



PCR Y qPCR PARA DETECCIÓN DE *Aeromonas salmonicida* Y *Flavobacterium psychrophilum* EN *Oncorhynchus mykiss*

PCR and qPCR FOR DETECTION OF *Aeromonas salmonicida* AND *Flavobacterium psychrophilum* IN *Oncorhynchus mykiss*

Juan Ospina-Ramírez^a, John Betancur-López^b, Andrés Montoya-Lopez^b,
Lina Correa-Agudelo^c

^a Estudiante Pregrado Biología. juospinar@uces.edu.co

^b Zootecnista.

^c Bióloga.

Universidad CES, Facultad de Ciencia y Biotecnología, Biología CES-EIA, Biología CES-EIA, Medellín, Colombia

RESUMEN

Introducción. Entre los principales patógenos involucrados en infecciones de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se incluyen las especies de bacterias Gram negativas como *Aeromonas salmonicida* y *Flavobacterium psychrophilum*. Estos son los agentes etiológicos de la forunculosis y de la enfermedad bacteriana de aguas frías respectivamente, que se caracterizan por la presencia de anorexia, letargia, septicemia, lesiones necróticas y hemorrágicas. Los métodos comunes de identificación de estas especies requieren largo tiempo y trabajo, y son difíciles de implementar por la variedad de perfiles bioquímicos y la ausencia de medios selectivos eficientes. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR en tiempo real (qPCR) se han posicionado como importantes herramientas en la identificación de especies bacterianas por la especificidad de la reacción. **Objetivo.** Diseñar y evaluar protocolos de PCR y qPCR para la detección de *A. salmonicida* y *F. psychrophilum* en *O. mykiss*. **Métodos.** Se utilizaron como control las cepas registradas *Flavobacterium psychrophilum* ATCC®45510 y *Aeromonas salmonicida* ATCC®33658; y cepas control para pruebas de especificidad: *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. iniae*, *S. pyogenes*, y *Edwardsiella tarda*, las cuales fueron reconstituidas y cultivadas según las especificaciones para cada cepa. Se realizó la extracción de DNA bacteriano mediante el equipo automatizado QIAcube utilizando el Kit comercial DNeasy® Blood & Tissue siguiendo el protocolo para extracción de DNA bacteriano. La concentración y pureza del DNA fue medida utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 y se verificó integridad del DNA por medio de electroforesis en gel de agarosa 1X. Cuatro secuencias de oligonucleótidos fueron sintetizadas. Para *A. salmonicida* fueron sintetizadas las secuencias Forward- 5'-CACACTGAGCCTGTTCCAGA-3', y Reverse- 5'-AGTCAGCTCGCCAAACAGAT-3' a partir del gen *fstB* (AM712656.1) esperando un producto de 124 pb. Para *F. psychrophilum* Forward – 5'- AGACTCTATCGCAGCCGTTAC 3' y Reverse - 5'- GTCGTCGTCTGAATCCTCA 3', a partir del gen *gyrA* (CAL42851.1); Esperando un producto amplificado de 175 pb. Las sondas utilizadas en la qPCR fueron marcadas con VIC y FAM como reporteros de amplificación. Las reacciones fueron llevadas a un volumen final de 25 µL conteniendo: >10 ng de DNA, 10X taq buffer, dNTPs (0,2 mM),

primer forward (0,5 µM), Primer Reverse (0,5 µM), MgCl₂ (2,5 mM), taq polimerasa (1,25 U). Las reacciones fueron llevadas a cabo en el termociclador C1000 Touch™ Bio-Rad con el siguiente perfil térmico: 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, y a 72°C por 30 s. Los productos amplificados por PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. **Resultados.** Se obtuvo una especificidad del 100% para cada par de “primers” evaluado con las cepas bacterianas de referencia. La concentración mínima de detección para ambos agentes fue en diluciones de 1:10000 tanto para PCR como para qPCR. **Conclusión-** Los resultados obtenidos demostraron que los protocolos diseñados y evaluados son específicos y sensibles para la detección de *A. salmonicida* y *F. psychrophilum*, convirtiéndolos en una herramienta diagnóstica de detección rápida y específica

Palabras clave: biología molecular, diagnostico, infección, patógeno, trucha arcoíris

Keywords: molecular biology, diagnosis, infection, pathogen, rainbow trout

Agradecimientos: Esta investigación fue financiada por la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia en el marco del convenio 4600000970 SADRA-ASOACUICOLA del fondo de Ciencia Tecnología e innovación del Sistema General de Regalías.