

Una estrategia exitosa

para introducir e integrar ADN exógeno y manipular genéticamente *Piscirickettsia salmonis*

José Saavedra, Naybel Hernández y Marcos Mancilla*
Laboratorio de Investigación y Desarrollo, ADL Diagnostic Chile SpA.
*mmancilla@adldiagnostic.cl

Piscirickettsia salmonis es un patógeno Gram negativo, intracelular facultativo que produce Piscirickettsiosis o SRS (Septicemia Rickettsial del Salmón), por lejos la enfermedad infecciosa más relevante de la salmonicultura nacional. Los brotes frecuentes de esta enfermedad constituyen un desafío sanitario permanente debido a las pérdidas económicas derivadas. Se calcula que los costos producidos por mortalidad, vacunación y tratamientos asociados con SRS estuvieron cerca de US\$ 450 millones de dólares en el 2012 (Camussetti y col., 2015). Al comparar este valor con el total de salmón exportado para el mismo periodo (US\$ 2.890 millones de dólares FOB), observamos que los costos debidos a brotes de SRS representaron casi el 16% del salmón exportado. Esta estimación requiere actualización, ya que la tendencia indica que hay una relación directa entre el aumento de producción y los brotes de SRS. Un problema anexo es el uso frecuente y dosis elevadas de antibióticos, necesarios para controlar los brotes y evitar la diseminación del patógeno (Rozas y Enriquez, 2014). Lo anterior ha impactado negativamente

la imagen de la industria, la cual se ha visto afectada por una baja de precios de mercado que está recién revirtiéndose. Dada la magnitud de las pérdidas y los costos ambientales, la Piscirickettsiosis es, sin duda, una seria amenaza para la competitividad, sustentabilidad y, en último término, el desarrollo futuro de la salmonicultura nacional.

En años recientes, se ha producido un avance sustancial en la genómica de *P. salmonis*. Se han dado a conocer varios borradores de secuencia de genomas de distintos aislados (Eppinger y col., 2013; Yañez y col., 2014). En este contexto, ADL Diagnostic Chile contribuyó con borradores de genomas de dos aislados de linajes diferentes, muy prevalentes: A1-15972 (tipo EM-90) y B1-32597 (tipo LF-89) (Bohle y col., 2014). Más tarde, se publicó la secuencia completa de la cepa tipo LF-89T (Pulgar y col., 2015). Para sorpresa nuestra, *P. salmonis* contiene varios plásmidos, elementos que se replican de manera autónoma y que pueden contener genes de virulencia, resistencia a antibióticos, o bien ser importantes para persistir bajo condiciones adversas como

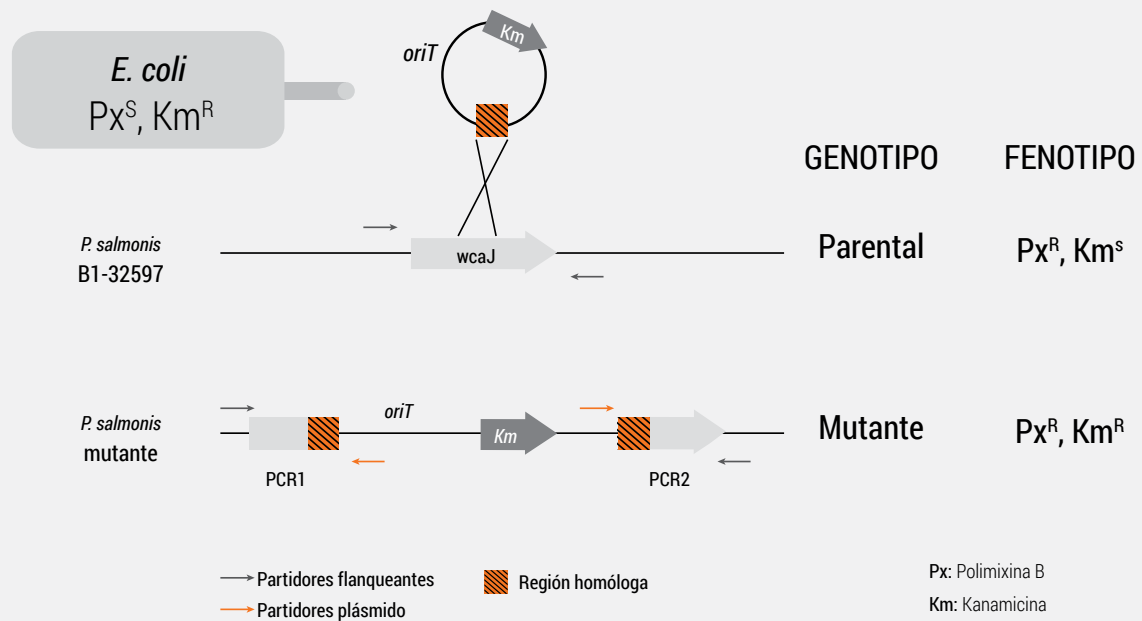


Figura 1. Estrategia de mutagénesis por integración. Las manipulaciones se hacen en *E. coli*, la cual transfiere el plásmido a la cepa de *P. salmonis* B1-32597 por conjugación. El plásmido contiene, además de un marcador de antibióticos (kanamicina, Km), una región *ori* que permite su movilización. La región homóloga es idéntica en secuencia a una región del gen blanco (*wcaJ*), lo que permite la inserción del plásmido por efecto de recombinación homóloga. La inserción interrumpe el marco de lectura del gen, produciendo a su vez una alteración en la expresión y producción de la proteína o enzima codificada. Lo anterior se traduce finalmente en un cambio de fenotipo.

son las que imponen los mecanismos de defensa del hospedero. Este hallazgo sugiere al menos que la bacteria es capaz de incorporar ADN desde fuentes externas, contradiciendo lo que se creía era hasta el momento un dogma; *P. salmonis* es refractaria a la introducción de material genético (Berger, 2014).

P. salmonis fue aislada por primera vez hace más de 25 años (Fryer y col., 1992). Sin embargo, el estudio de su biología está aún en una etapa temprana. Un paso importante para esclarecer la naturaleza patogénica de *P. salmonis* es disponer de herramientas genéticas para su manipulación. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método para la mutagénesis dirigida de *P. salmonis*, no sólo con el propósito de avanzar en el conocimiento, sino que además, con la intención de generar un insumo microbiológico que pueda utilizarse como modelo para el desarrollo de una vacuna viva atenuada.

Aprovechando las características de un plásmido que se utiliza para mutagénesis de diversas especies bacterianas (Quandt y Hynes, 1993), se generó un fragmento de ADN por PCR de una secuencia parcial de un gen, el cual se clonó en dicho plásmido

en *Escherichia coli*. El gen codifica para una enzima que participa presuntamente en la biosíntesis del exopolisacárido (EPS) de *P. salmonis* B1-32597, hipótesis que proviene del análisis del respectivo borrador de genoma publicado previamente (Bohle y col., 2014). Debido a que el plásmido no se replica en *P. salmonis* y a que contiene una secuencia homóloga al ADN de la bacteria, es esperable un evento de recombinación homóloga que conduzca a la integración de dicho plásmido en el cromosoma.

Este mecanismo es tan específico, que la integración se producirá en el gen blanco definido previamente. La consecuencia directa de este evento es la disrupción del gen en estudio y, por lo tanto, una cepa mutante (Figura 1). Los aislados de *P. salmonis* manifiestan resistencia intrínseca a la polimixina B (resultados no publicados), la cual excede varias veces la tolerancia de *E. coli* que sirve como dador de material genético. Por lo tanto, la selección de cepas mutantes se realiza utilizando medios de cultivo selectivos que contiene una combinación de antibióticos que es tolerada solamente por bacterias que han integrado el plásmido (polimixina B, kanamicina).

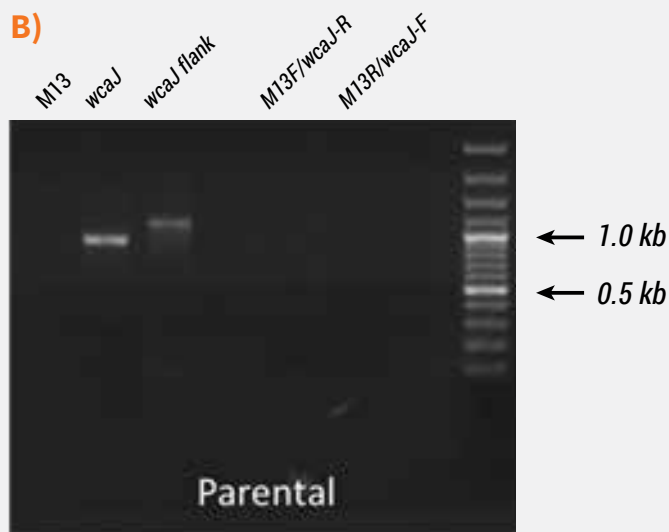
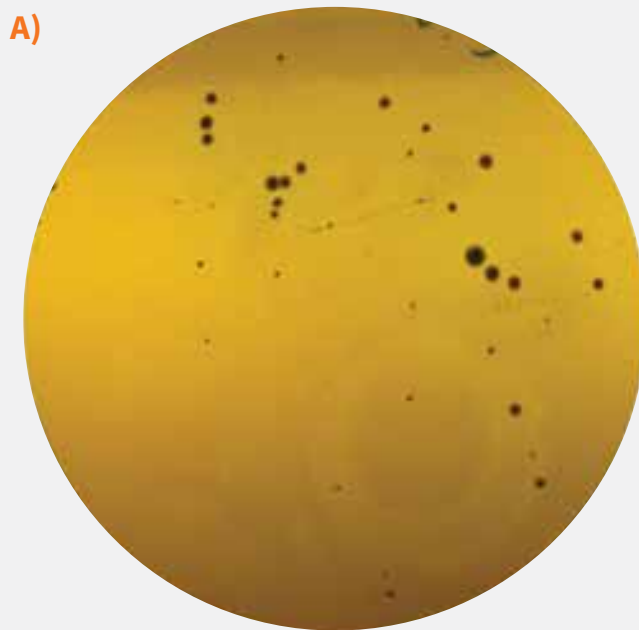


Figura 2.
Colonias mutantes de *P. salmonis wcaJ*.
A) Placa de agar ADL-PSA conteniendo mezcla de polimixina B-kanamicina. B) Caracterización por PCR utilizando distintas parejas de partidores (M13, partidores plásmido; wcaJ, partidores gen de *P. salmonis*).

El genotipo del mutante es fácilmente rastreable por PCR, generándose fragmentos específicos producto del apareamiento de partidores dirigidos a la secuencia del plásmido y secuencias flanqueantes del gen en estudio. Una vez aisladas las colonias (Figura 2A), se procedió a la confirmación del genotipo mediante PCR, donde se amplifican fragmentos únicos para la cepa mutante (Figura 2B). La falta de amplificación con partidores flanqueantes al gen, sugiere la mutación de esa secuencia producto de la integración del plásmido (Figura 2B). El resultado negativo se explica por el tamaño de la secuencia integrada, la cual supera el tamaño convencional para reacciones de PCR de este tipo.

Los EPS en bacterias son moléculas importantes que median interacciones con el medio externo y/o con el hospedero (Schmid y col., 2015). Las mutaciones que afectan la ruta de biosíntesis del EPS generalmente producen cambios en el fenotipo de colonia, lo que refleja una pérdida de integridad de dicho componente. Lo anterior se debe a que alteraciones a distintos niveles pueden afectar el ensamble o destinación del EPS. El EPS conforma una capa muy expuesta y en estrecha relación a membranas bacterianas resultando ser, generalmente, un antígeno inmunodominante, así como también un factor de virulencia para patógenos. La presencia de EPS en *P. salmonis* ha sido demostrada, la cual estaría conectada a la capacidad de la bacteria de persistir bajo condiciones de stress nutricional (Marshall y col., 2012). Sin embargo, el papel que puede jugar el EPS en la infección no se ha estudiado aún. La mutante de *P. salmonis* que se generó en este estudio tiene interrumpido artificialmente un gen ortólogo a *wcaJ* de *Edwardsiella tarda* (Yu y col., 2015), el cual codifica presumiblemente para la enzima que cataliza el inicio de la síntesis del EPS de *P. salmonis*. La figura 3 muestra la morfología y coloración de colonias mutantes. Como era de esperarse, las mutantes presentaron forma irregular y mayor afinidad por el colorante presente en el medio, tornándose oscuras al cabo de varios días. Aunque este resultado sugiere un defecto de membrana externa, probablemente sobre el EPS, falta aún confirmar este hallazgo mediante

otro tipo de análisis como formación de biopelícula, o bien adherencia al hospedero.

A la caracterización parcial anterior, se sumó la determinación de la alteración del crecimiento producto de la mutación introducida (**Figura 4**). De hecho, la inspección de las cinéticas de crecimiento indica que la mutante B1-32597 *wcaJ* creció más rápido que la cepa parental, ya a inicios de la fase logarítmica. Un cambio en la curva de crecimiento no necesariamente se relaciona con un defecto en la virulencia de un patógeno bacteriano, sino más bien responde a la supresión de una ruta metabólica probablemente necesaria para la infección. Ya que la virulencia representa una medida cuantitativa de la patogenicidad, para evaluar esta propiedad, se requiere de experimentación en el animal vivo. No obstante, un buen predictor del comportamiento *in vivo* suele ser la capacidad de infectar células y/o producir una infección activa *in vitro*. Para ello, se requiere de un modelo celular adecuado.

En el caso de *P. salmonis*, existen varias líneas celulares derivadas de peces que se han utilizado tanto para diagnóstico, como investigación (Fryer y col., 1990; Birkbeck y col., 2004; Rojas y col., 2009; Smith y col., 2015). Utilizando células CHSE-214, las cuales se inocularon a una razón de 10 bacterias por célula (*multiplicity of infection*, MOI = 10), monitoreamos la progresión de la destrucción de la monocapa infectada por un lapso de 14 días. Con el propósito de hacer más objetiva esta medición, se utilizó qPCR para cuantificar el ADN de la bacteria, cantidad que es proporcional a la multiplicación del patógeno.

En efecto, en la **figura 5** se registró una reducción de la capacidad infectiva de la cepa mutante, no así la cepa parental cuya multiplicación anotó incluso un repunte al finalizar el ensayo. Este resultado sugiere que el EPS de *P. salmonis* juega un papel importante en la interacción hospedero-patógeno. Por supuesto, si queremos confirmar la hipótesis de reducción de la virulencia, deberemos completar la investigación con ensayos en el modelo *in vivo*.



Figura 3. Fenotipo de colonia de la mutante *wcaJ* de *P. salmonis* sobre medio ADL-PSA. Nótese la forma irregular de las colonias. Las flechas blancas indican colonias que han experimentado un cambio de coloración.

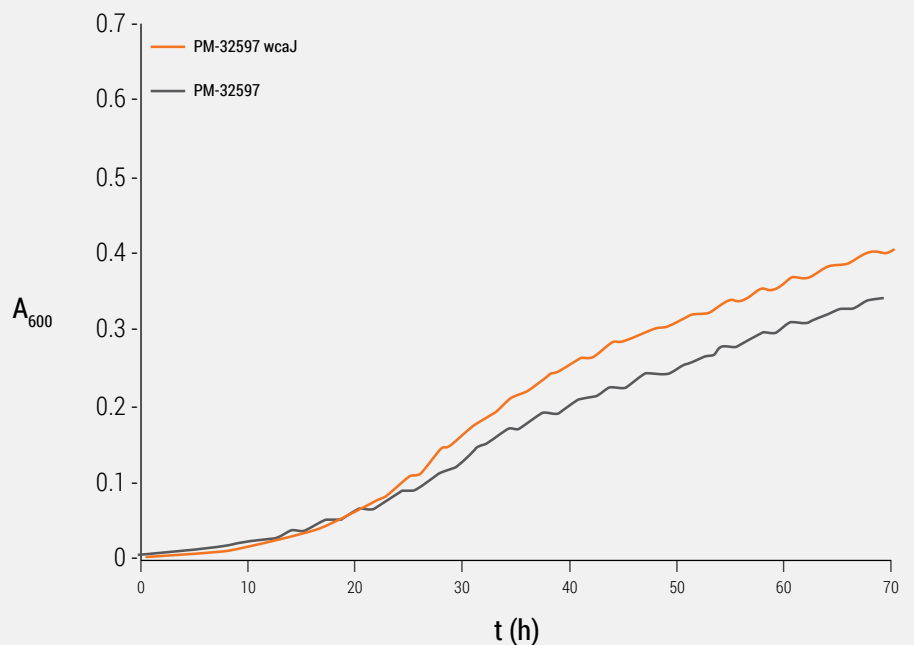
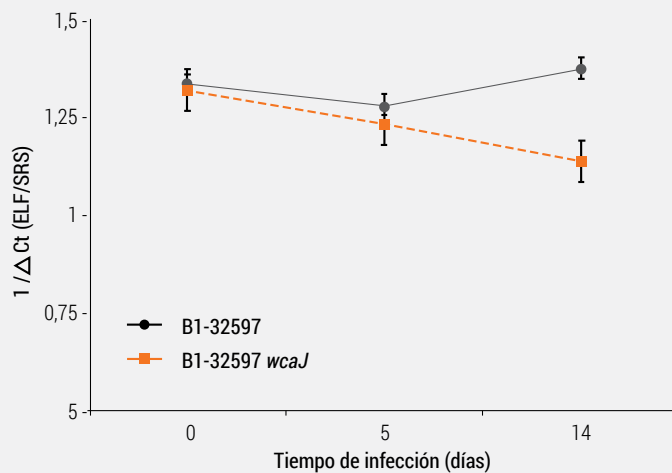


Figura 4. Curvas de crecimiento de cepa parental (B1-32597) y mutante (B1-32597 *wcaJ*) a 18°C y en caldo ADL-PSB. Las mediciones se realizaron con espectrofotómetro de microplacas EPOCH2, Biotek. Los inóculos correspondieron a 30 μ l de una dilución 1:10 de suspensión bacteriana ajustada a $A_{600} = 1,0$ en volumen final de 150 μ l de caldo.

Figura 5.
Cinéticas de multiplicación de cepas bacterianas en células CHSE-214 obtenidas por qPCR. El gráfico representa el valor recíproco del cociente entre el Ct SRS normalizado por el valor de Ct de ELF a diferentes tiempos, posterior a una infección con cepa parental o cepa mutante. Las monocapas de células se sembraron a una MOI (multiplicidad de infección) = 10.



Si bien el método de mutagénesis que describimos aquí representa un gran avance, un problema que puede presentarse, es la alteración de la expresión de genes ubicados “río abajo” de la mutación. Por lo tanto, la interpretación de los fenotipos de las mutantes debe realizarse cuidadosamente. Otra desventaja es que para desarrollar productos biotecnológicos como vacunas vivas atenuadas, se requiere de cepas que no posean marcador de antibióticos. Lo anterior, debido a que las autoridades regulatorias cuestionan el uso de éstas para formulación de vacunas, por el potencial peligro de diseminación de genes de resistencia entre la población silvestre de bacterias. Por ello, nuestra investigación en curso se enfoca en desarrollar una metodología que elimine rastros de genes de resistencia. De esta forma, dispondremos de una herramienta potente de manipulación genética que permitirá avanzar en la caracterización de las bases de la patogenicidad de *P. salmonis*, junto con aportar material biológico único para su estudio. Además, la metodología mejorada abrirá paso al desarrollo de futuras soluciones biotecnológicas necesarias para controlar la Piscirickettsiosis.

En resumen, nuestros resultados nos permiten concluir que hemos establecido un método para la introducción e integración de ADN exógeno dentro del genoma de células de *P. salmonis*.

Además, con la aplicación de este protocolo pudimos obtener la primera mutante de *P. salmonis* en un gen de

la biosíntesis del EPS, probablemente esencial para la virulencia del patógeno. Sin embargo, se requiere más investigación para verificar esta hipótesis. Finalmente, y no menos importante hemos demostrado que la manipulación genética de *P. salmonis* es factible.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el aporte de fondos de los proyectos Fondecyt 11130347 y Corfo 15ITE1-45434.

Referencias

- Camussetti, M., Gallardo, A., Aguilar, D. & Larenas, J. (2015) Análisis de los costos por la utilización de quimioterápicos y vacunas en la salmonicultura. *Salmonexpert* 4: 46-49.
- Rozas, M. & Enriquez, R. (2014) Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J Fish Dis*, 37, 163-188.
- Eppinger, M., Mcnair, K., Zogaj, X., Dinsdale, E.A., Edwards, R.A. & Klose, K.E. (2013) Draft Genome Sequence of the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Genome Announc*, 1, e00926-00913.
- Yañez, A.J., Molina, C., Haro, R.E., Sanchez, P., Isla, A., Mendoza, J., Rojas-Herrera, M., Trombert, A., Silva, A.X., Carcamo, J.G., Figueroa, J., Polanco, V., Manque, P., Maracaja-Coutinho, V. & Olavarría, V.H. (2014) Draft Genome Sequence of Virulent Strain AUSTRAL-005 of *Piscirickettsia salmonis*, the Etiological Agent of Piscirickettsiosis. *Genome Announc*, 2, e00990-00914.
- Bohle, H., Henriquez, P., Grothusen, H., Navas, E., Sandoval, A., Bustamante, F., Bustos, P. & Mancilla, M. (2014) Comparative genome analysis of two isolates of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* from different hosts reveals major differences in virulence-associated secretion systems. *Genome Announc*, 2, e01219-01214.
- Berger, E. (2014) *Piscirickettsia salmonis*; characterization and infection in the zebrafish model. In: Department of Biosciences, p. 74. University of Oslo, Oslo. Tesis de Master in Molecular Biosciences.
- Quandt, J. & Hynes, M. F. (1993) Versatile

- suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127:15-21.
- Schmid, J., Sieber, V. & Rehm, B. (2015) Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol*, 6, 496.
- Marshall, S.H., Gomez, F.A., Ramirez, R., Nilo, L. & Henriquez, V. (2012) Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth stress conditions: a putative *in vivo* survival/persistence strategy in marine environments. *Res Microbiol*, 163, 557-566.
- Yu, M., Xu, Y., Xu, T., Wang, B., Sheng, A. & Zhang, X. (2015) *WcaJ*, the initiating enzyme for colanic acid synthesis, is required for lipopolysaccharide production, biofilm formation and virulence in *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture*, 437, 287-291.
- Fryer, J.L., Lannan, C.N., Garces, L.H., Larenas, J. & Smith, P.A. (1990) Isolation of a rickettsiales-like organisms from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol*, 25, 107-114.
- Birkbeck, T.H., Griffen, A.A., Reid, H.I., Laidler, L.A. & Wadsworth, S. (2004) Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infect Immun*, 72, 3693-3694.
- Rojas, V., Galanti, N., Bols, N.C. & Marshall, S.H. (2009) Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. *J Cell Biochem*, 108, 631-637.
- Smith, P.A., Diaz, F.E., Rojas, M.E., Diaz, S., Galleguillos, M. & Carbonero, A. (2015) Effect of *Piscirickettsia salmonis* inoculation on the ASK continuous cell line. *J Fish Dis*, 38, 321-324.
- Sepúlveda, D., Bohle, H., Labra, A., Grothusen, H. & Marshall, S.H. (2013) Design and evaluation of a unique RT-qPCR assay for diagnostic quality control assessment that is applicable to pathogen detection in three species of salmonid fish. *BMC Vet Res*, 9, 183.