

## Desafíos y oportunidades para el desarrollo de la salmonicultura en Aysén

Análisis de condiciones de operación en la región

Página 10



Situación sanitaria de la producción de salmones en Aysén

Página 24



Entrevista:  
Raúl Morales, director regional de Corfo Aysén

Página 34



I+D+i:  
Virulencia diferenciada de aislados de campo chilenos de *R. salmoninarum*

Página 46



## Resumen

La virulencia de las cepas de *Renibacterium salmoninarum*, agente etiológico del BKD, ha sido relacionada al contenido de hemaglutinina p57 a nivel de membrana. El objetivo de este estudio fue estudiar la virulencia de aislados chilenos del patógeno en una prueba de desafío en salmón Atlántico pre-smolt y correlacionar el nivel de dicha propiedad con características fenotípicas *in vitro* de las bacterias. La mayoría de los aislados, excedieron la capacidad de autoaglutinación de la cepa ATCC 33209 (cepa virulenta) y se observó que la capacidad de aglutinación está directamente relacionada con la velocidad de crecimiento. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de p57. En la experimentación *in vivo*, se pudo constatar que aquellos aislados con baja capacidad de autoaglutinación, a su vez, mostraron un nivel de virulencia menor.

# Virulencia diferenciada de aislados de campo chilenos de *Renibacterium salmoninarum*

A. Ojeda<sup>1</sup>, J. Saavedra<sup>1</sup>, M. Grandón<sup>1</sup>, S. Villar<sup>1</sup>, M. Oyarzún<sup>2</sup>, N. Macaya<sup>2</sup>, P. Ibarra<sup>2</sup>, F. Bustamante<sup>1</sup>, P. Bustos<sup>1</sup> y M. Mancilla<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico y Biotecnología, ADL Diagnostic Chile, Puerto Montt, Chile

<sup>2</sup>Aquainnovo S.A., km 33 Camino Carretera Austral, Puerto Montt, Chile

\*mmancilla@adldiagnostic.cl

## Introducción

*Renibacterium salmoninarum* es un diplobacilo Gram positivo y patógeno intracelular facultativo, causante de la Enfermedad Bacteriana del Riñón o BKD (del inglés *bacterial kidney disease*) (Sanders y Fryer, 1980). BKD es considerada una enfermedad reemergente, cuya prevalencia ha ido en aumento, especialmente en salmón Atlántico. De hecho, según cifras oficiales, BKD es una de las causas más comunes de mortalidad adscrita a enfermedades infecciosas (Sernapesca 2019). Aunque la enfermedad es tan antigua como la acuicultura de salmónidos, todavía no existen vacunas efectivas que prevengan la expresión clínica, las pérdidas asociadas y el uso de antibióticos para el tratamiento de la enfermedad.

La virulencia se define como el aspecto cuantitativo de la patogenicidad, es decir, designa el carácter patogénico

y nocivo de un microorganismo y su capacidad para producir la enfermedad, la que depende del agente y no de la interacción con el ambiente y hospedero. Para determinarla, se requiere un modelo, sea este *in vitro* o *in vivo*, que permita establecer dicha expresión cuantitativa. En el caso de BKD, la virulencia de las cepas ha sido relacionada al contenido de hemaglutinina p57 a nivel de membrana, un factor de virulencia relevante para la bacteria (Daly y Stevenson, 1990).

Inicialmente, la capacidad de autoaglutinación de la bacteria, que está relacionada a la hidrofobicidad, se consideró como predictor de virulencia; aquellos aislados con una alta capacidad de autoaglutinación son más virulentos (Bruno 1988). Estudios recientes realizados sobre aislados de campo chilenos de *R. salmoninarum* indican una homogeneidad en cuanto a sus propiedades bioquímicas y antigénicas, con excepción de su hidrofobicidad



(Bethke y col, 2017). No obstante, no se ha estudiado aún en Chile si estos aislados difieren en su capacidad de autoaglutinación ni en su potencial virulento en una prueba *in vivo*.

Debido a la relevancia que tiene en la epidemiología de BKD, el objetivo de este estudio fue ampliar el conocimiento sobre los aislados chilenos de *R. salmoninarum*, estudiando su virulencia en una prueba de desafío en salmón Atlántico pre-smolt y correlacionando el nivel de dicha propiedad con características fenotípicas *in vitro* de las bacterias.

## Materiales y métodos

14 aislados de *R. salmoninarum*, recolectados entre 2013 y 2017, de distintos orígenes geográficos, especies, tejidos y etapa de ciclo productivo (Tabla 1), se cultivaron en medio KDM-2, por 14 días y a 18 °C. Como referencia se usó la cepa ATCC 33209.

Para los experimentos de autoaglutinación, se prepararon en triplicado suspensiones bacterianas en buffer PBS y a  $DO_{600} = 1,0$ . Las lecturas se realizaron cada una hora y por 6 h en

Tabla 1. Aislados de *R. salmoninarum* utilizados en el estudio.

Aislado/ cepa	Año	Tejido	Especie	Etapa ciclo	Origen	Referencia
ATCC	1974	Riñón	Chinook	alevín	Oregon, US	Sanders y Fryer 1980
Rs1	2013	Riñón	Coho	adulto	Region X, CL	Este estudio
Rs2	2013	Riñón	Coho	adulto	Region X, CL	Este estudio
Rs3	2013	Riñón	Coho	adulto	Region X, CL	Este estudio
Rs4	2013	Riñón	Salar	<i>smolt</i>	Region X, CL	Este estudio
Rs5	2013	Riñón	Salar	juvenil	Region X, CL	Este estudio
Rs6	2015	Riñón	Salar	<i>smolt</i>	Region X, CL	Este estudio
Rs7	2015	Cerebro	Salar	adulto	Region XI, CL	Este estudio
Rs8	2015	Riñón	Salar	adulto	Region XI, CL	Este estudio
Rs9	2015	Riñón	Salar	adulto	Region XI, CL	Este estudio
Rs10	2016	Riñón	Salar	<i>smolt</i>	Region X, CL	Este estudio
Rs12	2017	Riñón	Salar	adulto	Region XII, CL	Este estudio
Rs11	2017	Riñón	Salar	alevín	Region IX, CL	Este estudio
Rs13	2017	Riñón	Salar	alevín	Region X, CL	Este estudio
Rs14	2017	Riñón	Salar	juvenil	Region IX, CL	Este estudio

US: Estados Unidos; CL: Chile.

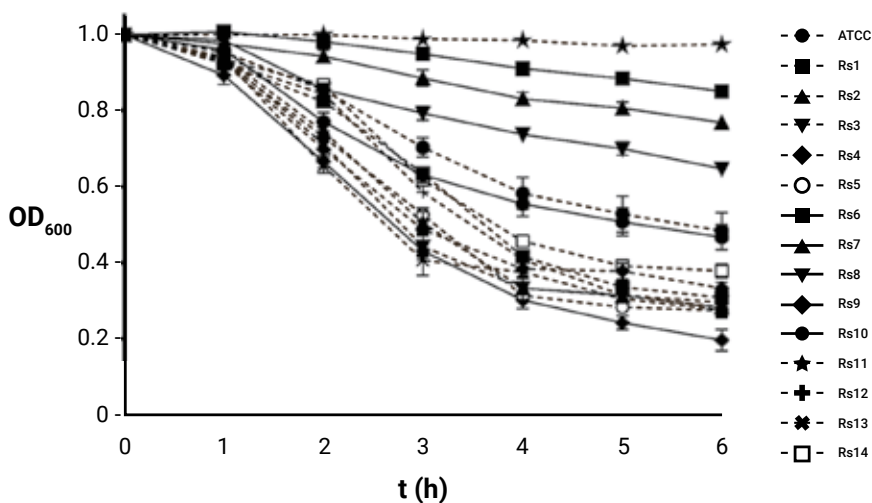


Figura 1: Ensayo de autoaglutinación de aislados de campo de *R. salmoninarum*.

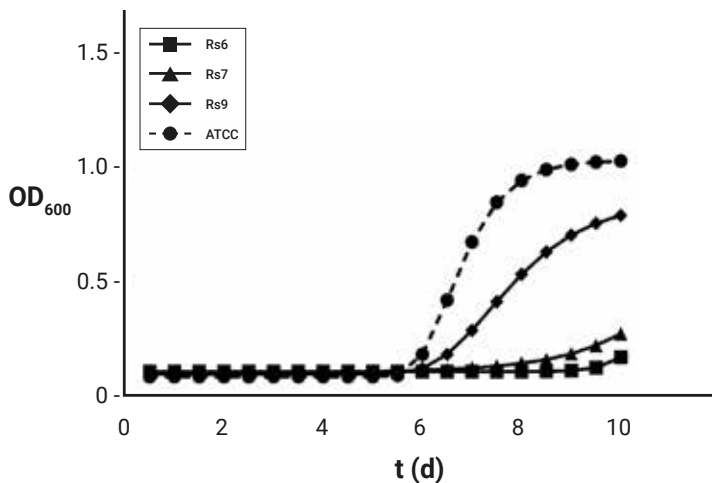


Figura 2: Cinética de crecimiento en caldo KDM-2 de aislados escogidos.

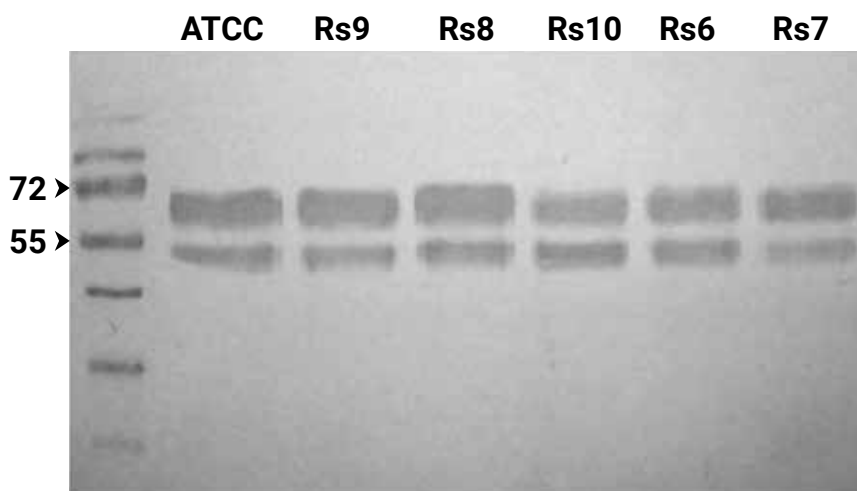


Figura 3: Análisis por *Western blot* de membranas de aislados de *R. salmoninarum*. Los números a la izquierda indican el tamaño molecular en kDa de bandas de proteínas de referencia. Las bandas que aparecen en los distintos carriles corresponden ambas a la hemaglutinina p57.

densitómetro, a 18 °C. Cinéticas de cultivo en KDM-2 se hicieron a partir del material descrito previamente, el que se utilizó para inocular matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de caldo KDM-2, en una relación 1:100. Los cultivos se incubaron a 18 °C y se tomaron alícuotas de 1 ml diariamente, las que se midieron con densitómetro. Para comparar el nivel de producción de proteína p57, se llevó a cabo un *Western blot* sobre una fracción de proteínas de membrana de aislados seleccionados, con un anticuerpo monoclonal comercial (Ango).

La virulencia se determinó en un experimento *in vivo*, utilizando alevines de salmón Atlántico (*Salmo salar*). Cinco grupos de 15 peces, por triplicado y con un peso promedio de  $62 \pm 2,54$  g, se mantuvieron en estanques de 250 l, a 10,3 °C y por 40 días. Cada animal recibió una dosis de 0,1 ml conteniendo  $\sim 10^8$  unidades formadoras de colonias. Un grupo control se inyectó con idéntico volumen de PBS. La mortalidad acumulada se retiró diariamente, de la cual se extrajeron muestras de riñón para detección de *R. salmoninarum* mediante RT-PCR. Al mismo tiempo, se realizó necropsia a cada pez para determinar los signos clínicos compatibles con un cuadro de BKD.

## Resultados

En los experimentos de autoaglutinación, se obtuvo una serie de curvas que indican el comportamiento de esta propiedad entre los distintos aislados (Figura 1). Podemos observar que hubo ciertos aislados que se comportaron como la cepa ATCC 33209, la cual se ha utilizado como cepa virulenta en ensayos *in vivo*. La mayoría de los aislados excedieron la capacidad de autoglutinación de la cepa ATCC, aunque también hubo algunos que casi se mantuvieron en suspensión durante el transcurso del ensayo (no autoaglutinantes).

A partir de aislados seleccionados, se realizaron cinéticas de crecimiento. Se observó que aislados con una capacidad de aglutinación significativamente menor, como Rs6 y Rs7, crecieron notoriamente más lento, no así aquellos similares o que excedieron la capacidad autoaglutinante

de la cepa de referencia, tales como Rs9 (Figura 2). El contenido de p57 asociado a membrana se comparó entre los aislados anteriores, incluyendo también Rs8, el cual tiene una capacidad autoaglutinante levemente inferior a la referencia. Sin embargo, el análisis no arrojó diferencias evidentes (Figura 3).

Por otro lado, en la experimentación *in vivo*, se pudo constatar que aquellos aislados con baja capacidad de autoaglutinación, a su vez, mostraron un nivel de virulencia menor (expresada en mortalidad acumulada). De hecho, los grupos de peces inoculados con los aislados Rs6 o Rs7 no superaron el 25% de mortalidad transcurridos 40 días post infección (16 y 24%, respectivamente, Figura 4). Por el contrario, los grupos de peces inoculados con aislados autoaglutinantes Rs8, Rs9 o Rs10 mostraron mortalidades por sobre el 50%, en el mismo periodo (75, 69 y 54%, respectivamente).

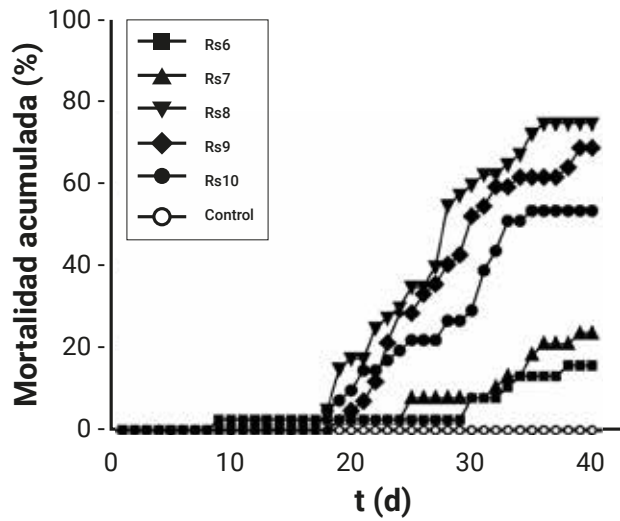


Figura 4: Desafío bacteriano en alevines de salmón del Atlántico. Cada curva representa el promedio de grupos de 15 peces, por triplicado, inoculados con un único aislado.

**Abbott**

**PROTECCIÓN garantizada**  
en tratamiento de Agua Dulce

**FAV Veterinary Pharmacology**

FARMACOLOGÍA EN AQUACULTURA VETERINARIA FAV S.A.

Es importante mencionar que durante la necropsia de peces y en el caso de las mortalidades, independiente del grupo, se encontraron signos clínicos compatibles con la enfermedad (Figura 5).

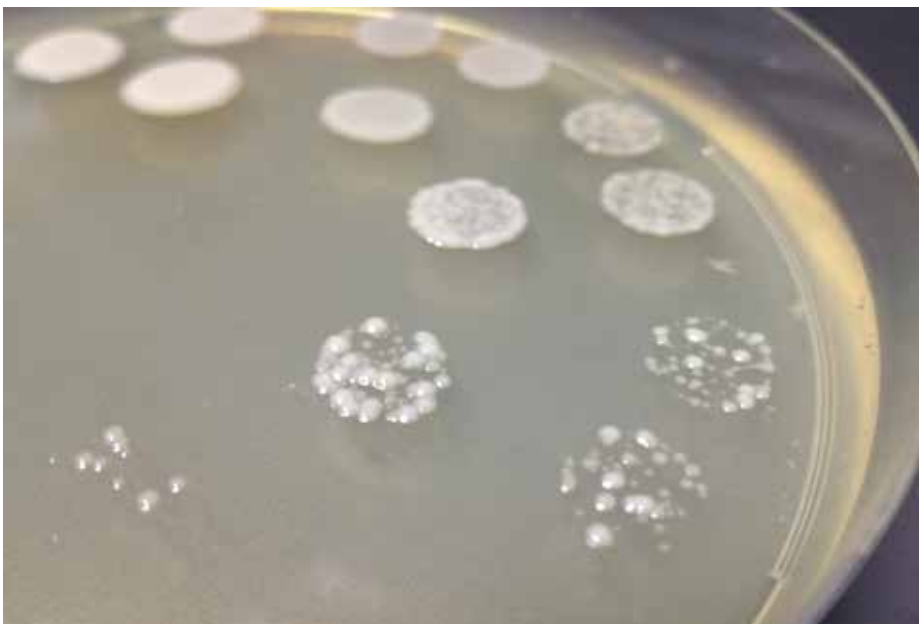
### Discusión

En el presente estudio, los datos sugieren una correlación entre la capacidad de autoaglutinación de los aislados de *R. salmoninarum* y su correspondiente nivel de virulencia. En efecto, se pudo constatar que los aislados de menor capacidad de autoaglutinación, Rs6 y Rs7, produjeron una mortalidad acumulada menor que

aquellos aislados con autoaglutinación cercana a la cepa de referencia. Sin embargo, esta relación no tiene una base molecular clara, ya que demostramos que todos los aislados producen la hemaglutinina p57, indistintamente del grado de virulencia exhibido (Figura 3).

Lo anterior confirma un hecho descrito en la literatura hace más de 20 años atrás, en donde se demostró que aislados con casi nula capacidad de autoaglutinación también producen la proteína (Senson y Stevenson, 1999). En el citado trabajo, se sugirió que la virulencia de un aislado depende en cierta medida no sólo del contenido de p57, sino también del grado de asociación de esta a la superficie bacteriana a través de carbohidratos, componente ausente en aislados de baja capacidad autoaglutinante.

Llama la atención la velocidad de crecimiento de los aislados, la cual parece estar relacionada con su capacidad autoaglutinante. De hecho, los aislados menos virulentos Rs6 y Rs7 resultaron crecer claramente más lentos que sus contrapartes autoaglutinantes Rs9 y ATCC, en el medio estándar KDM-2 (Figura 2). Variantes de crecimiento lento y fastidiosas han sido descritas en varios patógenos, las que corresponderían a subpoblaciones de aislados. Estas suelen estar asociadas a cambios en la morfología de colonia, a cuadros crónicos y recurrentes, representando versiones mejor adaptadas a su hospedero (Proctor, 2006). Sin embargo, para el caso de los



Cultivo de *R. salmoninarum*. Foto: José Saavedra.



Figura 5: Hallazgos de necropsia de la mortalidad obtenida durante el bioensayo (representativos). A) Granulomas multifocales en hígado y hepatomegalia. B) Esplenomegalia y granulomas en bazo.

aislados de *R. salmoninarum* del presente estudio, no observamos siquiera un dimorfismo de colonia en aquellos de crecimiento lento que pudiera soportar tal conclusión.

Otro posible origen de este tipo de aislados de virulencia reducida, es que correspondan a mutantes metabólicas presentes en la naturaleza, cuyo crecimiento *in vitro* muestre una velocidad particular y que dicha característica está en directa relación con el nivel de mortalidad observado. Esperamos que nuestro estudio de secuenciación, que está en progreso, permita identificar mutaciones que apoyen esta idea u otras hipótesis alternativas.

Desde el punto de vista de la epidemiología de la enfermedad, resultó interesante comprobar que, al igual que en el hemisferio norte, en Chile existen aislados de *R. salmoninarum* con diferentes grados de virulencia. Dada las limitaciones del estudio y, específicamente, al tamaño de la colección de aislados, no podemos hacer una estimación de las prevalencias de los distintos aislados, ni extrapolar su representatividad al contexto general. La recuperación de un mayor número de aislados y su caracterización *in vitro* nos ayudarán a responder la pregunta sobre cuál es la cepa predominante en nuestro país.

En un futuro cercano, esperamos proyectar esta investigación en el establecimiento de un ensayo por cohabitación, con toda la complejidad técnica que ello supone, el cual creemos propenderá a mejorar nuestra comprensión de la enfermedad, a su vez facilitando el desarrollo de una nueva generación de herramientas de control y tratamiento. No obstante, nuestros resultados indican que el modelo de desafío intraperitoneal desarrollado en este trabajo, fue capaz de producir mortalidades en un tiempo relativamente breve para la biología de *R. salmoninarum*.

En base a nuestra experiencia, el modelo es consistente y de alta reproducibilidad, cualidades deseables para la evaluación de herramientas de control que ya están en desarrollo. En este contexto, hemos llevado a cabo pruebas de seguridad y

eficacia de un prototipo de vacuna viva atenuada para BKD bajo este modelo, con resultados preliminares muy satisfactorios. Esta y otras novedades sobre esta relevante materia serán reveladas durante el segundo semestre del año en curso •

## Agradecimientos

Este estudio fue financiado por aportes internos de las compañías involucradas y por fondos del proyecto CORFO 18IDAE-90504.

## Referencias

- Bethke, J., J. Quezada, M. Poblete-Morales, R. Irgang, A. Yanez, C. Oliver & R. Avendaño-Herrera. 2017. Biochemical, serological, and genetic characterisation of *Renibacterium salmoninarum* isolates recovered from salmonids in Chile. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 37: 169-180.
- Bruno, D. 1988. The relationship between auto-agglutination, cell surface hydrophobicity and virulence of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol Lett*, 51: 135-140.
- Daly, J. R. & Stevenson. 1990. Characterization of the *Renibacterium salmoninarum* haemagglutinin. *J Gen Microbiol*, 136: 949-953.
- Proctor, R., C. Von Eiff, B. Kahl, K. Becker, P. Mcnamara, M. Herrmann & G. Peters. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*, 4: 295-305.
- Sanders, J. & J. Fryer. 1980. *Renibacterium salmoninarum* gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of *Bacterial Kidney Disease* in Salmonid Fishes. *Int J Syst Bacteriol*, 30: 496-502.
- Senson, P. & R. Stevenson. 1999. Production of the 57 kDa major surface antigen by a non-agglutinating strain of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Dis Aquat Organ*, 38: 23-31.
- Sernapesca. 2019. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmicultura nacional año 2018. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion>.