



Gobierno
de la Provincia
del Neuquén

Provincia del
neuquén

MINISTERIO DE TURISMO
Dirección Provincial de
Fauna, A.N.P. y C.E.A.N

Centro de Ecología Aplicada del Neuquén

INFORME TÉCNICO

Determinación de virulencia, por técnica de PCR punto final, de cepas de *Flavobacterium psychrophilum* aisladas de salmónidos de pisciculturas de Neuquén y Río Negro.

Mayo de 2024

Autores: Pablo Moreno, Juan M Castro y Virginia A. Bianchi.

Instituciones intervinientes: Laboratorio de Ictiopatología (CEAN) y Laboratorio de Ecotoxicología Acuática (INIBIOMA-CEAN).



Introducción

Flavobacterium psychrophilum es una bacteria gram-negativa, responsable de la “enfermedad bacteriana de agua fría, síndrome del alevino de trucha arcoíris o flavobacteriosis” en los sistemas de producción dulceacuícola (Barnes y Brown, 2011). Mediante la acción de enzimas proteolíticas (elastasas, colagenasas, etc.) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), rompe las barreras químicas y físicas del mucus, la piel y el tejido conectivo de salmónidos, ingresando al organismo y colonizando órganos internos como el riñón (Decostere et al., 2001). *F. psychrophilum* genera pérdidas económicas importantes en la industria acuícola (Barnes y Brown, 2011) y actualmente se la aísla a partir de peces enfermos de pisciculturas de todo el mundo, incluyendo pisciculturas de la región norpatagónica, donde se la ha encontrado como responsable de distintos eventos de mortalidad (Nematollahi et al., 2003; Moreno et al. 2016). Si bien en algunos casos la mortalidad generada por *F. psychrophilum* puede acercarse al 90% (Barnes y Brown, 2011), no todas las cepas de esta bacteria pueden ser igualmente letales ni causar el mismo grado de enfermedad. Además, pueden ser antigénicamente diferentes e incluso, la inmunización generada contra una cepa no necesariamente puede proveer inmunidad contra otras (Soule et al., 2005). Es por ello que uno de los principales desafíos que enfrenta la acuicultura es la identificación precisa y temprana de *F. psychrophilum* en peces enfermos, como así también la determinación del grado de virulencia de las cepas involucradas.

Debido a su grado de conservación, la identificación de *F. psychrophilum* puede llevarse a cabo a partir de la región 16S rRNA (Izumi et al., 2000; Ramsrud et al., 2007). En el Laboratorio de Ictiopatología del CEAN se ha puesto a punto la identificación molecular mediante el uso de los *primers* específicos FP1 - FP3 (del Cerro et al., 2002) y fpPPIC1F - fpPPIC1R (Yoshiura et al., 2006) en ensayos de PCR. Además, se han realizado pruebas bioquímicas de caracterización de algunas de las cepas estudiadas (Moreno et al., 2016). Sin embargo, no se ha avanzado hasta el momento en la ejecución de análisis moleculares destinados a determinar la virulencia de las cepas identificadas. En relación a esto, Ramsrud et al. (2007) desarrollaron un protocolo por el cual se puede distinguir entre cepas de *F. psychrophilum* virulentas y no virulentas, basándose en la demostración de la presencia de los alelos CFS 295-93 (virulento) y ATCC 49418T (avirulento), específicos para esta región genética conservada. Esta metodología ha sido utilizada, entre otros, por Ma et al. (2018)



para caracterizar cepas utilizadas en ensayos de inmunización de trucha arcoíris en EEUU y por Castillo et al. (2012) en el estudio del uso de bacteriófagos para control de la flavobacteriosis en Chile.

El objetivo del presente trabajo fue poner a punto el método propuesto por Ramsrud et al. (2007), que utiliza la variabilidad del gen 16S rRNA mediante un análisis por PCR punto final, y determinar el carácter de virulencia de diferentes cepas de *F. psychrophilum* aisladas a partir de salmónidos con signos de enfermedad provenientes de pisciculturas de Neuquén y Río Negro. El trabajo se realizó en forma colaborativa entre el Laboratorio de Ictiopatología del CEAN y el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática (INIBIOMA-CEAN).

Metodología

Muestreo

Para este estudio, se examinaron salmónidos con signos clínicos típicos de flavobacteriosis, provenientes de la piscicultura del CEAN, próximo a Junín de los Andes (Neuquén) y dos hatcheris (CRUB y Pto. Moreno) ubicados en la zona de Bariloche (Río Negro). En el primero de los casos, se muestrearon individuos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) que presentaron signos clínicos de flavobacteriosis: erosión tipo silla de montar o de montura, lesiones laterales en la región mandibular y/o erosión de aletas con presencia de áreas blanquecianas propias de la colonización bacteriana (Staliper et al., 2011; Cipriano et al., 2005). Mientras que los peces de los hatcheris fueron enviados al Laboratorio de Ictiopatología del CEAN para el estudio de dos eventos de mortalidad en lotes de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) asociados, en ambos casos, a la presencia del protozoo intestinal *Spironucleus salmonis*.

A todos los ejemplares examinados se les practicó sacrificio por exceso con benzocaína (CICUAL-INIBIOMA), para su posterior procesamiento.

Aislamiento bacteriano

Los peces sacrificados fueron desinfectados externamente con etanol al 70% junto con todo el material quirúrgico a utilizar, incluidas bandejas. En condiciones de esterilidad, se procedió a practicar una apertura dorso-lateral, se extrajo la vejiga natatoria y se tomaron muestras de riñón



con ansa en anillo. Estas muestras extraídas fueron sembradas en medio de cultivo sólido oligotrófico Triptona Extracto de Levadura y Sales (TYES) (Holt et al., 1993) y cultivadas de ocho a diez días a 15 °C. El rango de temperatura fue seleccionado con el objeto de conservar la virulencia de las cepas a ser aisladas (Bernardet et al., 1996). A partir del cultivo en medio sólido, se seleccionaron aquellas colonias cuyos rasgos morfológicos característicos de flavobacteria incluían aspecto circular y convexo con márgenes irregulares y coloración de amarilla a anaranjado brillante (Bernardet y Keroault, 1989). Las colonias seleccionadas fueron conservadas en etanol absoluto a temperatura ambiente hasta su utilización en ensayos de extracción de material genético (Moreno et al. 2016).

Extracción del material genético de cepas presuntivas de *F. psychrophilum*

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante la utilización de la resina Chelex® al 5% (Bio-Rad), según Izumi & Wakabayashi (1997). El material genético aislado fue conservado a -20 °C hasta el ensayo de amplificación.

Identificación y clasificación de cepas *F. psychrophilum* según su grado de virulencia

Para la identificación molecular de cepas de *F. psychrophilum* se utilizaron primers específicos, mezcla de reacción y condiciones de ciclado propuestos por del Cerro et al. (2002) (Tabla 1). La cepa *F. psychrophilum* NCIMB1947 fue utilizada como referencia y control positivo. Los procedimientos de electroforesis y visualización se realizaron según Moreno et al. 2016.

El material genético correspondiente a aquellas cepas que fueron positivas para esta primera ronda de identificación molecular, fue sometido a una nueva ronda de amplificación para determinar el grado de virulencia. Para esto, se utilizaron dos pares de primers específicos propuestos por Ramsrud et al. 2007 (Tabla 1). Estos primers determinan la presencia del alelo CFS 259–93, cuyo fragmento de amplificación es de 600pb, y corresponde al fenotipo virulento. Mientras que el otro par de primers, pone de manifiesto el alelo ATCC 49418, cuyo amplicón es de 298pb, y corresponde al fenotipo no virulento. La manifestación de los dos alelos corresponde al fenotipo de virulencia moderada.

Se usaron 2 µL del material genético como plantilla para las rondas de amplificación, la mezcla de



reacción contenía 1 μ L de cada par de *primers*, Master Mix GoTaq[®] Hot Start Green Master Mix, con desoxinucleótidos y agua de grado de biología molecular (volumen final 25 μ L). Como control positivo de amplificación se utilizó el material genético de la cepa *F. psychrophilum* NCMB 1947, ya que esta resulta positiva para los alelos CFS 259–93 y ATCC 49418. Como control negativo se reemplazó el volumen de ADN genómico extraído, por 2 μ L de solución de resina Chelex[®] al 5% (Bio-Rad) (Moreno et al. 2016). Las rondas de amplificación fueron llevadas a cabo en el termociclador Mastercycler[®] nexus (Eppendorf), según Ramsrud et al. (2007).

Tabla 1. *Primers* seleccionados para las diferentes rondas de amplificación.

	Referencia	Secuencia
<i>F. psychrophilum</i>, 16S rARN, Tamaño del amplicón 971pb	del Cerro et al. 2002.	FP1F 5'-CTT AGT TGG CAT CAA CAC-3' FP3R 5'-ACA CTG GCA GTC TTG CTA-3'
Alelo ATCC 49418, 16S rARN, Tamaño del amplicón 298 pb	Ramsrud et al. 2007.	A = 5'-CGT CAA GCT ACC TCA CGA GGT-3' AF = 5'-ATA GTG AGT TGG CAT CAA CAC ACT-3'
Alelo CSF259-93, 16S rARN, Tamaño del amplicón 600 pb	Ramsrud et al. 2007.	A = 5'-GAA ACA CTC GGT CGT GAC CG-3' AR = 5'-GAC AAC CAT GCA GCA CCT TG-3'

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 2% (p/v). En esta etapa, los fragmentos de material genético obtenidos a partir de las diferentes rondas de amplificación fueron separados en base a su tamaño. Como estándar de peso molecular se utilizó un marcador de 10000pb. La visualización de los fragmentos de material genético amplificado se llevó a cabo mediante el uso de bromuro de Etidio (Bio–Rad) y fotografiados bajo luz UV (Fig1). El voltaje aplicado en este ensayo fue de 101V, durante 30 min.

Resultados

Considerando el criterio de selección morfológica, se aislaron 9 cepas presuntivas de *F. psychrophilum*, desde las muestras de riñón de ejemplares de salmónidos con signos clínicos de enfermedad (Tabla 2). De las 9 cepas, 4 fueron positivas para la amplificación con los *primers* específicos FP1F y FP3R (del Cerro et al., 2002) para *F. psychrophilum* presentando un fragmento de amplificación típico de 971pb (Fig. 1).



La cepa Fp04 resultó positiva para los alelos ATCC 49418 y CFS 259-93, por lo que se clasificó como de virulencia moderada; mientras que las cepas Fp10-12 fueron positivas sólo para el fenotipo virulento, expresando el fragmento de amplificación específico para primers del alelo CFS 259-93, por lo que fueron clasificadas como de virulencia alta (Ramsrud et al., 2007) (Fig. 2). Para verificar si las condiciones de conservación del material genético aislado fueron afectadas a través del tiempo, el ADN genómico de la cepa Fp04, que resultó positiva para los primers FP1F y FP3R (dato no mostrado en Fig. 1), fue sometido a dos rondas de amplificación por duplicado (Fig. 2).

Tabla 2. Cepas bacterianas analizadas para la identificación y determinación de virulencia de *F. psychrophilum*.

Cepa	Hospedador	Lugar	Fecha	PCR			Virulencia
				FP	ATCC 49418	CFS 259-93	
Fp04	SS ⁽¹⁾	CEAN	08/21	+	+	+	Moderada
Fp05	TAI ⁽²⁾	CRUB	11/21	-			
Fp06	TAI	CRUB	11/21	-			
Fp07	TAI	Pto. Moreno	12/22	-			
Fp08	TAI	Pto. Moreno	12/22	-			
Fp09	TAI	Pto. Moreno	12/22	s/d			
Fp10	TAI	Pto. Moreno	11/23	+	-	+	Alta
Fp11	TAI	Pto. Moreno	11/23	+	-	+	Alta
Fp12	TAI	Pto. Moreno	11/23	+	-	+	Alta

⁽¹⁾ *Salmo salar*, Salmón del Atlántico; ⁽²⁾ *Oncorhynchus mykiss*, Trucha arcoiris

s/d: Sin determinar

CRUB: Centro Regional Universitario Bariloche

⁽⁺⁾ Resultado positivo para la amplificación

⁽⁻⁾ Resultado negativo para la amplificación

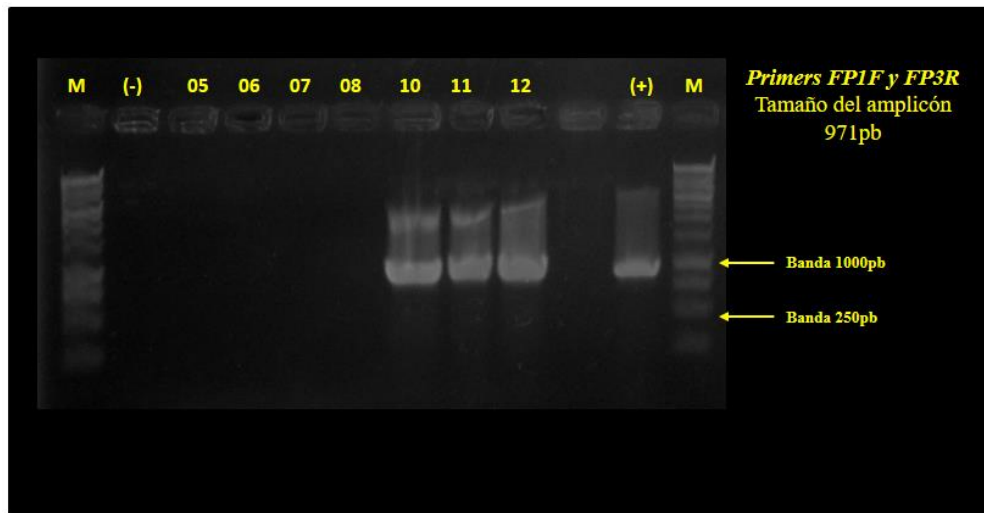


Figura 1. Electroforesis gel de agarosa al 2% (p/v) de productos amplificados por PCR mediante la utilización de los primers FP1 y FP3 para la identificación de *Flavobacterium psychrophilum* (del Cerro et al., 2002). Referencias: M: marcador de peso molecular, peso total 10000pb; (-): control negativo; 05 a 12: ADN genómico de cepas *F. psychrophilum* presuntivas; (+): cepa NCMB 1947 utilizada como control positivo.

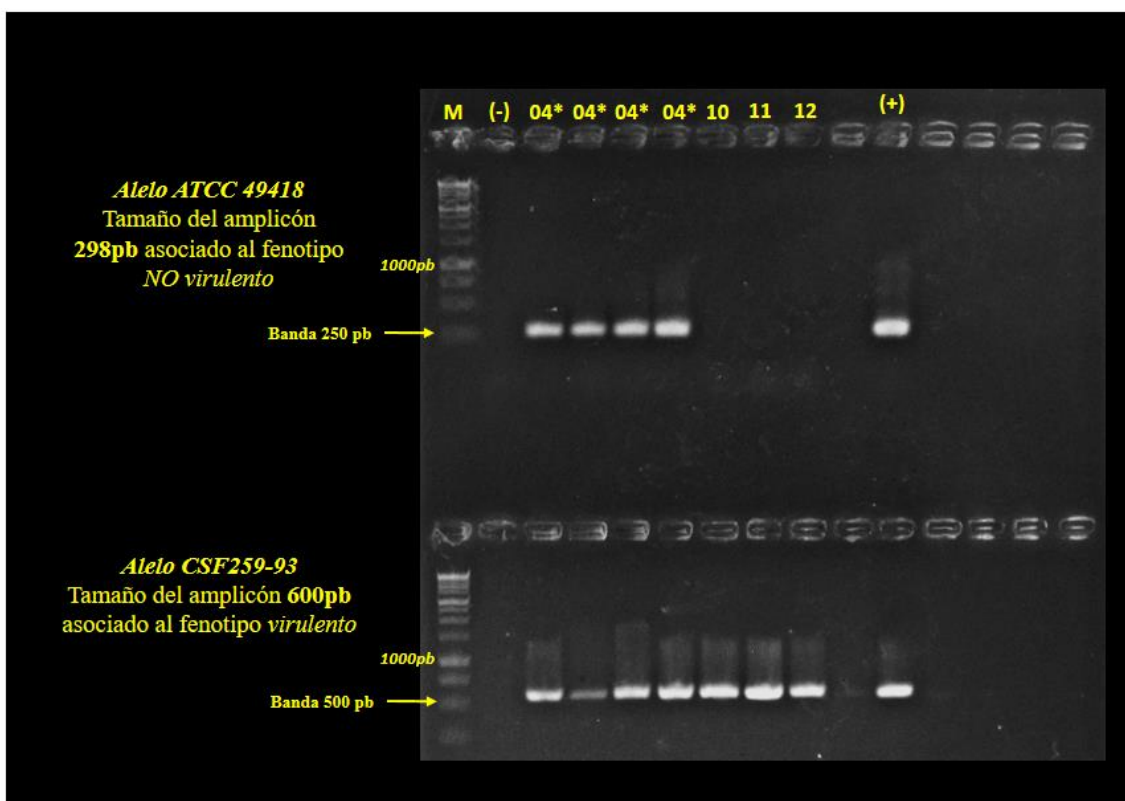


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) para evaluación del grado de virulencia en fragmentos de amplificación de cepas de *Flavobacterium psychrophilum*. Las condiciones del ensayo PCR punto final fueron de acuerdo a Ramsrud et al. (2007). Referencias: M: marcador de peso molecular, peso total 10000pb; (-): control negativo; 04*: material genético de la cepa Fp04 amplificado en dos rondas diferentes por duplicado; 10 a 12: cepas *F. psychrophilum* de virulencia alta; (+): cepa NCMB 1947 utilizada como control positivo.



Consideraciones

Los métodos de diagnóstico, identificación y caracterización basados en estrategias simples de biología molecular (protocolos de PCR de punto final), son herramientas que permiten agilizar la obtención de resultados y la consecuente toma de decisiones cuando se cuentan con las secuencias genéticas específicas. El presente trabajo abordó el aislamiento bacteriano y posterior identificación y caracterización de diferentes cepas de *F. psychrophilum* a partir de salmónidos de pisciculturas de Neuquén y Río Negro. En particular, se puso a punto y aplicó la metodología propuesta por Ramsrud et al. (2007) que permite determinar el carácter de virulencia de cepas de *F. psychrophilum*; observándose, que no todos los aislados analizados, que fueron identificados previamente por PCR, poseen el mismo carácter de virulencia. Mientras que la cepa aislada a partir de salmón del Atlántico en el CEAN se clasificó como de virulencia moderada, las cepas aisladas a de truchas arcoíris del hatcheri Pto. Moreno de Bariloche se clasificaron como de virulencia alta. La variabilidad genética en *F. psychrophilum* ha sido ampliamente estudiada y puede estar relacionada tanto a su distribución geográfica como a la especie de salmónido hospedadora (Soule et al., 2005; Ramsrud et al., 2007). Esta información resulta valiosa en términos de vigilancia sanitaria y estudios epidemiológicos y además es relevante para los análisis de susceptibilidad ante antimicrobianos y el potencial desarrollo de vacunas. Finalmente, cabe destacar que este trabajo refuerza las capacidades conjuntas y colaborativas de los Laboratorios de Ictiopatología del CEAN y Ecotoxicología Acuática (INIBIOMA-CEAN) para el estudio de las enfermedades que afectan a la producción de salmónidos en la región patagónica mediante un abordaje integral que incluya aspectos patológicos, inmunológicos, epidemiológicos y ambientales.



Bibliografía

- Barnes & Brown. 2011. A Review of *Flavobacterium psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment. *Open Fish Sci J*; 4:40-48
- Bernardet & Kerouault. 1989. Phenotypic and Genomic Studies of "*Cytophaga psychrophila*" Isolated from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol*; 55(7):1796-1800.
- Bernardet JF, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kersters K, Vandame P. 1996. Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatidis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis*, Strohl and Tait 1978). *mt. J. Syst. Bacteriol*; 46:128-148.
- Castillo MA, Ortega C, Fajardo R, Martínez-Castaneda S, Valladares B, Irgang R, Poblete Morales M, Avendano-Herrera R. 2017. First isolation and characterisation of *Flavobacterium psychrophilum* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Mexico. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*; 37: 23-30.
- Cipriano RC & Holt RA. 2005. *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. *Fish Disease Leaflet* No. 86. United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV.
- Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio o Experimentación (CICUAL), del INIBIOMA: PROTOCOLO N°00024/2020.
- Decostere A, D'Haese E, Lammens M, Nelis H and Haesebrouck F. 2001. In vivo study of phagocytosis, intracellular survival and multiplication of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), spleen phagocytes. *J Fish Dis*; 24:481-487.
- del Cerro A, Marquez I and Guijarro JA. 2002. *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol*; 68: 5177-5180.
- Holt RA, Amandi A, Rohovec JS, Fryer JL. 1989. Relation of water temperature to bacterial cold-water disease in coho salmon, Chinook salmon, and rainbow trout. *J. Aquat. Anim Health*; 1:94-101.
- Izumi S & Wakabayashi H. 1997. Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. *Fish Pathol*; 32:169-173.
- Ma J, Bruce TJ, Sudheesh PS, Knupp C, Loch TP, Faisal M, Cain KD. 2018. Assessment of cross-protection to heterologous strains of *Flavobacterium psychrophilum* following vaccination with a live-attenuated coldwater disease immersion vaccine. *J Fish Dis*; 42(1):75-84.
- Moreno P, Molinari L, Hualde P and Miyazaki T. 2016. First report of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Argentina. *Bull Eur Ass Fish Pathol*; 36:59-64.
- Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F and Haesebrouck F. 2003. *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis*; 26: 563-574.
- Ramsrud AL, LaFrentz SA, LaFrentz BR, Cain KD, Call DR. 2007. Differentiating 16S rRNA alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. *J Fish Dis. Mar*; 30(3):175-80. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00795.x. PMID: 17352793.
- Soule, M, LaFrentz, S, Cain K, LaPatra S, Call DR. 2005. Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* correlate with elastin hydrolysis and tetracycline resistance. *Dis Aquat Organ*; 65(3): 209–216. <https://doi.org/10.3354/dao065209>
- Starliper CE. 2011. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *J Adv Res* 2: 97–108.
- Urdaci MC, Chkroun C, Faure D, Bernardet JF. 1998. Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Res Microbiol*; 149:519-530.
- Yoshiura Y, Kamaishi T, Nakayasu C and Ototake M. 2006. Detection and *Flavobacterium psychrophilum* by PCR targeted to peptidyl-prolylcis-trans isomerase C gene. *Fish Pathol*; 41(2): 67-71.