

Estrategias para el monitoreo y control de Caligus

Imagen: IFOP

Las implicancias del etiquetado de salmones tratados con antibióticos

Página 16



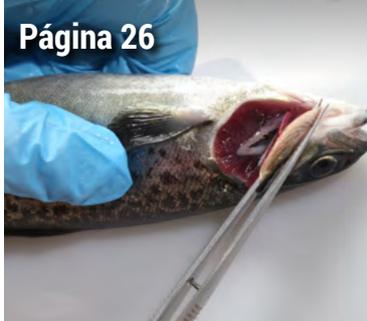
“La industria chilena merece tener una opción más amplia de genética”

Página 22



Las recomendaciones productivas del Manual de Buenas Prácticas de Pincoy

Página 26



I+D+i: Identificación, caracterización y uso de vesículas extracelulares en la acuicultura

Página 58



Resumen

La piscirickettsiosis, principal enfermedad infecciosa en la industria salmicultora, es causada por *Piscirickettsia salmonis*, una bacteria Gram- facultativa intracelular capaz de sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, y evadir la respuesta inmune del huésped. Se ha demostrado que algunas saponinas del árbol *Quillaja saponaria* (Quillay) son potentes adyuvantes y bloquean la asociación de patógenos con las células. Se estructuró un estudio que abarcó seis años de I+D, considerando modelos *in vitro*, *in vivo*, y de validación a escala piloto y comercial, con el objetivo de evaluar el uso potencial de Paq-Xtract, una formulación basada en EPSQ, para reducir el proceso infeccioso de *P. salmonis*, reducir las mortalidades asociadas al patógeno y reducir el uso de antibióticos destinados a su control. Los resultados *in vitro* demostraron que Paq-Xtract reduce la invasión y la replicación intracelular de *P. salmonis* en líneas celulares de macrófagos, y modula la expresión génica de marcadores de respuesta inmune innata (IL-10, IL-12). Los resultados *in vivo*, a escala piloto y comercial, mostraron una reducción significativa de la mortalidad (52%) por SRS, el uso de antibióticos (en más de 60%), y una modulación de la respuesta inmune innata (IL-10, IL-12) y adaptativa tanto celular (LT-CD8+, LT CD4+) como humoral (IgT, IgM), respectivamente. Los estudios también demostraron que Paq-Xtract induce la expresión génica del péptido anti-microbial Catelicidina a nivel de branquias, y que no induce efectos antimicrobianos directos sobre *P. salmonis* (MIC > 20 µg/mL).



Efecto del uso de extractos purificados de Quillay (Paq-Xtract) en la reducción de mortalidades por *Piscirickettsia salmonis*

H. Cortés^{1*}, T. Schlotterbeck², H. Cañón², M. Castillo², R. San Martín², K. Ruiz³, E. Jara³ y J. Mancilla³

¹Desert King Chile, Quilpue, Chile

²Saponin Research Center, Santiago, Chile

³Mowi Chile, Puerto Montt, Chile

*hcortes@desertkingchile.cl

Introducción

La piscirickettsiosis (SRS), principal enfermedad infecciosa bacteriana y principal causa de uso de antimicrobianos en la salmicultura chilena, aún no cuenta con un control adecuado (Sernapesca, 2018; Figueroa y col., 2019).

La naturaleza intracelular y las complejas estrategias de infección de *P. salmonis*, explican en parte el éxito del proceso infeccioso y lo infructuoso de los actuales tratamientos (Cabello, 2006; Rozas y Enríquez, 2014; Pulgar y col., 2015; Miranda y col., 2018). Una vez que *P. salmonis* entra en contacto con el hospedero, es fagocitado por macrófagos de la mucosa en branquias, piel y tracto gastrointestinal, donde mediante el uso de estrategias de infección, como los sistemas de secreción Tipo IV (Gómez y col., 2013; Rozas-Serri y col., 2017) exportan factores de virulencia, que les permite adherirse, invadir, replicar y modular procesos intracelulares del hospedero (Alix y col., 2011) (Thi y col., 2012) (Portnoy y col., 2016) (Sgro y col., 2019). Por lo anterior, las

nuevas estrategias de control y tratamiento deben superar estas dificultades.

Quillaja saponaria Mol (Quillay) es un árbol nativo de Chile cuyos extractos se han utilizado para obtener detergentes naturales llamados saponinas (San Martín y Briones, 2000). Los extractos de Quillaja contienen especialmente saponinas triterpénicas (glucósidos de ácido quillaico), y algunos componentes no saponina (polisacáridos y polifenoles) (Cheeke y Otero, 2005).

Los extractos purificados en saponinas de Quillaja contienen una alta concentración en saponinas, a diferencia de los extractos no purificados, ricos en los componentes no saponina (Cheeke y col., 2006; Maier y col., 2015). Los extractos de Quillaja (E 999) son un "material alimenticio" aprobado y autorizado por la Unión Europea y seguros para el consumo humano, en virtud del Anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés).

En base a estos antecedentes, se realizaron estudios durante seis años, empleando ocho diferentes extractos de Quillaja con diferente purificación en saponinas (2%, 7%, 15%, 20%, $\geq 65\%$) generando al final PAQ-XTRACT, una formulación basada en un extracto altamente purificado en saponinas de Quillaja, como único ingrediente activo de consumo directo en el alimento, el cual ha sido evaluado en pruebas de seguridad y eficacia tanto *in vitro* como *in vivo*, encontrando que la formulación reduce la infección de líneas celulares de macrófagos, no afecta el crecimiento de salmones en sus distintas fases de desarrollo (alevines, post *smolt* y engorda) y reduce la mortalidad por SRS en desafíos vía Intraperitoneal (IP) (ActivaQ), por cohabitación (Universidad Austral de Chile (UACH)), y naturales a escala piloto y comercial, respectivamente (Mowi).

Materiales y métodos

Extracto

El producto Paq-Xtract utilizado en estos estudios, fue suministrado por Desert King Chile, y corresponde a un extracto acuoso del árbol chileno *Quillaja saponaria* (Quillaja), altamente purificado en saponinas triterpénicas (Kamstrup y col., 2000; San Martín and Briones, 2000), secado a *spray* y formulado para ser entregado en el alimento de los peces.

Eficacia *in vivo*

Las pruebas preliminares *in vivo* fueron realizadas en agua dulce por la empresa ActivaQ. El ensayo consistió en suministrar Paq-Xtract (producto A) en la dieta de alevines de *Salmo salar* (peso vivo: 30 gr), sin antecedentes de infección por virus (ISA, IPN) y otras bacterias (BKD). El alimento suplementado se administró siete días antes del desafío, se midió la activación de marcadores del sistema inmune y luego todos los peces fueron desafiados vía IP (0,1 mL de inóculo por pez), con una cepa virulenta de *P. salmonis* LF-89 (que contenía 3×10^6 copias del genoma bacteriano/mL), evaluándose mortalidad y expresión génica de Interferón gamma en bazo y riñón de los alevines suplementados con una dieta conteniendo el producto A.

Desafío por cohabitación

La prueba se realizó en la Unidad de Ensayos Clínicos del Salmón de la UACH, en un modelo de desafío por cohabitación. Los peces utilizados fueron salmón Atlántico no vacunado, con un peso promedio inicial de 115 gr. La densidad de cultivo fue de 9,64 kg/m³. La prueba se llevó a cabo en duplicado y los peces control correspondieron a peces hermanos del mismo grupo.



Imagen 1. Jaulas experimentales en Centro Experimental Huenquillahue (Mowi – Chile).

Los peces fueron suplementados con el extracto de Quillaja durante un mes antes de iniciar el desafío. Las condiciones de prueba fueron normales para la producción de agua de mar, y se incorporó una salinidad de 15-17 ‰ al agua. En la fase de alimentación, el rango de temperatura fue de 9,6-12,6°C, oxígeno 6,2-6,8 mg/L y fotoperiodo 24 h de luz. Se evaluó mortalidad (RPS 60) y expresión de LT-CD8+ e Interferón gamma en riñón.

Eficacia a escala piloto

Se realizó un estudio para validar el potencial del producto para prevenir la presentación de SRS a escala piloto en salmones Atlántico en etapa de engorda en la unidad experimental del centro Huenquillahue de Mowi Chile. El periodo de evaluación fue de seis meses (diciembre de 2017 a junio de 2018). Los grupos experimentales se distribuyeron en tres jaulas para el grupo control (sin Paq-Xtract) y tres jaulas para el tratamiento con Paq-Xtract. Cada jaula contenía aproximadamente 10.000 peces. La suplementación con el extracto se inició un mes previo al desafío natural de *P. salmonis* en el área de estudio.

Eficacia sobre la expresión de marcadores inmunes a escala comercial

Se evaluó el efecto de la suplementación dietaria del producto sobre la expresión génica de marcadores de la respuesta inmune innata y adaptativa tanto celular como humoral en riñón, bazo y branquias, de salmones Atlántico en fase de engorda. Adicionalmente, se

determinó la expresión génica de Catelicida (Cath), un péptido antimicrobiano producido por los animales para combatir infecciones bacterianas y regular las respuestas inmunes innatas. El estudio se realizó en el Centro Camahue, de la empresa Mowi Chile.

Análisis de marcadores inmunes

Metodología

Las muestras de branquia, bazo y riñón anterior fueron enviadas al laboratorio en tubos de 2 ml en RNAlater, las que fueron procesadas para la extracción de RNA total.

Muestras y extracción de RNA total

El RNA total se extrajo a partir del tejido de branquia y bazo, utilizando reactivo de trizol, acoplado al kit E.Z.N.A RNA extraction kit (OMEGA Bio-tek), según las instrucciones del fabricante.

Síntesis de DNA complementario: cDNA

Una vez obtenido el RNA total, mRNAs fueron transformados a cDNA por medio de la reacción de transcripción inversa, la cual se realizó en un volumen total de 20 μ l de solución, dividido en dos partes. La primera reacción se efectuó en una mezcla conteniendo 1,6 μ l de oligo-dT (1,25 μ g/ml) para análisis de expresión génica de los marcadores 1,0 μ l de dNTPs (10 mM); 8,0 μ l de RNA total (5 μ g) y 0,1 μ l de agua libre de nucleasas y se incubó por 10 min a 60°C para eliminar estructuras secundarias de los mRNAs.

Luego, se agregó a esta solución una segunda mezcla comprendida por 1 µl de transcriptasa reversa M-MLV (200 U), 4 µl de *buffer* de la enzima 5X y 0,5 µl de inhibidor de ribonucleasa recombinante RNAsaOUT (40 U), en un volumen total de 5,5 µl, la que se incubó por 1 h a 37°C. Finalmente, para la inactivación de la transcriptasa reversa, la mezcla de reacción se incubó a 72°C por 10 min. El cDNA sintetizado fue almacenado a -20°C para su posterior amplificación por PCR o cuantificación mediante PCR tiempo real (qPCR).

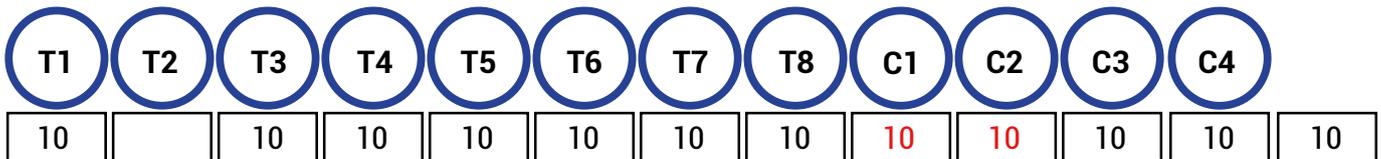
Implementación de RT-qPCR

Cada reacción de amplificación se realizó empleando como templado 2 µl de cDNA, partidores 0,2 µM, 0,8 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl de mezcla de amplificación Lightcycler Fast Start DNA Master SYBR Green en un volumen de 10µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler1.5.

El programa constó de los siguientes pasos: denaturación inicial a 95°C por 10 min, seguido de una reacción de PCR de 35 ciclos cada uno compuesto de denaturación a 95°C por 10 s, apareamiento 58°C por 10 s y extensión a 70°C por 10 s. Posteriormente un ciclo para la obtención de la curva de melting por 20 s a 95°C, y por último un ciclo de enfriamiento a 40°C por 30 s. Para la cuantificación relativa se realizó con una curva estándar, que consiste en reacciones conteniendo diluciones del producto de PCR purificado y de concentración conocida para el gen de interés.

Una vez obtenido y cuantificado el producto de PCR correspondiente a cada gen, se realizaron diluciones sucesivas en un rango de 10⁷ a 10² números de copias/µl para cada gen en estudio, para el posterior cálculo de la eficiencia de la reacción, donde se utilizó la siguiente relación, $E=10^{-(-1/\text{slope})-1}$. Para el

Esquema de estudio (Centro Huenquillahue - Mowi)



Jaulas tratamiento (con producto A) T1-T8

Jaulas Control C1-C4

Peces / Jaula: 90,000, aproximadamente

Esquema de estudio (Centro Camahue - Mowi)

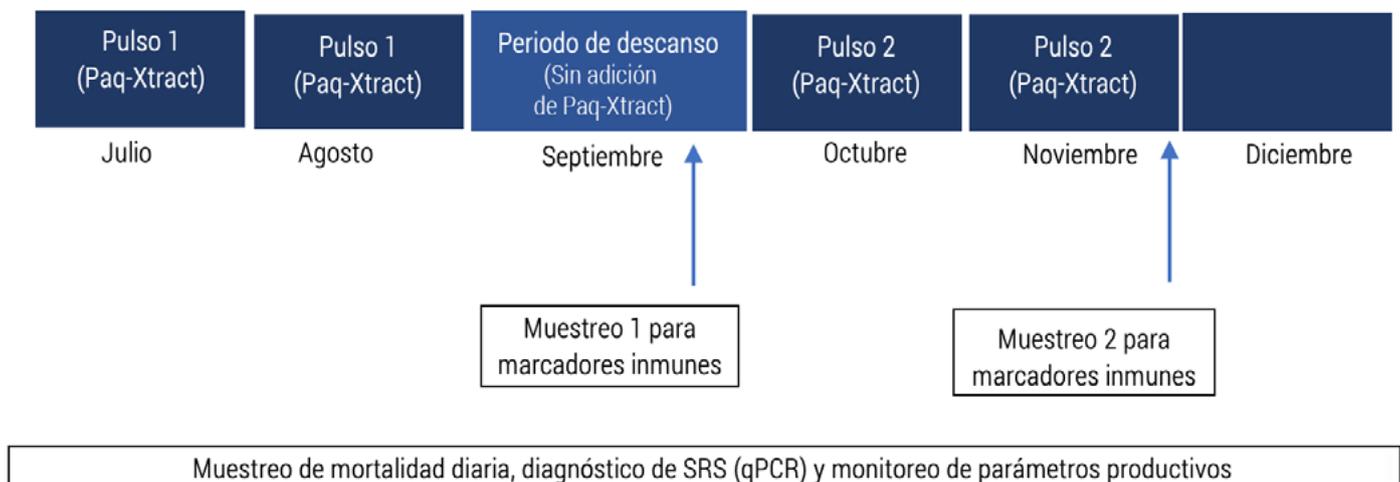


Figura 1. Esquemas de estudios de validación a escala piloto y comercial.

cálculo de la expresión relativa mediante la técnica de qPCR, se realizaron reacciones de amplificación del cDNA del gen ELF-1 en cada muestra de RNA de células tratadas con los distintos estímulos *in vitro*. Luego, los cambios de expresión fueron calculados a través del método comparativo CT (Pfaffl, 2001).

Resultados

Eficacia *in vivo*

Los resultados mostraron que el producto A redujo la mortalidad asociada con la infección por *P. salmonis* en un 37%, en comparación con el grupo desafiado con la bacteria y alimentado con una dieta estándar (sin Paq-Xtract) (Tabla 1).

Respecto de la respuesta inmune, la Figura 2 muestra que hubo un aumento significativo de la expresión de IFN- γ tanto en bazo como en riñón, en peces alimentados con la dieta que incluía el extracto natural con respecto a la dieta normal.

Eficacia *in vivo* del extracto de Quillay bajo un desafío por cohabitación

La Figura 3 muestra una menor tasa de mortalidad en peces suplementados con el producto A (28%), al compararse con el control positivo a un RPS60 (60%), lo que indica una reducción en la mortalidad de 52%, a los 20 días post inicio del desafío por cohabitación con peces infectados (troyanos).

Referente a marcadores de respuesta inmune, CD8 e IFN- γ , la Figura 4, muestra una expresión génica significativamente mayor de estos dos marcadores inmunes, relacionados con la respuesta inmune adaptativa mediada por células.

Eficacia del producto a escala piloto

Resultados productivos

El estudio piloto, realizado en el Centro Experimental Huenquillahue, demostró que la adición del extracto de Quillay en la dieta de salmónes Atlántico, redujo la mortalidad atribuida a piscirickettsiosis (qPCR) en un 52% (1,04% vs 0,5%) y la necesidad de uso de antibiótico (Florfenicol), en un 66%. Adicionalmente, la suplementación con el producto mejoró la biomasa obtenida al momento de la cosecha de los peces y la eficiencia de uso de alimento (FCRe) al final del estudio (Tabla 2 y Tabla 3)

Expresión de marcadores de inmunidad en bazo y branquia

Los resultados están expresados como las veces de cambio de cada gen para cada grupo tratado con la dieta (D) respecto del grupo de peces sin tratamiento (control). Además, se graficaron todos los resultados obtenidos para

Tabla 1. Resultados del estudio *in vivo* en alevines de *S. salar* suplementados con el producto A y desafiados vía IP con *P. salmonis* (ActivaQ).

Grupos experimentales	Promedio Mortalidad (%)	Promedio Supervivencia	Ensayo 3
Dieta estándar (sin aditivo)	0	100	-
Dieta estándar + infección con <i>P. salmonis</i>	45,9 ± 6,0	54,1 ± 5,9	-
Dieta con producto A + infección con <i>P. salmonis</i>	29,1 ± 5,9	70,9 ± 5,9	36,5 ± 12,8

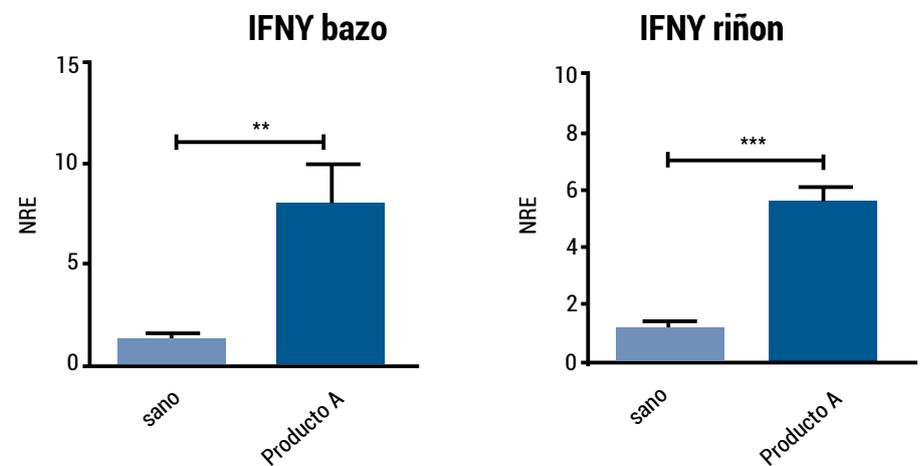


Figura 2. Expresión génica de Interferón gamma (IFN- γ) en bazo y riñón de alevines de *Salmo salar* suplementados con el producto A y desafiados vía IP con *P. salmonis*.

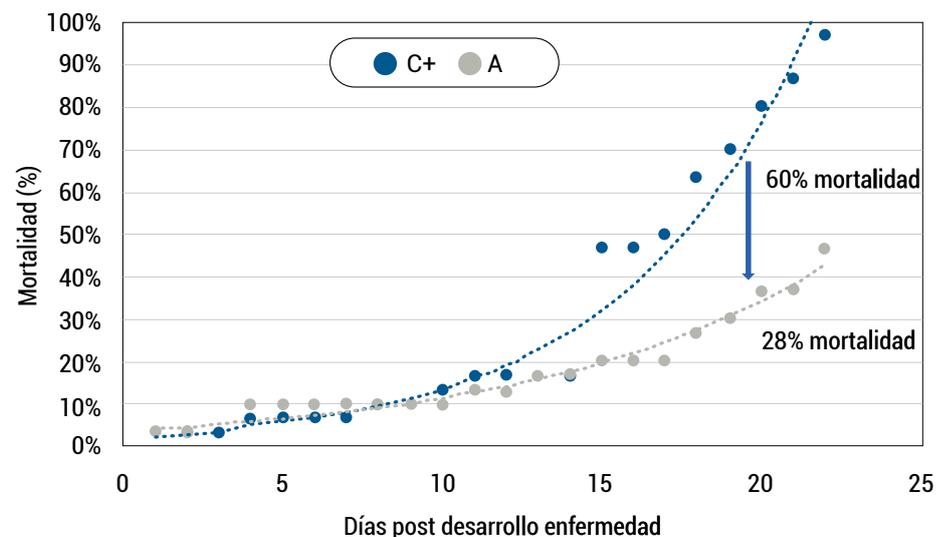


Figura 3. Curva de mortalidad en *smolts* de salmón Atlántico suplementados con el producto A, y desafiados con *P. salmonis* mediante cohabitación con peces troyanos (infectados).

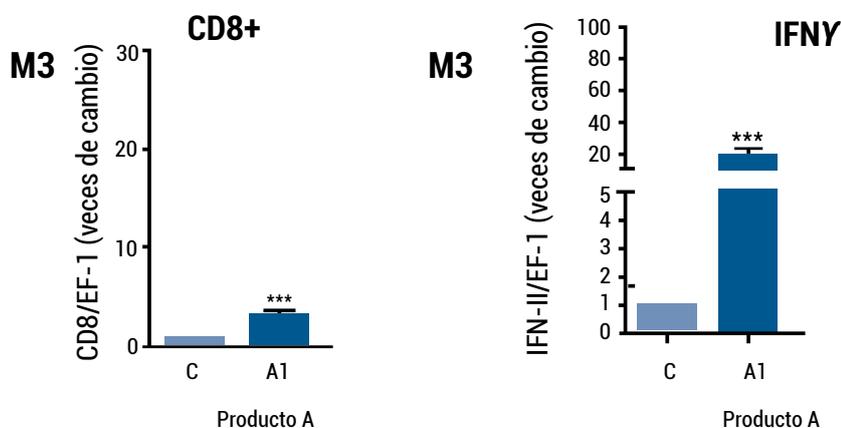


Figura 4. Expresión génica de los marcadores inmunes CD8 e IFN- γ en riñón de peces *smolt* de *S. salar*, suplementados con el Producto A.

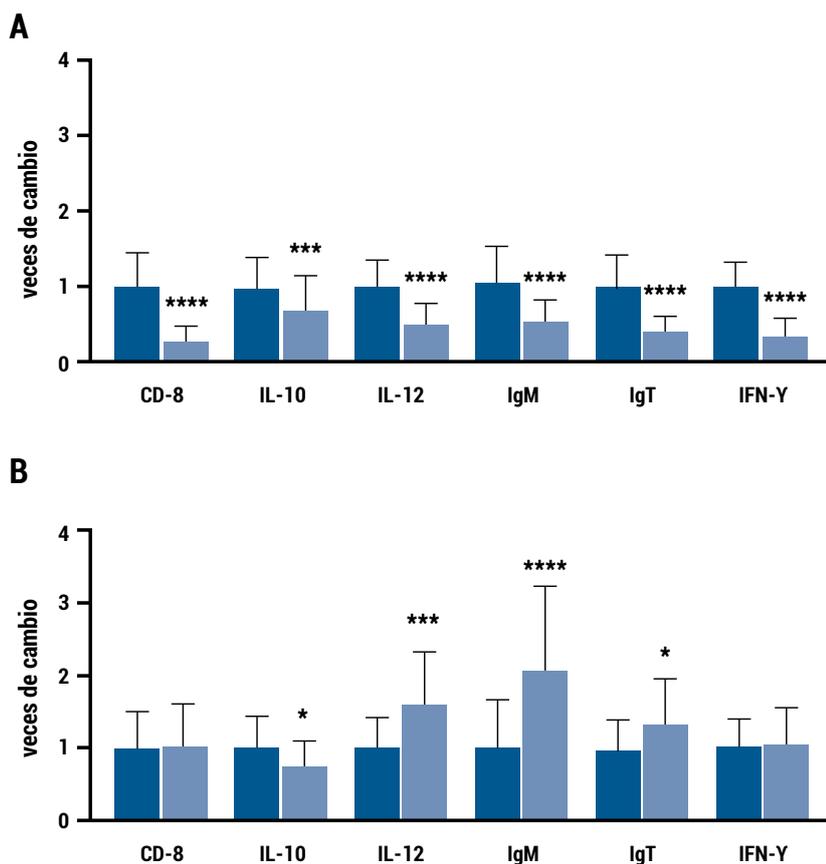


Figura 5. Análisis de expresión génica de marcadores inmunes en bazo y tejido branquial de *Salmo salar* en condiciones comerciales (Centro Camahue – Mowi). Los peces fueron alimentados con una dieta control (barras azules, n=30) y una dieta con el producto A (barras celestes, n=70). Se purificó el ARN de (A) bazo y (B) tejido branquial, determinándose marcadores inmunes como Linfocitos T CD8+, interleuquinas 10 y 12 (IL-10, IL-12), inmunoglobulinas M y T (IgM; IgT) e interferón-gamma factor de elongación-1 alfa (ef-1 α) como gen normalizador. Los gráficos representan el promedio y la desviación estandar de las veces de cambio de la expresión génica, respecto al Control. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Mann-Whitney (* p <0,05, *** p <0,001, **** p <0,0001).

cada tejido y jaulas control con un n=30 peces (Estanques 110, 111, 112) y tratados con n=70 (Estanques 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107).

Pulso 1: Para el primer pulso, en el caso de branquia, los genes codificantes de IgM e IgT mostraron un aumento significativo de su expresión en los grupos tratados con la dieta respecto del grupo control. Este mismo efecto pudo ser observado para IL-12. Asimismo, la expresión de citoquina antiinflamatoria IL-10, experimentó un descenso con respecto al grupo control (Figura 5B). En conclusión, se observa una mayor expresión de genes de inmunidad adaptativa IgM e IgT, junto con la citoquina pro-inflamatoria IL-12, en branquias de peces alimentados con la dieta conteniendo el producto.

(INF- γ) mediante RT-qPCR utilizando la expresión del factor de elongación-1 alfa (ef-1 α) como gen normalizador. Los gráficos representan el promedio y la desviación estandar de las veces de cambio de la expresión génica, respect al Control. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Mann-Whitney (* p <0,05, *** p <0,001, **** p <0,0001).

Pulso 2: En el caso del análisis la expresión génica del segundo pulso, el análisis de genes de inmunidad en riñón anterior mostró un aumento de la expresión de los genes para igm, igt y cd8 en los grupos de peces tratados versus el grupo de peces control (Figura 6A). Cabe destacar que estos genes son claves en la respuesta inmune específica mediada por los anticuerpos IgT e IgM. A su vez, CD8 corresponde a un marcador de Linfocitos T, células especializadas y específicas en la destrucción de células infectadas con virus y bacterias intercelulares como *P. salmonis* (Rozas-Serri y col., 2018).

En el caso de la branquia (Figura 6B), se observa principalmente un aumento de la expresión del gen codificante para igm y cath-2 (Cathelicidina-2). Cathelicidina-2 es una proteína perteneciente a una familia de péptidos antimicrobianos conservados en múltiples especies. Estos péptidos son un componente importante en la defensa inmune, expresándose en diversos tejidos y en forma inducible frente a infecciones bacterianas (Chang y col., 2006). Para il-12 y cd8, se observa una disminución significativa de su expresión en este órgano.

En conclusión, para este segundo pulso de tratamiento, los resultados sugieren que los peces tratados responden esencialmente a través del aumento de la expresión de genes asociados a la respuesta inmune mediada por anticuerpos IgM e IgT y respuesta inmune

celular específica CD8 en riñón anterior. De igual forma, en el caso de branquia, se observó un aumento significativo de la abundancia del mRNA de IgM y Cath-2.

Discusión

Los estudios a escala semicomercial (piloto) y comercial en el Centro Camahue, demostraron que la suplementación previa con Paq-Xtract, en la dieta de salmones Atlántico en fase de engorda, reduce en más de 66%, el requerimiento de uso de antibióticos para el control de SRS.

El estudio piloto en Centro experimental Huenquillahue (60 mil peces, aproximadamente), mostró una reducción de la mortalidad causada por SRS, de un 52% aproximadamente, y adicionalmente, efectos positivos en parámetros productivos, como ganancia de biomasa neta, tasa de crecimiento SGR y la eficiencia de uso de alimento (FCR).

El estudio a escala comercial en el Centro Camahue (+ de 1 MM de peces en engorda), mostró que el extracto de Quillay modula el balance de interleuquinas proinflamatorias (IL-12) y antiinflamatorias (IL-10), tanto en

Tabla 2. Resultados de la suplementación dietaria con el producto A en salmones Atlántico en fase de engorda.

	Control	Producto A
Biomasa Inicial, kg	4.858	4.669
Biomasa a cosecha, kg	154.901	171.601
Conversión alimenticia económica, FCR _e	1,20	1,10
SGR	0,93	0,97
Mortalidad (%)	1,04 % (311)	0,5 % (155)

Tabla 3. Tratamiento con antibióticos en estudio con el producto A en control de SRS.

Huenquillahue	Tratamiento antibiótico	Enfermedad
Control	Jaula 202	✓
	Jaula 204	✓
	Jaula 206	✓
Tratamiento con el producto A	Jaula 201	
	Jaula 203	
	Jaula 205	✓

Las 3 jaulas del grupo Control recibieron tratamiento con antibióticos (100%)
 1 de las 3 jaulas con el producto A, recibió antibiótico (33%)
 Reducción en el uso de antibiotico (Florfenicol): 66%

riñón, como en branquia, favoreciendo a nivel de branquia la expresión de IL-12 en el primer pulso de entrega del aditivo (fases tempranas de infección). Igualmente, el producto induce una mayor expresión de genes de inmunidad adaptativa IgM e IgT.

Se conoce que la rápida producción de interleucina-12 (IL-12) por las células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos) es un factor clave en la respuesta protectora frente a bacterias intracelulares (Nagamatsu y col., 2009). Citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-2, IL-18, TNF- β e interferón gamma (IFN- γ), favorece la respuesta inmunitaria celular activando macrófagos, mejorando la presentación de antígenos a los linfocitos T e induciendo la diferenciación, respuesta de los linfocitos T llamada respuesta de tipo Th1 (Hunt y col., 2012).

A diferencia de lo anterior, las citocinas antiinflamatorias, que incluyen IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13, si bien inducen la respuesta de tipo Th2, clave para coordinar las respuestas inmunes de anticuerpos contra patógenos extracelulares, pueden ser inducidas por *P. salmonis* y otros patógenos intracelulares, para inactivar los macrófagos y sobrevivir en ellos (Álvarez y col., 2016; Pérez-Stuardo y col., 2019).

Un equilibrio de citoquinas del sistema inmune innato (IL-12 proinflamatorio/IL-10 antiinflamatorio) regula la capacidad de degradación de las células presentadoras de antígeno, como los macrófagos y las células dendríticas, lo que favorece una respuesta inmunitaria sostenida contra las bacterias intracelulares a lo largo del tiempo (Barry y col., 2011; Wang and Husain, 2014).

Un estudio comparativo de la respuesta inmune en peces de salmón Atlántico post-smolt infectados por cohabitación con cepas de *P. salmonis* LF-89 y EM-90, demostró que las bacterias manipulan la producción de citocinas como un mecanismo de virulencia, basado en la inducción de una respuesta inmune innata especial y la inhibición de respuestas humorales adaptativas y mediadas por células (Rozas-Serri y col., 2017).

En una continuación del estudio anterior, se secuenció el ARN de peces (postsmolt) infectados por cohabitación con *P. salmonis* LF-89 y EM-90, mostrando que existían algunas diferencias en el perfil transcripcional de la respuesta en salmón Atlántico (Rozas-Serri y col., 2017, 2018). El estudio reveló una expresión génica diferencial posterior a la infección en algunos receptores del sistema inmune innato (señalización DC-SIGN y TLR5), junto con una respuesta inmune humoral y mediada por células inhibidas, en peces infectados (Rozas-Serri y col., 2018).

También se ha demostrado la depresión de la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos de trucha arcoíris infectados con *Renibacterium salmoninarum* (Grayson y col., 2002).

En general, los patógenos intracelulares como *P. salmonis* modulan la respuesta inmune innata y adaptativa de los peces, favoreciendo un ambiente intracelular adecuado para la supervivencia.

Este entorno incluye, especialmente al inicio del proceso infeccioso, un desequilibrio en los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-12) y antiinflamatorias (IL-10), favoreciendo un entorno antiinflamatorio (IL-10 más elevado) que impide que el macrófago (la célula

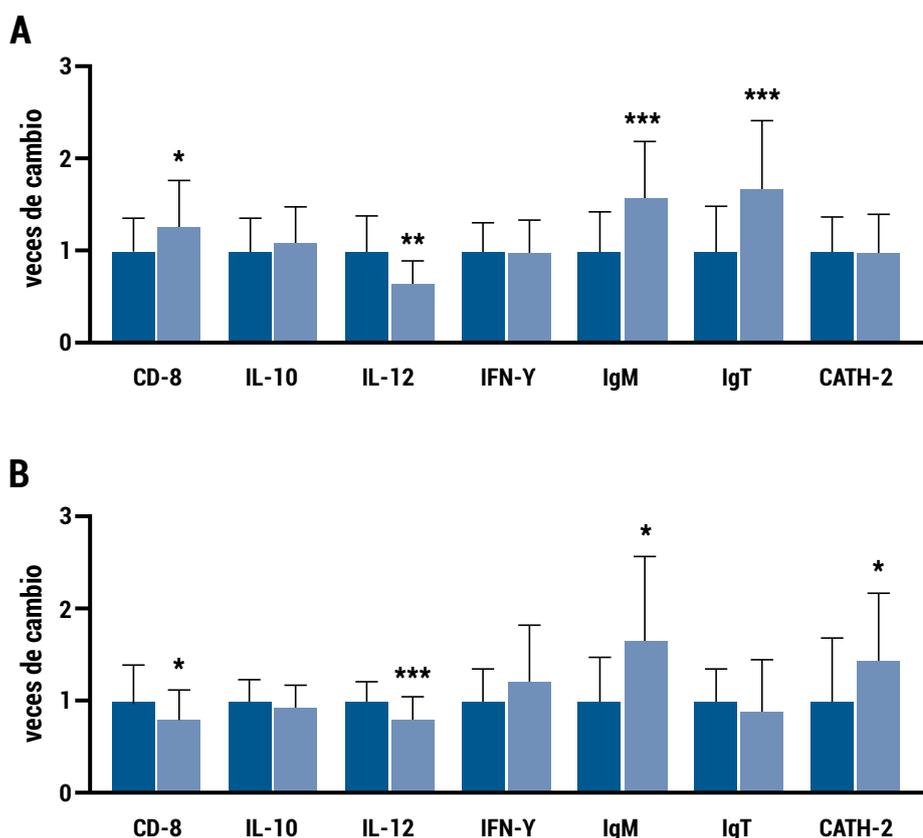


Figura 6. Análisis de expresión génica de marcadores inmunes en cabeza anterior del riñón y tejido branquial de *Salmo salar* en condiciones comerciales (Centro Camahue – Mowi). Los peces fueron alimentados con una dieta control (Barras azules n=30) y una dieta con el producto A (Barras celestes n=70). Se purificó el ARN de riñón, bazo y tejido branquial, determinándose marcadores inmunes como Linfocitos T CD8+, interleuquinas 10 y 12 (IL-10, IL-12), inmunoglobulinas M y T (IgM; IgT), interferón-gamma (INF- γ), y el péptido anti-microbial Cathelicidina-2 (cath-2) mediante RT-qPCR utilizando la expresión del factor de elongación-1 alfa (ef-1 α) como gen normalizador. Los gráficos representan el promedio y la desviación estandar de las veces de cambio de la expression genica, respect al Control. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Mann-Whitney (* p < 0,05, *** p < 0,001, **** p < 0,0001).

diana de la bacteria para su supervivencia y multiplicación), sea activo y pueda degradarlo. Esta “inactivación” de macrófagos impide una adecuada comunicación, activación y respuesta del sistema inmune adaptativo, Linfocitos LT-CD4 +, LT-CD8 +, interferón gamma e inmunoglobulinas IgM e IgT, para una respuesta integral frente a las bacterias.

Conclusiones

- El extracto de Quillay reduce en más de 50% la mortalidad causada por *P. salmonis* en condiciones comerciales.
- El extracto de Quillay reduce la necesidad de uso de antibióticos, en más de 66% en condiciones comerciales.
- El extracto de Quillay aumenta la resistencia de los peces a desafíos por patógenos intracelulares como *P. salmonis*.
- El extracto de Quillay revierte la respuesta inmune inducida por patógenos intracelulares como *P. salmonis*, reactiva los macrófagos, induce un balance de citoquinas proinflamatorias / antiinflamatorias, adecuados para control de patógenos intracelulares, y favorece la comunicación entre el sistema inmune innato (SII) y

el adaptativo (SIA), con la consecuente respuesta inmune adaptativa de tipo celular (LT CD8+, LT CD4+) y humoral (IgM e IgT).

Financiamiento

Esta investigación fue financiada en parte, por Cinicyt, Proyecto PAI N° 781301001, y por Corfo, Validación y Empaquetamiento de Innovación “Programas Estratégicos”, Gobierno de Chile.

Protección intelectual

Al final del proceso de I+D, y a raíz de los resultados obtenidos, se solicitaron patentes en 4 países, Estados Unidos (US: WO2018018170A1. WIPO PCT), Canadá (CA2972175A1), Noruega (NO20171171A1) y Chile (CL2017001679A1).

Agradecimientos

Los autores agradecen: a la profesora Dra. Ana María Sandino de la Universidad Santiago de Chile y ActivaQ, por su apoyo técnico y estudios *in vitro* y de desafío de peces con *P. salmonis* en agua dulce. De otro lado, a los

profesores Dr. Ricardo Enríquez y Dr. Alex Romero del Laboratorio de Inmunología y Estrés de Organismos Acuáticos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, por los estudios de desafío de peces con *P. salmonis* en agua de mar, y evaluación de marcadores inmunes del estudio a escala comercial. Finalmente, se agradece a la empresa Mowi Chile, por su participación en los estudios a escala piloto y comercial, y permitir su desarrollo en los Centros Huenquillahue y Camahue, respectivamente.

Referencias

Descargue las referencias en la página www.salmonexpert.cl/descargas.



AGT
Consultores & Asociados

Outsourcing contable y tributario para pymes, una alternativa efectiva para su empresa en tiempos de pandemia

Dirección
Las Margaritas del Lago, casa C, Puerto Varas, Region de los Lagos, Chile

Telefono
+56 65 223 8951

Email
bperez@agtconsultores.cl

www.agtconsultores.cl