

MARZO 2024

POLICY BRIEF N°15

INNOVACIONES EN LA GENOTIPIFICACIÓN DE LA PISCIRICKETTSIOSIS PARA UN ENFOQUE INTEGRADO DE SU GESTIÓN EN SALMONICULTURA

Adolfo Isla, Ruben Avendaño-Herrera, Jaime Figueroa y Alejandro Yáñez.

Contacto: ayanez@uach.cl, adolfoisla@gmail.com

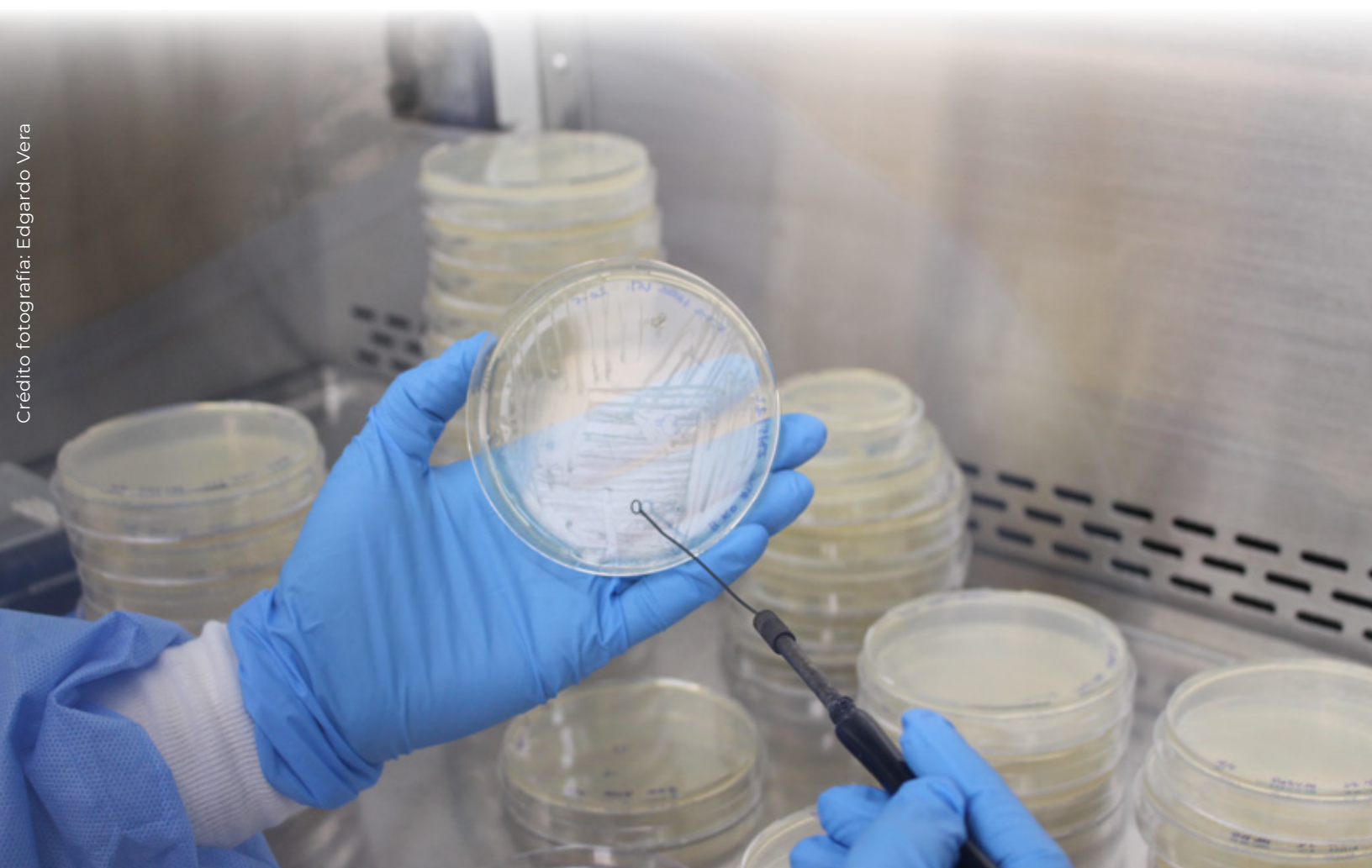
Antecedentes, Alcance y Objetivos del Tema

Piscirickettsia salmonis, una bacteria facultativa intracelular, es reconocida como el agente causante de la Piscirickettsiosis o SRS, sigla que se refiere a la Septicemia Rickettsial Salmonídea. Históricamente, esta enfermedad ha ocasionado pérdidas económicas significativas en la salmonicultura chilena, estimadas en 700 millones de dólares. A pesar de la implementación del Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis y otras medidas, se anticipa que los costos asociados con la mortalidad, prevención y control del patógeno sean aún mayores. Además, el impacto ambiental y social en la salmonicultura es considerable debido al uso intensivo de antibióticos durante la etapa de engorde para controlar *P. salmonis*.

Los estudios microbiológicos y genéticos en *P. salmonis* han revelado la existencia de diversidad intraespecífica, con dos grupos genéticos principales denominados LF-89 y EM-90. Estos genogrupos se han relacionado tanto con brotes en centros de cultivo de salmónidos, con diferencias en la severidad de las mortalidades y la susceptibilidad de los aislados de *P. salmonis* al tratamiento con florfenicol y oxitetraciclina, los principales antimicrobianos empleados para su control. Desde principios de la década de 2000 hasta 2020, los aislados del genogrupo EM-90 se consideraron de alta virulencia en comparación con el genogrupo LF-89. No obstante, la información más reciente indica que esta situación se ha invertido, siendo el genogrupo LF-89 el que presenta una mayor virulencia.

El centro INCAR ha realizado esfuerzos significativos para generar conocimiento científico de excelencia, útil para la formulación de políticas públicas y el diseño de herramientas para la vigilancia epidemiológica de *P. salmonis* y el desarrollo de nuevos productos para la prevención de la enfermedad. Los investigadores del centro han sido pioneros en el desarrollo de los primeros medios de cultivo líquido y en placa libres de sangre (1), lo que ha facilitado el desarrollo de vacunas (2), metodología de MICs (3) y el aislamiento de cepas puras. Esto ha permitido aislar el ADN de cepas aisladas de colonia única y obtener información genómica mediante la secuenciación de 80 aislados chilenos de *P. salmonis* (4), confirmando la existencia de los dos distintos genogrupos LF-89 y EM-90 y su asociación con variaciones en la virulencia (5). Esta información ha posibilitado proponer inicialmente un esquema de Multilocus Sequence Typing (MLST), único para *P. salmonis* y considerado un estándar de oro para el seguimiento epidemiológico de los aislados causantes de la Piscirickettsiosis, mediante la secuenciación de 7 genes de cada cepa (6). Recientemente, se ha divulgado una técnica de identificación y genotipificación basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple o PCR-multiplex, que proporciona información rápida y precisa sobre la presencia de cada genogrupo en los centros de cultivo (7). Una ventaja del PCR-multiplex es que puede emplearse directamente con material genómico obtenido de distintos tejidos de salmónidos, sin requerir el cultivo microbiológico de *P. salmonis* y solo necesita la amplificación de un gen específico de cada genogrupo. Comparativamente con el MLST, esta técnica es menos costosa y más fácil de implementar y adoptar por las autoridades sanitarias como técnica estandarizada para los laboratorios de referencia. En la publicación se incluyen al menos 3 genes únicos para cada genogrupo que pueden ser utilizados por cada laboratorio, evitando que cada uno realice diseños erróneos de genes únicos de los genogrupos de *P. salmonis* (4).

Dada la importancia de clasificar la mortalidad según la causa, como en el caso de la Piscirickettsiosis, y de diagnosticar a su agente mediante diversas metodologías disponibles en los laboratorios de diagnóstico de la red del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, es esencial también reconocer y asignar el genotipo asociado al cuadro infeccioso en salmónidos en el centro de cultivo. Esta información permitirá comprender mejor el potencial patogénico y generar conocimiento para el desarrollo u optimización de métodos de prevención. En este contexto, la presente propuesta tiene como objetivo implementar una plataforma genética que permita identificar a *P. salmonis* y discriminar entre los genogrupos LF-89 y EM-90. La implementación masiva de estas metodologías permitirá una discriminación rápida y precisa, contribuyendo a una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad y facilitando la toma de decisiones para la prevención y control de los brotes. Además, estas técnicas pueden ser cruciales para identificar la fuente de la infección y las posibles rutas de transmisión.



Crédito fotografía: Edgardo Vera

Metodología

Genotipificación de los Aislados Chilenos por MLST

Para la genotipificación de los aislados chilenos de *Piscirickettsia salmonis* mediante la técnica de MLST, se procede inicialmente con la extracción del ADN cromosomal. Esta se realiza a partir de colonias bacterianas puras, obtenidas de un cultivo microbiológico del patógeno en placas desarrolladas y patentadas por nuestro laboratorio. El ADN extraído se utiliza como plantilla para la amplificación mediante la técnica de PCR, empleando siete genes constitutivos del patógeno: *dnaK*, *rpoD*, *fumC*, *epf*, *murG*, *trpB* y *glyA* (Tabla 1). El proceso de amplificación se lleva a cabo mediante ciclos que incluyen la separación de la doble hebra a 95°C, la unión de los cebadores o partidores a las regiones del ADN que serán amplificadas a 60°C, y la síntesis de nuevas cadenas a 72°C. Este proceso se repite 35 veces, permitiendo una amplificación exponencial de cada segmento de ADN del patógeno.

Los productos de PCR obtenidos son secuenciados para identificar variaciones en las secuencias de los genes, lo que permite asignar códigos únicos denominados Secuencias Tipo o ST. La información genética obtenida para cada muestra de ADN analizada se compara con la información previamente disponible en la base de datos internacional de acceso público PubMLST (<http://pubmlst.org/psalmonis>) (6). Este recurso, administrado por nuestro grupo de investigación, contiene información relevante para cada muestra analizada, incluyendo la fecha de obtención de la muestra, la ubicación geográfica y el nombre del organismo hospedero (Figura 1).

Tabla 1. Secuencia de partidores utilizados para MLST de *P. salmonis*

NOMBRE PARTIDOR	PARTIDOR 1	PARTIDOR 2
<i>dnaK</i>	ATGGTGATAAACCGCGTGTG	TCTTCACCACCTAAGTGCCT
<i>rpoD</i>	TTGAAGAGATCGTTGCAATG	CGATCATATTGGGCTTTAGG
<i>fumC</i>	CGATAGAAATCGCGGGTGGGA	ATCATTGCCCATCACCTGCA
<i>epf</i>	TACCAGTGAATTTAAGGGCG	GAACAAATAATGGCACACGC
<i>murG</i>	AGCAGAAATTGTACCTGAGG	CTTTGATGATCATCCACAGC
<i>trpB</i>	CCGTTAACTTATGCTGGGCG	TTACGCCATGCAATACACCC
<i>glyA</i>	GCAGGTAAGCGTTACTATGG	CCATTGCTTCTTTAAACGCC

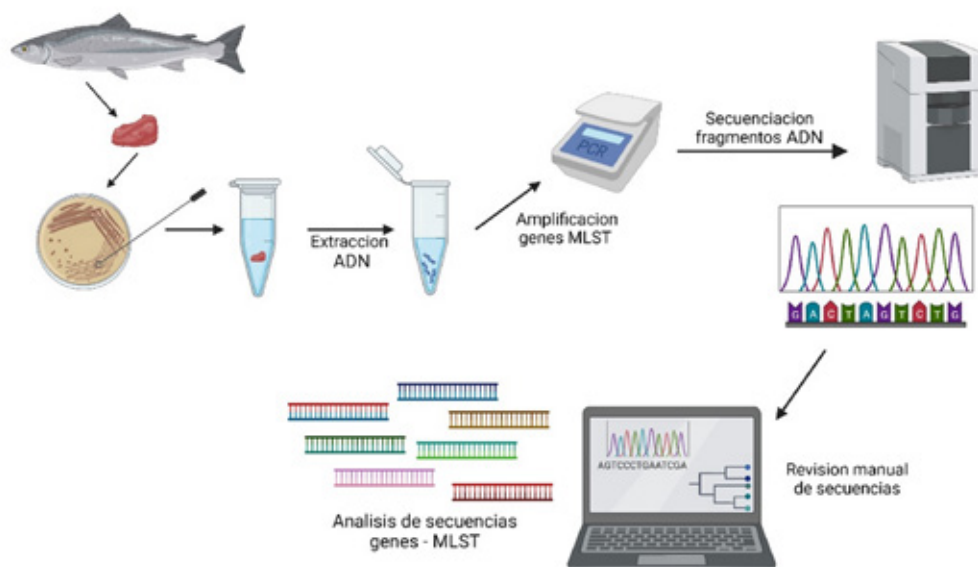


Figura 1. Esquema de trabajo para implementar MLST de *P. salmonis*

Diagnóstico de Genogrupo LF-89 y EM-90 por PCR-multiplex

El ADN cromosomal de los aislados de *Piscirickettsia salmonis* puede ser extraído tanto a partir de colonias bacterianas puras obtenidas de un cultivo microbiológico del patógeno como directamente de tejidos de órganos de peces infectados con *P. salmonis*. Este ADN se somete a un PCR-multiplex utilizando cebadores específicos para el genogrupo LF-89 o EM-90 (Tabla 2), esperando obtener una amplificación de un gen único con un tamaño de 131 o 177 pares de bases (pb), respectivamente (4). El PCR-multiplex se ha desarrollado de manera flexible para que pueda ser implementado tanto en laboratorios que cuentan con equipos de PCR convencional como en aquellos con qPCR. La amplificación exponencial del ADN sigue las etapas mencionadas previamente en el análisis de MLST. La técnica de PCR-multiplex permite diagnosticar la presencia de cada genogrupo en una muestra pura o reconocer una coinfección de ambos genogrupos (Figura 2).

Tabla 2. Secuencia de partidores para PCR-multiplex

NOMBRE PARTIDOR	PARTIDOR 1	PARTIDOR 2
LF-89	ACACCTGTAGTTGCTGCTGG	GCAGCTTCAATGCCATTAGCC
EM-90	TGACGAAGCGTATTGTTGCG	ACGCTATCGCCACATCATCC

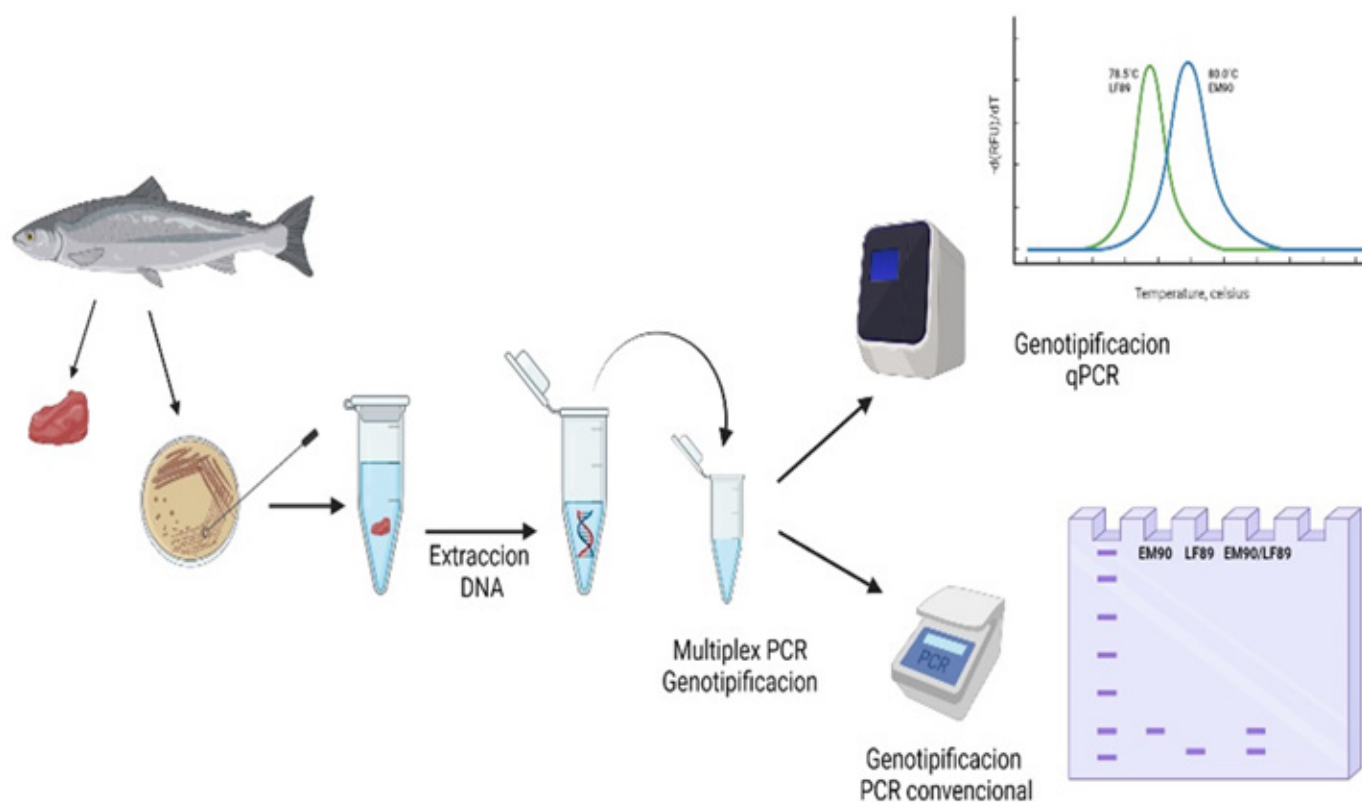


Figura 2.
Esquema de trabajo para implementar
PCR-multiplex de *P. salmonis*

Resultados Relevantes

Diversidad Genética de los Aislados Chilenos por MLST

El desarrollo de la base de datos se basó en el análisis de 43 muestras de campo de *Piscirickettsia salmonis*, recuperadas de salmón del Atlántico (n=27), salmón coho (n=9) y trucha arcoíris (n=7) cultivados en centros ubicados entre Puerto Montt y Aysén durante los años 2008 a 2015 (6) (Figura 3). Los resultados indicaron que las 43 muestras de ADN de *P. salmonis* analizadas se clasificaron en 23 secuencias tipo o ST, distribuidas principalmente en los ST1, ST2 y ST5. El ST1 incluye al primer aislado de *P. salmonis* obtenido en 1989 de salmón coho, denominado cepa LF-89 (6). Además, como se observa en la Figura 3, las muestras clasificadas en el ST1 se obtuvieron en diferentes regiones geográficas de la Región de los Lagos y la Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo.

Adicionalmente, los resultados sugieren que los aislados de *P. salmonis* estarían filogenéticamente relacionados con los genogrupos LF-89, EM-90 y con un grupo híbrido que compartiría información genética de ambos genogrupos (6).

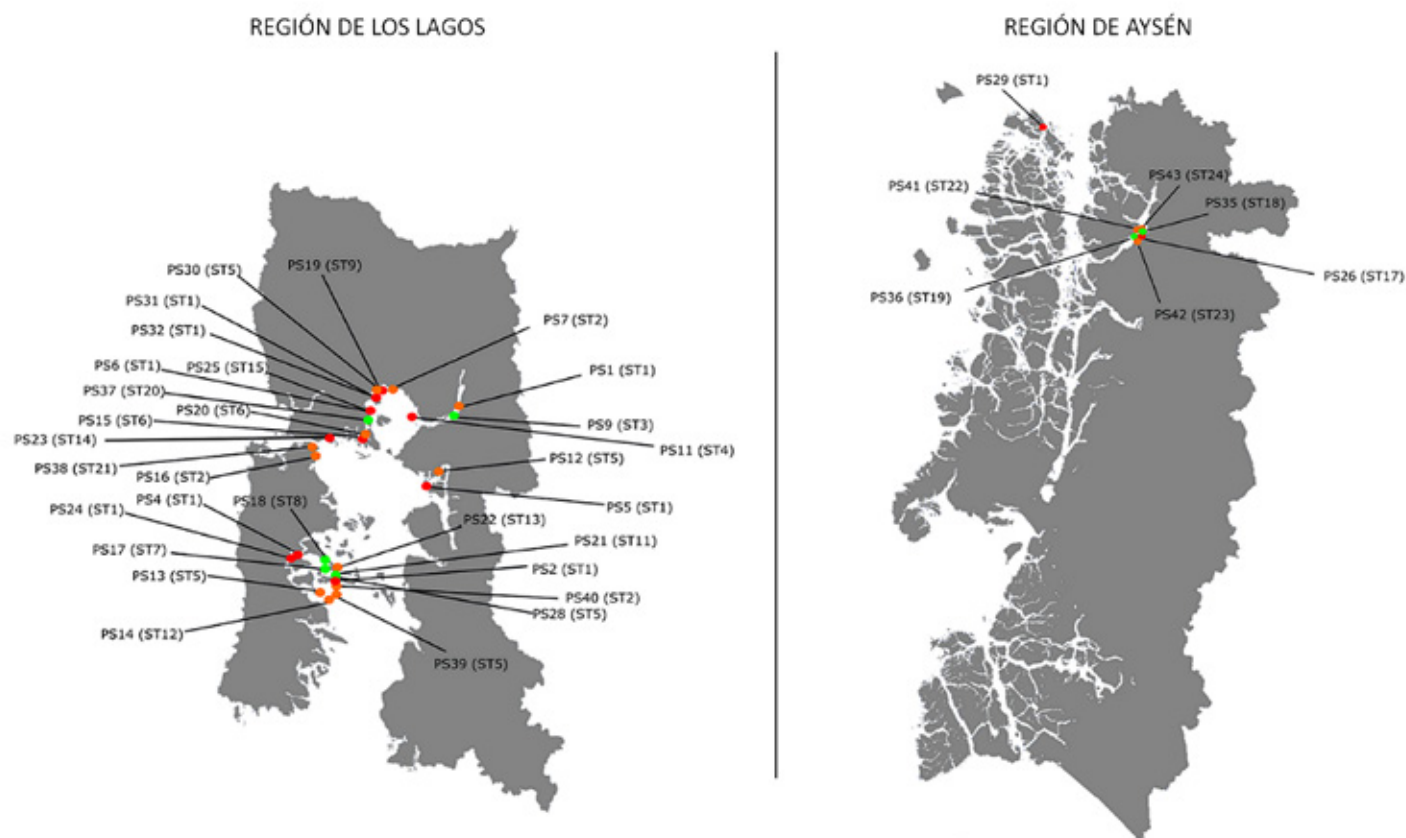
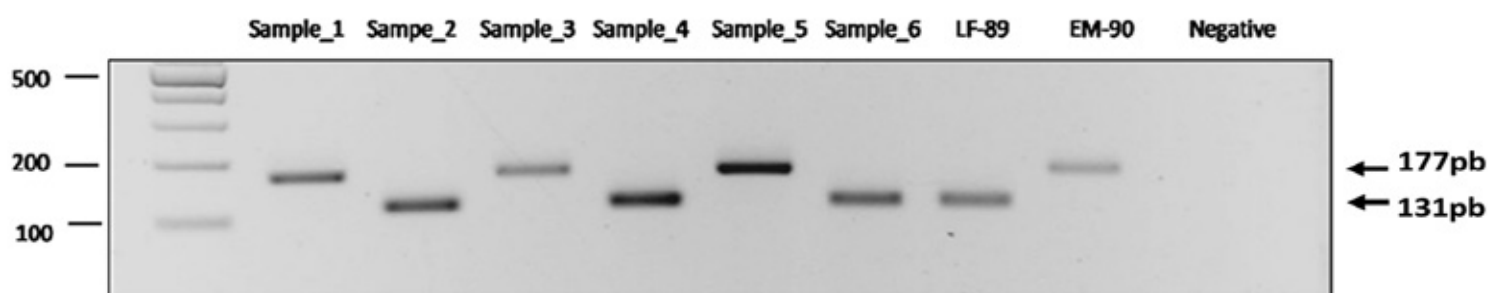


Figura 3.
Distribución geográfica de cepas analizadas en el estudio.

● **círculo rojo:** genogrupo LF-89;
● **círculo naranja:** genogrupo EM-90;
● **círculo verde:** cepas Híbridas.

Diagnóstico de Genogrupo LF-89 y EM-90 por PCR-multiplex

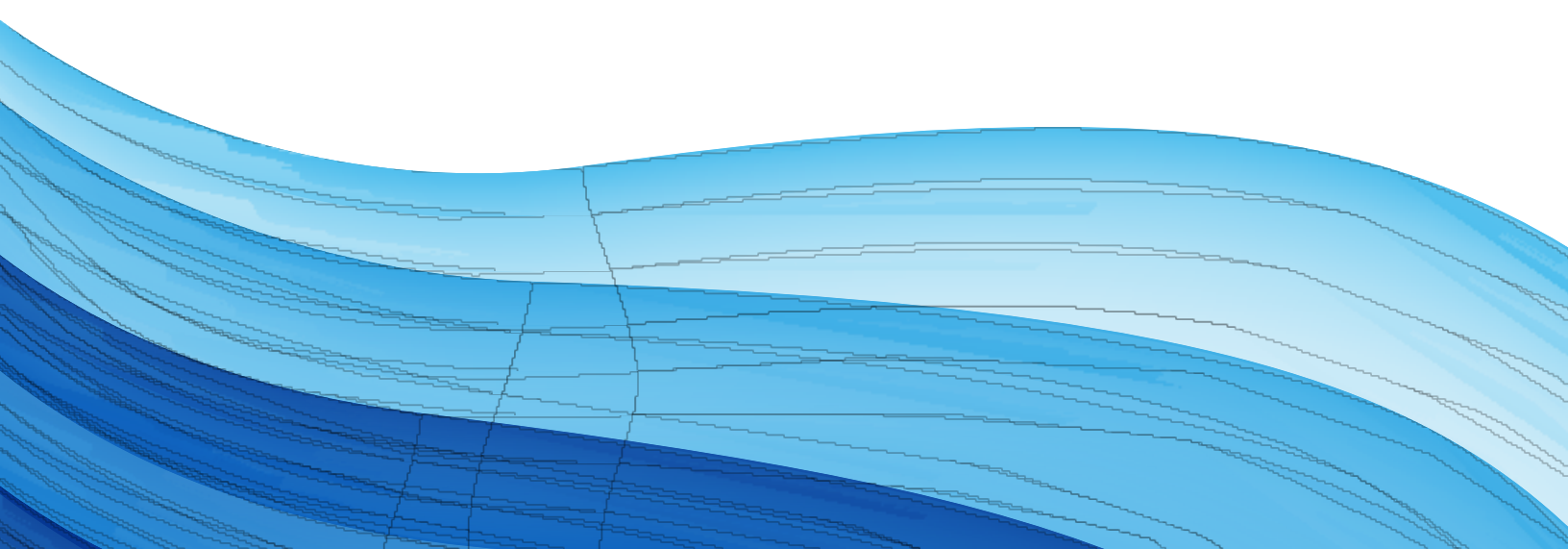
El análisis del ADN genómico extraído de 48 aislados puros de *Piscirickettsia salmonis* reveló un producto de amplificación de 131 pares de bases en 23 muestras de ADN, correspondientes al genogrupo LF-89. Por otro lado, 25 muestras presentaron un producto de amplificación de 177 pares de bases, asociado al genogrupo EM-90 (Figura 4). Es importante señalar que, en caso de coinfección con las cepas LF-89 y EM-90 en un mismo pez, se observarían ambas bandas en el gel de agarosa (4).





Recomendaciones para Políticas Públicas

- ▶ Promover la adopción de técnicas genotípicas avanzadas como el MLST (Multilocus Sequence Typing) y el PCR-multiplex en los laboratorios de diagnóstico para la genotipificación de *P. salmonis*, para permitir una identificación precisa y rápida de los genogrupos de *Piscirickettsia salmonis*, lo que es crucial para la detección temprana de brotes y la implementación de medidas de control específicas.
- ▶ Desarrollar y mantener una plataforma de seguimiento epidemiológico que integre datos genéticos y geográficos de los aislados de *P. salmonis*, para facilitar la comprensión de la dinámica de transmisión de la enfermedad y la identificación de patrones espaciales y temporales en la aparición de brotes.
- ▶ Las autoridades sanitarias deben fortalecer el programa de vigilancia y control de la Piscirickettsiosis, incorporando las tecnologías genotípicas mencionadas como herramientas estándar en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, lo cual contribuirá a una gestión más efectiva de los brotes y a la reducción de las pérdidas económicas asociadas.





Recomendaciones para Políticas Públicas

- Es crucial establecer sistemas de seguimiento y monitoreo continuo para rastrear la diseminación de la Piscirickettsiosis entre las poblaciones de salmónidos. Lo que implica la vigilancia de los centros de cultivo afectados, y la evaluación de posibles vías de transmisión, incluyendo movimientos de peces, prácticas de manejo y factores ambientales.
- Promover programas de capacitación para el personal de los laboratorios de diagnóstico en el uso y la interpretación de las técnicas de MLST y PCR-multiplex, para incentivar la actualización tecnológica de los laboratorios para asegurar la implementación exitosa de estas metodologías.
- Fomentar la colaboración entre universidades, centros de investigación, el sector público y el sector privado de la salmonicultura, para compartir información relevante sobre la epidemiología de la Piscirickettsiosis y coordinar acciones conjuntas para su control y prevención.

AGRADECIMIENTOS

Centro INCAR, Fondap ANID.15110027 y 1522A0004.

REFERENCIAS

- (1) Pontigo, J. P., Espinoza, C., Hernandez, M., Nourdin, G., Oliver, C., Avendaño-Herrera, R., Figueroa, J., Rauch, C., Troncoso, J. M., Vargas-Chacoff, L., & Yáñez, A. J. (2021). Protein-Based Vaccine Protect Against *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in immunology*. 12: 602689. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.602689>
- (2) Yáñez, A. J., Silva, H., Valenzuela, K., Pontigo, J. P., Godoy, M., Troncoso, J., Romero, A., Figueroa, J., Carcamo, J. G., & Avendaño-Herrera, R. (2013). Two novel blood-free solid media for the culture of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of fish diseases*. 36: 587–591. <https://doi.org/10.1111/jfd.12034>
- (3) Yáñez, A. J., Valenzuela, K., Matzner, C., Olavarria, V., Figueroa, J., Avendaño-Herrera, R., & Carcamo, J. G. (2014). Broth microdilution protocol for minimum inhibitory concentration (MIC) determinations of the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* to florfenicol and oxytetracycline. *Journal of fish diseases*. 37: 505–509. <https://doi.org/10.1111/jfd.12144>
- (4) Isla, A., Martinez-Hernandez, J. E., Levipan, H. A., Haussmann, D., Figueroa, J., Rauch, M. C., Maracaja-Coutinho, V., & Yáñez, A. (2021). Development of a Multiplex PCR Assay for Genotyping the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis* Through Comparative Genomics. *Frontiers in microbiology*. 12: 673216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673216>
- (5) Nourdin-Galindo, G., Sánchez, P., Molina, C. F., Espinoza-Rojas, D. A., Oliver, C., Ruiz, P., Vargas-Chacoff, L., Cárcamo, J. G., Figueroa, J. E., Mancilla, M., Maracaja-Coutinho, V., & Yáñez, A. J. (2017). Comparative Pan-Genome Analysis of *Piscirickettsia salmonis* Reveals Genomic Divergences within Genogroups. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 7: 459. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00459>
- (6) Isla, A., Saldarriaga-Córdoba, M., Fuentes, D. E., Albornoz, R., Haussmann, D., Mancilla-Schulz, J., Martínez, A., Figueroa, J., Avendaño-Herrera, R., & Yáñez, A. (2019). Multilocus sequence typing detects new *Piscirickettsia salmonis* hybrid genogroup in Chilean fish farms: Evidence for genetic diversity and population structure. *Journal of fish diseases*. 42: 721–737. <https://doi.org/10.1111/jfd.12976>

Las Fotografías de este documento son referenciales y alguna de ellas creadas con IA.



Universidad
de Concepción



Universidad
Andrés Bello®



Universidad Austral de Chile
Conocimiento y Naturaleza

www.centroincarc.cl