





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE
Flavobacterium psychrophilum. OBTENIDAS DE CASOS DE
SÍNDROME DEL ALEVÍN DE LA TRUCHA ARCOÍRIS (RTFS)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

MVZ. ALMA YANINE CASTILLO MIRANDA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Junio 2017.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE *Flavobacterium psychrophilum*. OBTENIDAS DE CASOS DE SÍNDROME DEL ALEVÍN DE LA TRUCHA ARCOÍRIS (RTFS)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

MVZ. ALMA YANINE CASTILLO MIRANDA

COMITÉ DE TUTORIAL:

DR. CÉSAR ORTEGA SANTANA

DR. J. SIMON MARTINEZ CASTAÑEDA.

Ph.D. RAÚL CUAUHTÉMOC FAJARDO MUÑOZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Junio 2017

DEDICATORIA

A SAMUELITO.....

Porque no hay manera de compensar el tiempo de convivencia que perdimos, cuando me dedique solo a perseguir mí sueño.

Por las noches de angustia que te hice pasar cuando despertabas buscando mis brazos y yo no estaba ahí para velar tus sueños.

Por el apoyo y comprensión que siempre me demostraste, a pesar de ser tan pequeñito.

Por todas las preguntas que no pude responderte.

Porque desde que llegaste a mí, haz llenado de luz mi vida, de sonrisas y gratos momentos, de grandes pruebas y mayores enseñanzas.

Porque simplemente ya no soy nada sin ti. TE AMO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por el financiamiento del proyecto que hizo posible la creación de este trabajo de investigación.

Al centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UAEMex y al Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello en Viña del Mar, por prestarme el espacio necesario para la realización plena de este trabajo.

Al Dr. Cesar Ortega Santana, por la oportunidad y la confianza de formar parte de su equipo de trabajo, por los consejos, la paciencia, las llamadas de atención y los mensajes que nunca conteste, por el tiempo que invirtió revisando, corrigiendo y moldeando no solo este trabajo de investigación si no también mi inexperta personalidad de investigador y conducirme en este difícil camino.

A los doctores Raúl Fajardo Muñoz y Simón Martínez Castañeda, por las observaciones realizadas durante las evaluaciones de este trabajo, mostrándome las cosas bajo su perspectiva y enriqueciéndolo con su experiencia, sin duda fueron de gran apoyo en mi formación.

Al Dr. Rubén Avendaño Herrera, por haberme permitido pertenecer por un tiempo a su honorable equipo, abrirme las puertas de su laboratorio y llenar de innovación y cambio mi proyecto de investigación.

A mis compañeros laboratoristas del CIESA, Ulises, Carlos, Lupita y Sandra por los inconvenientes causados dentro del laboratorio, por el desinteresado apoyo a este trabajo. Sin duda gracias por aguantar la invasión de su espacio de trabajo.

A los compañeros del Laboratorio de Patología de organismos Acuáticos y biotecnología acuícola, Matías, Diana, Felipe, Jörn, Johan y Rute, por la hospitalidad mostrada durante mi estancia en Chile. Especialmente a Diana que

sin conocerme me abrió las puertas de su casa, y me mostro su país a través de su gente, sus costumbres, tradiciones y buenos vinos, gracias Diana lo que hiciste por mí nunca lo olvidare.

A Delia Miranda, mi mamá por ser mi más grande apoyo moral en esta vida no hay paso que dé sin que tu vallas siempre conmigo. Por qué no hay palabras que expresen lo mucho que te quiero, admiro y respeto.

A Samuel Castillo, mi padre por darme los cimientos necesarios para conducirme en la vida, por formar mi carácter y fortalecer mi alma al darme la prueba más grande que he tenido: tu muerte, espero haber sido la persona que tu querías que fuera y haberte llenado de orgullo el tiempo que estuvimos juntos.

A Nancy por ser mi mejor amiga y cómplice de todas mis aventuras, mi mejor crítica y consejera.

A Mario, por el apoyo incondicional, la confianza y el amor que me demuestras en todo lo que hago, especialmente en este proyecto. Por los malos ratos que te he hice pasar al tratar de vivir esta aventura a mi manera. Me gustaría que supieras que eres el gran amor de mi vida, y si tuviera que elegir de nuevo te elegiría a ti sin dudarlo.

A Gerardo por ser mi mejor ejemplo de lucha y perseverancia en esta vida, por enseñarme que no hay obstáculo grande que no se pueda vencer.

A mis abuelitos, tíos y primos por los gratos momentos, porque en su compañía mi alma siempre encuentra alivio, porque con ustedes no hay problema sin solución, porque a pesar de los conflictos siempre seremos una gran familia.

ÍNDICE	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ABSTRACT.....	viii
RESUMEN.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Antecedentes.....	4
2.2 Distribución mundial.....	5
2.3 Hospederos.....	6
2.4 Transmisión.....	6
2.5 Patogenicidad.....	7
2.6 Diagnostico.....	11
2.7 Prevención y control.....	14
2.8 Estudios de caracterización y tipificación de <i>F. Psychrophilum</i> en el mundo.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos.....	22
6. METODOLOGÍA (MATERIALES Y MÉTODOS).....	23
6.1 Diseño.....	23
6.2 Lugar de trabajo.....	23
6.3 Toma de muestras.....	24
6.4 Aislamiento bacteriano, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	24
6.5 Identificación fenotípica y bioquímica.....	25
6.5.1 Caracterización morfológica.....	25
6.5.2 Movilidad celular.....	25
6.5.3 Identificación bioquímica.....	26
6.5.3 Bioquímica básica.....	26
6.5.4 Bioquímica avanzada.....	26
6.6 Caracterización genética.....	30
6.6.1 Extracción de ADN.....	30

6.6.2 PCR simple.....	30
6.6.3 RFLP-PCR.....	31
6.6.4 Estudio del gen 16S ARNr.....	32
6.7 Estudio serológico.....	33
6.8 Desafío experimental (prueba de virulencia).....	34
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Descripción de la enfermedad.....	36
7.2 Análisis histológico.....	39
7.3 Descripción fenotípica del patógeno.....	41
7.4 Perfil bioquímico.....	43
7.5 Caracterización genética.....	47
7.5.1 PCR convencional	47
7.5.2 RFLP-PC.....	50
7.5.3 ESTUDIO DEL GEN 16S ARNr.....	53
7.6 Estudio serológico.....	55
7.7 Desafío experimental.....	56
7.8 Artículo aceptado y publicado	57
8. DISCUSIÓN.....	66
9. CONCLUSIONES.....	71
10. REFERENCIAS	73
11. ANEXOS	81

	ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1.	Cría de trucha arcoíris con oscurecimiento corporal, distensión abdominal severa y exoftalmia.	38
Figura 2.	Cría de trucha arcoíris mostrando palidez branquial; palidez de órganos y musculatura.	38
Figura 3.	Cría de trucha arcoíris en donde se muestra esplenomegalia y necrosis de bazo rodeado de un pigmento amarillento producto de la acumulación de células bacterianas.	38
Figura 4.	Cortes histológicos teñidos con H&E de órganos de crías de trucha arcoíris clínicamente afectadas por RTFS a causa de <i>F. psychrophilum</i> .	40
Figura 5.	Morfología típica de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .	43
Figura 6.	Gel de agarosa 1.5% PCR convencional, utilizando iniciadores Fp1 y Fp2 (Urdaci <i>et al.</i> , 1998).	48
Figura 7.	Gel de agarosa 2% qPCR, utilizando los iniciadores Fp_16S1_fw, Fp_16Sint1_rev (Orieux <i>et al.</i> , 2011)	49
Figura 8.	Modelo lineal de amplificación de productos de qPCR de las muestras 34,122 y 134.	49
Figura 9.	Gel de agarosa al 1.5% utilizando los iniciadores PSY-GIF y PSY-GIR (Izumi <i>et al.</i> , 2000).	50
Figura 10.	Gel de agarosa al 1.5% utilizando los iniciadores GYR-1 y GYR-1R (Izumi <i>et al.</i> , 2000).	51
Figura 11.	Gel de agarosa al 1.5% utilizando producto de PCR de los GYR-1 y GYR-1R sometidos a digestión con la endonucleasa HinfI (Izumi <i>et al.</i> , 2000).	52
Figura 12.	Gel de agarosa al 1.5% utilizando producto de PCR de los PSY-GIF y PSY-GIR sometidos a digestión con la endonucleasa RsaI (Izumi <i>et al.</i> , 2000).	53
Figura 13.	Gel de agarosa al 1.5% correspondiente al estudio del gen 16S del ARNr, usado para determinación de linajes.	54
Figura 14.	Alevines de trucha con lesiones de piel producidas por <i>Flavobacterium psychrophilum</i> en condiciones (desafío).	56

ÍNDICE DE TABLAS		Página
Tabla 1.	Relación de los aislados de <i>Flavobacterium spp</i> y su origen asociados al Síndrome del Alevín de la Trucha arcoíris, remitidos al CIESA entre Enero 2015 a Julio 2016.	37
Tabla 2.	Resultados de la Caracterización fenotípica de las colonias de <i>Flavobacterium spp</i> , obtenidas de casos remitidos para diagnóstico sanitario al CIESA-UAEMex.	42
Tabla 3.	Resultado de las pruebas bioquímicas básicas de los 13 aislados mexicanos, utilizando como referencia la cepa tipo 1947t	44
Tabla 4.	Resultado de pruebas bioquímicas avanzadas. Utilizando los datos de la cepa tipo 1947t como referencia se marcan 2 grupos con perfiles bioquímicos distintos.	46
Tabla 5.	Resultado serológico utilizando la técnica de Western Blot con sueros de cepas chilenas probados en los aislados de México	55

ABSTRACT

Flavobacterium are a group of Gram negative bacteria that significantly affect fish production, causing great economic damage. The best known etiological agent within this group is *Flavobacterium psychrophilum*, pathogenic to several species including the most important Atlantic salmon (*Salmon salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), mainly affecting young fish and fry, causing mortalities of 50 To 90%. *Flavobacterium psychrophilum* has a clinical manifestation of 2 types, the first characterized by musculo-cutaneous lesions that received several names called "Cold Water Disease" (CWD), and the second of a systemic type known as "Rainbow trout fry syndrome "(RTFS).

In Mexico the RTFS has not been officially or scientifically reported, however; It is suggested the presence of this pathogen in farms of the State of Mexico and Michoacán when an increase in the cases of sanitary contingency, whose clinical manifestation corresponds to a septicemic infection diagnosed in the aquacultural health department of CIESA-FMVZ-UAEMex. Of these cases, 13 isolates with a phenotypic and biochemical profile similar to the pathogenic group known as *Flavobacterium spp.* However with the use of conventional PCR, it was determined that only 8 of the 13 isolates correspond to the *psychrophilum* species. Genetic characterization of the gene for the gyrase subunit B (*gyrB*) by RFLP-PCR of the isolates found the B genotypes in all isolates, as well as the S and R genotype. It was determined that both lineage I and the II (predominant) with the study of the 16S rRNA gene. Serologically two of the isolates showed positive response when crossing with antisera specific for Chilean strains and strain type. In addition to that, the isolate 001 showed productivity of the disease in laboratory conditions, showing the signology corresponding to the RFTS. With the above it is shown that the RFTS is present in central Mexican farms and that there is genetic variability even though the isolates come from a narrow geographical area.

RESUMEN

Las Flavobacterias son un grupo de bacterias Gram negativas que afectan de manera importante a peces de producción, causando grandes estragos económicos. Siendo el agente etiológico más conocido dentro de este grupo *Flavobacterium psychrophilum*, patogénico para varias especies entre ellas las más importantes Salmón del atlántico (*Salmon salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), afectando principalmente a alevines y peces juveniles, causando mortalidades de entre 50 a 90%. *F. psychrophilum* tiene manifestación clínica de 2 tipos la primera caracterizada por lesiones musculocutáneas que ha recibido varias denominaciones la más sonada “Enfermedad del agua Fría” (CWD), y la segunda de tipo sistémico conocido como “Síndrome del Alevín de la trucha arcoíris” (RTFS).

En México el RTFS no ha sido reportado de manera oficial o científica, sin embargo; se sugiere la presencia de este patógeno en granjas del Estado de México y Michoacán al encontrarse un incremento en los casos de contingencia sanitaria, cuya manifestación clínica corresponde a una infección septicémica diagnosticada en el departamento de sanidad acuícola del CIESA-FMVZ-UAEMex. De dichos casos se han obtenido 13 aislados con perfil fenotípico y bioquímico similar al grupo patogénico conocido como *Flavobacterium spp.* Sin embargo con la utilización de PCR convencional se determinó que solo 8 de los 13 aislados de flavobacterias corresponden a la especie *psychrophilum*. A partir de caracterización genética del gen de la girasa subunidad B (*gyrB*) por RFLP-PCR de los aislados se encontraron presentes los genotipos B en todos los aislados, así como el genotipo S y R. Se determinó que están presentes tanto el linaje I y el II (predominante) con el estudio del gen 16S ARNr. Serológicamente 2 de los aislados mostraron respuesta positiva al cruzar con antisueros específicos para cepas chilenas y la cepa tipo. Además de que el aislado 001 manifestó reproductividad de la enfermedad en condiciones de laboratorio, mostrando la signología correspondiente al RFTS. Con lo anterior se demuestra que el RFTS está presente en granjas trutícolas del centro de México y que existe variabilidad genética a pesar de que los aislados provienen de una zona geográfica estrecha.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la acuicultura ha tenido un repunte importante a nivel nacional e internacional. A nivel mundial la acuicultura es la segunda actividad agropecuaria con mayor movimiento; asimismo, después del arroz, los productos forestales, la leche y el trigo, los peces son el quinto producto agrícola más importante y es el mayor recurso de proteína de origen animal disponible para la población humana.

El potencial de la acuicultura en México es grande, ya que se cuenta con los recursos necesarios, además de que existe una gran oportunidad de mercado pues en el territorio nacional solo se explotan 12 de las 600 especies acuáticas que se cultivan en el mundo (CONAPESCA). A la fecha, el consumo per cápita en México es de 10.5 kg de pescado al año (2012) comparado con los 8.3 kg en promedio que se consumían en 2002 (SAGARPA), lo cual hace que la acuicultura en el país pueda ser una empresa rentable, tanto para las personas que se dedican a la explotación de las especies cultivables, como de aquellos que se dedican de manera profesional a la investigación a favor de este sector.

Sin embargo debido a que la acuicultura industrial alrededor del mundo se ha intensificado y diversificado, es natural que en especies cultivables aparezcan agentes infecciosos con mayor frecuencia, y por tanto enfermedades, debido a las condiciones en las que se crían, el tiempo de crecimiento y el constante intercambio de especímenes entre granjas y áreas de producción.

Las enfermedades a nivel mundial constituyen un grave problema para el desarrollo y sostenimiento de la acuicultura ya que son una limitante en la producción acuícola apareciendo en forma esporádica y algunas otras de forma periódica. Existen enfermedades que pueden manifestarse en forma asintomática sin ocasionar daños visibles o, bien desarrollar el cuadro clínico típico de enfermedad, siguiendo un curso crónico o desapareciendo en su totalidad. Asimismo, existen enfermedades con características muy específicas, fáciles de

identificar, mientras que otras se presentan de una manera inespecífica lo cual hace que su diagnóstico sea complicado, e incluso muchas veces tiende a confundirse con otros agentes, lo que complica el diagnóstico, el control, y tratamiento, lo que se ve reflejado en la disminución de la rentabilidad del cultivo.

La principal acción que debe realizarse para evitar enfermedades es la prevención, para lo cual se requiere conocer los puntos críticos y los factores de riesgo que genera cada uno de los agentes infecciosos en los sistemas de producción de manera profunda y específica. En el mundo de la piscicultura se emplean estrategias que van desde las más sencillas hasta el empleo de técnicas nuevas que garanticen que conocemos el espécimen en cuestión y que lo diferencien de otros para eficientizar el tratamiento y controlar la diseminación de la enfermedad.

En peces las enfermedades pueden ser de distinta etiología: bacterianas, virales, micóticas, parasitarias, relacionadas con el estado nutricional, neoplasias y hasta enfermedades congénitas, en donde la signología clínica puede ser indistinta y otras cuya manifestación clínica puede ser característica; sin embargo siempre se requiere la confirmación del agente involucrado como causa del proceso de enfermedad.

Dentro de las enfermedades bacterianas que afectan a los peces se encuentran algunas como la Furunculosis producida por *Aeromonas salmonicida*, Septicemia hemorrágica producida por *Aeromonas sp.* y *Pseudomonas sp.*, Enfermedad Bacteriana del Riñón producida por *Renibacterium salmoninarum*, La Septicemia entérica del bagre cuyo patógeno es *Edwardsiella ictaluri*, Septicemias estreptocócicas producidas por bacterias del género *Streptococcus* como *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus iniae* entre otros; enfermedad de la boca roja que la provoca *Yersinia ruckeri* y la Flavobacteriosis, siendo esta última una de las de mayor importancia económica y que son un grupo de bacterias psicótrofas que tienen predilección por peces salmónidos.

Morfológicamente, las flavobacterias son bacilos filamentosos Gram negativos que provocan enfermedades como son enfermedad de las branquias (*F. branchophilum*), enfermedad de la columna (*F. columnare*), y enfermedad de las aguas frías o síndrome del alevín de la trucha (*F. psychrophilum*), siendo esta última la más sobresaliente debido a las manifestaciones clínicas severas y altas mortalidades que presentan.

Flavobacterium psychrophilum es el responsable de una enfermedad por cuya manifestación clínica se le han dado varias sinonimias. En su presentación típica que afecta a peces tanto jóvenes como adultos se le conoce como Enfermedad Bacteriana de las aguas frías, enfermedad de las aguas frías, y enfermedad del pedúnculo. Y en su presentación sistémica se le conoce como el Síndrome del alevín de la trucha arcoíris por afectar peces recientemente eclosionados (León *et al.*, 2008; Staliper., 2011; Valdebenito *et al.*, 2009; Cipriano *et al.*, 2005).

Si bien en México se ha sugerido la presencia de alguna de estas patologías o de estos agentes en peces, a la fecha no existen reportes oficiales o científicos que lo constaten. En los últimos dos años en crías de trucha arcoíris del centro del país se han estado manifestando casos clínicos sugestivos de RTFS, los cuales han sido remitidos al área de sanidad acuícola del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UAEMex, En el presente trabajo se realizó un estudio que confirma la presencia de *Flavobacterium psychrophilum* como causa de RTFS en crías de trucha arcoíris; se describe la presentación clínica de la enfermedad, las características patológicas de la misma y de las características morfológicas, bioquímicas y moleculares del agente.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

En el mundo de la piscicultura las bacterias Gram negativas son las principales causantes de enfermedades bacterianas en salmónidos; siendo *Flavobacterium* el grupo patológico de mayor importancia (León *et al.*, 2008), representado por tres agentes etiológicos que causan enfermedades bacterianas de importancia en la producción de peces de consumo, siendo *Flavobacterium columnare*, causante de la enfermedad de la columna, *Flavobacterium branchiophilum* causante de la enfermedad de las branquias y *Flavobacterium psychrophilum* agente etiológico del síndrome del alevín de la trucha (Loch *et al.*, 2013).

Las bacterias del grupo *Flavobacterium* especie *psychrophilum*, son Gram-negativas, de entre 0,2 a 0,75 micras de diámetro por 1.5 a 7.5 micras de longitud (Bernardet *et al.*, 1989) filamentosas, pertenecientes al género *Bacteroidetes* (Avendaño *et al.*, 2014) y que anteriormente eran conocidas como *Cytophaga psychrophila* y *Flexibacter psychrophilus*. (Staliper, 2011; León *et al.*, 2008).

Flavobacterium psychrophilum es el agente causal de una de patología de manifestación clínica severa en especímenes jóvenes y raramente en adultos, que ha recibido diferentes denominaciones, siendo las más comunes: “enfermedad del pedúnculo”, “enfermedad del agua fría” (CWD), “enfermedad bacteriana del agua fría” (BCWD) (León *et al.*, 2008; Staliper., 2011; Valdebenito *et al.*, 2009), “enfermedad de la temperatura baja” (Cipriano *et al.*, 2005), también es el responsable de la enfermedad conocida como síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS).

El síndrome del Alevín de la trucha es caracterizado por un cuadro septicémico de leve a severo en alevines y jóvenes de talla pequeña, que a diferencia de la enfermedad del agua fría la cual tiene manifestaciones cutáneo musculares, este padecimiento es todo un conjunto de anormalidades internas principalmente esplenomegalia, y anemia generalizada (Lorenzen *et al.*, 1997), se produce predominantemente a temperaturas menores de 16°C, siendo más patógena a

menos de 10°C (Staliper *et al.*, 2011). Además de la temperatura del agua existen otros factores ambientales desencadenantes como la irradiación solar directa a los alevines muy jóvenes, el estrés, la superpoblación y otros factores inherentes al pez (talla, estado inmunológico) que pueden condicionar la aparición y/o desarrollo de la enfermedad (León *et al.*, 2008).

En países Sudamericanos, como Chile tiene una tasa de mortalidad del 5% a 70% en alevines (Avendaño *et al.*, 2014).

2.2 Distribución mundial

F. psychrophilum fue aislado por primera vez en el noroeste de Estados Unidos en 1941, de especímenes de trucha con lesiones ulcerativas en el pedúnculo (Davis, 1946). En 1948 se recupera la bacteria de salmones Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y se le da la sinonimia de la enfermedad del agua fría al observarse que solo aparecía a temperaturas del agua entre 4°C y 10 °C, (Borg, 1948) dicho hallazgo se realizó en Washington; los reportes posteriores hasta mediados de los años 80 se realizaron en Estados Unidos por lo cual se creía que estaba solo distribuido en el norte del continente Americano, en la actualidad se sabe que la bacteria está ampliamente diseminada a través del mundo.

En la trucha arcoíris se tienen reportes de RTFS en Australia, Canadá, Chile (Valdebenito *et al.*, 2009), Dinamarca (Lorenzen *et al.*, 1991), Finlandia (Wiklund *et al.*, 1994), Francia (Bernardet *et al.*, 1989), Alemania (Weis, 1987), Japón (Wakabayashi *et al.*, 1991), Italia (Sarti *et al.*, 1992), Irlanda, Perú (León *et al.*, 2008), Escocia, España (Toranzo *et al.*, 1993), Suecia, Suiza, Turkia, Reino Unido (Santos *et al.*, 1992) y Estados Unidos (Staliper.2011, Lonnstrom *et al.*, 2008, Cipriano *et al.*, 2005, Bernardet *et al.*, 1989).

2.3 Hospederos.

La mayoría de los peces salmónidos criados en cautiverio tienen algún grado de susceptibilidad de infectarse con *F. Psychrophilum*. La trucha arcoíris (*O. mykiss*) y el salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) son particularmente susceptibles a la infección (Barnes *et al.*, 2011). Sin embargo; la bacteria se ha recuperado de otras especies en menor escala donde no ha sido asociado a enfermedad clínica (Cipriano *et al.*, 2005), tal es el caso de las anguilas (*Anguilla anguilla*), carpa común, pez dorado (*Carassius carassius*), tenca (Lehmann *et al.*, 1991) y ayu (Wakabayashi *et al.*, 1992). Existe concordancia entre los autores de que este patógeno no tiene un huésped específico, y aunque no en todos son capaces de reproducir la enfermedad, mantienen un activo rol como portadores y diseminadores (Lonnstrom *et al.*, 2008).

Aunque los peces se ven afectados en todas las edades, los pequeños peces (alevines 0.2 a 2g) son particularmente vulnerables a las infecciones resultando en un 50% a 70% de mortalidad de estos. (Valdebenito *et al.*, 2009); los peces de mayor tamaño que suelen ser afectados presentan mortalidades menores (Dalsgard *et al.*, 1993). Los brotes más graves de la enfermedad del síndrome del alevín de la trucha se producen en alevines que aún no han reabsorbido el saco vitelino y por lo tanto no se alimentan mediante alimento sólido (Holt *et al.*, 1989; León *et al.*, 2008), generalmente de alrededor de 6-7 semanas luego de iniciada la primera alimentación, aunque también se describen brotes más tardíos (Lorenzen *et al.*, 1991).

2.4 Transmisión

Actualmente el hábitat de la bacteria es desconocido, suponiéndose que sería la superficie de los peces o aguas con alto contenido de materia orgánica, considerándose una bacteria ubiquitaria (Holt *et al.*, 1993) es decir puede encontrarse en varias partes. Se ha demostrado que el principal reservorio natural

de *F. psychrophilum* es el agua de los ríos y lagos, existe evidencia de que la bacteria puede sobrevivir en el agua x lo menos 300 días conservando su virulencia (Madetoja *et al.*, 2000). Otro reservorio son los peces, detectándose células de *F. psychrophilum* adheridas a la piel y branquias de los salmónidos (Madetoja *et al.*, 2002).

Flavobacterium psychrophilum es transmitido por la vía horizontal, a través del agua que es un medio viable en donde se pueden mover las bacterias ya que se ha demostrado en condiciones de laboratorio que sobrevive por periodos largos en agua dulce estéril sin añadir ningún tipo de nutriente (Madetoja *et al.*, 2002). Los reservorios incluyen el agua, peces muertos, peces patógeno-portadores, peces infectados y fómites utilizados en los cultivos. Este patógeno tiene una gran capacidad para adaptarse a una amplia variedad de entornos, y no sólo sobreviven, sino que también mantiene su patogenicidad. (Staliper. 2011).

Referente a la vía vertical, se sabe que la bacteria pudiera ser transmitido de forma sexual a través de las hembras reproductoras ya que la bacteria se ha aislado de fluidos ováricos y de la superficie mucosa de los huevos (Vatsos *et al.*, 2006). Aunque hasta ahora, la vía de transmisión de *F. psychrophilum* no está totalmente clara, investigadores como Rangdale *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997; Ekman *et al.*, 1999 defienden la hipótesis de transmisión vertical, otros no concuerdan con tal aseveración ya que no han podido detectar el traspaso de *F. psychrophilum* desde progenitores a progenies (Kumagai *et al.*, 1998; Madsen *et al.*, 2005; Vatsos *et al.*, 2006)

2.5 Patogenicidad

Existe poca información acerca de los mecanismos de virulencia de *F. psychrophilum* debido a la complejidad de estos organismos. Los mecanismos de patogenicidad aún no han sido discernidos en su totalidad; sin embargo se sabe que la virulencia de los diferentes aislados de *F. psychrophilum* puede variar

enormemente (Holt *et al.*, 1993; Madsen y Dalsgaard, 2000; Nematollahi *et al.*, 2003), dependiendo de la cepa de estudio.

Las proteasas, exotoxinas, endotoxinas y adhesinas se consideran los principales factores de patogenicidad de esta bacteria (Dalsgaard, 1993; Bertolini *et al.*, 1994; Secades *et al.*, 2001). Las proteasas extracelulares contribuyen a la patogenicidad, ya que se ha demostrado que producen diferentes enzimas proteolíticas capaces de degradar gelatina, caseína, tirosina, elastina, fibrinógeno, colágeno y extracto de músculo que podrían causar lesiones en los tejidos o incrementar la capacidad invasiva de las cepas (León *et al.*, 2009).

Dalsgaard (1993) demostró que *F. psychrophilum* es activamente proteolítico sin embargo fue hasta que Duchaud *et al.*, 2007 secuenciaron el genoma completo de *F. psychrophilum* cuando se describió que esta bacteria codifica para 13 proteasas putativas de secreción probablemente implicadas en la destrucción de los tejidos del hospedero.

Se han descrito la presencia de varias metaloproteasas en la composición bioquímica de *F. psychrophilum* entre ellas la denominada como Fpp1, esta proteasa hidroliza gelatina, laminina fibronectina, fibrinógeno, colágeno tipo IV, y, en menor grado colágeno tipo I y II (Secades *et al.*, 2001) se ha determinado que también degrada actina y miosina, elementos básicos del sistema muscular de los peces.

Otra de las metaloproteasas más importantes es la descrita por Secades *et al.*, 2003, Fpp2, la cual tiene una masa molecular estimada de 62kDa con el ión calcio unido a la molécula, el cual juega un rol importante en la termoestabilidad de la enzima. Su actividad proteolítica prevalece teniendo un pH 6,0-7,0 con temperaturas de 24°C, siendo inactiva a temperaturas por sobre los 42°C. Esta enzima es capaz de hidrolizar la matriz extracelular y proteínas musculares, lo que explica el daño musculo-cutáneo presentado en algunos casos.

Otro grupo de investigadores (Bertolini *et al.* 1994) encontraron que adicionalmente a las metaloproteasas *F. psychrophilum* produjo 2 proteasas bacterianas (114 y 152kDa), las que degradan caseína y gelatina, y otras ocho proteasas (32 a 86kDa), que degradan gelatina no siendo funcional para la caseína.

Un importante factor de virulencia son las toxinas citolíticas tal como las hemolisinas bacterianas. Se sugirió que la principal causa de la anemia desarrollada por alevines de truchas arcoíris infectados con *F. psychrophilum* se debió en cierto grado a la capacidad que tiene esta bacteria de lisar y aglutinar parcialmente los eritrocitos de truchas arcoíris (Lorenzen *et al.*, 1994), siendo esto corroborado años más tarde (Lorenzen *et al.*, 1997).

Grupos científicos (MacLean *et al.*, 2001) han considerado varias moléculas de la superficie de *F. psychrophilum*, incluyendo lipopolisacáridos (LPS) y antígeno O, como potenciales candidatos para generar vacunas y/o como macromoléculas para el diagnóstico debido a la implicación en su patogénesis.

Además de las toxinas bacterianas, exoenzimas y macromoléculas asociadas a membrana externa, componentes asociados con la adhesión como lo son fimbrias, pili, cápsula y capa superficial, también deben ser consideradas como importantes factores de virulencia (Dalsgaard *et al.*, 1993; Rangdale, 1995). Se han identificado en el genoma de *F. psychrophilum* 27 genes involucrados en la adhesión bacteriana (Duchaud *et al.* 2007). Sin embargo; la adherencia de las bacterias depende en gran medida de la cepa bacteriana en relación a la temperatura en la que se encuentre, por ello es común encontrar cepas muy patógenas en temperaturas que oscilan los 12°C. (Nematollahi *et al.*, 2003)

Todos los elementos anteriores en conjunto generan los signos clínicos de la enfermedad asociados con RTFS que pueden ser variados y extensos, los signos

iniciales incluyen apatía, pérdida de apetito que lleva a la caquexia crónica, y puntas de las aletas erosionadas son los signos iniciales (Barnes *et al.*, 2011).

La enfermedad que genera *Flavobacterium psychrophilum* se presenta en 2 formas claramente diferenciadas: La presentación típica, considerada de mayor prevalencia que la cual produce lesiones abiertas características en las superficies externas del cuerpo de los peces, en la que en casos severos, las lesiones son muy impactantes, pudiéndose observar como la exposición total de la columna vertebral de la zona caudal o del pedúnculo y la desaparición total de la aleta dorsal, (Staliper *et al.*, 2011; Cipriano *et al.*, 2005) lesión comúnmente denominada erosión tipo silla de montar o de montura. Estas Las lesiones también se pueden observar en los laterales, en la región mandibular y la musculatura a menudo entre la aleta dorsal y la cabeza. En las zonas de colonización bacteriana pueden aparecer, áreas blancas débiles en las aletas, algunos peces muestran separación de las radios de la aleta (Cipriano *et al.*, 2005).

La otra forma de presentación es de tipo sistémico, caracterizada por una desarrollada septicemia en conjunción con una amplia patología interna, incluyendo riñones e hígados anémicos y pálidos; letargo, ascitis, exoftalmia (a menudo bilateral), pigmentación oscura de la piel y branquias pálidas (Barnes *et al.*, 2011). Que en conjunto son signos característicos del Síndrome del alevín de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Staliper, 2011). Los exámenes histológicos muestran extenso daño en los tejidos del huésped, incluyendo: necrosis focal en el bazo, el hígado, y los riñones; aumento de la degeneración vacuolar; aumento de eosinofilia y hemosiderina en el riñón; necrosis, pinocitosis e infiltración de linfocitos en la dermis y musculatura (Staliper, 2011) (Barnes *et al.*, 2011).

Las infecciones secundarias favorecidas por *F. psychrophilum* son muy comunes en la trucha arco iris una de ellas es la bacteria Gram-negativa *Yersinia ruckeri*, agente causal de la enfermedad de la boca roja. Hay otras co-infecciones de *F.*

psychrophilum con virus, por ejemplo el virus de la Necrosis pancreática infecciosa, el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, y el virus del síndrome de cuerpos de Inclusión Eritrocítica (Staliper, 2011).

2.6 Diagnóstico.

La identificación de *F. psychrophilum* así como el diagnóstico de la enfermedad que causa este patógeno son tradicionalmente basados en los signos clínicos, sin embargo esto no suele ser suficiente debido a la especificidad de la manifestación clínica, además se han reportado asociaciones con enfermedades no bacterianas tales como la saprolegniosis y el IPNV (virus de la necrosis pancreática infecciosa (Wiklund *et al.*, 2000) que dificulta o imposibilita el diagnóstico de la enfermedad en los laboratorios.

Por ello el paso siguiente en el diagnóstico es el aislamiento de la bacteria en medios de cultivo de tipo oligotrófico es decir bajos en nutrientes (Bernardet *et al.*, 1996). El más común es el agar cytophaga mejor conocido como Anacker y Ordall (A&O) (Anacker y Ordall, 1959) y sus modificaciones propuestas posteriormente como el denominado Anacker y Ordall modificado (MAO) (Cipriano y Teska, 1994) y el agar Triptona Extracto de Levadura y sales (TYES) (Holt *et al.*, 1993) que tienen como principales componentes: triptona, extracto de levadura, extracto de sodio, extracto de carne. Sin embargo se ha observado que el crecimiento bacteriano en estos medios es lento (de 72 a 120 hrs), por lo cual varios autores han optado por la suplementación del medio con carbohidratos y leche descremada lo cual permite un crecimiento más rápido y con mayor biomasa (Dalskalov *et al.*, 1999).

La temperatura es de importancia en el crecimiento bacteriano aunque se ha reportado crecimiento entre los 4 a 23 °C (Bernardet y Keroault, 1989), la temperatura optima estándar necesaria para conservar la virulencia de las cepas es de 15 a 18 °C (Bernardet *et al.*, 1996), teniendo como resultado la presencia de

colonias circulares, convexas y de márgenes irregulares con coloraciones que van de amarillo a un anaranjado brillante (Bernardet y Keroault, 1989).

Una vez obtenido el aislado de *F psychrophilum*, la identificación tarda por lo menos 5 días, ya que se recurre comúnmente a la identificación bioquímica que se basa en distintas técnicas básicas como son la: presencia de pigmentos de tipo flexirubina; absorción de rojo Congo; crecimiento anaeróbico; presencia de la citocromo oxidasa y catalasa; capacidad para reducir nitratos y para producir sulfuro de hidrógeno; presencia de *B-galactosidasa*; hidrólisis de la celulosa, carboximetilcelulosa, quitina, almidón, esculina y agar; hidrólisis de la gelatina, caseína, y tirosina; presencia de arginina dihidrolasa y de lisina y ornitina descarboxilasas; hidrólisis de tributirina, lecitina, y Tween 20 y 80; actividad enzimática, concentración de NaCl y ph (Bernardet *et al.*, 1989), que se realizan de manera convencional a través de la preparación de los distintos medios necesarios o de sistemas comerciales miniaturizados (APY ZYM) (Bernardet y Grimont, 1989) sistema no muy recomendado como única herramienta de diagnóstico, ya que algunas especies filogenéticamente relacionadas presentan perfiles enzimáticos similares, detectando solo pequeñas diferencias en la intensidad de la reacción que pueden pasar inadvertidas por el laboratorista a cargo generando diagnósticos erróneos.

Además del perfil bioquímico antes descrito la identificación de *F. psychrophilum* debe ser complementada por las pruebas de presencia de pigmentos de tipo flexirubina, la incapacidad de absorber rojo congo, la degradación de esculina, y la tolerancia a concentraciones sobre 1.5% de Cloruro de sodio. (Bernardet y Grimont, 1989; Bernardet *et al.*, 1989).

No obstante la identificación basada en características morfológicas y bioquímicas se consideran primarias, un tanto obsoletas además de tardadas e inespecíficas por lo cual se han implementado técnicas con mayor sensibilidad para posibilitar el diagnóstico exacto y temprano de este agente.

Dichos métodos complementarios pueden ser los basados en propiedades serológicas como la técnica de ELISA (Rangdale, 1995) que es una aplicación básica usada para analizar antígenos solubles (Hornbeck, 1991). Esta técnica presenta varias ventajas como el procesamiento simultáneo de muchas muestras, así mismo es capaz de detectar y cuantificar sustancias tales como péptidos, hormonas, proteínas y anticuerpos. Si bien autores describen que diferentes cepas del patógeno poseían antígenos comunes (Pacha, 1968), actualmente no se consideran seguros los sistemas de identificación antigénica debido a los posteriores reportes que han demostrado diversidad antigénica (Wakabayashi *et al.*, 1994; Lorenzen *et al.*, 1997; Izumi y Wakabayashi, 1999), ya que hoy en día se han reconocido por lo menos siete serotipos (Mata *et al.*, 2002).

Sin embargo los métodos de diagnóstico e identificación más sensibles específicos y oportunos son los basados en técnicas moleculares la mayoría basados en protocolos de PCR (Urdaci *et al.*, 1998; Izumi *et al.*, 2003; Ramsrud *et al.*, 2007) las cuales son consideradas particularmente ventajosas para la diferenciación en análisis epizootiológicos, además de ser capaces de detectar bajas cantidades del patógeno tanto de cultivos puros y mixtos, así como de tejidos infectados. Modificaciones posteriores en los procedimientos de los protocolos de PCR han permitido aumentar la sensibilidad, tal es el caso de la PCR- anidada, los cuales facilitan la identificación de unas pocas copias de ADN del patógeno (Baliarda *et al.*, 2002). Otras opciones genéticas son la ribotipificación (Madetoja *et al.*, 2002) hibridación sustractiva y microarrays (Soule *et al.* 2005) siendo todas ellas útiles para la tipificación, no así para el diagnóstico debido a su complejidad.

Recientemente se ha diseñado un ensayo de LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) de alta sensibilidad para la detección de *F. psychrophilum*, el cual detecta al patógeno a partir de 2×10^1 copia/reacción en menor tiempo que las técnicas moleculares (Fujiwara *et al.*, 2009).

Como se puede observar las opciones de diagnóstico son variadas pero se considera el aislamiento del patógeno, como herramienta fundamental, ya que es esencial para el desarrollo de estudios epidemiológicos y generación de vacunas.

2.7 Prevención y control.

Las buenas prácticas de producción y zoonosanitarias como medidas de manejo, higiene y desinfección son la herramienta principal para el control y diseminación no solo de la Flavobacteriosis si no en general de cualquier enfermedad presente en las granjas de producción.

La FAO en su manual práctico para el cultivo de trucha arcoíris resalta puntos clave que deben considerarse para evitarse enfermedades, así como maximizar el rendimiento del cultivo, estos puntos son:

- Selección del sitio, Instalaciones y equipo.
- Criterios para la compra de alevines (siendo ideal la compra cuando estos ya hallan absorbido el saco vitelino, en talla de 2,5 a 5 cms.)
- Almacenamiento y manejo del alimento de truchas.
- Control de sanidad acuícola: (monitoreo constante para la detección de enfermedades o parásitos)
- Indumentaria del personal responsable del procesamiento de trucha (manejo higiénico adecuado).
- Captura y eviscerado de truchas (evitar lesiones o daños en la piel y la carne de los peces que afecte la calidad final del producto, así como la reducción del estrés por manejo).

Es importante resaltar que el control del RFTS debe ser dirigida a la prevención particularmente manteniendo densidades poblacionales adecuadas (inferiores a 15Kg/ m³), la limpieza de los estanques, apropiada formulación de los alimentos, control de manejo y transporte de los peces, así como reducción de factores de estrés entre otros (Avendaño Herrera, 2011).

Lönström *et al.*, (2008) indica que baños tratados con Cloramina T o Formalina es un método eficiente para controlar las bacterias presentes en la superficie de los huevos e incluso pueden ayudar a mejorar las condiciones de los peces con lesiones epiteliales visibles. Mientras que para los estanques la FAO propone utilizar la cal viva como desinfectante a razón de 80 gramos por metro cuadrado en estanques previamente drenados y aun húmedos.

Sin embargo mediante la utilización de vacunas en cultivos potencialmente susceptibles es posible reducir las pérdidas ocasionadas por enfermedades bacterianas, y aunque no existe una vacuna comercial hasta ahora, muchos son los autores que han realizado investigaciones para la obtención de productos antigénicos que permitan la elaboración de vacunas y con ello la reducción de casos de *F. psychrophilum* (Kondo *et al.*, 2002; Madetoja *et al.*, 2006; Sudhesesh *et al.*, 2007).

Hasta ahorita la única forma de control ampliamente discernida de este patógeno, en las granjas de peces son las terapias antimicrobianas, que principalmente consisten en cloranfenicol y oxytetraciclinas. (Avendaño *et al.*, 2014). Sin embargo ante el uso indiscriminado de antibióticos, se ha observado un patrón atípico de resistencia contra los antimicrobianos en varias de las cepas de *Flavobacterium psychrophilum* (Crump *et al.*, 2001) debido a que en la mayoría de los casos los tratamientos son aplicados antes de conocer el antibacteriano más adecuado, es decir sin previo antibiograma, situación que tiene lugar debido a *F. psychrophilum* tarda en crecer de 3 a 7 días dependiendo del medio de cultivo utilizado que no siempre es el idóneo para tal fin. Por lo que se deduce que la resistencia dependerá de la cepa que se presente en cada lugar geográfico, por ello la importancia de la tipificación.

2.8 Estudios de caracterización y tipificación de *F. Psychrophilum* en el mundo.

Debido a la distribución mundial de este patógeno a lo largo de los años se han realizado diversos estudios en los diferentes países donde se han presentado de forma permanente o emergente la RTFS, lo que ha generado una amplia fuente de información referente a la tipificación de las cepas de *F. psychrophilum* alrededor del mundo.

Una herramienta valiosa en la tipificación fueron las primeras descripciones fenotípicas del patógeno, con lo cual se ha establecido que existe homología entre las diferentes cepas pese a su distribución geográfica. *F. psychrophilum* ha sido descrito como un bacilo filamentoso, curvo y de bordes redondeados Gram negativo, aerobio estricto (Holt, 1988; Rangdale, 1995; Matedoja *et al.*, 2001) posee un diámetro de 5µm, una longitud entre 1,25 y 6,25µm (Pacha, 1968; Bernardet y Grimont, 1989), y además son bacterias que presentan movimiento de tipo deslizante (Bernardet y Kerouault).

Las características dominantes reportadas referentes a la morfología colonial describen a *F. psychrophilum* como el patógeno generador de colonias convexas, brillantes, circulares, levantadas, de coloración amarillo claro, de tamaño variable que oscila entre 1-5 mm y un borde irregular (Bernardet y Kerouault, 1989; Dalsgaard *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1993; Cipriano *et al.*, 1996). Pocos son los autores que difieren en sus descripciones fenotípicas, ahondando en que dichas variaciones son generadas por las edades de los cultivos principalmente.

De igual forma los estudios bioquímicos muestran la existencia de una alta homogeneidad entre los aislados, mostrando solo resultados variables en propiedades como la degradación de elastina y oxidasa (Holt *et al.*, 1993; Bertolini *et al.*, 1994).

Sin embargo antigénicamente *F. psychrophilum* ha sido descrito como una especie heterogénea (Lorenzen *et al.*, 1997; Mata *et al.*, 2002). Wakabayashi *et al.*, 1994 a través del análisis de adsorción con antígenos termoestables y el uso de anticuerpos policlonales hechos de conejo, definieron 3 serotipos los cuales denominaron O-1, O-2, y O-3 en cepas de origen europeo, japonés y americano respectivamente Lorenzen y Olsen, (1997) identificaron tres serotipos de aislamientos europeos que denominaron. Fpt, Fd y Th mediante la técnica de ELISA. El serovar Th comprendió la mayoría de las cepas, el serovar Fpt correspondió a la cepa de referencia *F. psychrophilum* NCIMB 1947, el cual es homónimo al serovar O-1 (Wakabayashi *et al.*, 1994).

Recientemente se ha reportado un esquema de serotipado, donde mediante la técnica de aglutinación en porta-objetos con antisueros preparadas de aislados de distintas especies (salmón, trucha y ayu), recogidos de distintas áreas geográficas, se determinaron de 3 a 7 serotipos los cuales guardan una estrecha relación con la especie hospedera (Mata *et al.*, 2002).

Con la introducción de nuevas técnicas moleculares se ha podido diversificar el estudio de las diferentes cepas encontrando clasificaciones generalmente vinculadas a las características epidemiológicas de las cepas.

Diversas son las técnicas moleculares que se han utilizado para la tipificación de *F. psychrophilum*, tales como el análisis del polimorfismo genómico (RAPD (Chakroun *et al.*, 1997), ribotipado y análisis de plasmideos (Madetoja *et al.*, 2001), polimorfismo de productos de PCR (PCR-RFLP) (Izumi *et al.*, 2003), así como estudios del gen 16S ARNr (Soule *et al.*, 2005), estos dos últimos estudios considerados un parteaguas en trabajos de investigación posteriores.

Izumi *et al.*, 2003 como se mencionó anteriormente a través de la técnica de PCR-RFLP, tomando como referencia el gen de la girasa (*gyrB*) encontraron 4 genotipos (A, B, R y S). El genotipo A solo encontró solo en la especie AYU.

Soule *et al.*, 2005 identifican 2 linajes genéticos claramente definidos a través de microarrays determina la presencia de 2 linajes en salmones del Atlántico los nombraron: linaje I (realizados en aislamientos de salmón del pacífico) que se encontró en una cepa de referencia genética (ATTCC 49418t) y linaje II cuya cepa de referencia se estableció como CFS 259-93 (asociado a las características propias de la trucha arcoíris) de acuerdo a los polimorfismos del gen 16S ARNribosomal. Posteriormente Rasmrud *et al.*, (2007) diseñaron oligonucleótidos independientes para PCR convencional para identificar los 2 alelos propuesta por Soule *et al.*, 2005, teniendo una correspondencia del 100% con los resultados de este estudio.

En Sudamérica no hay muchos estudios; sin embargo, Chile (2° país productor de salmón a nivel mundial), aisló por primera ocasión una cepa de *Flavobacterium psychrophilum* en 1993; sin embargo la genotipificación se realizó hasta el año 2005 según el protocolo de Soule *et al.*, 2005, ubicando los aislados en el linaje II, sin importar la especie afectada (Valdebenito *et al.*, 2009). Otro estudio realizado en Perú advierte de la presencia de esta bacteria en un centro piscícola denominado El Ingenio en 2003 afectando alevines de trucha arcoíris; las bacterias fueron identificadas mediante el aislamiento y técnicas microbiológicas estándar como tinción de Gram, bioquímica y análisis de producción de enzimas extracelulares (León *et al.*, 2008), sin embargo aún no hay reporte de tipificación.

En México no hay reporte científico de la presentación de esta enfermedad, sin embargo no se descarta la existencia de la bacteria en varios estados de la república.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el creciente interés del público consumidor por dar variedad a los alimentos que consume ha generado que se busquen especies alternas al pollo, res y cerdo, que son las principales fuentes de proteína animal, lo que lo ha llevado al consumo de especies acuáticas como lo es el pescado, haciendo de la producción piscícola de este una industria cada vez más tecnificada, cuyos retos crecientes han hecho que se empleen técnicas y especies de cultivos que les sean rentables. Sin embargo; el incremento de la actividad piscícola también ha generado que los problemas de sanidad aumenten, y con ello las enfermedades.

La aparición de enfermedades emergentes como el Síndrome del Alevín de la Trucha Arcoíris (RTFS) en peces genera una preocupación importante, ya que la inocuidad alimentaria se ve afectada generando en el consumidor la duda de si realmente lo que consume es sano para él, y aunque en muchos de los casos no existe un riesgo zoonótico, la calidad y presentación de los productos suele verse afectada por las secuelas tras la infección del agente etiológico.

Actualmente se sabe que la flavobacteriosis y específicamente RTFS es una enfermedad de distribución mundial, que causa pérdidas económicas importantes ya que afecta principalmente a los peces de producción como el salmón del atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) afectando principalmente en las primeras etapas de vida de los peces: alevines y juveniles, siendo estos los principales productos de intercambio y comercialización entre granjas, favoreciendo la diseminación de la enfermedad.

En la piscicultura de México no se cuenta con reportes oficiales o científicos sobre la existencia de *Flavobacterium psychrophilum*. Sin embargo en el área de diagnóstico de sanidad acuícola del CIESA, se han manifestado casos sugestivos a RTFS, provenientes de granjas del Estado de México y Michoacán (estados que en los últimos años han manifestado un incremento en la producción de peces de consumo principalmente trucha arcoíris), de estos se han aislado organismos filamentosos Gram negativos similares a *Flavobacterium psychrophilum*, por tal razón es importante realizar la caracterización fenotípica, bioquímica y genética de dicho organismo para descartar o aceptar la presencia en el país del síndrome del alevín de la Trucha Arcoíris, padecimiento según estudios de otros países puede generar mortalidades que van desde el 50 al 90%, situación que justificaría los casos catalogados como contingencias en este Estado.

4. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Ante las manifestaciones clínicas sugestivas a RTFS podemos inferir la presencia de *Flavobacterium psychrophilum*, en granjas Trutícolas de México, además de que este no difiere en sus características, fenotípicas, bioquímicas y genéticas de las cepas reportadas en el mundo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar fenotípica, bioquímica y molecularmente a la bacteria filamentosa Gram negativa aislada de alevines de trucha arcoíris (*O. mykiss*), con enfermedad clínica sugestiva a Síndrome del Alevín de la Trucha Arcoíris (RTFS) obtenidas de casos remitidos al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal.

5.2 Objetivos específicos.

- Aislar la Bacteria Filamentos en agar cytofaga y TYES a partir de peces con manifestaciones clínicas aparentes causadas por una infección con *Flavobacterium spp.*, sugestiva a la especie *psychrophilum*.
- Realizar la descripción clínica e histológica de la enfermedad así como la caracterización fenotípica del agente.
- Realizar bioquímicas básicas y especializadas para el diagnóstico confirmatorio de *Flavobacterium psychrophilum*.
- Realizar caracterización genética, a través de pcr convencional, RFLPS-PCR, estudio del alelo 16s ARNr.
- Hacer un acercamiento al perfil serológico de los aislados obtenidos, comparándolo con cepas chilenas y la cepa tipo 1947t aplicando la técnica de western Blot e inmunoaglutinación en placa.
- Realizar desafío experimental, para determinar la virulencia de los aislados y la reproductividad de la enfermedad en condiciones de laboratorio.

6. METODOLOGÍA (MATERIALES Y MÉTODOS)

6.1 Diseño de la investigación: Descriptiva transversal.

Esta investigación tuvo un enfoque cualitativo, usando un modelo exploratorio, que permitió obtener puntos de partida para hacer una correlación entre los datos obtenidos de las diferentes pruebas de laboratorio realizadas a los aislados obtenidos de casos sugestivos a síndrome del alevín de la trucha arcoíris de granjas del Estado de México y Michoacán con los ya existentes de *Flavobacterium psychrophilum* reportados en el mundo.

Para el estudio, se trabajó con muestras provenientes de alevines de trucha arcoíris que fueron remitidos al área de diagnóstico del departamento de sanidad acuícola del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEMex entre el periodo de enero 2015 a julio 2016 de diferentes granjas del centro de México, cuyas manifestaciones clínicas correspondían al síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS) y de los cuales se obtuvieron 13 aislados del patógeno implicado.

6.2 Lugar de trabajo

La primera parte del proyecto se realizó en el departamento de sanidad acuícola del CIESA FMVZ-UAEMex consistió en el aislamiento, cultivo y conservación de la muestra, además de la bioquímica básica. La segunda etapa consistente en actividades de bioquímica especializada y caracterización genética se realizó en el Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello en Viña del Mar, república de Chile, bajo la dirección del Dr. Rubén Avendaño Herrera.

6.3 Toma de muestras

Los peces recibidos en el área de diagnóstico del departamento de sanidad acuícola fueron procesados de acuerdo al protocolo de toma de muestras, basado en el código sanitario para los animales acuáticos de la OIE, apartado 7 relativo al bienestar de los peces de cultivo.

Inicialmente, se procedió a revisar la superficie externa y branquias, y posteriormente se realizó la necropsia para documentar las lesiones y obtener de muestras de órganos internos (riñón y bazo) o de úlceras externas cuando estas fueron observadas (branquias, aletas, piel).

6.4 Aislamiento bacteriano, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

- De los órganos afectados se realizó el aislamiento en el medio de cultivo de elección primaria para bacterias cytophagas, conocido como MAO (Anacker and Ordall modificado utilizado comúnmente en el laboratorio, que contiene 0,05 % de triptona, extracto de levadura 0,05 % , acetato de sodio 0,02 % , y 0,02 % extracto de carne con un pH de 7.2. La muestra se incubo a 15°C durante 72 a 96 horas; el aislamiento primario se inoculó en el medio selectivo agar extracto de sales de Triptona (TYES) utilizando la siguiente concentración según el protocolo de Avendaño *et al.*, (2014): 0.4% triptona, 0.05% extracto de sales, 0.02% cloruro de calcio anhidro, 0.05% sulfato de magnesio heptahidratado, 1.2% agar, con un Ph de: 7.2.
- Se conservaran las muestras en crio viales con esferas (criobolas), a -80°C para posterior utilización.

6.5 Identificación fenotípica y bioquímica

6.5.1 Caracterización morfológica

La descripción morfológica de los aislados sugestivos a *Flavobacterium psychrophilum* se realizó en los cultivos primarios de 24- 48hrs de incubación a través de la observación directa de las placas de agar, observando las características y el número relativo de cada tipo de colonia presente en el medio, en caso de haber variabilidad de colonias.

Se determinó la pureza del cultivo mediante una tinción de Gram, para lo cual se colocara una gota de aproximadamente entre 40 y 50 microlitros de agua destilada sobre un portaobjeto, posteriormente se emulsionara con una colonia tomada del medio sólido, se extenderá esta emulsión en el portaobjeto, dejándose secar a temperatura ambiente, para posteriormente fijarla con calor y proceder con la tinción.

En la caracterización de las colonias se observaron cambios en el medio que las rodea, con el fin de localizar actividades metabólicas específicas de las bacterias recuperadas. La lectura de morfología colonial se realizó tomando en cuenta: el tamaño de la colonia, la forma, elevación, margen o borde (entero, rugoso, incompleto etc.), color, superficie, transmisión de la luz y consistencia (cremosa, mucoide, solida, etc).

6.5.2 Movilidad celular

La movilidad celular y el movimiento de deslizamiento característico de *Flavobacterium psychrophilum* reportado por diferentes autores, serán evaluados por examen al microscopio en cultivos de 40 horas con la técnica de gota pendiente o gota colgante según (Rangdale, 1995).

6.5.3 Identificación bioquímica

Para la identificación bioquímica se tomaron en cuenta las recomendaciones de Bernardet and Kerouault, 1989 donde refieren que es de suma importancia hacer una serie de pruebas para caracterizar de manera precisa a *Flavobacterium psychrophilum*, de entre las cuales la absorción de rojo congo, presencia de pigmentos de tipo flexirrubina, degradación de gelatina, e hidrólisis de caseína y lecitina son vitales para la caracterización de este microorganismo y los cuales son considerados como procesos avanzados ya que se realizaron después de realizar el tren de bioquímicas básicas utilizado en el área de bacteriología del CIESA, para la determinación de la degradación de carbohidratos.

6.5.4 Bioquímica básica.

La bioquímica básica hace referencia a la serie de pruebas encaminadas a la detección de la degradación de distintos nutrientes como carbohidratos y minerales que la bacteria pudiera utilizar como fuente de energía en los diversos procesos metabólicos de su ciclo biológico.

Triple azúcar hierro agar (TSI): determina la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico ya sea glucosa, sacarosa o lactosa con producción o no de gases y ácido sulfhídrico. La inoculación se realizó por picadura y estría en el pico de flauta.

Agar de hierro y lisina (LIA): Mide la capacidad enzimática para descarboxilar la lisina y arginina para formar una amina y manifestar alcalinidad, además también se puede discernir la producción de ácido sulfhídrico y producción de gas. Para la inoculación se tomó una pequeña porción de colonia con el asa de punta y se realizó la picadura de la superficie al fondo del medio para finalizar con una estría en la superficie.

Citrato de Simmons: determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento provocando alcalinidad, para la inoculación se tomó una porción de la colonia del cultivo primario y se inoculó como estría única en la superficie de pico de flauta.

Movilidad, indol y ornitina (MIO): Evidencia movimiento, la descarboxilación de la ornitina para formar una amina, además de la producción de indol. La inoculación se realizó por picadura en forma vertical con el asa de punta en el medio cuidando que el camino de salida del asa sea el mismo que el de entrada, para verificar si el organismo es indol positivo, se le adicionó 5 gotas de reactivo de kobacs se agito suavemente y se leyó de inmediato.

BASE O/F (oxido, fermentación): Determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono. La prueba requiere de 2 tubos de medio los cuales se inocularon por picadura, a uno de los tubos se le adicionaron aproximadamente 1.5 ml de aceite mineral para generar un ambiente anaerobio y verificar la fermentación, en el otro es necesaria la presencia de oxígeno por lo cual no se requirió el aceite mineral.

PRUEBA AP (agua peptonada): los microorganismos lactosa positivos tienen B-galactosidasa y permeasa, dos enzimas necesarias para la formación de ácidos a partir de la lactosa. La inoculación se realizó por disolución del inóculo en el medio y la adición de polvo ONPG.

ROJO DE METILO Y VOGES PROSKAUER: son 2 pruebas que se realizan con el mismo medio, determina la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de ácido por la vía ácido mixta o con producción de un producto final neutro (acetoina) por la vía butanodiolica. Para la primera se le agregaron 5 gotas de solución indicadora rojo de metilo y para la prueba de VP A

1 mL de cultivo se añadieron 12 gotas ($\pm 0,6$ mL) de α - naftol al 5% en etanol y 4 gotas ($\pm 0,2$ mL) de KOH al 40%, se agito y dejo reposar por 5 a 10 minutos.

UREA: Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoniaco por la acción de la enzima ureasa produciendo un cambio de color rojo en el medio en caso de ser positivo, para el caso de *F. psychrophilum* no deben manifestarse ningún cambio de coloración.

Sulfuro, indol, movilidad (SIM): Determina si un organismo es móvil o inmóvil, si es capaz de liberar ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro y por último la capacidad de desdoblar el indol de la molécula triptófano. La inoculación del medio se realizó por picadura en forma recta cuidando que el camino de salida fuera el mismo por el cual entró el asa. *F psychrophilum* no manifiesta ninguna reacción en el medio.

CATALASA: La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, esta descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Para realizar la prueba sobre un portaobjetos se colocó una gota de H₂O₂ de 10 volúmenes y sobre esta se suspendió una colonia con ayuda de un asa, inmediatamente se evaluó la reacción, observando si hay o no presencia de burbujas procedentes del oxígeno que indicarían que la prueba es positiva. Hay que tomar en cuenta que el cultivo bacteriano debe estar en fase exponencial de crecimiento, es decir que no debe ser mayor de 96 horas. *F psychrophilum* ha demostrado variabilidad de acuerdo a la cepa estudiada, sin embargo la mayoría de los autores coinciden que el resultado varia de débil positivo a positivo, observándose algunas burbujas en la reacción.

OXIDASA: La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo este es reducido por el oxígeno molecular y produce agua o peróxido de hidrogeno según la especie bacteriana. Esta esta prueba se realizó utilizando un hisopo que fue impregnado

con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, una vez teniendo el reactivo en el hisopo con este se tomó una colonia y se frotó en su totalidad esperando que transcurrido un minuto la zona impregnada virara aun color azul- violeta si fuera positivo. *Flavobacterium psychrophilum* varía de acuerdo a la cepa estudiada mostrando resultados negativos, a débil positivos según algunos autores.

6.5.5 Bioquímica avanzada.

ABSORCIÓN DE ROJO CONGO: se colocaron alrededor de 2 o 3 colonias de *Flavobacterium psychrophilum* sobre un porta objeto y se le añadió una gota de colorante rojo congo, si la reacción es positiva hay un cambio de coloración que va desde un amarillo a rojo de las colonias, la reacción también puede ser evaluada directamente en la placa de agar adicionándole solo la gota de colorante sobre las colonias. *F. psychrophilum* no evidencia absorción.

PIGMENTOS DE TIPO FLEXIRRUBINA: para evidenciar la presencia de este tipo de pigmento a una placa de cultivo en crecimiento exponencial (no mayor a 96hrs) se inundaron con algunas gotas de KOH al 20% (p/v). Una reacción positiva se evidenció como un cambio de color en la colonia desde el amarillo característico a un rojo-anaranjado, purpura o marrón. *F. psychrophilum* contiene este tipo de pigmentación.

HIDROLISIS DE LA GELATINA. Se siguió el protocolo descrito en el libro de MacFaddin (de 1980). *F. psychrophilum* muestra variabilidad en esta prueba bioquímica ya que se considera esta característica como muestra de virulencia que varía de acuerdo a la cepa de estudio.

HIDROLISIS DE LA CASEÍNA: La presencia de caseinasa en las cepas se determinó inoculando cultivos en el medio base suplementado con 3% de leche

entera. En una reacción positiva, se observó un halo claro alrededor de las colonias.

HIDRÓLISIS DE LECITINA. La producción de lecitinasa fue evaluada agregando 5% de yema de huevo estéril a la media base. La aparición de un halo opaco en torno al pocillo después de la incubación indica la actividad de esta enzima.

TOLERANCIA A NaCl. Según reportes *Flavobacterium psychrophilum* es una bacteria poco tolerante al NaCl, por tal razón pocas veces se puede encontrar en ambientes de agua salada, sin embargo alcanza un rango de tolerancia que va desde el 1% al 2% en medios suplementados con NaCl. Se midió esta tolerancia suplementando el medio base con 0.5%, 1%, 1.5% y 2% de NaCl.

6.6 Caracterización genética

6.6.1 Extracción de ADN

La extracción de DNA se realizó a partir de bacterias cultivadas en placas de TYES en crecimiento exponencial (no mayor de 96 hrs). Se realizó con el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1). El DNA resultante se cuantifico (Anexo 2) y conservó a 20 °C para su posterior uso en PCR.

6.6.2 PCR convencional o a tiempo final

Los primers que se usaron fueron los diseñados por Urdaci *et al.*, 1998, específicos para *Flavobacterium psychrophilum*. Que se ubican en la región 186 a 203 pares de bases y 1278 a 1261 pares de bases respectivamente.

Forward FPI (5'-GITAGTTGGCATCAACAC-3')

Reverse FP2 (5'-TCGATCCTACTTGCGTAG-3').

Aplicando el siguiente protocolo térmico: Un ciclo de desnaturalización: 95°C de 5 min; Alineamiento y extensión 35 ciclos. 94°C durante 30 s, 54°C durante 1 min ,72°C durante 1 min y finalmente un ciclo de extensión de 72°C durante 10 min. Para visualizar el producto se requiere de electroforesis en gel de agarosa (Merck) al 1.5%, con un marcador de alto peso molecular (AccuRuler 100 bp Plus DNA Ladder de Maestrogene).

6.6.3 RFLP-PCR

En un volumen de 50µL de mix de reacción, se realizara PCR convencional utilizando los siguientes pares de primers específicos para *gyrB* de *F. psychrophilum*: GYR1-GYR1R y PSY-GIF PSY-GIR cuya secuencia es 5'-CAYGCNNGGNGGNAARTTYGA-3', 5'-CCRTC- NACRTCNGCRTCNGT-3', 5'-TGCAGGAAATCTTA- CACTCG-3' y 5'-GTTGCAATTACAATGTTGT-3' respectivamente (Izumi *et al.*, 2003). GYR1-GYR1R amplifica 1178 pb mientras que PSY-GIF PSY-GIR nos da como producto un fragmento de 1017 pb. El contenido de DNA dentro del mix fue de 2 µL con una concentración de 50 ng.

Para el perfil térmico se usó el mismo protocolo de Izumi *et al.*, 2003 que consiste en una primera desnaturalización a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 56°C por 30 s, y extensión a 72°C por 90 s y una extensión final a 72°C por 5 min.

Basándonos en el mismo estudio se realizó una digestión utilizando endonucleasas de restricción. Para el producto de GYR se utilizó la enzima HinfI la cual nos definirá 2 genotipos: El genotipo A cuyo producto final serán fragmentos de 429, 217 y 161 pb y el genotipo B que proporciona fragmentos de 429, 217 y 186 pb. Para PSY la enzima correspondiente fue RsaI, que da como resultado un genotipo S con fragmentos de 429 y 367 pb o el genotipo R con 429 y 327 pb. La digestión se realizó en un volumen final de 20 µl en los cuales 8 µl son de producto de PCR, 1µ de la enzima HinfI o RsaI según sea el caso, y 2µl del

buffer específico para cada enzima. Necesariamente a 37°C durante 4 o 5 horas en baño termoregulado, u overnight a la misma temperatura. Para visualizar los fragmentos se requirió de electroforesis horizontal en gel de agarosa (Merck) al 2%, con un marcador de bajo peso molecular (Gene Ruler low Range DNA de Thermo).

6.6.4 ESTUDIO DEL ALELO 16S ARNr

Para realizar la identificación de uno o ambos alelos 16S rRNA, que proporcionan información útil sobre la presencia de polimorfismos o los linajes genéticos I y II relacionados con la virulencia de las cepas descritos por Soule *et al.*, 2005), y que años más tarde fueron corroborados por Rasmrud *et al.*, 2007 con ensayos de PCR simple, el cual empleamos en este estudio para discernir los linajes presentes en México.

El estudio se realizó utilizando un mix de reacción de 25µl, de los cuales 3µl son de DNA con una concentración de 50ng, se usaron 2 pares de primers en reacciones independientes. El primer par es el realizado a partir de alelos A49418: 5'-CGTCA-AGCTACCTCACGAGGT-3' and AF49418: 5'-ATAGTGAGTTGGCATCAACACACT-3') de la cepa tipo ATCC 49418t, mientras que el segundo pertenece a la cepa virulenta CSF 259-93 A259-93: 5'-GAAACACTCGGTCTGTGACCG-3' y AR259-93: 5'-GACAACCATGCAGCACCTTG-3'. El ciclo térmico empleado para ambas reacciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 61°C por 60 segundos, extensión a 72°C por 60 segundos. Y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para la visualización de los productos se hizo electroforesis horizontal, en gel de agarosa al 1.5%, utilizando un el marcador molecular Maestro gen de 100 a 3000 pb.

6.7 Estudio serológico

Para el estudio serológico se utilizaron como base los LPS y Antígeno O de la bacteria, estos productos se extrajeron de cultivos bacterianos puros de no más de 96 horas de crecimiento.

Para la extracción del antígeno O, inicialmente se realizó una suspensión bacteriana en PBS o solución salina, se calentó por una hora a 100°C en un vaso con agua, posteriormente se enfrió en hielo por 10 minutos, se verificó y ajustó la concentración de la suspensión a aproximadamente 1×10^{-9} cel/ml y se refrigeró a 4°C para su uso posterior en la técnica de inmunoaglutinación en placa.

Los LPSs se extrajeron de cepas crecidas de no más de 96 hrs post cultivo, se lavaron 2 veces con PBS, se centrifugaron, y resuspendieron en 200 µl de PBS, posteriormente utilizando un termoblock se hirvieron por 10 minutos, se enfriaron en hielo para posteriormente incubarlas a 60°C/1 hr con 80 µl de proteinasa K (25mg/ml), las muestras se agitaron cada cierto tiempo durante el proceso, al final se almacenaron se ajustaron (Anexo 3) y se conservaron a -20°C, para ser usados en la técnica de Western Blot.

Se realizó Western Blot utilizando los sueros homólogos de las cepas chilenas 1739, 1731, 1150, 1196 y el homólogo a la cepa tipo 1947 diluidos 1:10. Para esta técnica se utilizan los LPS con una concentración de 50ng, siguiendo el protocolo empleado en el laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuicola, que en resumen consiste en:

- Los LPS se corren en un gel de poliacrilamida para emplear en electroforesis vertical mezclados con un marcador de proteínas preteñido.

- Una vez terminada la electroforesis se realiza la transferencia en una membrana de PBDF.
- Concluida la transferencia se bloquea la membrana con leche en PBS al 3% durante toda la noche.
- Después de este proceso se realizaran 3 lavados con tween 20 (0.05%) más PBS durante 5 minutos sobre una plataforma de agitación.
- Se realiza la incubación a 37°C por una hora con el anticuerpo primario (1:1000) en PBS y leche al 1%. (todo el tiempo la membrana debe estar en movimiento)
- se lava nuevamente con PBS y Tween 20 con agitación continua por 5 minutos repitiendo este proceso 3 veces.
- Se realiza otra incubación esta vez con el anticuerpo secundario que es un anticonejo (1:3000), durante 1 hora a 37°C en PBS y leche al 1%.
- Se realizan otros 2 lavados con PBS.
- Se revela con Diaminobencidina 1mg/agua oxigenada 1µl/PBS 1ml.

Solo a manera de reforzamiento se realizó la técnica de inmunoaglutinación en placa pero esta vez con los antígenos O con las muestras positivas en el western Blot, en una relación de 10µl de suero/10µl antígeno O.

6.8 Desafío experimental (prueba de virulencia)

Se utilizó el aislado 001 en peces clínicamente sanos, confirmando estos a través de muestreo de branquias, moco, piel, bazo y riñón los cuales se evaluarán microscópicamente, bacteriológicamente y por PCR (Urdaci *et al.*, 1998) para asegurar una ausencia previa de *F. psychrophilum* u otros patógenos.

Los peces se separaron en peceras de 10 L de capacidad, se formaron 2 grupos (grupo de estudio, grupo control) de 15 individuos cada uno, los cuales se

aclimataron durante siete días en la pecera con agua des clorada. El inóculo se preparó a partir de cultivos de caldo TYES durante la noche (18°C, 120 rpm). Cada pez experimental se inyectó intramuscularmente con 0,1 ml (5 x 10⁷ CFU, conteo directo de placas). Los peces de control se inyectaron sólo con caldo TYES. Todos los ensayos se realizaron en un sistema cerrado a 17 ± 1 °C, un pH de 7,6-7,8, y se utilizó un régimen de luz 12L: 12D. Los peces se alimentaron diariamente al 1,5% del peso corporal, y el agua del tanque se cambió cada dos días. En caso de obtener mortalidad se realizaron cultivos en medios TYES al tener presencia de aislados pigmentados puros, se utilizaron los métodos de identificación bioquímicos y PCR específicos antes descritos para confirmar la infección por *F psychrophilum*.

7. RESULTADOS

7.1 Descripción de la enfermedad

Durante el periodo comprendido entre enero 2015 y julio 2016 se remitieron al departamento de Sanidad Acuícola del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CIESA) de la FMVZ-UAEM un total de 13 casos de crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con signos clínicos sugestivos del síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS). Once de las granjas remitidas con fines de diagnóstico sanitario en la modalidad de contingencia sanitaria correspondieron al Estado de México y una al Estado de Michoacán (tabla 1).

Los datos aportados por quienes remitieron las muestras indicaron que en la mayoría de las granjas de donde se obtuvieron los peces, se reportó entre un 50 a 80% de mortalidad por este padecimiento; así mismo, informaron que los peces afectados presentaban desorientación, letargia, anorexia, natación superficial, oscurecimiento de la piel, lesiones de la pared costal a nivel de bazo y en aletas, además de una marcada exoftalmia.

Durante el análisis macroscópico realizado, los peces evidenciaron estar padeciendo un proceso de infección sistémica, caracterizado por oscurecimiento corporal, distensión abdominal, exoftalmia (Figura 1), palidez branquial severa (figura 2), erosión de aletas y lesiones en la pared costal a nivel de la ubicación de bazo. Internamente se observó una palidez generalizada, ascitis, esplenomegalia, bazo con hemorragias y áreas necróticas en ocasiones rodeado de un material purulento de color amarillo, erosión anal, renomegalia y edema renal (figuras 2 y 3).

Tabla 1. Relación de los aislados de *Flavobacterium spp* y su origen asociados al Síndrome del Alevín de la Trucha arcoíris, remitidos al CIESA entre Enero 2015 a Julio 2016.

Id aislado	Especie	Granja	Lugar de procedencia	Fecha	Órgano del que se aisló
42	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Ex hacienda Chalchihuapa	Tenancingo Edo. Méx	26/01/2015	Bazo
51	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	El rincón	Amanalco Edo. Méx	29/01/2015	Bazo
66	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Truchas el manantial.	Villa del carbón Edo. Méx	09/02/2015	Bazo
148	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Sociedad de producción rural de R.L Botzanga	Temoaya, Edo. Méx	09/03/2015	Lesión anal
418	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	La joya	Donato Guerra Edo. Méx	06/11/2015	Lesión aletas
001	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	La escondidita	Amanalco Edo. Méx	12/01/2016	Lesión aleta
34	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Unidad Truticola Las Peñitas AC	Amanalco Edo. Méx	15/01/2016	Bazo
100	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Corral de piedra san Bartolo estanque 1	Amanalco Edo. Méx	14/03/2016	Bazo
101	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Corral de piedra san Bartolo estanque 2	Amanalco Edo. Méx	14/03/2016	Bazo
122	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Truchas Agua Bendita	Coatepec Harinas Edo. Méx	13/04/2016	Bazo
134	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	El nevado	Coatepec Harinas Edo. Méx	03/05/2016	Lesión lateral
174	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)				
185	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Las peñitas	Ocampo Michoacán	07/06/2016	Lesión pedúnculo



Figura 1. Cría de trucha arcoíris con oscurecimiento corporal, distensión abdominal severa y exoftalmia.



Figura 2. Cría de trucha arcoíris mostrando palidez branquial; palidez de órganos y musculatura.



Figura 3. Cría de trucha arcoíris en donde se muestra esplenomegalia y necrosis de bazo rodeado de un pigmento amarillento producto de la acumulación de células bacterianas. (Imagen del artículo Castillo et al., 2017).

7.2 Análisis histológico

Histopatológicamente, la afección más común que presentaron los peces bajo este proceso septicémico, se encontró a nivel de bazo donde la integridad de la cápsula desaparece gradualmente perdiéndose la definición de sus bordes, a la vez que es reemplazada por una capa de material fibrinoso, el cual se extiende frecuentemente al peritoneo y tejido pancreático circundante, así como al tejido graso que rodea a este produciendo una esteatitis mononuclear de tipo no supurativo (Figura 4A y 4C) observándose numerosas formas sugestivas de la bacteria *F. psychrophilum* y células inflamatorias en la periferia del bazo, lo que explica la esplenitis y peritonitis fibrinosa.

En el corazón se evidenciaron diferentes grados de pericarditis, frecuentemente zonal, con áreas localizadas de infiltración celular y vacuolización del músculo cardíaco y ocasionalmente depósito de fibrina, intercalado con células inflamatorias degeneradas, en la capa externa del músculo cardíaco y tejidos adyacentes (figura 4I). En resumen los alevines manifestaron degeneración miocárdica y endocárdica en diferentes grados, que van de moderado a severo en relación a la talla del alevín, siendo los peces de mayor tamaño los más afectados.

A nivel branquial se encontraron acúmulos de *F. psychrophilum* localizados libremente alrededor del arco branquial y en las laminillas secundarias, las cuales también se evidenciaron hipertróficas.

En los cortes histológicos de los organismos que manifestaban exoftalmia severa e incluso opacidad corneal se evidencio edema (Figura 4H). Finalmente, en los especímenes que presentaban ulceraciones y lesiones en los costados y aleta dorsal se encontró necrosis de fibras musculares con pérdida de sus estriaciones y circundadas por edema, principalmente en los músculos de pared abdominal a nivel de bazo (Figura 4F y 4G). Generalmente en las ulceraciones se encontró una inflamación de tipo granulomatoso.

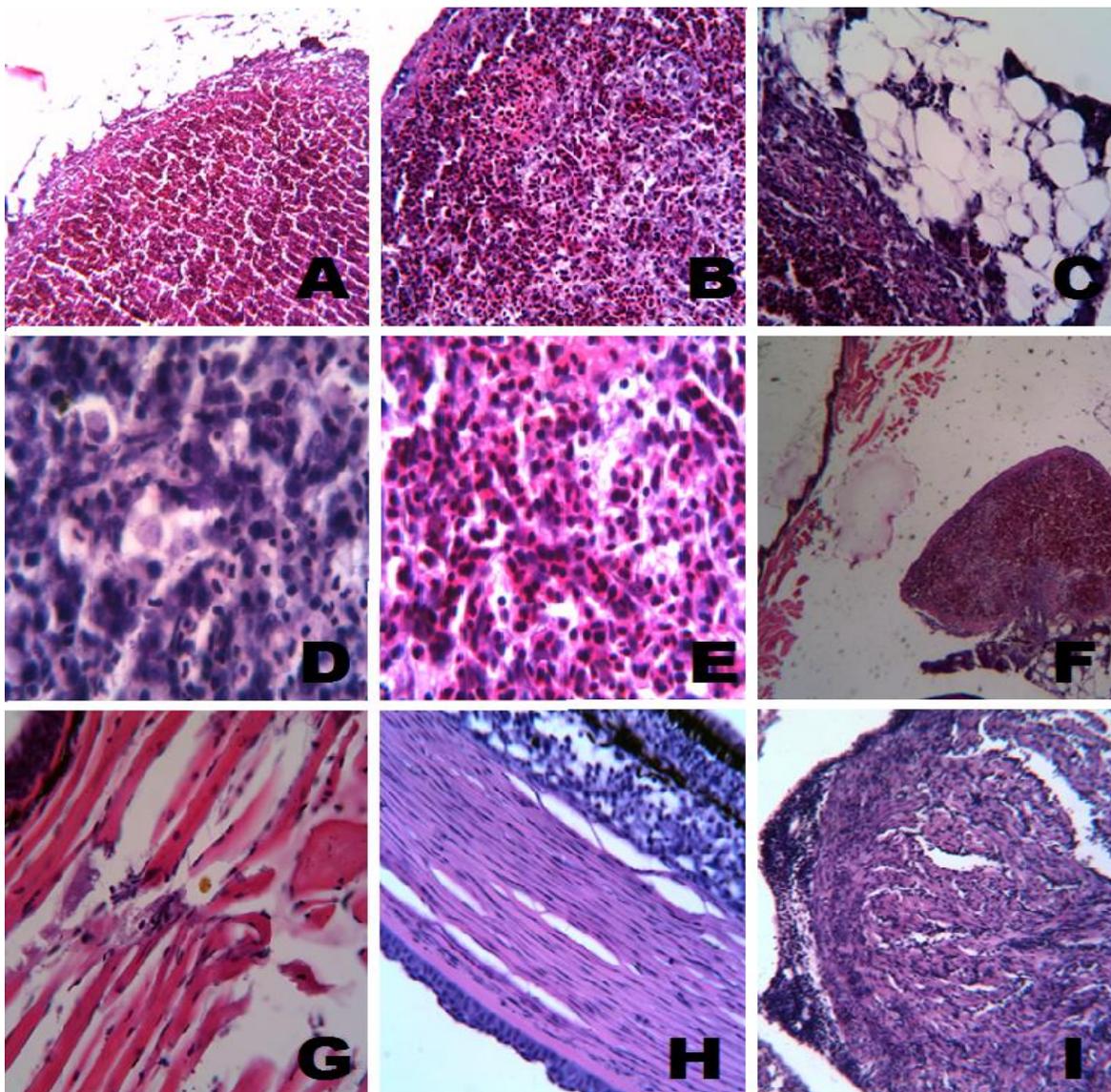


Figura 4. Cortes histológicos teñidos con H&E de órganos de crías de trucha arcoíris clínicamente afectadas por RTFS a causa de *F. psychrophilum*,

(A) Destrucción de capsula esplénica con neoformación de tejido fibroso (100X); (B) Congestión esplénica, marcada depleción linfoide, zonas hemorrágicas en bazo (100X). (C) sustitución de la capsula esplénica por una capa de material fibrinoso con evidencia de esteatitis mononuclear no supurativa (250X). (D) Depleción linfoide, degeneración y necrosis hepática (630X). (E) zona hemorrágica en superficie esplénica (630X). (F) Esplenitis, daño a fibras musculares de la pared abdominal a nivel de bazo (25X). (G) destrucción de fibras musculares e infiltración mononuclear (250X). (H) Edema corneal característico en especímenes con exoftalmia (250X). (I) infiltración subepicárdica (100X).

7.3 Descripción fenotípica del patógeno

De los trece casos remitidos se obtuvieron igual número de aislados a partir de órganos internos (riñón y bazo), úlceras externas cuando estas fueron observadas (branquias, aletas, piel) utilizando los medios de agar MAO y TYES. A partir del 3° a 5° día de incubación a 15°C las bacterias se organizaron como agrupaciones bacterianas pigmentadas de color amarillo a amarillo intenso. La morfología bacteriana predominante consiste en células filamentosas y delgadas, de tinción gram negativa, que se agrupan formando redes.

Los aislados obtenidos fueron codificados con los siguientes números 42, 51, 66, 148, 418, 001, 34, 100, 101, 122, 134, 174 y 185 (tabla 1).

En la estandarización de los procesos para la identificación y caracterización bioquímica, se mostró que el agar TYES tiene mayor eficiencia en el crecimiento de *F. psychrophilum* reduciendo en 24 horas el tiempo de crecimiento comparado con el Agar MAO por lo que para estudios posteriores se utilizó Agar TYES como medio de elección, quedando como 72 horas tiempo mínimo de crecimiento en este medio.

Como resultado de la interpretación de cultivos primarios se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 2, donde sobresale que el tamaño de la colonia varía entre 1- 4 mm, la forma predominante es puntiforme sin encontrar ninguna otra morfología para estas colonias que se sobre elevan y no se adhieren al agar. En cuanto a los bordes, existió una ligera variación entre enteros y rugosos, siendo predominante el borde rugoso para los aislados del 2015 a diferencia del borde entero mostrado en los aislados del 2016. La consistencia de la colonia fue de tipo mucoide en todos los aislados.

En general, la morfología de las colonias obtenidas fueron similares en todos los aislados; sin embargo, los primeros 5 aislados codificados como: 42, 51, 66, 148, 418, manifiestan mayor relación entre sí, es decir morfológicamente son iguales coincidiendo en la definición de sus bordes y en la coloración amarillo pálido de las agrupaciones bacterianas, dichas características pudieron ser modificadas debido al número de pases que se les dio a los cultivos con el fin de obtener colonias puras.

Tabla 2. Resultados de la Caracterización fenotípica de las colonias de *Flavobacterium spp*, obtenidas de casos remitidos para diagnostico sanitario al CIESA-UAEMex.

Id del aislado	Tamaño	Forma	Elevación	Margen	Color	Superficie	Consistencia	Transmisión de luz
42	1-4mm	Puntiforme	Sobre elevada	entero	amarillo	Brillante	Mucoide	Traslucida
51	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	rugoso	amarillo	Brillante	Mucoide	Traslucida
66	1-3mm	Puntiforme	Sobre elevada	rugoso	amarillo	Brillante	Mucoide	Traslucida
148	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	entero	amarillo	Brillante	Mucoide	Traslucida
418	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	rugoso	amarillo	Brillante	Mucoide	Traslucida
001	1-3mm	Puntiforme	Sobre elevada	entero	Amarillo intenso	Brillante	Mucoide	Traslucida
34	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	entero	Amarillo intenso	Brillante	Mucoide	Traslucida
100	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	Entero	Amarillo intenso	Brillante	Mucoide	Traslucida
101	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	Entero	Amarillo intenso	Brillante	Mucoide	Traslucida
122	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	Entero	Amarillo intenso	Brillante	Mucoide	Traslucida
134	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	Entero	Amarillo intenso	Brillante	Mucoide	Traslucida
174	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	Entero	Amarillo intenso	Brillante	Mucoide	Traslucida
185	1-2mm	Puntiforme	Sobre elevada	Entero	Amarillo intenso	Brillante	Mucoide	Traslucida

Con respecto a la morfología bacteriana, en la tinción de Gram se observaron 2 tipos de morfología, los aislados 42, 51, 66, 148, 418 tienen un aspecto más corto con respecto a los otros aislados y su forma es más bien como de varilla alargada con los extremos achatados; sin embargo, los aislados 001, 34, 100, 101,

122, 134, 174 y 185 son de una morfología filamentosa, más largo que los anteriores y forman agrupaciones que dan un aspecto de red como se observa en la figura 5, similar a lo que se describe en la literatura para *Flavobacterium psychrophilum*.

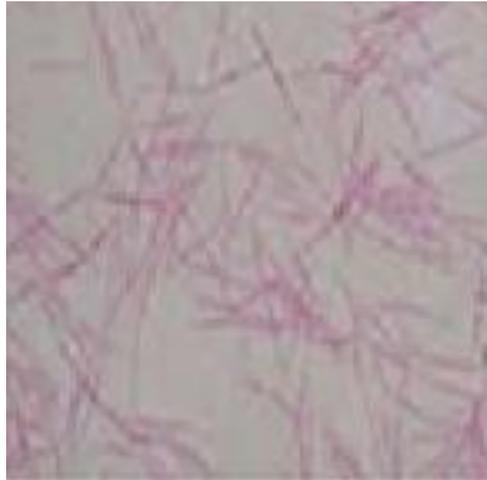


Figura 5. Morfología típica de *Flavobacterium psychrophilum*. Bacilos filamentosos Gram Negativos, que forman redes.

7.4 Perfil bioquímico

Utilizando como referencia a la cepa tipo de *F. psychrophilum* NCIMB 1947T se realizó el perfil bioquímico de los aislados mexicanos. El tren básico de pruebas bioquímicas consistió en la medición de degradación de nutrientes entre ellos carbohidratos y minerales que pudieran utilizarse en el metabolismo y en el ciclo biológico de la bacteria. Si bien se mencionan variaciones entre las cepas de *F. psychrophilum*, todos los autores coinciden en la incapacidad para degradar carbohidratos ya sea simples o complejos, situación que en el presente trabajo se demostró (tabla 3) al encontrar que en todas las pruebas bioquímicas realizadas relacionadas con la utilización de estos nutrientes el resultado siempre fue

negativo para los 13 aislados mexicanos de *F. psychrophilum* al igual que para la cepa tipo.

Tabla 3. Resultado de las pruebas bioquímicas básicas de los 13 aislados mexicanos de *F. psychrophilum*, utilizando como referencia la cepa tipo 1947t

PRUEBA BIOQUÍMICA	CEP A TIPO	AISLADOS MEXICANOS												
	1947t	42	51	66	14	41	00	34	10	10	12	13	17	18
Catalasa	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+	+	+	D+	D+	+	D+	D+
Citocromo oxidasa (reducción de oxígeno molecular)	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+
TSI (hidratos de carbono)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIA (aminoácidos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRATO (fuente de carbono)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MIO	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-	M- I- O-
OXIDACION	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FERMENTACION (fosforilación glucosa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SIM	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-	S- I- M-
VP (formación de acetoniá-glucosa)	VP- RM-	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -	VP -
RM (producción de ácido)		RM -	RM -	RM -	RM -	RM -	RM -	RM -	RM -	RM -	RM -	RM -	RM -	RM -
UREA (partículas de amoniaco)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CALDO NITRATO		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Positivo (+)
 Negativo (-)
 Movilidad Negativa M-
 Indol negativo I-
 Ornitina negativa O-
 Sulfuro negativo S-
 Vogues proskauer negativo VP-
 Rojo de metilo negativo RM-

En los procesos de bioquímica avanzada, se encontró que algunos de los aislados mexicanos de *F. psychrophilum* son activamente proteolíticos con capacidad de degradar diferentes proteínas cuando son incorporadas al medio de cultivo, como gelatina, caseína y albumina como lo manejan Dalsgaard *et al.*, 1993) y Lorenzen *et al.*, 1997). De los 13 aislados analizados, únicamente 8 (001,34, 100, 101, 122,134, 174 y 185) presentaron similitud con la cepa tipo, al parecer degradan el medio suplementado con proteína; mientras que los otros 5 aislados (42, 51, 66, 148 y 418) no manifiestan ningún cambio en el medio suplementado donde son cultivados.

En relación con lo anterior, se comprobó que los aislados proteolíticos no absorbieron el rojo Congo, colorante utilizado como una prueba importante en el diagnóstico y caracterización de *F. psychrophilum*; mientras que los otros cinco aislados si lo absorbieron, tiñéndose de amarillo a un rojo suave, conservando dicha coloración aun cuando las colonias se lavaban con agua destilada.

Respecto a la producción de flexirrubina, únicamente los aislados identificados como 001, 34, 100, 101, 122, 134, 174 y 185 poseen este tipo de pigmentación, y aunque muchos autores no han podido demostrar la presencia de estos pigmentos en sus cepas se considera estos como parte fundamental del perfil bioquímico típico de dicha bacteria.

De acuerdo con los datos de la tabla número 4, se puede observar que de los trece aislados mexicanos se diferencian 2 grupos de *F. psychrophilum*, uno que concuerda con la cepa tipo y el otro difiere en algunas características de relevancia como la absorción de rojo congo y la presencia de pigmentos de tipo flexirrubina. Por tanto, hasta este momento del estudio se puede afirmar que únicamente 8 aislados de los 13 corresponden a la especie *psychrophilum*, mientras que los otros 5 solo han quedado como miembros de la familia de flavobacterias. Sin embargo, por su comportamiento clínico tienen relación a las llamadas cytophaga-like. A partir de este momento, en el estudio, solamente se

consideraron los 8 aislados definidos como *F. psychrophilum* por su mayor similitud con el perfil de la cepa tipo, para continuar con el análisis genético y el API ZYM.

Tabla 4. Resultado de pruebas bioquímicas avanzadas aplicadas a los aislados mexicanos de *F. psychrophilum*. Utilizando los datos de la cepa tipo 1947t como referencia se marcan 2 grupos con perfiles bioquímicos distintos.

Prueba bioquímica avanzada	Cepa tipo	Grupo no proteolítico de aislados mexicanos					Grupo proteolítico de aislados mexicanos							
		42	51	66	148	418	001	34	100	101	122	134	174	185
Crecimiento en TSA	1947 (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tolerancia a NaCl 0.5%	(+)	(+)	M+	M+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Tolerancia a NaCl 1.0%	D+	D+	(-)	(-)	M+	D+	D+	D+	M+	M+	M+	M+	M+	M+
Tolerancia a NaCl 1.5%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tolerancia a NaCl 2.0%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tolerancia a NaCl 3.0%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tolerancia a NaCl 4%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tolerancia a NaCl 5%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Hidrolisis de gelatina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hidrolisis de albumina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hidrolisis de caseína	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Pigmentos de tipo flexirrubina	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Absorción de rojo congo.	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Negativo (-)

Positivo (+)

Moderadamente positivo M+

Débilmente positivo D+

El sistema API ZYM (bioMèrieux) se realizó como reforzamiento del perfil bioquímico básico. En éste se confirmó que no hay enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos como se anticipaba con el tren de bioquímicas básicas; sin embargo, se encontró positividad a la fosfatasa alcalina, la esterasa C4, la lipasa esterasa C8, la leucina arilamidasa, la valil arilamidasa, la fosfatasa ácida y la naphтол AS-BI-fosfohidrolasa (datos usados en artículo Castillo *et al.*, 2017). Por lo tanto se encontró que los aislados mexicanos recuperados tienen patrones bioquímicos clásicos para *F. psychrophilum* según Bernardet y Grimont, 1989) y Lorenzen y Olensen, 1997).

7.5 Caracterización genética.

7.5.1 PCR convencional o tiempo final.

A manera de diagnóstico confirmatorio de *F. psychrophilum* se realizó un PCR específico con el material genómico de los 13 aislados mexicanos utilizando el protocolo y primers descritos por Urdaci *et al.*, 1988); en este proceso, los 5 aislados: 42, 51, 63, 148, 418, dieron negativo a la reacción de PCR. En tanto, los aislados 001, 100, 101, 174, y 185 confirmaron su positividad con estos primers al dar el fragmento amplificado de 1088 pb esperado (Figura 6). Por tanto, se descartan los aislados 42, 51, 66, 148 y 418 al no presentar ninguna banda. Debido a lo anterior, estos últimos aislados no se tomaron en cuenta para continuar con el trabajo de caracterización de *F. psychrophilum*.

Al analizar el gel de agarosa de los aislados que mostraron positividad con los primers específicos, los aislados 34, 122, 134, mostraron un patrón diferente en cuanto al grosor de la banda, por lo cual se decidió hacer qPCR con el protocolo de Orioux *et al.*, 2011) (figura 7) para confirmar su positividad. Con la visualización del gel de agarosa se confirmó que estos 3 aislados también pertenecen a la especie *psychrophilum* al mostrar el fragmento esperado de 146 pb.

Gráficamente en el modelo lineal de amplificación se muestra que los controles negativos no cruzan el valor cero de fluorescencia durante todo el proceso. En este proceso la cepa tipo y el referencial positivo a Urdaci *et al.*, 1998) fueron las primeras muestras en cruzar el umbral, seguidos por el aislado 34, 122 y 134 respectivamente, con un patrón homogéneo y sin presentar picos anormales, demostrando que no existen variaciones significativas con lo cual se descarta la presencia de otro patógeno (figura 8).

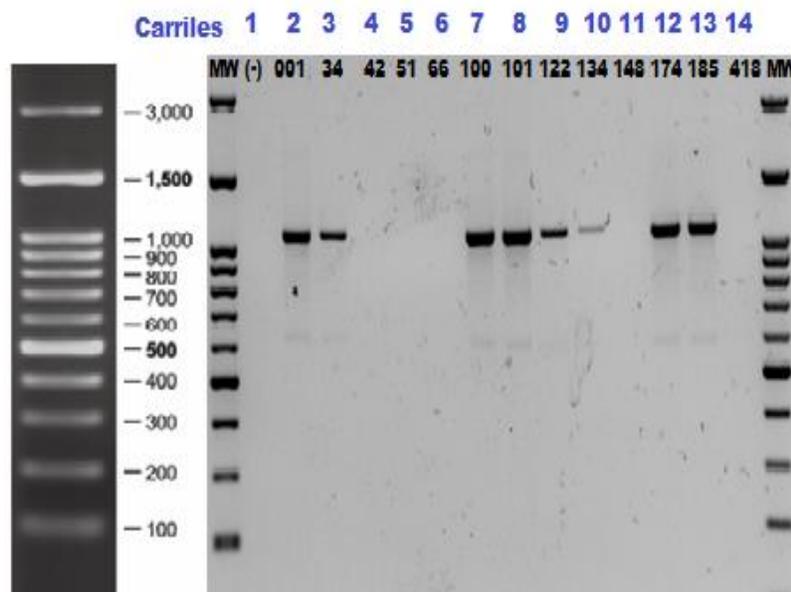


Figura 6. Gel de agarosa 1.5% PCR simple, utilizando iniciadores Fp1 y Fp2 (Urdaci *et al.*, 1998). Los carriles 2, 3, 7, 8, 9, 10, 12 y 13 muestran los aislados clasificados como *Flavobacterium psychrophilum* al dar el tamaño de banda de 1088 pares de bases esperado.



Figura 7. Gel de agarosa 2% qPCR, utilizando los iniciadores Fp_16S1_fw, Fp_16Sint1_rev (Orioux *et al.*, 2011). Los carriles 5,6 y 7 correspondientes a las muestras en duda muestran el mismo patrón de bandeado que las muestras de *Flavobacterium psychrophilum* antes confirmadas.

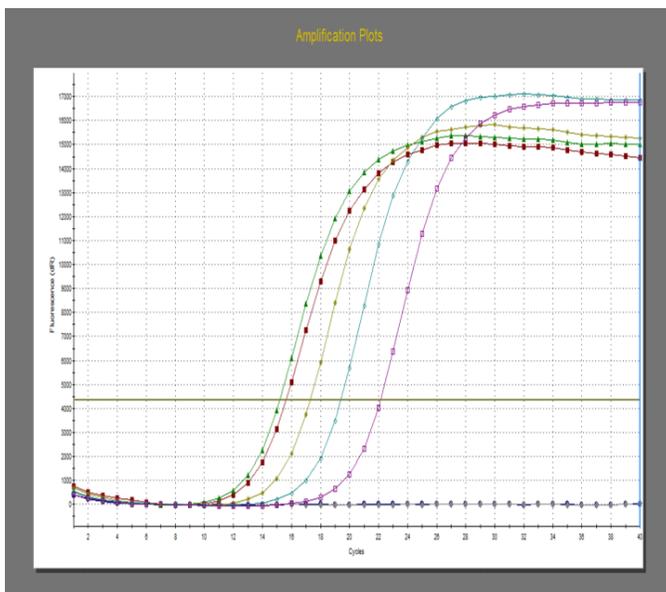


Figura 8. Modelo lineal de amplificación de productos de qPCR de las muestras 34,122 y 134.

La cepa tipo (rojo) y el referencial positivo a Urdaci *et al.*, 1998) en verde, son los primeros en cruzar el umbral, seguidos por el aislado 34 (azul), 122 (amarillo) y 134 (rosa) respectivamente, con un patrón homogéneo sin presentar picos anormales. Los controles negativos (azul y Gris) no cruzan el umbral de amplificación.

Los resultados anteriores arrojan que únicamente 8 aislados fueron *F. psychrophilum*, lo que refuerza lo observado en el perfil bioquímico (tabla 4).

7.5.2 RFLP-PCR

Para la caracterización genotípica de los 8 aislados, se utilizó la técnica de RFLP-PCR basado en la amplificación del gen de la subunidad B de girasa (*gyrB*), utilizando 2 pares de primers en reacciones independientes GYR1-GYR1R y PSY-GIF PSY-GYR (Izumi *et al.* 2003). Cabe mencionar que se anexo una cepa chilena como referencia y la cepa tipo como control positivo. En los productos de pcr de PSY-GIF PSY-GYR . Se observó un solo fragmento de 1017 pb con buena definición en las bandas lo que indica una positividad a dichos cebadores del 100% de los aislados del estudio (figura 9).

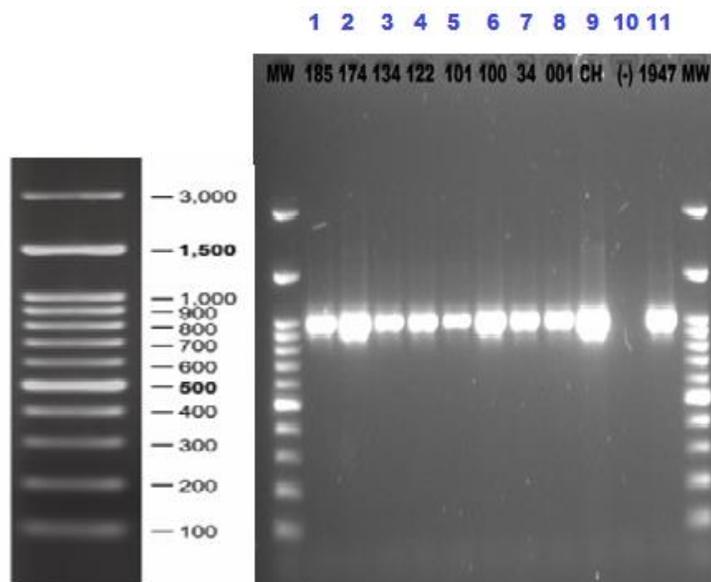


Figura 9. Gel de agarosa al 1.5% utilizando los iniciadores PSY-GIF y PSY-GIR (Izumi *et al.*, 2003). En todos los carriles con material genómico se muestra positividad, al mostrarse un fragmento único de 1017 pb.

Al realizar un PCR de GYR-1 , GYR-1R, se obtuvieron 2 fragmentos de 1178 y 298 pb aunque de menor intensidad y nitidez, las bandas en las posiciones esperadas dieron la positividad deseada (figura 10). Estos 2 últimos procedimientos realizados con el material genómico de los aislados fueron la base para iniciar con la digestión de endonucleasas.

Con el producto de PCR resultante de los iniciadores GYR utilizamos la enzima HinfI en la digestión para determinar el genotipo de los aislados, lo cual nos arrojó un resultado homogéneo para los 8 aislados así como para las cepas de referencia (cepa tipo y cepa de origen chileno). Esta enzima permitió determinar que los aislados mexicanos pertenecen al genotipo B, ya que se derivaron fragmentos de 429, 217 y 186 pb (figura 11), y lógicamente se descarta la presencia del genotipo A.

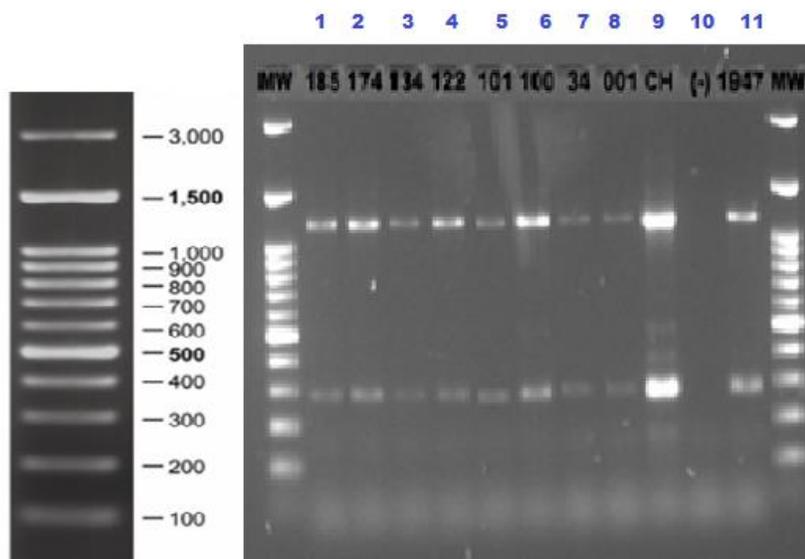


Figura 10. Gel de agarosa al 1.5% utilizando los iniciadores GYR-1 y GYR-1R (Izumi *et al.*, 2003). En todos los carriles con material genómico se muestra positividad, al mostrarse 2 fragmentos de 1178 y 298 pb.

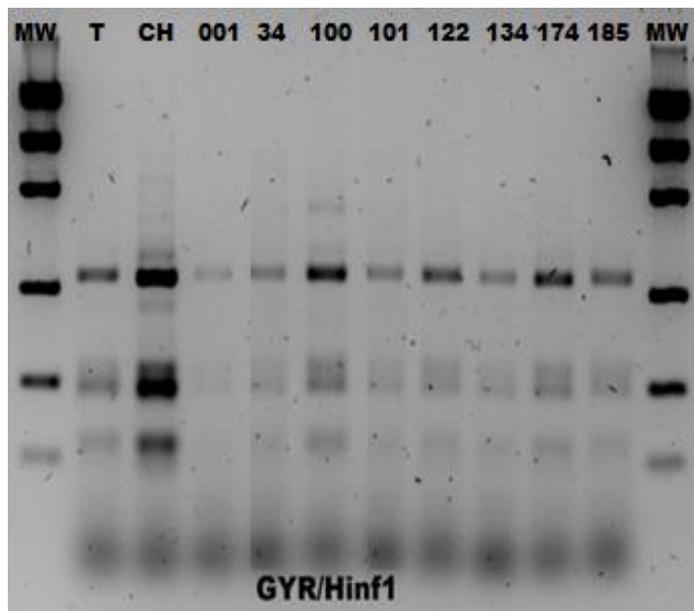


Figura 11. Gel de agarosa al 1.5% utilizando producto de PCR de los GYR-1 y GYR-1R sometidos a digestión con a la endonucleasa HinfI (Izumi et al., 2003). En todos los carriles se muestran 3 fragmentos de 429, 217 y 186 correspondientes al genotipo B.

El producto de PCR resultante de los iniciadores PSY se sometió a digestión con la enzima RsaI para determinar el genotipo asociado a la especie huésped (R o S). En los aislados mexicanos se encontraron ambos genotipos a pesar de que las muestras son solo provenientes de trucha arcoíris. La cepa tipo y el aislado mexicano 001 pertenecen al genotipo S (asociado a salmón del atlántico, con fragmentos de 429 y 367 pb) mientras la cepa chilena y el resto de los aislados se ubican con el genotipo R (asociado a Trucha, con fragmentos 429 y 327 pb)(figura 12). En conclusión con este método tenemos que los aislados mexicanos

pertenecen en su mayoría al tipo B y S lo cual es muy común entre la especie *Oncorhynchus mykiss*.

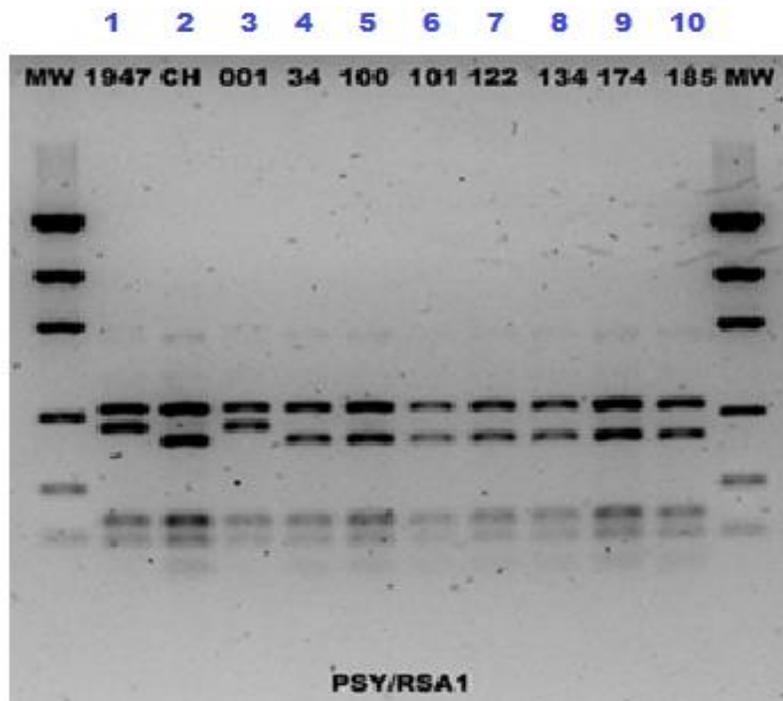
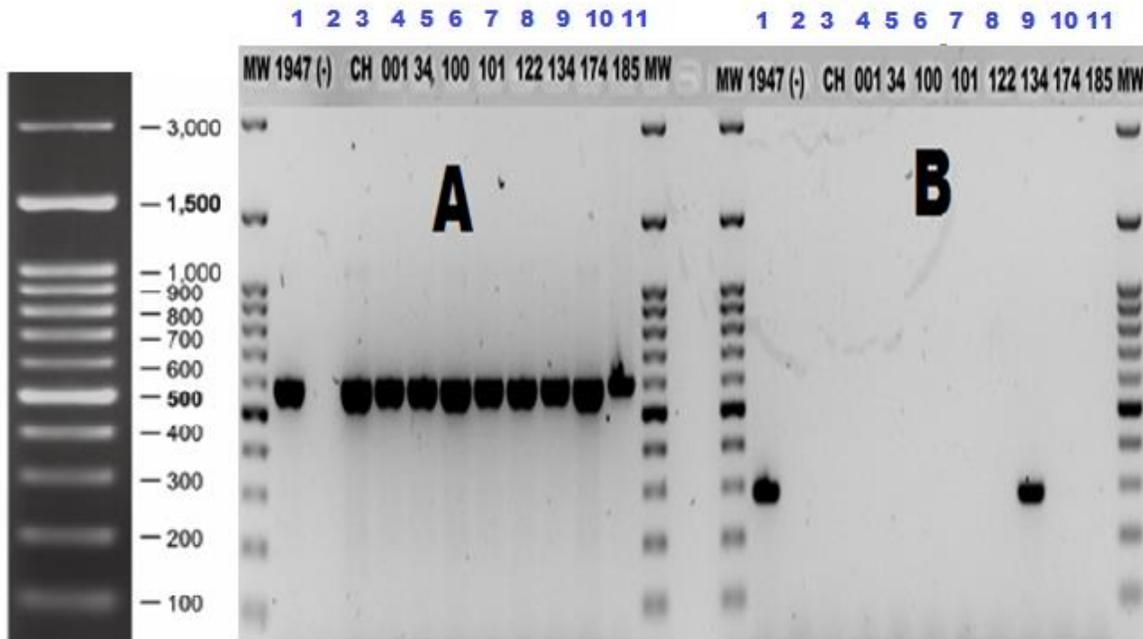


Figura 12. Gel de agarosa al 1.5% utilizando producto de PCR de los PSY-GIF y PSY-GIR sometidos a digestión con la endonucleasa RsaI (Izumi *et al.*, 2003). Los carriles 1 y 3 correspondientes a la cepa tipo y el aislado 001 muestran fragmentos de 429 y 367 pb por tanto se consideran Genotipo S. El resto de los carriles correspondientes al material genómico chileno y los demás aislados mexicanos evidencian fragmentos de 429 y 327 pb lo que corresponde al genotipo R.

7.5.3 Estudio del gen 16S ARNr

El estudio del gen 16S del ARNr que se realizó con el fin de determinar los linajes genéticos encontrados en la investigación de Soule *et al.*, 2005 corroborado y simplificado por Rasrumd *et al.*, 2007 cuyo protocolo fue utilizado en este estudio arroja resultados interesantes ya que en los aislados de México se encontraron los 2 alelos correspondientes a la cepas de referencia CFS259-93 y ATCC

49418T; como se muestra en la figura 13A, todas las muestras manifiestan el fragmento de 600 pares de bases característico del linaje II, cuya cepa representativa es la CFS259-93 considerada de gran virulencia, sin embargo; el aislado 134 al igual que la cepa tipo evidencia el fragmento de 298 pb característico del linaje I cuya cepa representativa es la ATCC 49418T considerada avirulenta (figura 13B). Con lo cual podemos resumir que en México tenemos la presencia de ambos alelos tanto para el linaje I como para el linaje II, teniendo predominancia el linaje II, sin embargo este estudio tendría que ampliar el número de aislados para encontrar mayor variabilidad.



7.6 Caracterización serológica

El Western Blot realizado utilizando sueros homólogos de cepas chilenas y el homólogo a la cepa tipo 1947t, indica que algunos de los aislados mexicanos tiene una respuesta positiva ante los sueros chilenos, tal es el caso del aislado 001 que cruzo con los 4 sueros, y más interesante aun el aislado 134 que presento positividad incluso con el suero ATCC (tabla 5), por lo tanto se puede inferir que no solo genéticamente son similares al poseer los alelos tanto para el linaje I como para el II, si no que serológicamente también tienen concordancia.

Tabla 5. Resultado serológico utilizando la técnica de Western Blot con sueros de cepas chilenas probados en los aislados de México.

ATCC					
1947 t	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
42	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
001 ch	(-)	(-)	(+)	-	(+)
001	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
101	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
122	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
134	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
174	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
185	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Con la técnica de inmunoaglutinación en placa utilizando los antígenos O con las muestras positivas en el western blot, en una relación de 10µl de suero/10µl antígeno O, reforzamos dichos resultados al tener 100% de concordancia con la primera técnica.

7.7 Desafío experimental

Derivado de la inoculación intramuscular con 0,1 ml (5×10^7 CFU, conteo directo en placa) de un cultivo en caldo TYES del aislado 001 previamente caracterizado el cual se encontró que es genética y serológicamente similar a la cepa tipo 1947t en el grupo experimental. Se obtuvieron registros de la manifestación clínica así como de las secuelas post infección con el patógeno *F psychrophilum*. Los cuales refieren que durante las primeras 48 h, los alevines de trucha (*O. mykiss*) presentaron oscurecimiento de la piel y pérdida de la escala, en el día 5, aparecieron heridas profundas de tipo úlcera en los laterales, y en el sitio de inoculación, en el día 8, se produjo la primera mortalidad y se alcanzó el 100% de mortalidad en el día 10 (fig. 13).

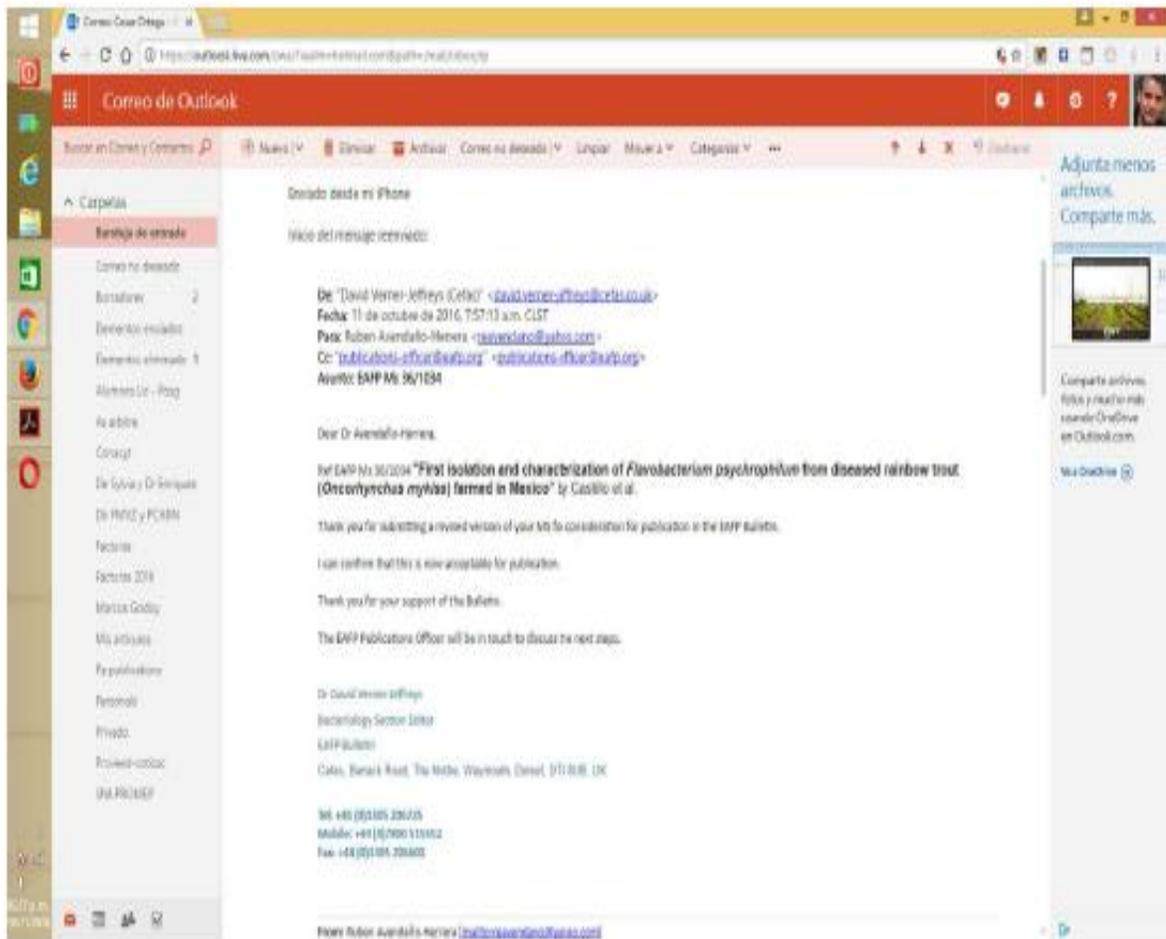
En el grupo control no hubo mortalidad, ni manifestación de enfermedad clínica aparente.



Figura 14. Alevines de trucha arcoíris con lesiones de piel producidas por *F psychrophilum* en condiciones controladas de laboratorio. Evidencia de heridas laterales de tipo úlcera además de la pérdida de la aleta dorsal en algunos casos. (Imagen del artículo Castillo *et al.*, 2017)

F. psychrophilum se recuperó de la muestra de riñón, bazo y lesión. Los ensayos bioquímicos y de PCR confirmaron todos los aislamientos como *F. Psychrophilum* estableciendo este como *principal patógeno en este desafío*.

7.8 Artículo aceptado y publicado



First isolation and characterisation of *Flavobacterium psychrophilum* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Mexico

A. Y. Castillo^{1,4}, C. Ortega^{1*}, R. Fajardo¹,
S. Martínez-Castañeda¹, B. Valladares¹, R. Irgang^{2,3},
M. Poblete-Morales^{2,3} and R. Avendaño-Herrera^{2,3*}

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Carretera Toluca-Atlacomulco Km. 15.5, Toluca 50200, Mexico; ²Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuicola, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile; ³Centro FONDAP, Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Chile; ⁴Estudiante de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (PCARN), FMVZ-UAEM, Toluca, Mexico

Abstract

In 2015, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, weighing 4 ± 0.5 g) mortalities occurred at an aquaculture facility near the "Nevado de Toluca" National Park in Mexico. Affected fish showed exophthalmia, body darkening, abdominal distension, and pale gills. Pure culture, splenic isolates were recovered and biochemically- and PCR-identified as *Flavobacterium psychrophilum*. These isolates were virulent, representing a potential threat to *O. mykiss* aquaculture. This is the first study to identify and characterise *F. psychrophilum* as causative of a severe disease outbreak in Mexico-farmed *O. mykiss*.

Introduction

Flavobacterium psychrophilum is a fish bacterium that causes bacterial cold water disease (BCWD) and rainbow trout fry syndrome (RTFS), which cause substantial economic losses to the salmonid industry. Reported in many parts worldwide (see review Nematollahi et al., 2003; Barnes and Brown, 2011), including recently Argentina (Moreno et al., 2016), this pathogen is a suspected cause of aquaculture mortalities in Mexico (Ortega et al., 1998).

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production in Mexico is dependent on imported eggs (≈ 17.5 M in 2009), and nine Mexican states account for most trout production ($\approx 9,757$ t in 2013; CONAPESCA, 2013). For over a decade, BCWD and RTFS have been suspected, but isolates remain unidentified (Ortega and Valladares, 2015).

* Corresponding author's e-mail: ravendano@unab.cl - reavendano@yahoo.com (R. Avendaño-Herrera) and cos_mx@hotmail.com (C. Ortega)

24, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 37(1) 2017

In 2015, rainbow trout mortalities occurred at a Mexican aquaculture farm. Clinical RTFS signs were found, namely, fish mortality with exophthalmia, body darkening, abdominal distension, and pale gills. Bacteria were obtained, and this is the first study to isolate and identify *F. psychrophilum* causing RTFS in Mexican *O. mykiss*.

Materials and methods

Specimens

In January 2015, an epizootic outbreak occurred in central Mexico in *O. mykiss* (4 ± 0.5 g) farmed in concrete ponds with untreated spring water ($13 \pm 1^\circ\text{C}$). Over 15 days, mortalities reached 9,000 of 18,000 total fish. All fish were originally hatched in another water source at a broodstock centre near the affected farm. Moribund fish ($n = 10$) were given a benzocaine overdose, transported to the lab, and subjected to post-mortem, pathological, and bacteriological exams.

Histology

Internal samples were fixed in vials with 10% buffered formalin, dehydrated, and embedded in paraffin wax using standard procedures. Each tissue was sectioned at 5 mm and haematoxylin and eosin stained (Fernando et al., 1972). Sections were observed under an Olympus BH2 light microscope.

Microbiology

Kidney and spleen scrapings were microscopically and microbiologically analysed. Slides were stained for Gram observations. Kidney and spleen bacterial samples were aseptically taken, streaked onto agar plates with Tryptone-Yeast Extract-Salt (TYES; 0.4% tryptone, 0.05% yeast extract, 0.02% anhydrous calcium chloride, 0.05% magnesium sulphate heptahydrate, and 1.2% agar, pH 7.2), and aerobically incubated at

15°C for ≤ 10 days. Representative predominant morphotype colonies were selected, streaked onto a new TYES plate to obtain pure cultures, and stored at -80°C in Criobille tubes (AES Laboratories).

Phenotyping

Isolates were phenotypically characterised (Bernardet et al., 2002). The *F. psychrophilum* type strain, NCIMB 1947^T, was comparatively used. Biochemical reactions included colony morphology and pigmentation; Gram staining; cytochrome oxidase; Congo red absorption; presence/absence of flexirubin-type pigment; catalase reaction (3% H_2O_2); and cell morphology and gliding motility. Growth was tested in TYES under aerobic conditions at 4, 15, 18, 25, and 37°C and in TYES broth supplemented with 0, 1, 2, 3, 4, and 5% NaCl. Gelatin, starch, aesculin, and Tween 80 were hydrolysed using TYES media.

All phenotype tests were aerobically incubated at 18°C and observed after 1, 4, 7, and 10 days before being recorded negative. The API ZYM system (bioMérieux) was used following manufacturer instructions, but incubation was fixed at 18°C and read after 72 h.

In addition, antimicrobial susceptibility of the *F. psychrophilum* isolates was determined on diluted Mueller–Hinton agar and the following disk concentrations were tested (Oxoid, mg per disk): oxytetracycline (30), florfenicol (30), oxolinic acid (2) and ampicillin (10). The diameter of each zone of inhibition was determined after 68–72 h of incubation at 15°C .

PCR

Total DNA was extracted from pure bacterial isolates using the InstaGene Matrix (Bio-Rad)

according to manufacturer instructions. DNA was stored at -20°C until PCRs. *F. psychrophilum* was confirmed using the species-specific FP1 and FP2 primers (Urdaci et al. 1998). PCR amplifications used a Mastercycler Personal Apparatus (Eppendorf) and the GoTaq Green Master Mix Kit (Promega), which included all reaction reagents, except specific primers and the DNA template. Negative controls used the same reaction mixture and sterile distilled water instead of template DNA. The products were electrophoresed in a 1.5% (w/v) agarose gel visualised with a 1/10,000 GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) and photographed under UV light. An AccuRuler 100-bp Plus DNA RTU ladder (Maestrogen) was used as a molecular mass marker. A single 1088 bp band positively identified *F. psychrophilum*.

Genetic characterisation

In epidemiology, many genomic typing methods exist for *F. psychrophilum*. PCR assays, per Ramsrud et al. (2007), distinguished 16S rRNA alleles, which can indicate polymorphisms or genetic lineages I and II distributions (Soule et al., 2005a). Two independent PCRs were performed using CFS259-93 and ATCC 49418^T alleles-specific primers.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was conducted using two primer pairs (Izumi et al., 2003); 1) a degenerate universal primer pair, GYR-1 and GYR-1R, and 2) a specific primer pair for *F. psychrophilum* gyrB, PSY-G1F and PSY-G1R. Amplification cycles for denaturation, primer annealing, and primer extension were carried out using published protocols (Izumi et al., 2003). After electrophoresis, each *F. psychrophilum* was restriction enzyme digested with *RsaI* or

HinfI endonucleases (New England BioLabs), according to the manufacturer's instructions. The digested solution (10 μL) was analysed by horizontal electrophoresis.

Virulence tests

F. psychrophilum Flavo-COS-042-15.1 was used to investigate bacterial virulence capacity against healthy *O. mykiss* (5-6 g). Fish samples (i.e. gills, mucus, skin, spleen, and kidney) were microscopically, bacteriologically, and PCR assessed (Urdaci et al., 1998) to ensure a pre-challenge absence of *F. psychrophilum* or other pathogens. Fish were separated in tanks (10 L, 15 fish per tank) containing aerated dechlorinated water and acclimatised for seven days. The inoculum was prepared from overnight TYES broth cultures (18°C , 120 rpm). Each experimental fish was intramuscularly injected with 0.1 mL (5×10^7 CFU, direct plate count). Control fish were injected with only TYES broth. All trials were conducted in a closed system at $17 \pm 1^{\circ}\text{C}$, a pH of 7.6-7.8, and using a 12L:12D light regime. Fish were fed daily at 1.5% body weight, and tank water was changed bi-daily.

Clinical signs and dead fish were monitored/removed daily and microbiologically analysed to confirm *F. psychrophilum*-caused mortality. Kidney, spleen, and external lesions were directly streaked onto TYES plates and incubated at 18°C for one week. If pure pigmented isolate cultures were obtained, biochemical and PCR methods of identification were used.

Results and discussion

Externally, *O. mykiss* exhibited body darkening, bilateral exophthalmia, and abdominal distension. Internally, splenomegaly and located/diffuse splenic haemorrhages, some of which

26, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 37(1) 2017

were yellowish, were found (Figure 1A, B). Ascites, generally pale internal organs, adhesions to the stomach and spleen, and necrosis of the abdominal wall and of the area surrounding the spleen were also recorded. These results coincide with clinical RTFS (Bustos et al., 1995).

The spleen was the most affected (Figure 2), with splenic capsule destruction; diffuse, chronic and congested necrosis; an absence of lymph cells; a predominance of splenic stromal cells; necrotizing, but not suppurative, pancreatitis and steatitis; necrotic myositis under the spleen, with muscle fibre breakage; peritonitis; and renal edema with melanomacrophage proliferation. Splenic wet mount and Gram staining microscopy from all moribund fish showed abundant long rods of Gram-negative bacteria able to flex. Pure splenic cultures of orange-yellowish colonies grew on TYES after six days from 2 of 10 specimens, while from the remaining rainbow trout colonies were recovered in mixed cultures. Two orange-yellowish bacterial isolates (Flavo-COS-042-15.1 and Flavo-COS-042-15.2), which were biochemically homogeneous and identical to NCIMB 1947^T, were used in biochemical and genetic assays.

Phenotypically, all isolates were Gram-negative, long, slender rods with gliding motility that produced weak cytochrome oxidase and catalase reactions. All isolates contained a cell wall-associated flexirubin-type pigment but did not absorb Congo red. Colonies grown for five days on TYES plates were bright orange-yellowish with entire edges, a raised and shiny surface, and ≈ 3 mm diameter. Growth occurred at 4-18°C and only without NaCl. All biochemical traits are shown in Table 1.

On the other hand, our results obtained from disk diffusion showed an identical antibiotic susceptibility pattern for both Mexican isolates to florfenicol, oxytetracycline and ampicillin with mean inhibition zones of 59, 52 and 31 mm, respectively. In addition, as reported by other authors for *F. psychrophilum* (Henríquez-Núñez et al., 2012), none of the isolates tested generated produced any inhibition zones (<7 mm) for oxolinic acid.

For API ZYM, the detected enzyme numbers (i.e. 19) and activity levels were similar to the type strain. No enzymes were involved in carbohydrate metabolism, but were positive to alkaline phosphatase, esterase C4, lipase esterase C8, leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. Thus, the two recovered Mexican isolates had classical biochemical patterns for *F. psychrophilum* (Bernardet and Grimont, 1989; Lorenzen and Olensen, 1997).

A specific PCR (Urdaci et al., 1998) identified the *F. psychrophilum* 16S rRNA gene, and isolates amplified a single 1088 bp fragment, supporting *F. psychrophilum* classification.

Typing processes are essential for understanding pathogen outbreaks, cross-transmission, geographical and host distributions, virulence, and vaccination programmes (Olive and Bean, 1999). Ramsrud et al. (2007) proposed PCRs to type *F. psychrophilum* genetic lineages (I and II) and 16S rRNA variants (6 base differences) (Soule et al., 2005a, b). Both *F. psychrophilum* isolates were positive for the CSF-259-93 allele of lineage II, and RFLP classified isolates as genotypes B and R. There is also evidence that European and Chilean *O. mykiss* isolates fit these

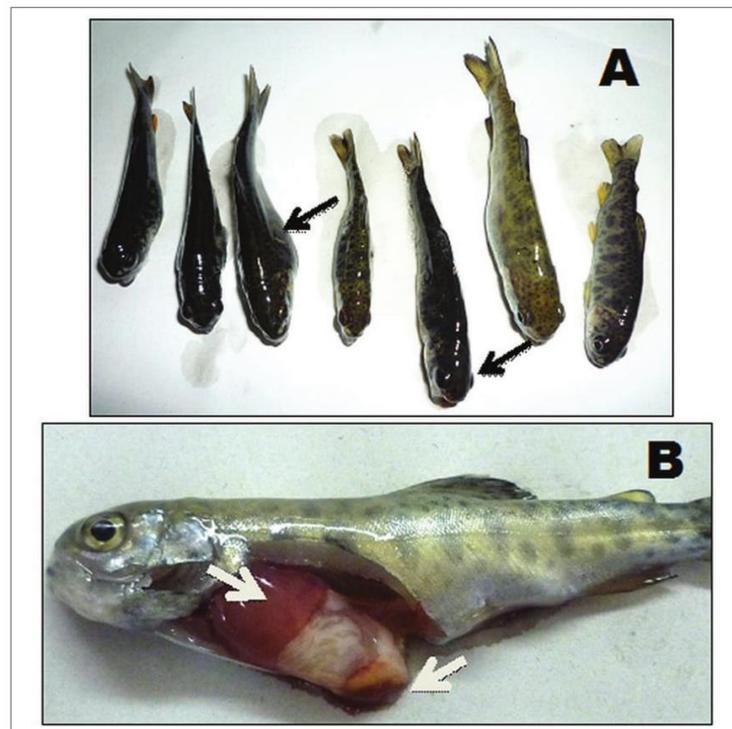


Figure 1. *O. mykiss* with (A) body darkening, bilateral exophthalmia (arrow) and abdominal distension (arrow) and (B) splenomegaly, diffuse splenic haemorrhages (arrow), and pale internal organs (arrow).

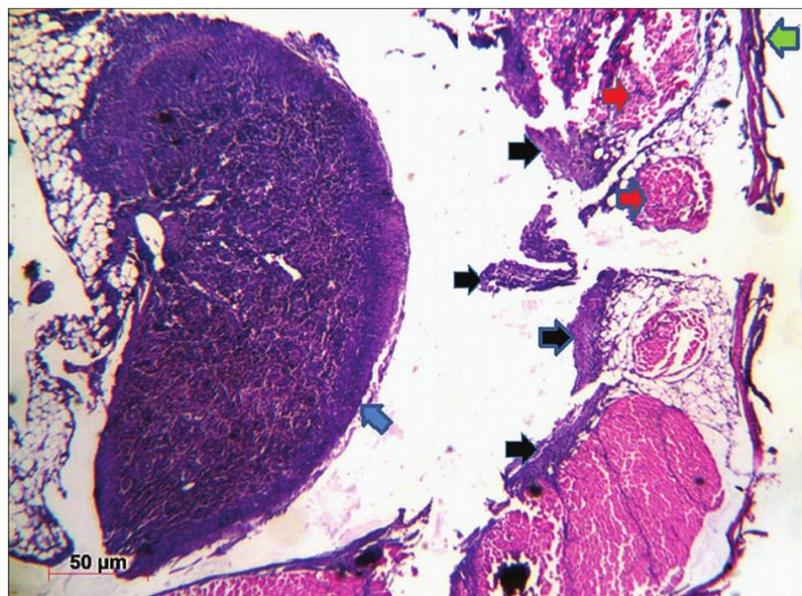


Figure 2. Representative H&E-stained *O. mykiss* tissues. Transversal splenic tissues with fibronectic splenitis (blue arrow), necrotic steatitis (black arrows), and necrotic myositis of the abdominal muscle (red arrows). Green arrow indicates epidermal tissue. Bar = 50 µm.

28, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 37(1) 2017

Table 1. Phenotypic and biochemical properties of Mexican isolates. +, Positive; -, Negative, and w, weakly positive.

Characteristics	Flavo-COS-042-15.1	Flavo-COS-042-15.2	NCIMB 1947 ^T
Gram	-	-	-
Morphology	long rods	long rods	long rods
Motility	gliding	gliding	gliding
Catalase	w	w	w
Oxidase	w	w	w
Flexirubin pigment	+	+	+
Congo red adsorption	-	-	-
<i>Growth at (°C)</i>			
4	+	+	+
10	+	+	+
15	+	+	+
18	+	+	+
22	-	-	-
37	-	-	-
<i>Growth with NaCl</i>			
0	+	+	+
1	-	-	-
3	-	-	-
5	-	-	-
7	-	-	-
10	-	-	-
<i>Hydrolysis of</i>			
Aesculin	-	-	-
Gelatine	+	+	+
Tween 80	+	+	+
Starch	-	-	-
<i>Genotypes using</i>			
PCR-RFLP	B/R	B/R	B/S
16S rRNA allele	CSF-259-93	CSF-259-93	Both*

* Positive for ATCC 49418 and CSF-259-93 alleles (Soule et al., 2005b)

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 37(1) 2017, 29

genotypes (Izumi et al., 2003; Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009), suggesting Mexican *F. psychrophilum* might have originated from fish and eggs imports. Genotypes B and S and both alleles (ATCC 49418^T and CSF-259-93) were found in the type strain (Izumi et al., 2003; Valdebenito and Avendaño-Herrera, 2009).

F. psychrophilum Flavo-COS-042-15.1 caused 100% mortality. In the first 48 h, *O. mykiss* suffered skin darkening and scale loss. By day 5, deep, ulcer-like wounds were present on the lateral side and inoculation site (data not shown). On day 8, the first mortality occurred, and 100% mortality was reached on day 10. The control group had no mortalities.

F. psychrophilum Flavo-COS-042-15.1 was recovered from kidney, spleen, and lesion samples, but the lesion produced mixed cultures, which could be due to direct environment contact. Biochemical and PCR assays confirmed all isolates as *F. psychrophilum* (Table 1), supporting pathogenicity.

As occurring in other countries and in fish farming worldwide, the increasing or the intensification of aquaculture activities in Mexico have been accompanied by the appearance of new diseases in Mexico such as Francisellosis in tilapia (Ortega et al., 2016). This is the first study to identify and characterise *F. psychrophilum* as a causative outbreak agent in Mexican *O. mykiss* aquaculture. Severe clinical signs and mortalities indicate isolate virulence. Thus, *F. psychrophilum* represents a relevant potential risk for local *O. mykiss* farming, and future studies should establish clinical significance for trout aquaculture in Mexico.

Acknowledgments

This work was supported by the Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Chile [CONICYT/FONDAP 15110027 and FONDECYT 1150695] and by Grant 3675/2014/CID (Diagnóstico y Caracterización Molecular de Enfermedades Emergentes de Peces) from the Universidad Autónoma del Estado de México.

References

- Barnes ME and Brown ML (2011). A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. *The Open Fish Science Journal* **4**, 1–9.
- Bernardet J-F and Grimont PAD (1989). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida and Masumura 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**, 346–354.
- Bernardet J-F, Nakagawa Y and Holmes B (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1049–1070.
- Bustos PA, Calbuyahue J, Montaña J, Opazo B, Entrala P and Solerisenc R (1995). First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **15**, 162–164.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) (2013). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. México. [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2013]. Revised: May 27th 2016.

30, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 37(1) 2017

- Fernando CH, Furtado JI, Gussev AV, Hanek G and Kakong SA (1972). Methods for the study of freshwater fish parasites, 1st edn. University of Waterloo, Biology series, 76 pp.
- Henríquez-Núñez H, Evrard O, Kronvall G and Avendaño-Herrera R (2012). Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* **354**, 38–44.
- Izumi S, Aranishi F and Wakabayashi H (2003). Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**, 207–214.
- Lorenzen E and Olesen NJ (1997). Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. *Diseases of Aquatic Organisms* **31**, 209–220.
- Moreno P, Molinari L, Hualde P and Miyazaki T (2016). First report of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Argentina. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **36**, 63–70.
- Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F and Haesebrouck (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infection in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* **26**, 563–574.
- Olive DM and Bean P (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1661–1669.
- Ortega C, Salgado C, Vega F and Romero V (1998). Descripción de un cuadro clínico de enfermedad branquial en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), causado por *Flexibacter* sp. Proceedings: Programa Nacional de Sanidad Acuicola, 50 pp.
- Ortega C and Valladares B (2015). Analysis on the development and current situation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farming in Mexico. *Reviews in Aquaculture* (online doi:10.1111/raq.12133).
- Ortega C, Mancera G, Enríquez R, Vargas A, Martínez S, Fajardo R, Avendaño-Herrera R, Navarrete MJ and Romero A (2016). First identification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* causing mortality in Mexican tilapia *Oreochromis* spp. *Diseases of Aquatic Organisms* **120**, 205–215.
- Ramsrud AL, LaFrentz SA, LaFrentz BR, Cain KD and Call DR (2007). Differentiating 16S rRNA alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. *Journal of Fish Diseases* **30**, 175–180.
- Soule M, Cain K, LaFrentz S and Call D (2005b). Combining suppression subtractive hybridization and microarrays to map the intraspecies phylogeny of *Flavobacterium psychrophilum*. *Infection and Immunity* **73**, 3799–3802.
- Soule M, LaFrentz S, Cain K, LaPatra S and Call D (2005a). Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* with elastin and tetracycline resistance. *Diseases of Aquatic Organisms* **65**, 209–216.
- Urdaci MC, Chakroun C, Faure D and Bernardet J-F (1998). Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Research in Microbiology* **149**, 519–530.
- Valdebenito S and Avendaño-Herrera R (2009). Phenotypical, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *Journal of Fish Diseases* **32**, 321–333

8. DISCUSIÓN

En la actualidad Flavobacteriosis es el nombre común para definir a las enfermedades causadas por microorganismos Gram-negativos del grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Flexibacter*, siendo *Flavobacterium psychrophilum* la especie de mayor relevancia entre especies de producción especialmente salmón del atlántico y Trucha arcoíris debido a la alta mortalidad que manifiesta afectando de manera importante la rentabilidad de los cultivos.

Aunque se conoce que *Flavobacterium psychrophilum* patógeno causante de la enfermedad sistémica conocida como el síndrome del alevín de la trucha, tiene distribución mundial reportándose en países como Australia, Canadá, Dinamarca (Lorenzen *et al.*, 1991), Finlandia (Wiklund *et al.*, 1994), Francia (Bernardet *et al.*, 1989), Alemania (Weis, 1987), Japón (Wakabayashi *et al.*, 1991), Italia (Sarti *et al.*, 1992), Irlanda, , Escocia, España (Toranzo *et al.*, 1993), Suecia, Suiza, Turquía, Reino Unido (Santos *et al.*, 1992) y en países del continente americano como Estados Unidos (Staliper.2011, Lonnstrom *et al.*, 2008, Cipriano *et al.*, 2005, Bernardet *et al.*, 1989) Chile (Valdebenito *et al.*, 2009), Perú (León *et al.*, 2008), que geográficamente son muy cercanos a México en este no se tenían reportes sobre la presencia de *Flavobacterium psychrophilum*.

Sin embargo a raíz de la descripción de la enfermedad branquial en crías de truchas arco iris, causado por *Flexibacter* sp. descrito por Ortega *et al.*, 1998, se genera la duda sobre la presencia de este patógeno en el país. Siendo hasta el año 2015 ante las manifestaciones clínicas recurrentes sugestivas a RFTS, reportadas en el área de diagnóstico del laboratorio de sanidad Acuícola del CIESA, y la trascendencia económica en las granjas de producción que implica, se toma la decisión de aislar y caracterizar al patógeno causante de tal padecimiento.

Los datos aportados por quienes remitieron las muestras indicaron que en la mayoría de las granjas de donde se obtuvieron los peces, se reportó entre un 50 a 80% de mortalidad por este padecimiento, rango correspondiente al mencionado

en el estudio de Valdebenito et al., 2009 en Chile; asimismo, informaron que los peces afectados presentaban desorientación, letargia, anorexia, natación superficial, oscurecimiento de la piel, lesiones de la pared costal a nivel de bazo y en aletas, además de una marcada exoftalmia tal como menciona Ostland *et al.*, 1997. Histopatológicamente, la afección más común que presentaron los peces bajo este proceso septicémico, se encontró a nivel de bazo donde la integridad de la cápsula desaparece se pierde la definición de sus bordes, que son reemplazados por una capa de material fibrinoso tal como lo describe Rangdale, 1995.

De los casos remitidos entre enero 2015 y julio 2016 se obtuvieron 13 aislados sugestivos a *F. psychrophilum* que mostraron en general resultados homogéneos, principalmente de fenotipo y perfil bioquímico. La morfología celular de los aislados analizados es coincidente con lo reportado por Bernardet y Grimont, 1989; Bernardet y Kerouault, 1989; Holt *et al.*, 1993, Toranzo y Barja 1993; Lorenzen et al., 1997 que reportan una morfología bacteriana de tipo filamentoso, que microscópicamente forman agrupaciones similares a una red.

Sin embargo a pesar de lo indicado por Bernardet y Grimont, 1989, Bernardet y Kerouault, 1989 y Lehmann *et al.*, 1991 con respecto al movimiento de tipo deslizante en los aislados estudiados este no se demostró ni con la técnica de gota pendiente, ni con las pruebas bioquímicas MIO y SIM. Aunque se conoce que esta es una característica de suma importancia en la identificación de *F. psychrophilum* en los aislados mexicanos no está presente.

La morfología colonial de los aislados fue muy similar a aquella descrita por Bernardet y Grimont, 1989; Bernardet y Kerouault, 1989; Lehmann et al., 1991; Toranzo y Barja, 1993; Bustos *et al.*, 1995; Lorenzen 1997 teniendo como promedio un diámetro entre 1-4mm, la mayoría de las colonias presentaron bordes enteros o regulares, siendo irregular o rugoso solo en aquellos cultivos que se descartaron como *F. psychrophilum*, y en el medio de cultivo MAO y los medios enriquecidos con albumina de huevo y leche.

La producción de pigmentos de tipo flexirrubina fue evidenciada en el 100% de los aislados confirmados por PCR (8 aislados) y aunque ésta es una característica un tanto común, también lo es variable. Diversos autores han demostrado la producción de este pigmento por parte de cepas de *F. psychrophilum* (Lehmann *et al.*, 1991; Toranzo y Barja, 1993; Rangdale, 1995; Schmidtke y Carson, 1995; Lumsden *et al.*, 1996; Skarmeta, 1996; Lorenzen *et al.*, 1997; sin embargo a diferencia de ellos, Cipriano *et al.*, 1996 no detectaron flexirrubina en sus cepas. Lo que pudo haber pasado con nuestros primeros 5 aislados donde al igual que Lorenzen, 1994, achacamos la nula presencia de pigmentación de tipo flexirrubina a la edad de los cultivos, siendo importante utilizar para su detección cultivos jóvenes no mayores a 72 horas, y con no más de 2 pases a partir del cultivo primario ya que las poblaciones de más edad generan reacciones débiles en ocasiones imperceptibles a simple vista.

En cuanto a la absorción de rojo congo, test didácticamente usado en la identificación rápida de *F. psychrophilum*, encontramos total similitud con lo descrito Bernardet y Grimont, 1989; Bernardet y Kerouault, 1989; Lorenzen *et al.*, 1991; Lorenzen *et al.*, 1997; Autores que recalcan la importancia de dicha prueba ya que *F. psychrophilum* es incapaz de absorber rojo congo, condición que lo diferencia de *F. columnare* el cual si es capaz de absorberlo y manifestar una pigmentación que va de rojo a marrón en las colonias o células bacterianas que se ponen en contacto con dicho colorante.

En lo referente a las técnicas moleculares, el protocolo propuesto por Urdaci *et al.*, 1998, nos sirvió para la discriminación efectiva de los aislados mexicanos, al usar primers específicos, pudimos descartar 5 de los 13 aislados que morfológicamente eran similares a *Flavobacterium psychrophilum*. Estudios muestran una gran diversidad genética entre diferentes lugares geográficos y se ha publicado evidencia de que existe una relación entre las diferentes cepas de *F. psychrophilum* y su hospedero (Madetoja *et al.*, 2000; Apablaza *et al.* 2013. Soule *et al.*, 2005; Izumi *et al.*, 2003), al tener como hospedero de estudio únicamente a la trucha arcoíris (*Onchorinchus mykiss*) y muestras provenientes de una estrecha

zona geográfica, suponíamos que no existiría variabilidad genética significativa en los aislados estudiados, sin embargo el análisis del gen del 16S ARNr, nos confirma la presencia de los 2 alelos descritos en el trabajo de Soule *et al.*, 2005 que no solo hacen referencia a la distribución geográfica y de hospedero, sino también a la virulencia de las cepas considerándose más virulentos los que presentaban el alelo CSF 259–93 (proveniente de trucha), que los que presentan sólo el alelo ATCC 49418T (proveniente de salmón del Atlántico), dicha afirmación fue posible demostrar gracias a la utilización del protocolo simplificado basado en PCR simple de Ramsrud *et al.*, 2007. Además se comprobó que existe una estrecha relación entre la degradación de la elastina y el genotipo, de esta manera son más virulentos los aislados que presentan la combinación elastinasa positiva y CSF 259–93 (linaje II) (Soule *et al.*, 2005; Valdebenito *et al.* 2009).

Con la técnica de genotipificación de aislados de *F. psychrophilum*, propuesta por Izumi *et al.*, 2003 la cual se realiza a través de RFLP–PCR del gen de la girasa sub unidad B (*gyrB*), y que establece 4 genotipos diferenciando entre aislados provenientes de salmónidos (genotipo B), y aislados provenientes Ayu (*Plecoglossus altivelis*, genotipo A) se determina que en los aislados del presente estudio se mantiene dicha relación al encontrarse solo el genotipo B. En cuanto a los genotipos S y R específicos para *F. psychrophilum*, éstos se encuentran asociados al origen geográfico de los aislados, principalmente a EE.UU. y Europa, existe una homología del 87.5% al encontrarse en su mayoría el genotipo R.

Crump *et al.*, 2001 mediante análisis de Western Blot de células tratadas con proteinasa K, encontraron que *F. psychrophilum* exhibe LPS que comprenden oligosacáridos de baja masa molecular y polímeros que contienen el antígeno-O de alta masa molecular. En los aislados mexicanos se utilizaron dichos productos biológicos con el fin de evidenciar características antigénicas de los cuales solo el aislado 134 reaccionó con un antisuero producido contra la cepa de referencia 1947t, así como para los antisueros 1739, 1731, 1196, 1150 pertenecientes a cepas chilenas, (Valdebenito *et al.*, 2009) mientras que el 001 solo lo hizo para las cepas chilenas, dejando como evidencia que se necesita realizar los antisueros

propios a los aislados, dicho resultado se reforzó mediante aglutinación en placa. Concordando con Toranzo y Barja, 1993, quienes analizaron serológicamente, mediante esta técnica, cepas recuperadas durante un brote de flavobacteriosis visceral en España, indicando que estas tampoco reaccionaron con antisueros producidos contra la cepa tipo, afirmando que podrían pertenecer a un grupo antigénico diferente, como pudiera ser el caso de los aislados de este estudio.

Dalsgaard, 1993 demostró que *F. psychrophilum* es activamente proteolítico y que esta naturaleza proteolítica juega un importante rol en la patogenicidad de las cepas. Bertolini et al., 1994 encontraron que *F. psychrophilum* produjo 2 proteasas bacterianas (114 y 152kDa), las que degradaban caseína y gelatina, y otras ocho proteasas (32 a 86kDa), que degradaban gelatina no así caseína. Aunque se manifestaron algunas relaciones entre la composición de las proteasas y la virulencia de los aislados la correlación no siempre fue certera. Sin embargo en el caso de los aislados mexicanos podemos inferir que la capacidad de degradar tanto gelatina, como caseína, tiene inferencia inmediata en la capacidad de reproducir una infección con signología severa cuando se infecta a organismos sanos en condiciones ambientales controladas, como lo manifestó el aislado 001 de este estudio que fue capaz de mostrar el cuadro típica de la enfermedad a partir de las 48 horas post infección.

Cabe mencionar que existen innumerables estudios que confirman los hallazgos encontrados en este trabajo de investigación, sin embargo; a corto plazo es imprescindible aumentar el número de muestras para determinar con mayor exactitud los diferentes grupos genéticos y serológicos presentes en el país, situación que podría ser a futuro para el desarrollo de vacunas contra la flavobacteriosis que aunque no solucionarían el problema serían de gran ayuda para prevenir la aparición del patógeno y reducir el impacto sanitario y económico que este causa.

9. CONCLUSIONES

Los diferentes estudios realizados en el desarrollo de esta investigación, permiten concluir que:

- En los 13 casos sugestivos a RTFS provenientes de granjas del Estado de México y Michoacán, las lesiones macroscópicas más comunes fueron palidez branquial, palidez generalizada y esplenomegalia, siendo estas típicas de una infección septicémica como lo describe la literatura para el RTFS.
- Los aislados bacterianos obtenidos en medio de cultivo TYES tienen una concordancia fenotípica significativa con lo reportado a nivel mundial. Mientras que Bioquímicamente, son pocas las diferencias que pueden encontrarse con respecto a las cepas ya reportadas.
- De acuerdo al análisis de PCR simple se estableció que solo 8 de los 13 aislados fueron positivos a *Flavobacterium psychrophilum*. Los cuales de acuerdo al estudio del gen de la girasa expresan el genotipo B y genotipo R en su mayoría, difiriendo solo el aislado 001 que tiene mayor similitud a la cepa tipo 1947T al expresar el genotipo S. Con el estudio de los alelos 16S ARNr, se determinó que los aislados se encuentran incluidos dentro del linaje II representado por la cepa CFS259-93 y que demuestra que son altamente virulentos.
- En el estudio serológico, realizado mediante Western Blot se obtuvieron resultados positivos como es el caso del aislado 001 el cual cruzo con los 4 sueros homólogos de cepas chilenas no siendo así para el suero de la cepa tipo a diferencia del aislado 134 que se encontró positivo para los 5 sueros, evidenciando la relación genética-serológica que manifiesta con la cepa tipo 1947T. Mediante aglutinación rápida en portaobjeto se obtuvo una relación del 100% con los resultados de la primera prueba.
- En el desafío experimental, los peces infectados con el aislado 001, manifestaron los típicos signos del RTFS, además de las lesiones características

de enfermedad siendo predominantes las ulceraciones en aletas dorsales y laterales, además del obscurecimiento de piel. El grado de virulencia es alto al presentarse 100% de mortalidad a los 10 días post infección; la bacteria fue aislada de estos peces y fue confirmada como *F. psychrophilum*.

- Por tanto se establece que el agente patológico encontrado en por lo menos 8 de los 13 casos sugestivos a RTFS de granjas de México, coinciden en un 100% con lo establecido en la literatura para *Flavobacterium psychrophilum*. Sin embargo, debería considerarse la inclusión de mayor número de aislados para verificar la variabilidad genética-serológica presente en el país.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anacker, RL and Ordal EJ (1955) Study of a bacteriophage infecting the *Myxobacterium Chondrococcus columnaris*. J. Bacteriol. 70:738-741.

Apablaza P, Brevik ØJ, Mjøs S, et al. (2015) Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) analysis of *Flavobacterium psychrophilum* from salmonids in Chile and Norway. BMC Veterinary Research. 11:150

Avendaño-Herrera R, Houel A, Irgang R, Bernardet JF, Godoy M, Nicolas P, Duchaud E (2014) Introduccion, expansion and coexistencia of epidemic *Flavobacterium psychrophilum* lineages in Chilean Fish Farms. Veterinary Microbiology. 170: 298-306.

Baliarda A, Faure D, Urdaci MC (2002) Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluids and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Journal os Applied Microbiology 92: 510-516.

Barnes ME, Michael LB (2011) A Review of *Flavobacterium psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment. The Open Fish Science Journal, 4: 1-9

Bernardet J.F., P.A. Grimont. (1989). Deoxyribonucleic-acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rey., *Flexibacter psychrophillus* sp. nov., nom. rey., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 346-354

Bernardet and 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, J.F., P. Segers., M. Vancanneyt., F. Berthe., K. Kersters., P. Vandame. (1996). Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis*, Strohl and Tait 1978). mt. J. Syst. Bacteriol. 46:128-148.

Bertolini, J.M., Wakabayashi, H., Watral, V.G., Whipple, M.J. and Rohovec, J.S. (1994). Electrophoretic detection of protease from selected strains of *Flexibacter psychrophilus* and assessment of their variability. J. Aquat. Anim. Health., 6, 224 - 233.

Borg A.F. (1948). Studies on *myxobacteria* associated with diseases in salmonid fishes. PhD. Thesis. University of Washington. Seattle.

Brown, L.L., W.T.Cox., R.P. Levine. (1997). Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. Dis. Aquat. Org . 29: 2 13-218.

Chakroun C, Urdaci MC, Faure D, Grimont F Bernardet J-F (1997) Random amplified polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation among isolates of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* and among *Flavobacterium* species. Diseases of Aquatic Organisms 31: 187-196.

Cipriano RC and 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

Cipriano RC, Teska JD (1994) Effects of médium composition on the growth of two fish pathogens, *Cytophaga columnaris* and *Cytophaga psychrophilum*. Biomedical Letters 49:7-12

CONAPESCA (2013) Anuario estadístico de acuicultura y pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Mexico. Available from URL: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2013.

Crump Elizabeth M. Malcolm B. Perry, Sharon C. Clouthier, and William W. Kay (2001) Antigenic Characterization of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Applied and Environmental Microbiology 67(2): 750-759.

Dalsgaard I. (1993). Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga-like* bacteria pathogenic for fish. Ann. Rev. Fish Dis. 3: 127-144.

Daskalov, H., D.A. Austin., B. Austin. (1999). An Improved growth medium for *Flavobacterium psychrophilum*. Lett. Appl. Microbiol. 28: 297-299.

Davis HS. (1946). Care and diseases of trout. US Dept. of the Interior Research Report N° 12. US Government Printing Office, Washington DC. pp. 98

Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J-F., Michel, C., Kerouault, B., Mondot, S., Nicolas, P., Bossy, R. And other authors (2007). Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Nat. Biotechnol., 25, 763–769.

Ekman, E., H. Börjeson., N. Johansson. 1999. *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. Dis. Aquat. Org. 37: 159-163.

Fernando CH, Furtado JI, Gussev AV, Hanek G and Kakong SA (1972). Methods for the study of freshwater fish parasites, 1st edn. University of Waterloo, Biology series, 76 pp

Fujiwara- Nagata E, Eguchi M (2009) Development and Evaluation of a Loop – mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Fish Diseases 32:873-881.

Holt, R.A., A. Amandi., J.S. Rohovec., J.L. Fryer. (1989). Relation of wáter temperature to bacterial cold-water disease in coho salmon, chinook salmon, and rainbow trout. *J. Aquat. Anim Health.* 1: 94-101.

Holt, R.A., J.S. Rohovec., J.L. Fryer. (1993). Bacterial cold-water disease. En: Inglis, V, R.J. Roberts; N.R. Bromage (ed.). *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 3-22.

Hornbeck, P. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay. In Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevack EM, Strober W, eds. *Curr. Protoc. Immunol.*, New York: John Wiley and Sons, Inc. p 2.1.2-2.1.22

Izumi S., Wakabayashi H(1999). Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathology*, 34: 89-90.

Izumi, S., Aranishi, F. & Wakabayashi, H., 2003. Using PCR-RFLP analysis. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 56: 207–214.

Kondo, M., Kawai, K., Kurohara, K. and Oshima, S. (2002). Adherence of *Flavobacterium psychrophilum* on the body surface of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Microbes Infect.*, 4, 279–283.

Kumagai, A., K. Takahashi., S. Yamaoka., H. Wakabayashi. (1998). Ineffectiveness of iodophore treatment in disinfecting salmonid eggs carrying *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.* 33: 123-128.

LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR, Congleton JL, Sun B. and Cain KD (2002) Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative percent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 25: 703–713.

Lehmann J., D. Mock., F.J. Stürenberg., J.F. Bernardet. (1991). First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids. *Dis. Aquat. Org.* 10: 217-220.

León Jorge, Rita Ávalos y Milagros Ponce (2009) *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo Rev. Peru. Biol. 15(2): 117- 124

Loch TP , M Fujimoto , SA Woodiga , ED Walker , TL Marsh and M Faisal (2013) Diversity of Fish Associated *Flavobacteria* of Michigan, Journal of Aquatic Animal Health, 25(3): 149-164

Lönström LG , M L Hoffrn and T Wiklund. (2008) *Flavobacterium psychrophilum* associated with mortality of farmed perch, *Perca fluviatilis* L. Journal of Fish Diseases 31: 793–797

Lorenzen E. Olsen NJ. (1997) Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. Diseases of Aquatic Organisms, 31: 209-220.

Lorenzen, E. (1994). Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS). PhD. Thesis. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.

Lorenzen, E. (1994). Study on *Flexibacter psychrophilus* in Relation to Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS). PhD thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

Lorenzen, E., I. Dalsgaard., J. From., E.M. Hansen.,V. Horlyck., H. Korsholm., S. Mellergaard., N.J. Olesen. (1991). Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11:77-79.

Lumsden J.S., V.E. Ostland., H.W. Ferguson. (1996). Necrotic myositis in cage cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), caused by *Flexibacter psychrophilus*. J. Fish Dis. 19: 113-119.

MacLean, L.L., Vinogradov, E., Crump, E.M., Perry, M. B. and Kay, W.W. (2001). The structure of the lipopolysaccharide O-antigen produced by *Flavobacterium psychrophilum* (259-93). Eur. J. Biochem., 268: 2710-2716

Madetoja J and T Wiklund (2002) Detection of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in Water from Fish Farms. System. Appl. Microbiol. 25, 259–266.

Madetoja J, Lönnström LG, Björkblom C, Uluköy G, Bylund G, Syertsen C, Gravningen K, Norderhus EA, Wiklund t (2006) Efficacy of injection vaccines against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum). Journal of Fish Diseases 29: 9-20.

Madetoja, J., P. Nyman., T. Wiklund. (2000). *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org. 43: 27-38.

Madsen L, Moller JD, Dalsgaard I (2005). *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum), hatcheries: studies on Broodstock, eggs, fry and hatcheries. Journal of Fish Diseases 28:39-47.

Madsen L. and Dalsgaard I. (2000) Comparative studies of Danish *Flavobacterium psychrophilum* isolates: ribotypes, plasmid profiles, serotypes and virulence. Journal of Fish Diseases 23, 211–218

Mata M, Skarmeta A, Santos Y (2002) A proposed serotyping system for *Flavobacterium psychrophilum*. Letters in Applied Microbiology 35:166-170.

Nematollahi A, A Decostere, F Pasmans, R Ducatelle, F Haesebrouck (2003) Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 55: 101–107.

OIE (2012) Código Sanitario para los Animales acuáticos, 16ª ed. OIE, Paris. Available from URL: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea>.

Ortega C, Salgado C, Vega F, Romero V (1998). Descripción de un cuadro clínico de enfermedad branquial en crías de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*),

causado por *Flexibacter sp.* Proceedings: Programa Nacional de Sanidad Acuicola. Pp 50.

Ostland V.E., D.G. mcgrogan., H.W. Ferguson. (1997). Cephalic osteochondritis and necrotic scieritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*. J. Fish Dis. 20: 443-451.

Pacha, R. (1968). Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. App!. Microbio!. 16: 97-101

Ramsrud AL, LaFrentz SA, LaFrentz BR, Cain KD, Call DR. (2007). Differentiating 16S rRNA alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. Journal of Fish Diseases, 30: 175–180.

Rangdale R.E. (1995). Studies on Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS). PhD thesis, University of Stirling, Stirling.

SAGARPA (2013) Diario Oficial; Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualizacion de la Carta Nacional Acuicola. Available from URL: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313326&fecha=

Santos Y., P.J. Huntly., A. Turnbull., T.S. Hastings. (1992). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacterpsychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in the United Kingdom, Bu!!. Eur. Ass. Fish Pathol. 12: 209-210.

Schmidtke, L.M., J. Carson. (1995). Characteristics of *Flexibacter psychrophilus* isolated from Atlantic salmon in Australia. Dis. Aquat. Org. 21: 157- 161.

Secades, P., Alvarez B. and Guijarro J.A. (2001). Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Appl. Environ. Microbiol., 67: 2436–2444.

Secades, P., Alvarez, B. and Guijarro, J.A. (2003). Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. FEMS Microbiol. Lett. 226: 273–279.

Skarmeta A.M. (1996). Caracterización bioquímica, serológica y molecular del patógeno de peces *Flexibacter psychrophilus*. PhD. Tesis. Universidad de Santiago de Compostela, España.

Soule M, Cain K, LaFrentz S and Call D (2005a) Combining suppression subtractive hybridization and microarrays to map the intraspecies phylogeny of *Flavobacterium psychrophilum*. *Infection and Immunity* 73: 3799–3802.

Soule M, LaFrentz S, Cain K, LaPatra S, Call D, (2005b) Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* with elastin and tetracycline resistance. *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 209–216.

Starliper CE (2011) Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research* 2: 97–108

Toranzo, A.E., J.L. Barja. 1993. Fry mortality syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 13: 30-32.

Valdebenito S. and R Avedaño- Herrera (2009). Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *Journal of Fish Diseases*, 32: 321-333.

Vatsos I N, K D Thompson and A Adams (2006) Colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), eggs by *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of rainbow trout fry syndrome. *Journal of Fish Diseases* 29: 441–444

Wiklund T., K. Kaas., L. Lonnstrom., Dalsgaard. (1994). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14: 44-46.

11. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de DNA. Wizard® Genomic DNA Purification Kit

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Pellet Cells
Centrifuge 1ml of overnight culture for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g**. Discard the supernatant.

A. For Gram Positive Bacteria

1. Suspend cells in 480µl 50mM EDTA.
2. Add lytic enzyme(s) (120µl) [lysozyme and/or lysostaphin].
3. Incubate at 37°C for 30–60 minutes.
4. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g** and remove supernatant.
5. Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

B. For Gram Negative Bacteria
Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

Lyse Cells

1. Add 600µl Nuclei Lysis Solution. Pipet gently to mix.
2. Incubate for 5 minutes at 80°C, then cool to room temperature.
3. Add 3µl of RNase Solution. Mix, incubate at 37°C for 15–60 minutes, then cool to room temperature.

Protein Precipitation

4. Add 200µl of Protein Precipitation Solution. Vortex.
5. Incubate on ice for 5 minutes.
6. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g** for 3 minutes.

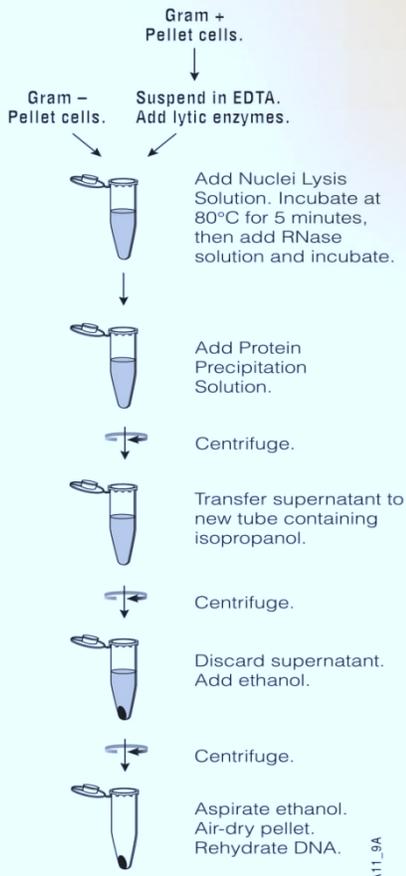
DNA Precipitation and Rehydration

7. Transfer the supernatant to a clean tube containing 600µl of room temperature isopropanol. Mix.
8. Centrifuge as in "Pellet Cells" above, and decant the supernatant.
9. Add 600µl of room temperature 70% ethanol. Mix.
10. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g**.
11. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
12. Rehydrate the DNA pellet in 100µl of Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: www.promega.com

ORDERING / TECHNICAL INFORMATION:
www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601



2825MA11_9A

©1999–2010 Promega Corporation. All Rights Reserved.



Printed in USA. Revised 10/10
Part #9FB022

Anexo 2. Cuantificación de ADN para el total de muestras Presuntivas a *Flavobacterium psychrophilum*.

TAMAÑO DE LA MUESTRA MEDIDA: 2µl

HADWARE: Scan drop (analytikjena)

SOFTWARE: WinAspect Scan drop.

RESULTADOS:

Sample Name	Date / Time	Result	260 nm	Zero (320nm)
F 001	16/08/2016 11:12	280.7793	6.0975	0.4819
F 34	16/08/2016 11:12	790.6902	57.3583	41.5445
F 42	16/08/2016 11:12	1026.7997	20.5434	0.0074
F 51	16/08/2016 11:12	526.5433	14.393	3.8622
F 63	16/08/2016 11:12	321.9621	6.6538	0.2146
F 100	16/08/2016 11:12	51.3332	0.4695	-0.5572
F 101	16/08/2016 11:12	47.1276	0.9657	0.0232
F 122	16/08/2016 11:12	481.0297	9.475	-0.1456
F 134	16/08/2016 11:12	427.0661	8.7242	0.1829
F 148	16/08/2016 11:12	1050.5833	22.1956	1.1839
F 174	16/08/2016 11:12	61.4297	1.3281	0.0995
F 185	16/08/2016 11:12	78.752	2.2139	0.6389
F 418	16/08/2016 11:12	644.7447	13.4088	0.5139

SE REALIZO UN AJUSTE PARA DEJARLO EN 50 ng.

Sample Name	Cantidad de DNA en µl	Agua
F 001	8.90	41.10
F 34	3.16	46.84
F 42	2.43	47.57
F 51	4.75	45.25
F 63	7.76	42.24
F 100	48.70	1.30
F 101	53.05	-3.05
F 122	5.20	44.80
F 134	5.85	44.15
F 148	2.38	47.62
F 174	40.70	9.30
F 185	31.75	18.25
F 418	3.88	46.12

Los valores en amarillo no se les realizo ajuste, mientras que los rojos se realizó nuevamente la cuantificación para verificar los resultados.

Anexo 3. Protocolo de Cuantificación de LPS:

En una placa de 96 posillos se colocaron:

- 10µl de curva patrón comercial (LYPOPOLYSACCHARIDE, DE SALMONELLA ENTÉRICA SEROTYPE ENTERITIDIS . SIGMA-ALDRICH)
- 10µl de la muestra por duplicado.
- A todos los posillos se les colocaron 200µl de *DMB*

Utilizando un nanocuantificador (infinite m200 pro de Tecan y el software i-control 1.10 Nano Quant. Se programa para mover la placa en movimiento orbital durante 25s con una amplitud de 6mm y que mida la absorbancia 535nm.

Diagrama de la curva patrón

