos del proyecto

1. Aislar bacteriófagos con actividad bactericida contra *P. salmonis*.
2. Desarrollar un protocolo estandarizado para la aplicación *in vivo* de bacteriófagos.
3. Revisar antecedentes disponibles acerca de uso de bacteriófagos y sus consideraciones regulatorias.

CAPITULO 5

Actividades del proyecto.

Carta Gantt y avances del proyecto.

ETAPA		Actividades/Resultados/Hitos		INFORME	ESTADO
Nº	Nombre	Nº	Descripción		
1	Obtención y Caracterización de Bacteriófagos	1.1	Revisión de los Ceparios disponibles y selección dirigida de las cepas de <i>P. salmonis</i>	INFORME 1	Entregado 29-jun
		1.2	Muestreo, aislamiento de fagos, obtención de fagos	INFORME 2	Entregado 30-Sept
		1.3	Caracterización básica de los bacteriófagos.	Informe 4	En este informe
		1.4	Determinación del rango hospedero entre <i>P. salmonis</i> y bacterias de la microbiota		
		1.5	Estabilización y envío a depósito.		
		1.6	Redacción de manual de procedimientos experimentales para pesquisar fagos contra <i>P. salmonis</i>		
		H.1.1	Hito Listado de cepas <i>P. salmonis</i>	INFORME 1	Entregado 29-jun
		H.1.2	Hito listado de profagos en genomas y plásmidos de <i>P. salmonis</i>	INFORME 1	Entregado 29-jun
		H.1.3	Hito Listado de fagos aislados (Fagoteca)	Informe 4	En este informe
		H.1.4	Hito Lisados con actividad bactericida enviados a depósito		

		H.1.5	Manual de procedimiento ¿cómo generar una fagoteca?		
2	Método de Administración de Fagos	2.1	Preparación de los protocolos a probar (diferentes métodos de administración)	INFORME 2	Entregado 30-Sept
		2.2	Pruebas técnicas (ensayo en peces) y Redacción de protocolo final	Informe 3	En este informe 3, capítulo 2
		H2.1	Hito diseños determinados	INFORME 2	Entregado 30-Sept
		H2.2	Hito Protocolos redactados	Informe 3	Entregado 30-noviembre
3	Revisión de Antecedentes	3.1	Levantamiento de información regulatoria	INFORME 1	Entregado 29-jun
		3.2	Búsqueda de información en las diferentes bases de datos disponibles	INFORME 2	Entregado 30-Sept
		3.3	Compilación y síntesis en informe regulatorio	INFORME 3	Entregado 30-Nov
		H3.1	Hito Informe de avance aspectos legales de fagoterapia	INFORME 1	Entregado 29-jun
		H3.2	Hito Informe de avance uso de fagoterapia (pre-comercial y comercial)	INFORME 2	Entregado 30-Sept
		H3.3	Hito Informe compilado y actualizado	INFORME 3	Entregado 30-Nov
4	Difusión de Resultados	4.1	Redacción de reportes científico/técnicos (papers y artículos técnicos).	INFORME 2	Entregado 30-Sept
		4.2	Workshop final: de nivel internacional	INFORME 3	Entregado 30-Nov
		H4.1	Hito Publicación lanzamiento proyecto	INFORME 1	Entregado 29-jun
		H4.2	Hito Publicación difusión del proyecto (científico; técnico)	INFORME 2	Entregado 30-Sept
		H4.3	Hito Workshop Internacional Seminario	INFORME 3	Entregado 30-Nov