

Detección molecular de *flavobacterium psychrophilum* trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivada en el lago Guamuéz municipio de Pasto República de Colombia.

Alvaro Javier Burgos Arcos
Zoot. McS (c) Biotecnología.

Profesor Asistente Universidad de Nariño
Programa de Ingeniería en Producción Acuícola.
Pasto Nariño Colombia.

Laboratorio de Biotecnología. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Universidad de Guayaquil. Ecuador.

Introducción

Uno de los mayores problemas que afecta a productores de Trucha arco iris en Latinoamérica y para este caso, acuicultores del Lago Guamuéz, es una tasa de mortalidad estacionaria de hasta del 90% de los alevinos durante los tres primeros meses de cultivo, cuando los animales presentan un peso entre los 2,5 y 18 g.

El principal síntoma patológico, en afecciones avanzadas, es decoloración de las laminillas branquiales, luego cuando los animales están próximos a morir, pueden presentar alta congestión de mucus purulento, impidiendo la respiración, autores como Davis (1927), Later et al (1952), Bullock(1972) y Huh y Wakabayashi (1987), reportan sintomatologías similares a las anteriores en cultivos de trucha intensivos y otras especies de aguas calidas; además el tejido epitelial de las laminillas de las branquias afectadas presenta hiperplasia e hipertrofia. Las observaciones postmortem, también revelan palidez en hígado, y riñón. Clínicamente los animales se muestran letárgicos, inapetentes y con nado superficial (Vatsos et al 2001).

Las medidas profilácticas mas frecuentes es la realización de baños de inmersión de los alevinos con soluciones de sal marina, formaldehído, amonio cuaternario, con frecuencias de una a dos veces por semana en la etapa crítica. Cuyos resultados generalmente no son eficaces.

Autores como Wiklund, T y Dalsgaard, I. (2003), .también reportan el uso de compuestos a base de amonio cuaternario tal como el benzalkonium clorado con el 98.8% de ingrediente activo, así como el catión diquat en concentraciones de 8,4 a 16,8 ppm , los mismos autores señalan que ninguno de los anteriores es aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos para el Control en Alimentos de Pescado.

Uno de los mayores obstáculos para el diseño de estrategias que permitan controlar esta enfermedad se inicia con el aislamiento de *F. Psychrophilum* , a través de cultivos clásicos en agar, debido al lento crecimiento de estas células bacterianas y, especialmente, por el sobrecrecimiento o inhibición de microorganismos acuáticos que se multiplican más rápidamente (Wiklud, Madsen, Bruñi y Dalsgaard 2000). De la misma manera Nematollahi et al (2003) destacan las características de medios de cultivos bacteriológicos de uso exitoso por varios investigadores, cual es la de ser necesarios medios de cultivo con bajos contenidos nutritivos y periodos de incubación de 8 a 12 días a temperaturas de 16° C ; aspectos que fueron importantes en la obtención de resultados de la presente investigación, ya que este microorganismo es catalogado de difícil y laborioso cultivo y aislamiento.

Por otra parte, las sondas de ADN, para hibridaciones con el ácido nucleico blanco, en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) están disponibles para detectar una amplia variedad de patógenos encontrados en el ambiente acuático, con alto grado de especificidad y sensibilidad, característica indiscutible de los métodos de detección moleculares en el diagnóstico oportuno y rápido de enfermedades.

Estas últimas consideraciones son especialmente válidas para el *Flavobacterium psychrophilum* , bacteria objeto de la presente investigación, detectada molecularmente por medio de la reaccion en cadena de la polimerasa anidada y semianidada, mediante la aplicación de protocolos sencillos y asequibles para profesionales de entidades públicas y privadas comprometidas con el desarrollo y fortalecimiento del subsector acuícola nacional y regional.

II.Revisión bibliográfica

2.1 Antecedentes

La bacteria *Flavobacterium psychrophilum* es el agente causal de la enfermedad bacteriana de las aguas frías (CWD) o también conocida como el síndrome de los alevinos de trucha arco iris (RTFS). Esta enfermedad se ha identificado como la responsable de pérdidas económicas sustanciales en acuacultivos de salmónidos (Baliarda 2002). El Lago Guamuéz o Laguna de la Cocha, ubicada en el Municipio de Pasto, Departamento de Nariño, Republica de Colombia, donde se producen importantes cantidades de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*. walbaum), Corponariño 2003, no es la excepción a esta problemática.

Los brotes, asociados con epizootias, incluyen altos índices de mortalidad, incremento de la susceptibilidad a otras enfermedades, altos costos en los tratamientos por manipulación y labores quimioterapéuticas (Leann et al 2001).

A pesar del significativo incremento de la enfermedad, la patogénesis de la infección de *Flavobacterium psychrophilum* hasta el momento es parcialmente entendida, impidiendo el desarrollo de medidas preventivas para combatir eficientemente las condiciones de esta enfermedad (Nematollahi 2003).

El *Flavobacterium psychrophilum*, fue inicialmente aislado de riñón y lesiones externas de juveniles enfermos de salmón cho, *Oncorhynchus kitsutch*, en el estado de Whashintong, USA y fue originalmente denominado *Citopahaga psychrophila* (borg 1960). Desde 1948 Davis describió la patología causada por este organismo en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum), caracterizada por una lesión abierta sobre o cerca del pedúnculo. Por esta razón, inicialmente la denominó como enfermedad del pedúnculo; debido a que los brotes de la enfermedad se presentaban en invierno o primavera en condiciones de bajas temperaturas menores a 10o C, también fue denominada como enfermedad de aguas frías o de baja temperatura (Borg 1960; holt 1988 citados por Nematollahi 2003).

2.2 Taxonomía

La taxonomía de esta bacteria ha sufrido varios cambios desde su descubrimiento por Borg (1960), quien basado en características bioquímicas propuso el nombre de *Citopahaga psychrophila*. Así mismo Reinchenbach (1989) listó *C. Psychrophila* en el género *Cytophaga* y le asigno NCMB 1947 como cepa tipo.

Por su parte, Bernardet y Grimont (1989) reclasificaron este agente bajo el género *Flexibacter* basados en homología de ADN y desde entonces se renombró como *Flexibacter psychrophilus*.

Finalmente, trabajos más recientes nuevamente modificaron el estado taxonómico de este patógeno, el cual fue transferido al género *Flavobacterium* basándose en datos de hibridación ADN- rARN y designado como *F. Psychrophilum* (Bernardet, Sergers, Berthe, Kerster y vandamme 1996, citados por Nematollahi 2003).

Cabe anotar que bacterias de importancia en salud humanas y de característica nosocomiales, designadas durante muchos años dentro del género *Flavobacterium*, actualmente se reubicaron en géneros diferentes a éste, como *Empedobacter* y *Shingobacterium* (Forbes, et al 2004).

2.3 Morfología y características bioquímicas

Las células de esta bacteria son Gram negativas, flexible a nuevas condiciones ambientales, débilmente brillante, escasamente alargada con extremos redondeados (Wiklund 2001).

Según, Bernardet y Grimon 1989, las células, de esta bacteria, que muestran crecimiento en medios de cultivos especiales, por sus bajos contenidos nutritivos, presentan un diámetro de 0,25 micras y un largo de 1,25 a 6,25 micras. También, se reporta que algunas cepas presentan motilidad casi imperceptible, justamente difícil de observar, aún después de prolongados tiempos de observación (Lorenzen, Dalsgaard y Bernarbet 1997).

De acuerdo con Hunnicut y McBride 2000, en este tipo de motilidad parecen no estar involucrados pili, sino que la fuerza para el movimiento parece estar relacionada con la secreción de lipopolisacáridos.

Con respecto a la producción de enzimas, se reporta que el *Flavobacterium psychrophilum* produce enzimas que degradan colágeno, fibrinógeno, caseína, gelatina, elastina y extracto de músculo de pez (Ostland, Byrne, Hoover y Ferguson 2000). Por el contrario no degradan quitina, verde de aesculina, almidón y xantinas. Si presentan, aunque débilmente, actividad positiva a catalasa y oxidasa, pero con actividad negativa a indol, ácido sulfhídrico, lisina y ornitina. Aunque el *Flavobacterium psychrophilum*, no es capaz de degradar la mayoría de carbohidratos complejos (Austin y Austin 1999), si es capaz de degradar el condroitín sulfato (Otis 1984).

2.4 Métodos de diagnóstico

El aislamiento de *F. Psychrophilum* por medio de cultivos clásicos en agar es difícil debido al lento crecimiento de estas células bacterianas y, especialmente, por el sobrecrecimiento o inhibición de bacterias acuáticas que se multiplican más rápidamente (Wiklund, Madsen, Bruñi y Dalsgaard 2000).

Este patógeno no crece sobre los medios de cultivo usados normalmente, justamente enriquecidos, tal como agar sangre, y por lo tanto debe ser cultivado sobre medios específicos que deben contener niveles bajos de nutrientes (Nematollahi et al 2003).

2.4.1 Medios de cultivo específicos

El medio de cultivo, y aislamiento, donde crecen colonias a partir de peces enfermos más comúnmente aislado es el *Citopahaga* agar (Anacker y Ordal 1959), desde entonces varios investigadores (Cepeda, García-Márquez et al 2004, Lorenzen 1993, Toranzo 1993, Santos et al 1992, Song, Fryer y Rohovec 1988) han propuesto formulas mejoradas, obteniendo respuestas diferentes en el crecimiento de esta bacteria, la mayoría de medios evaluados contienen tripticasa y extracto de levadura como nutrientes básicos (Holt 1993).

Daskalov, Austin y Austin (1999), reportan buenos niveles de crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum*, utilizando el caldo y el agar *Citopahaga*, enriquecido con azúcares monosacáridos y leche descremada; presentando el mejor

crecimiento en rapidez y número de colonias, a 16°C, dicho medio de cultivo está compuesto de 0,5 g de tryptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,2 g de extracto de carne, y 0,2 g de acetato de Sodio trihidratado por litro de medio. Los azúcares monosacáridos y leche descremada se adicionaron en proporción de 0,5 g por litro de medio, galactosa, glucosa, ramnosa fueron los azúcares arriba referidos.

Además de el aislamiento por medio de microbiología tradicional, otros métodos han sido utilizados para la detección de este patógeno (Nematollahi et al 2003) entre los cuales se reportan métodos serológicos como ELISA (Rangdale y Way 1995) y técnicas de anticuerpo inmunofluorescencia (Lorenzen y Karas 1992; Amita 2000).

2.5 Técnicas moleculares

Los avances en tecnologías de la genética molecular en el campo de investigación de enfermedades acuáticas incluyen detección e identificación de patógenos, interacciones parasito –hospedero, mecanismos de virulencia así como el entendimiento de relaciones taxonómicas entre organismos patógenos y grupos relacionados. La disponibilidad de bases de datos moleculares han permitido el desarrollo de pruebas de detección sensibles y específicas para patógenos acuáticos. Además, las secuencias de ADN, en particular, los datos de los genes de la pequeña subunidad (SSU) ribosomal, son usadas para análisis filogenéticos moleculares; y por tanto para fines diagnósticos. (Reece, Kimberly 2004).

Los mencionados autores, también agregan que las sondas de ADN para hibridaciones in situ y protocolos para el empleo en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) están disponibles para una amplia variedad de patógenos encontrado en el ambiente acuático, que los métodos de detección moleculares pueden facilitar diagnósticos de enfermedades, sobre todo cuando son catalogados como difíciles y/o que lleva mucho tiempo su aislamiento e identificación, y, en situaciones donde los patógenos no puede ser distinguidos certeramente basado en caracteres morfológicos fisiológicos.

Además, el diagnóstico molecular es invaluable cuando una especie particular dentro de un género o hasta dentro de ciertas cepas de la misma especie puede ser patógena, mientras la especie estrechamente relacionada o cepas de ellas son inofensivas. Por lo tanto, para el desarrollo de sondas específicas de género, específicas de especie y específicas de cepas, es importante obtener datos de secuencia de tantas cepas diferentes y especie dentro de un género como sea posible.

En este punto es necesario hacer énfasis, en la importancia y las ventajas científicas comparativas de las pruebas basadas en la tecnología de Ácidos nucleicos, especialmente cuando se trata de bacterias como el *Flavobacterium psychrophilum*.

2.5.1 Reacción de polimerización o PCR (polimeraza chain reaction)

La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR Polimerasa chain reaccion) fue ideada por Kary Mullis a mediados de la década de 1980 (Mullis y Faloona.1987; Saiki et al 1985) y desde entonces ha causado una enorme revolución en la Biología Molecular tanto en la investigación dirigida hacia la comprensión de procesos biológicos fundamentales como en las áreas aplicadas, incluyendo diagnósticos y mejoramiento genético de plantas y animales. La rapidez, versatilidad y sensibilidad de la PCR la vuelve particularmente poderosa para estudios genéticos moleculares (Ferreira y Grattapaglia. 1989).

Esta tecnología permite amplificar in Vitro pequeños fragmentos de ADN, obteniendo millones de copias a partir de una única copia original por medio de la repetición de ciclos sucesivos de desnaturalización y síntesis del ADN. Para ello se utilizan oligonucleótidos como cebadores que sirven para iniciar cada nuevo proceso de síntesis en los extremos del fragmento que se quiere amplificar (Mullis et al., 1986; Mullis y Faloona, 1987; Mullis, 1990).

La automatización del proceso en un termociclador ha sido posible utilizando ADN polimerasa que no se desnaturaliza a las elevadas temperaturas en que normalmente se produce desnaturalización. En este aspecto ha jugado un papel importante la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Innis et al., 1988), que fue propuesta como "molécula del año" en 1989 por la revista Science (Guyer y Koshland, 1989).

2.5.2 Derivaciones del método de PCR

De acuerdo con Forbes et al 2004, la gran capacidad de amplificación de la PCR estimuló el desarrollo de varias modificaciones que aumentan la eficacia de esta metodología, en particular para los métodos diagnósticos. Algunos ejemplos específicos son la PCR anidada, la PCR múltiple, la cuantitativa, la RT PCR, La PCR con cebadores aleatorios.

2.5.2.1 La Nested PCR. Reaccion en Cadena de la Polimerasa Anidada

Esta metodología involucra el uso de secuencial de dos juegos de cebadores. El primer juego se utiliza para secuenciar una secuencia blanco. El amplicón obtenido se usa luego para una segunda amplificación, mediante cebadores internos con respecto al primer amplicón. En esencia, esta es una amplificación de una de una secuencia interna de un amplicón. La ventaja de este enfoque es su sensibilidad y especificidad extrema, confirmadas sin la necesidad de usar sondas. Debido a que la producción del segundo amplicón requiere de la presencia del primero, la presencia del segundo amplicón

verifica de manera automática la exactitud del primer amplicón. (Forbes et al 2004).

Además, Forbes y colaboradores (2004), agregan que el problema observado con la PCR anidada es que el procedimiento requiere manipulaciones abiertas de ADN amplificado, el cual es muy susceptible de aerosolizarse en forma inadvertida y contaminar otra reacción.

Con respecto, a la PCR anidada, Luque y Herráez 2002, hacen una interesante observación en el sentido de que en esta metodología: "las copias correctas de la primera diana contendrán ambas secuencias complementarias a los nuevos cebadores, a diferencia de los productos no específicos generados en la primera PCR (que se observan en la electroforesis como varias bandas o una banda difusa) , que por ello no resultaran amplificadas en la segunda."

2.6 Técnicas moleculares aplicadas en la investigación de *Flavobacterium psychrophilum* .

La investigación para la detección de *Flavobacterium psychrophilum* , con herramientas de diagnóstico molecular incluyen los estudios de el Polimorfismo de Tamaño de Fragmentos de Restricción (RFLP) reportado por Nilson y Strom (2002); Hibridación in situ reportado por Liu et al 2001.

Investigaciones basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se reportan desde 1994 con los trabajos de Toyama, Kita-Tsukamoto y Wakabayashi, así mismo, ciertos diagnósticos de *Flavobacterium psychrophilum* basados en biotecnología han sido realizados por Izumi y Wakabayashi en 1997; Urdaci, Chakroum, Faure y Bernardet en 1998, así como Cepeda y Santos; Wiklund et al ambos en el año 2000.

Madejota y Winklund (2002) detectaron el *F. psychrophilum* en peces y en el agua de piscifactorías, en este trabajo compararon tres métodos de detección, y, reportan que la Nested PCR fue el método más sensible para la detección de este patógeno, ya que la detección estimó hasta 3 UFC por caja petry de cultivo en agar; aunque la utilidad de este grado de susceptibilidad es discutible debido al largo periodo de incubación de este difícil microorganismo, de 7 a 16 días, tal como lo corrobora Daskalov, Austin y Austin (1999).

Madejota y Winklund (2002), basados en la técnica de anticuerpo inmunofluorescencia (IFAT) detectaron hasta 41 cédulas de *Flavobacterium psychrophilum* , y para la detección de este mismo patógeno en agar tradicional se requirieron de hasta 410 CFU por ml, además, los mismos autores agregan que la detección por Nested PCR e IFAT a partir de muestras de agua fue mucho más frecuente, que la detección por medio de microbiologías tradicionales. Sugiriendo la aplicación de estas dos metodologías para la detección de este patógeno catalogándolas como herramientas efectivas de alta sensibilidad y especificidad, especialmente la Nested PCR.

Madetoja, Hanninen et al 2001, en Finlandia aislaron 37 cepas de *Flavobacterium psychrophilum* , de cultivos de salmónidos, estudiando características fenotípicas y genotípicas. Las características de las cepas fueron comparadas con las aisladas en Suecia, en Estonia y con la cepa *F. psychrophilum* tipo NCIMB 1947T. Además múltiples aislados de ocho brotes de enfermedad fueron examinados, y determinaron que las diferentes aislados realmente correspondían al mismo tipo microorganismo *Flavobacterium psychrophilum* , resultados obtenidos a partir de la caracterización genética con enzimas de restricción.

III. Materiales y Métodos

3.1 Aislamiento de bacterias

A partir de alevinos con pesos de 0,8 y 28 grs. obtenidos de diversos centros de producción ubicados en el Lago Guamuez, Municipio de Pasto , se cultivaron y aislaron cepas bacterianas con características morfológicas similares a las reportadas por Daskalov, Austin y Austin (1999) Se realizaron frotis a partir de diferentes tejidos externos e internos de animales con y sin sintomatología de Flavobacteriosis.

Inicialmente, los aislados se realizaron en TYEA (Trypticase, Extracto Levadura y Agar) y TYEB (Trypticase, Extracto Levadura, Caldo) como lo reportan Cepeda, García y Santos (2004), sin embargo las colonias que crecieron en estos medios no correspondían a *Flavobacterium psychrophilum* , ni siquiera en las características fisiológicas ni de tinción de Gram. Los mismos autores reportan crecimientos de hasta 5×10^9 UFC /ml utilizando un medio de cultivo denominado FLBP (Trypticase, Extracto de Levadura y sales suplementado con glucosa). Sin embargo la incubación, hasta por 12 días, a 16°C, con estos medios no produjo ningún crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum* .

Por lo anterior hubo necesidad de utilizar los medios de cultivos reportados por Daskalov, Austin y Austin (1999), obteniéndose los aislados iniciales reportados en la Tabla 1 y Tabla 2 de Anexos. Este medio de cultivo se caracterizó por obtener una baja concentración tanto de nutrientes básicos como de nutrientes aditivos. Por cada litro medio de cultivo se adicionó 0,5 g de tripticasa, 0,5 g de extracto de levadura, 0,2 g de extracto de ternera, 0,2 g de Acetato de Sodio, una vez ajustado el pH a 7,2 , se adicionó 0,5 g de manosa, 0,5 g de galactosa y 0,5 g de glucosa y 0,5 g de leche descremada por cada litro de caldo nutritivo, para preparación del medio sólido a los anteriores se les adicionó 9 g de agar. La temperatura de incubación se mantuvo en 16°C por un periodo de 15 días.

En la Tabla 1 y 2, de Anexos, se observan los detalles del origen de cada una de las cepas y los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas.

3.2 Extracción de ADN

Se utilizaron con éxito diversos protocolos, denominados como cortos y largos, para la extracción de ADN genómico de los aislados bacterianos y los diversos tejidos, Entre los protocolos cortos se destaca la utilización de la resina Chelex R Sigma al 5%(resina queratinizada en ácido amino acético) de la cual se mezclan 300 uL con un pellet de cepa bacteriana obtenida a a partir 1,5 ml de caldo nutritivo micro centrifugado a 5000 rpm, previo descarte del sobrenadante; se coloca en vortex a alta velocidad por 15 seg. Se incubó en baño maría a 56°C por 30 min., nuevamente vortex, someter a ebullición por 20 minutos y enfriar inmediatamente sobre hielo, nuevamente vortex y luego micro centrifugar a 10000 rpm por 10min. Del sobrenadante se tomó alícuotas de 2 uL para la preparación de las soluciones de primera PCR. El anterior protocolo es reportado por Wiklund, Madsen, Bruñi y Dalsgaard (2000).

Uno de los protocolos largos extracción y purificación de ADN consiste en la aplicación de la metodología descrita por Ausbel, et al (2000), así:

• Método de mini-extracción y purificación de ADN genómico de bacterias. Protocolo CTAB:

- Cultivo de la cepa aislada en caldo nutritivo.
- Microcentrifugación de 1,5 ml.
- Eliminación del caldo.
- Resuspensión del sedimento en solución de TE 50 uL.
- Adición de SDS al 10% y de proteinasa K.
- Incubación por una hora a 37°C.
- Adición de NaCl 5 molar. 300uL.
- Adición de CTAB/NaCl. 100 uL.
- Adición de cloroformo isoamil alcohol. Dos volúmenes.
- Centrifugar y el sobrenadante pasar a un nuevo tubo.
- Añadir fenol. 200uL.
- Centrifugar y adicionar solución de precipitación.
- Centrifugar y lavar con solución de etanol.
- Centrifugar y secar al ambiente.
- Adicionar de 20 a 50 uL de TE y guardar en congelación a -20°C.

• Método de extracción de ADN genómico y plasmídico de bacterias por ebullición:

- Cultivo de la cepa aislada en caldo nutritivo.
- Micro centrifugación de 1,5 ml.
- Eliminación del caldo.
- Resuspensión del sedimento en solución de STET con lysozima.
- Incubar en hielo 10 minutos.
- Colocar en agua a ebullición por dos minutos.
- Micro centrifugar y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Mezclar con isopropanol helado.
- Remover el sobrenadante y secar al ambiente.
- Agregar TE y guardar en congelación a -20°C.

3.3 Condiciones y reactivos para las dos reacciones de PCR anidada

La investigación utilizó, primers universales catalogados como 20F y 1500R, para la ejecución de la primera PCR, obteniendo un fragmento de 1500 pb, al ser aplicados al ADN extraído de la bacteria en referencia, estos fragmentos de ADN son complementarios a una región altamente conservada de la subunidad 16 de rARN de la mayoría de eubacterias; para la segunda PCR utilizaron primers específicos a la especie, denominados PSY1 y PSY2, complementarios a un fragmento de secuencias en dos regiones variables de los genes de la 16S rARN del *F. Psychrophilum*, los cuales producen un amplicón de 1086 pb cuando se aplican al resultado de la primera PCR; estos mismos iniciadores fueron desarrollados y utilizados por Toyama et al en 1994.

Se utilizó 50uL de mix o mezcla para cada una de las PCR señaladas, constituido por: 35,8 uL de agua ultra pura, 2 uL de ADN, 4 uL de Buffer 10X, 2 ul de MgCl a 50 mM, 4 uL de de dNTPs, 1 uL de cebador sentido y 1 ul de cebador antisentido y 0,2 uL de Taq ADN polimerasa, Gibco. La reacción en cadena de la polimerasa se corrió en un termociclador 2400 genius TM; Las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a 95°C por 5 min., seguidos de 35 ciclos de amplificación que incluyen 30seg a 95°C, 30 seg. a 57°C para hibridación de cebadores, 60 seg. a 72°C para extensión de las cadenas, finalizando todo el proceso a 72°C por 5 min., antes de la baja de temperatura a 4°C.

3.4 Migración en gel de electroforesis y lectura UV

Para este caso, es una etapa que tiene como fin depositar el ADN amplificado y migrarlo con corriente eléctrica sobre el gel con el 1% de agarosa, permitiendo que el bromuro de etidio se intercale en la doble hélice del ácido nucleico, para una posterior lectura en el transiluminador de UV, ya así comprobar la presencia, tamaño de bandas. Los pasos a seguir en este proceso corresponden a los descritos por Madigan, Martinko y Parker (2000).

IV. Resultados y discusión

En la Tabla I (ver Anexos) se observa el aislamiento inicial de 30 cepas cuyas características morfológicas y fisiológicas correspondían a *Flavobacterium psychrophilum*, dichos aislados corresponden a animales de diferentes tamaños y con síntomas de la enfermedad. Los resultados de pruebas bioquímica no fueron coherentes para definir si efectivamente se trataba de *Flavobacterium psychrophilum*.

En la Tabla 2 (ver anexos) se reporta 7 aislados adicionales de animales aparentemente sanos, pero cuyas colonias bacterianas, todas, con morfología y fisiología bioquímica relacionada con *Flavobacterium psychrophilum*, sin embargo al igual que el caso anterior los resultados de pruebas microbiológicas tradicionales carecieron de contundencia.

4. Técnicas moleculares para la detección de plásmidos en la bacteria *Flavobacterium psychrophilum*

Esta Bacteria es un importante patógeno de peces salmónidos; varios ensayos para aplicar técnicas genéticas a este difícil y fastidioso microorganismo psicrótrófilo han fallado (Álvarez et al 2004), estos investigadores desarrollaron técnicas para su manipulación genética e identificación de plásmidos, marcadores de selección, un sistema reportero y un transposón que funciona en varios aislados de este patógeno. En el presente trabajo se aplicaron los primers Cat-1(CAC TGG ATA TAC CAC CG) y Cat 2 (TGC CAC TCA TCG CAG TA) correspondientes a secuencia del gen Cat (que codifican a la acetil transferasa cloranfenicol) y que según el trabajo de los citados autores amplifican un segmento de ADN de 633 pb, sin embargo en el presente proyecto se obtuvo amplicóm de 400pb (datos no mostrados) por lo que estos iniciadores se descartaron para el perfeccionamiento de elaboración de los protocolos de diagnostico de *Flavobacterium psychrophilum*, ya que este resultado indico que estos iniciadores eran inespecíficos para le detección de este microorganismo.

4.1 Detección de *flavobacterium psychrophilum* de aislados microbiológicos de tejidos de trucha arco iris mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa. PCR anidada

Algunas de las técnicas genéticas disponibles en la actualidad para la detección de *Flavobacterium psychrophilum* son dispendiosas o carecen de la suficiente sensibilidad (Wiklund et al 2000, Tirola et al 2002, Izumi, Aranishi y Wakabashi 2003). En la presente investigación, para la detección de *F. psychrophilum* en tejidos de peces de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con aparente buen estado sanitario y de otros con síntomas patológicos de Flavobacteriosis, se implemento la técnica de PCR ANIDADA utilizando iniciadores universales (20F y 1500R) y específicos PSY1 y PSY2 (Tabla 1) reportados por Toyama 1994 y citados por Wiklund et al 2000.

Tabla 1. Secuencias y posición de los iniciadores para la detección de *flavobacterium psychrophilum* mediante PCR anidada

INICIADOR	POSICIÓN	SECUENCIA	AMPLICÓM
20F 1500R	8-27 1510-1492	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	1502 pb
PSY1 PSY2	190-206 1278-1262.....	GTTGGCATCAACACACT CGATCCTACTTGCGTAG	1089 pb

Aquí se destacan los tamaños de amplicones para cebadores universales para bacterias (20F y 1500R) de 1502 pb y de 1089 pb para cebadores específicos de la bacteria objeto de investigación. Igualmente se muestra en detalle la secuencia de nucleótidos de cada uno de los cebadores de la investigación.

4.1.1 Visualización de resultados en gel de electroforesis

La Foto 1 se puede observar los amplicones de 1502pb correspondientes a iniciadores universales (20F y 1500R), así como amplicones de 1089pb generados por primers específicos (PSY1 y PSY2), correspondientes a secuencias del ADN del gen que codifica la Subunidad 16 de los ribosomas del *Flavobacterium psychrophilum*. El ADN se extrajo tanto de cepas obtenidas de animales sintomáticos como de animales aparentemente sanos.

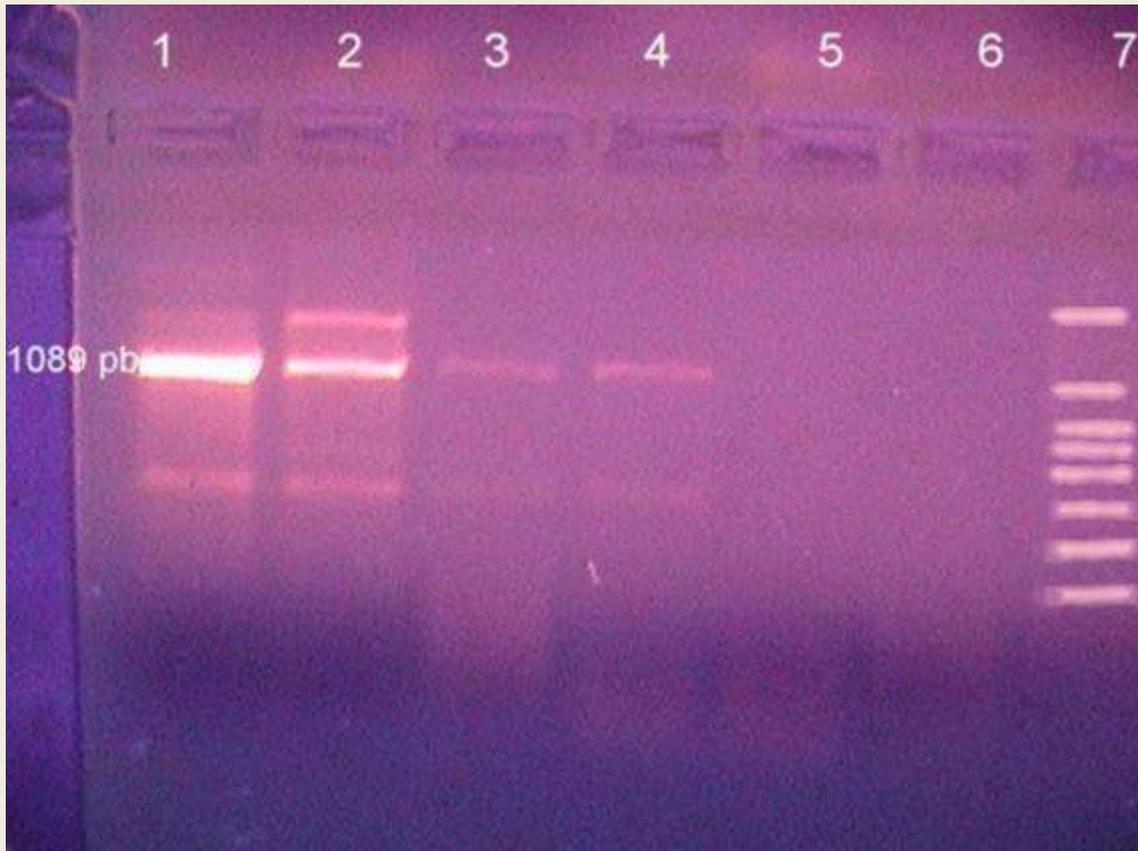


Línea 1 marcador de peso molecular 100pb; Línea 2: aislado 1 peces sintomático cerebro adulto, Línea 3: aislado peces sintomático intestino adulto; Línea 5 aislado alevino sintomático branquia; Línea 6: aislado intestino peces sintomáticos; Línea 7: aislado peces aparentemente sanos intestino adulto; Línea 8: aislado 7S alevinos intestino aparentemente sanos.

4.2 Detección de *Flavobacterium psychrophilum* de tejidos de trucha arco iris mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa PCR anidada

Por lo anterior, debido al difícil y prolongado cultivo de este microorganismo se procedió a tomar muestras directas de diferentes órganos y en diferentes tipos animales aparentemente sanos diluyéndolas en PBS, enseguida se procedió a la extracción directa de ADN genómico con protocolo CTAB de para extracción de ADN genómico de organismos procarióticos. Cuyos resultados se pueden observar en la Foto 2.

Foto 2. Visualización de resultados en gel de electroforesis



Línea 1: barrido piel alevinos aparentemente sanos; Línea 2: contenido intestinal de alevinos aparentemente sanos; Línea 3: Branquias alevinos aparentemente sanos; Línea 4: bazo adulto aparentemente sano.

4.2.1 Reacción en cadena de la polimeraza semi anidada

Con el fin ratificar que los amplicones obtenidos realmente corresponden a un fragmento de ADN de 1089 pb que codifica para la 16S rARN, se realizaron dos PCR adicionales, o PCR SEMI ANIDADAS, la primera de ellas se efectuó con el primer universal sentido 20F y el primer específico antisentido PSY2 para generar un amplicón de 1270 pb; la segunda PCR SEMI ANIDADADA se corrió con el iniciador específico sentido PSY1 y el iniciador universal antisentido 1500R que como se puede observar en la Foto 3 generó un amplicón de 1320 pb.

Foto 3. Visualización de resultados en gel de electroforesis



En la Foto 3 se detallan en la línea 1 amplicón de 1502 pb generado con primer universales, línea 2 amplicón de primera PCR semi anidada de 1270 pb, en la línea 3 fragmento de 1320 pb producto de segunda PCR semi anidada, línea 4

amplicón de 1089 pb generada en PCR anidada con iniciadores específicos para diagnóstico de *Flavobacterium psychrophilum*.

Conclusiones

Teniendo en cuenta, la importancia sanitaria y su incidencia en las altas pérdidas económicas en el cultivo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Colombia y otros países latinoamericanos, los resultados alcanzados en esta investigación pueden contribuir de manera significativa en el diagnóstico rápido y oportuno de este patógeno con el fin de definir estrategias profilácticas y de control de la bacteria, ya que las técnicas de biología molecular cada día son más asequibles para profesionales e instituciones comprometidas con el campo de la producción acuícola debido a su relativa sencillez, rapidez, eficacia y relativo bajo costo en comparación a las metodologías bacteriológicas tradicionales, aunque se debe aclarar que estas últimas continúan siendo un apoyo inicial importante en las rutinas de diagnóstico utilizadas en la prevención y diagnóstico de patologías que afectan los sistemas de producción animal.

Los resultados reportados concuerdan con la mayoría de investigaciones reportados en Europa, Asia y Norte América tal como se observó anteriormente, y, es oportuno agregar que en la medida de los avances de la acuicultura en la mejora de rendimientos biológicos y por lo tanto económicos, su alto grado de intensificación conlleva a la complicación de los aspectos sanitarios y fisiopatológicos, cuya solución se ha venido centrando en el uso y abuso de sustancias químicas, como desinfectantes y, antibióticos especialmente, por ello para finalizar, si bien es cierto el diagnóstico de patógenos por medio estrategias Biotecnológicas, cada día, a nivel mundial, cobra más importancia la investigación en el uso de bacterias probióticas, tanto para el control de microorganismos patógenos, como para el mejoramiento del valor nutritivo de los alimentos que se suministran en los cultivos acuícolas.

Bibliografía

- Development of genetic techniques for the psychrotrophic fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (1):581-587.- Alvarez,B, Secades,P, McBride,MJ, and Guijarro,JA. (2004).
- Genetic fingerprinting of *Flavobacterium columnare* isolates from cultured fish. *Journal of Applied Microbiology* 97 (2):421-428.- Arias,CR, Welker,TL, Shoemaker,CA, Abernathy,JW, and Klesius,PH. (2004).
- Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology* 92 (3):510-516.- Ballarda,A, Faure,D, and Urdaci,MC. (2002).
- Concomitant exposure of rainbow trout fry to *Gyrodactylus derjavini* and *Flavobacterium psychrophilum*: effects on infection and mortality of host. *Veterinary Parasitology* 117 (1-2):117-122.- Busch,S, Dalsgaard,I, and Buchmann,K. (2003).
- Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *Int.Microbiol* 3 (4):235-238.- Cepeda,C and Santos,Y. (2000).
- Microarray analysis of microbial virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7):3258-3263.- Chizhikov,V, Rasooly,A, Chumakov,K, and Levy,DD. (2001).
- An improved growth medium for *Flavobacterium psychrophilum*. *Letters in Applied Microbiology* 28:297-299.- Daskalov,H, Austin,DA, and Austin,B. (1999).
- Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Diseases of Aquatic Organisms* 42 (3):191-197.- Garcia,C, Pozet,F, and Michel,C. (2000).
- Effect of Experimental *Flavobacterium columnare* infection on IgM Production in Japanese Eel *Anguilla japonica*. *Fish Pathology* 35 (4):185-191.- Hirayabu,E, Mano,N, Uchida,D, Suzuki,T, and Hirose,H. (2000).
- Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis Aquat Organ* 56 (3):207-214.- Izumi,S, Aranishi,F, and Wakabayashi,H. (2003).
- Relationship between *gyrA* mutations and quinolone resistance in *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7):3968-3972.- Izumi,S and Aranishi,F. (2004).
- Sequencing of *gyrB* and their Application in the Identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathology* 35 (2):93-94.- Izumi,S and Wakabayashi,H. (2000).
- Changes in the cell structure of *Flavobacterium psychrophilum* with length of culture. *Microbiology and Immunology* 45 (12):813-818.- Kondo,M, Kawai,K, Yagyu,K, Nakayama,K, Kurohara,K, and Oshima,S. (2001).
- Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome. *Journal of Fish Diseases* 26 (7):377-384.- LaFrentz,BR, LaPatra,SE, Jones,GR, and Cain,KD. (2003).
- The structure of the lipopolysaccharide O-antigen produced by *Flavobacterium psychrophilum* (259-93). *European Journal of Biochemistry* 268 (9):2710-2716.- MacLean,LL, Vinogradov,E, Crump,EM, Perry,MB, and Kay,WW. (2001).
- Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. *Systematic and Applied Microbiology* 25 (2):259-266.- Madetoja,J and Wiklund,T. (2002).
- Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment. *Journal of Fish Diseases* 28 (1):39-47.- Madsen,L, Moller,JD, and Dalsgaard,I. (2005).

GldI is a lipoprotein that is required for *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility and chitin utilization. *J Bacteriol.* 186 (8):2295-2302.- McBride,MJ and Braun,TF. (2004).

Purification and characterization of a membrane glycoprotein from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology* 94 (6):1120-1127.- Merle,C, Faure,D, Urdaci,MC, and Le Henaff,M. (2003).

Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum*: approach and control. *Research in Microbiology* 150 (5):351-358.- Michel,C, Antonio,D, and Hedrick,RP. (1999).

Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 95 (5):1008-1015.- Michel,C, Kerouault,B, and Martin,C. (2003).

Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Veterinary Research* 34 (1):127-132.- Michel,C and Garcia,C. (2003).

Involvement of a sialic acid-binding lectin with hemagglutination and hydrophobicity of *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9):5275-5280.- Moller,JD, Larsen,JL, Madsen,L, and Dalsgaard,I. (2003).

Flavobacterium psychrophilum infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 26 (10):563-574.- Nematollahi,A, Decostere,A, Pasmans,F, and Haesebrouck,F. (2003).

Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl Environ Microbiol* 67 (6):2430-5.- Nikoskelainen,S, Salminen,S, Bylund,G, and Ouwehand,AC. (2001).

Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Fems Microbiology Letters* 226 (2):273-279.- Secades,P, Alvarez,B, and Guijarro,JA. (2003).

Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. *Letters in Applied Microbiology* 33 (3):178-182.- Vatsos,IN, Thompson,KD, and Adams,A. (2001).

Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Dis.Aquat.Organ* 63 (2-3):129-138.- Welker,TL, Shoemaker,CA, Arias,CR, and Klesius,PH. (2005).

Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology* 88 (2):299-307.- Wiklund,T, Madsen,L, Bruun,MS, and Dalsgaard,I. (2000).

Survival of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum in vitro. *Fish & Shellfish Immunology* 12 (2):141-153.- Wiklund,T and Dalsgaard,I. (2002).

Association of *Flavobacterium psychrophilum* with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kidney phagocytes in vitro. *Fish & Shellfish Immunology* 15 (5):387-395.- Wiklund,T and Dalsgaard,I. (2003).
