

***Francisella philomiragia*, bacteria asociada con altas mortalidades en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) cultivados en balsas-jaulas en el lago Llanquihue**

Francisella philomiragia, a bacteria associated with high mortalities in Atlantic salmon (*Salmo salar*) cage-farmed in Llanquihue lake

H Bohle*, E Tapia, A Martínez, M Rozas, A Figueroa, P Bustos

Laboratorio de Diagnóstico y Biotecnología, ADL Diagnostic Chile Ltda., Puerto Montt, Chile.

SUMMARY

Francisella philomiragia was isolated from Atlantic salmon cage-farmed in the Llanquihue lake with outbreaks of a granulomatous disease, with high rates of morbidity and an accumulated mortalities between 5% to 20%. The isolates had 100% similarity with *F. philomiragia* ssp *noatunensis* or *F. piscicida* isolated in Atlantic cod, 99% similarity with *Francisella* sp. detected in tilapia from Asia and Central America and 99% of similarity with the reference strain *F. philomiragia* through 16s rDNA phylogenetic analysis.

Palabras clave: *Francisella philomiragia*, salmón del Atlántico, análisis filogenético.

Key words: *Francisella philomiragia*, Atlantic salmon, phylogenetic analysis.

INTRODUCCIÓN

A fines de la década de 1980, se detectó en Chile una nueva patología infecciosa cuyo agente causal presentaba morfología rickettsial (Bravo y Campos 1989) y fue denominado “unidentified agent”. Este agente fue aislado por primera vez en una línea celular de embrión de salmón Chinook CHSE-214 (Fryer y col 1990) y posteriormente identificado como *Piscirickettsia salmonis* (Fryer y col 1992). La piscirickettsiosis ha sido una de las principales causas de mortalidad en salmónidos cultivados en las costas marinas del sur de Chile y ha significado grandes pérdidas económicas para la salmicultura chilena. Sin embargo, a mediados de la década de los 1990 se logró aislar un segundo agente con morfología rickettsial en salmón del Atlántico cultivado en el lago Llanquihue (Cvitanich y col 1995), denominado “unidentified agent 2” (U2 o UA-2) para diferenciarlo de *P. salmonis* (Unidentified agent). Desde junio del 2006 plantales de salmón del Atlántico cultivado en balsas-jaulas en el lago Llanquihue presentaron altas tasas de morbilidad y mortalidad, con varios y simultáneos brotes de una enfermedad crónica de tipo granulomatosa principalmente evidenciada a nivel de bazo y que en todos los casos se detectó y se aisló un agente bacteriano con morfología rickettsial sugerente de U2 (Birkbeck y col 2007).

El análisis filogenético de las secuencias del gen 16s rDNA de los aislados reveló pertenecer a la familia Francisellaceae, la que fue descrita en el año 2005 por

Sjøstedt y agrupa a bacterias dentro de la subclase gamma proteobacteria y tiene un solo género, *Francisella*. Este género tiene dos especies tipo, *F. tularensis* patógeno humano (Nano y col 1992) y *F. philomiragia* aislado desde fuentes de agua, ratas de río y de algunas infecciones accidentales en humanos (Hollis y col 1989). Adicionalmente, existe una gran cantidad y variedad de otras *Francisella* sp. de afiliación incierta y que han sido aisladas de diversas fuentes tales como garrapatas (Scoles 2004), del ambiente (Barns y col 2005) y de una amplia variedad de peces (Chen y col 1994, Mauel y col 2003, Nylund y col 2006). El análisis filogenético de los genes 16s rDNA, espaciador intergénico (ITS), 23s rDNA, *rpoB*, *fopA*, *groEL*, *lpnB* y *sdhA*, reveló que los aislados pertenecen al grupo *F. philomiragia* y un 100% de similitud con *F. philomiragia* ssp *noatunensis* (Mikalsen y col 2007), formando parte del mismo grupo en conjunto con otras Francisellas aisladas de bacalao en Noruega, tilapia en Asia y América Central (Nylund y col 2007, Mikalsen y col 2007, Mauel y col 2007).

El presente estudio tiene como objetivo mostrar antecedentes generales de la patología, condiciones de aislamiento, fisiológicos, susceptibilidad y filogenéticos de los aislados bacterianos de *Francisella philomiragia* aislados de salmón del Atlántico.

MATERIAL Y MÉTODOS

PECES

Salmones del Atlántico con brotes de la enfermedad fueron capturados y trasladados al laboratorio de diagnóstico y biotecnología de ADL Diagnostic Chile Ltda. para su análisis clínico. Los peces presentaron un peso

Aceptado: 03.06.2009.

* Casilla 160, Puerto Montt, Chile; hbohle@adldiagnostic.cl

promedio de 60 g (30 a 80 g), con una mortalidad mensual acumulada entre 5 a 20% en la mayoría de los centros de cultivo (9 de 15 centros).

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO, SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y CULTIVO CELULAR

Tejidos de riñón, bazo, hígado, corazón, aletas y branquias de los peces afectados fueron cultivados bajo condiciones de completa asepsia en los medios bacteriológicos agar tripticasa de soya¹, agar columbia suplementado con 5% sangre cordero², agar Mueller-Hinton¹, Agar nutriente¹ 0% y 6% NaCl, agar BHI¹ y agar Eugon¹ suplementado con 0,1% L-cisteína³, 1% glucosa⁴, 6% (v/v) yeastolate⁵ y 10% (v/v) suero fetal bovino⁶ e incubados por 8 semanas a 18 °C con monitoreo diario para la observación de crecimiento de colonias bacterianas. Desde las colonias bacterianas se realizó tinción Gram⁴ para evaluar la morfología y características tintoriales, además de las pruebas bioquímicas de oxidasa⁴ y catalasa. Adicionalmente, se determinó la sobrevivencia de los aislados en agar Eugon enriquecido y suplementado con diferentes concentraciones finales de NaCl⁴ (0,4%, 1%, 2%, 3% y 6%) a 18 °C por 8 semanas de incubación. Paralelamente, se evaluó el desarrollo de colonias de los aislados en agar Eugon enriquecido a diferentes temperaturas (5, 10, 15, 18, 20, 22, 25, 30 y 37 °C) durante 8 semanas de incubación. Se determinó la concentración inhibitoria mínima de los aislados para florfenicol⁷, amoxicilina⁷, flumequina⁷, oxitetraciclina⁷ y ácido oxolínico⁷ según método de medición de susceptibilidad en dilución en caldo para bacterias aisladas de animales acuáticos (M49-A, CLSI 2006) usando como control *E. coli* ATCC 25922.

Riñones asépticamente tomados con tórula² fueron inoculados en placas de 24 pocillos⁸ con las líneas celulares CHSE-214 (Chinook salmo embryo) cultivado en MEM-10⁵, 2 mM L-glutamina⁵ y sin antibióticos. Otras líneas celulares también fueron inoculadas como SHK-1 (*Salmo salar* head kidney), BF-2 (Bluegill fry caudal trunk) en medio Leibovitz L-15⁵ y en líneas celulares continuas desarrolladas en ADL Diagnostic Chile Ltda., correspondientes a RTR-2 (Rainbow trout renoma, 2005) y OKE-1 (Coho salmo embryo, 2003) cultivadas en Leibovitz L-15. Todas las líneas celulares fueron incubadas por 8 semanas a 15 °C con monitoreo diario para la aparición de efecto citopático (ECP).

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Trozos de riñón, bazo e hígado de los peces con lesiones granulomatosas fueron fijados en formaldehído al 10% en PBS (pH 7,2) para su análisis histopatológico. Las muestras procesadas fueron teñidas con hematoxilina-eosina de Harris y tinción Gram previo a su análisis.

Para el análisis por microscopía electrónica fue cosechado 1 ml de suspensión celular de las líneas celulares que presentaron 50% CPE y se centrifugó a 3.000 rpm por 10 minutos, posteriormente el sobrenadante fue eliminado y el botón celular fue resuspendido en glutaraldehído⁴ al 3% en PBS (pH 7,2). Las muestras fueron enviadas a la Universidad Prince Edward Island (UPEI) en la ciudad Charlottetown en Canadá para su procesamiento y análisis.

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO DE LOS GENES *16s* rDNA, *ITS*, *23s* rDNA, *rpoB*, *fopA*, *groEL*, *lpnB* Y *sdhA*

El ADN genómico bacteriano fue extraído utilizando las columnas de extracción EZNA® tissue DNA kit⁹, siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación por PCR de los genes fue llevada a cabo utilizando los partidores descritos en el cuadro 1. Las amplificaciones de PCR fueron ejecutadas en un termociclador T3 (Biometra, Inglaterra) en un volumen final de 50 µl, con una mezcla de 46 µl que contiene 1 U *Taq* polimerasa¹⁰, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM de cada partidor y 4 µl de templado. El perfil térmico utilizado fue de: paso de denaturación inicial a 95 °C por 3 min; 30 ciclos a 95 °C por 40 seg, 50 °C por 40 seg, 72 °C por 1,5 min, seguido por una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% y las bandas correspondientes purificadas con el kit comercial EZNA® Gel extraction kit⁹ siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN purificado fue secuenciado con el Kit BigDye® Terminator v3.1¹¹ en un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystem, EUA) utilizando partidores descritos en el cuadro 1. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas con el software Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystem, EUA) y luego publicadas en la base de datos pública GenBank (NCBI, EUA) con los siguientes números de acceso: EU931318 *rpoB* (261 pb), EU931319 *groEL* (702 pb), EU931320 *sdhA* (218 pb), EU931321 *fopA* (960 pb), EU931322 *lpnB* (252 pb) y EU931323 para *16s ITS 23s* rDNA (1748 pb).

¹ Difco, EUA
² Linsan SA, Chile
³ Calbiochem, EUA
⁴ Merck, Alemania
⁵ Gibco, EUA
⁶ Hyclone, EUA
⁷ Aquafarma, Chile
⁸ Nunclon, Dinamarca

⁹ Omega Bio-Tek, EUA
¹⁰ Invitrogen, EUA
¹¹ Applied Biosystems, EUA

Cuadro 1. Conjunto de partidores usados para el secuenciamiento genético de *F. philomiragia* aislados de salmón del Atlántico.
Set of primers used in the genetic sequencing of *F. philomiragia* isolated from Atlantic salmon.

gen	sentido	antisentido
<i>sdhA</i>	5'-ACTTGTGCTGCGGCTGATAGAAC-3'	5'-TACGACCTGCTCCACCAGTAGC-3'
<i>fopA</i>	5'-CAGATCCAAATCATATTGAAACTC-3'	5'-TGCTATTGCTTCTTTACCTTTAG-3'
<i>lpnB</i>	5'-GTAACCTTGATAATCCTGATC-3'	5'-GAACACTCTGATTGTCCAC-3'
<i>groEL</i>	5'-TACTTTCTAAGCCTTGTTTCAG-3'	5'-AAGAGCATCATCCACACG-3'
<i>rpoB</i>	5'-GTTGAGAACCAGTTTAGAATTG-3'	5'-CTTCAAAGCCTGCTCTATCACG-3'
<i>16s+ITS+23s rDNA set 1</i>	5'-AACGGTAACAGGTCTTCG-3'	5'-ACCAGGTAAGGTTCTTCG-3'
<i>16s+ITS+23s rDNA set 2</i>	5'-CTTACCTGGTCTTGACATCC-3'	5'-GCTTATCGCAGATTAACACG-3'
<i>16s+ITS+23s rDNA set 3</i>	5'-GTGTTAATCTGCGATAAG-3'	5'-GTTTCCCTTCCACTACG-3'

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El análisis filogenético de los genes fue realizado por alineamientos múltiples de secuencias de especies bacterianas relacionadas para el gen *16s rDNA* (figura 1), con la información de los genomas de *Francisella* disponibles en GenBank para los genes *16s+ITS+23s rDNA* (figura 2a) y el análisis multilocus con los genes constitutivos (Housekeeping) *rpoB*, *groEL*, *sdhA*, *fopA* y *lpnB* (figura 2b) con el software ContigExpress y AlignX (Vector NTi v10.0, Invitrogen, EUA), editados y exportados a formato NEXUS con BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Los tres árboles filogenéticos obtenidos fueron construidos con el criterio de la regla de la mayoría (50%) a partir de 1000 réplicas de bootstrap con el método de máxima similitud ejecutado en PAUP v4.0b10 (Swofford 2002) usando el proceso heurístico de búsqueda con la opción de bisección y recombinación (TBR) con el modelo HKY+G para el análisis del gen *16s rDNA*, HKY para el análisis de los genes *16s+ITS+23s rDNA* y TrN+G para el análisis multilocus de los genes constitutivos, todos los modelos seleccionados por el software Modeltest (Posada y Crandall 1998).

RESULTADOS

OBSERVACIONES DE CAMPO Y NECROPSIA

Los peces afectados se caracterizaron por presentar anorexia, natación errática en la superficie y letargia. A la necropsia, mostraron aumento de tamaño del hígado, riñón y bazo, con múltiples focos blanquecinos en el hígado y bazo, con grasa perivisceral y vejiga natatoria congestiva y en los casos más severos con equimosis.

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO, SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y CULTIVO CELULAR

Los cultivos bacterianos en agar tripticasa de soya, agar columbia sangre, agar Mueller-Hinton, agar nutriente con y sin sal y agar BHI fueron negativos a las 8 semanas de

incubación. Sin embargo, se observó desarrollo de colonias redondas de 1 a 2 mm de diámetro, de consistencia butirosa, convexas, brillantes, de color gris-verdoso sin pigmento difusible en agar Eugon, con crecimiento visible a los 12 días de incubación a 18 °C. La tinción Gram de las colonias evidenció estructuras cocoides y cocobacilares Gram negativas dispuestas individuales, en pares y agrupaciones, con test de oxidasa negativo y reacción de catalasa débil. En el desafío a diferentes salinidades, los aislados se desarrollaron solamente entre 0,4% a 1% NaCl, escasamente a 2% y no hubo desarrollo a 3% y 6%. Adicionalmente, en el desafío a diferentes temperaturas, los aislados no se desarrollaron a 5 °C, 30 °C y 37 °C a las 8 semanas de incubación, el desarrollo fue lento a los 10 °C, 15 °C y 25 °C y abundante a los 18 °C, 20 °C y 22 °C. Se evidenció desarrollo inicial a los 6 días a 22 °C y 12 días a 18 °C de incubación. Las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas fueron para florfenicol 1,0 µg/ml, flumequina 0,25 µg/ml, ácido oxolínico 0,25 µg/ml, oxitetraciclina 0,5 µg/ml y amoxicilina > 64,0 µg/ml.

En los cultivos celulares se observó efecto citopático en OKE-1 a las dos semanas de incubación, a diferencia de BF-2 donde se observó desprendimiento celular de la monocapa celular a los 12 días de incubación; SHK-1 presentó CPE y desprendimiento celular a los 20 días de incubación. El resto de las líneas celulares CHSE-214 y RTR-2 no presentaron efecto citopático o desprendimiento celular a las ocho semanas de incubación; sin embargo, a la tinción Gram y microscopía electrónica se observó la presencia del agente y cambio en la morfología celular ultraestructural en estas últimas líneas celulares.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El análisis histopatológico reveló una patología sistémica con degeneración celular y necrosis ampliamente diseminada a través del hígado, bazo y riñón. Los bazos presentaron degeneración del tejido conectivo y con esplenocitos con núcleos picnóticos y cariorréticos. Los leucocitos y en particular los macrófagos fueron observados como células

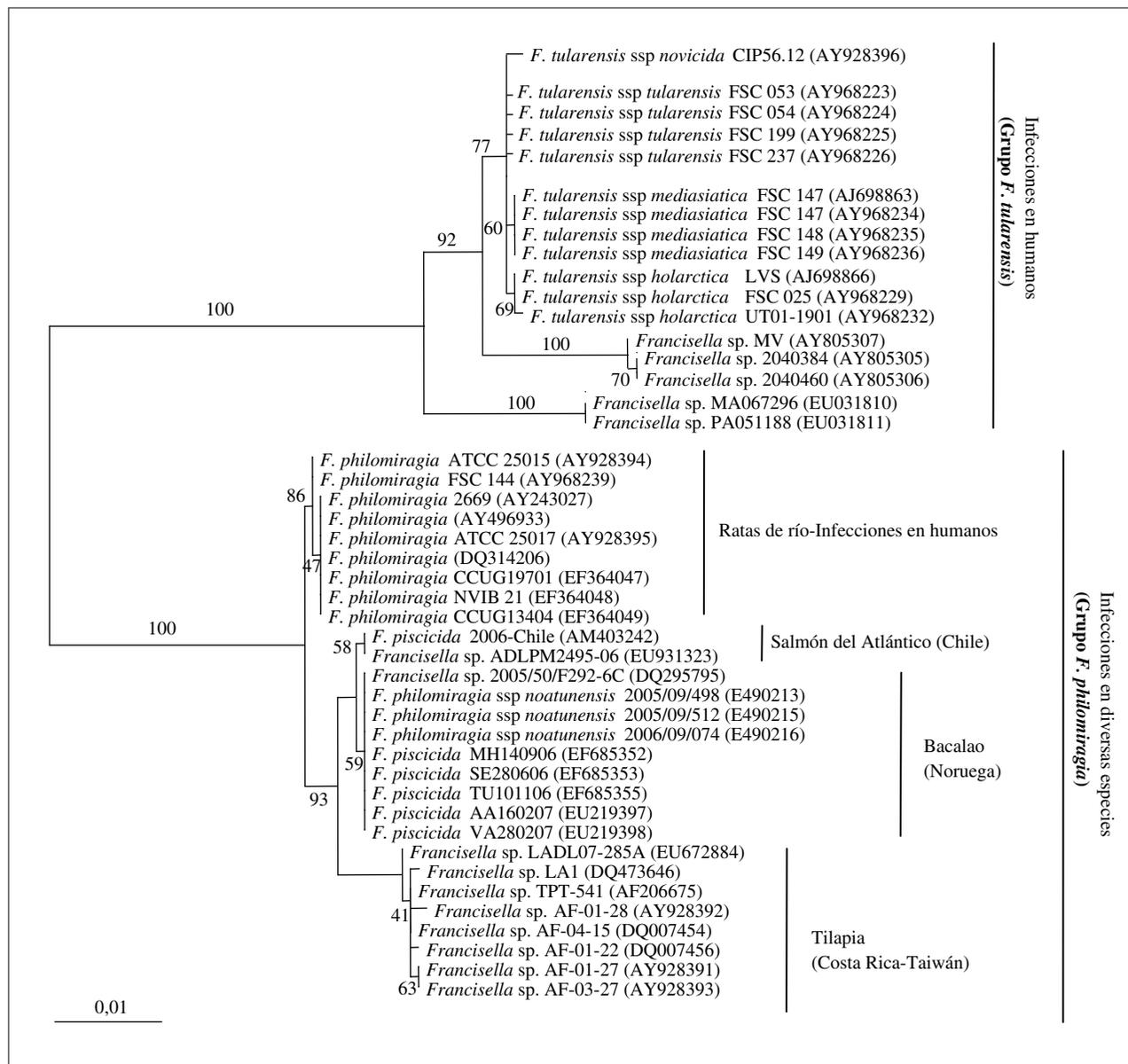


Figura 1. Relación filogenética de los aislados de *Francisella* salmón del Atlántico en Chile y otras *Francisellas* aisladas de diferentes fuentes como bacalao, tilapia, garrapatas y mamíferos en base a las secuencias del gen 16s rDNA. El árbol filogenético fue ruteado con el grupo *F. tularensis*.

Phylogenetic relationship of the isolates of *Francisella* from Atlantic salmon in Chile and other *Francisella* isolated from different species such as cod, tilapia, ticks and mammalian using sequences of 16s rDNA gene. The phylogenetic tree was rooted with the *F. tularensis* cluster.

hipertróficas con vacuolas intracitoplasmáticas, algunas de las cuales contenían agrupaciones de bacterias cocoides basofílicas. En el tejido hematopoyético del bazo se observó una necrosis extensiva con degeneración y lisis de la membrana nuclear y citoplasmática. Los riñones se observaron con una glomeronefritis crónica y difusa con acumulación de centros de melanomacrófagos distribuidos ampliamente en el tejido necrótico. Hepatitis y necrosis ampliamente distribuida, con degeneración hidrópica de los hepatocitos y megalocitosis, con ruptura aislada de los ductos biliares presentando exudado biliar en el parénquima del hígado.

La tinción Gram permitió observar bacterias de formas cocoides y cocabacilares teñidas Gram negativas formando agrupaciones intracitoplasmáticas o libres en la matriz extracelular o detritus celular en diferentes tejidos como riñón, bazo, hígado, corazón, aletas y branquias.

El análisis por microscopía electrónica mostró agrupaciones de bacterias de forma cocoide y elongadas (300 a 1.000 nm) dentro de vacuolas (endosomas o fagosomas) contenidas en el citoplasma de las células de las líneas celulares de tipo macrofágicas OKE-1 y SHK-1 (figura 3).

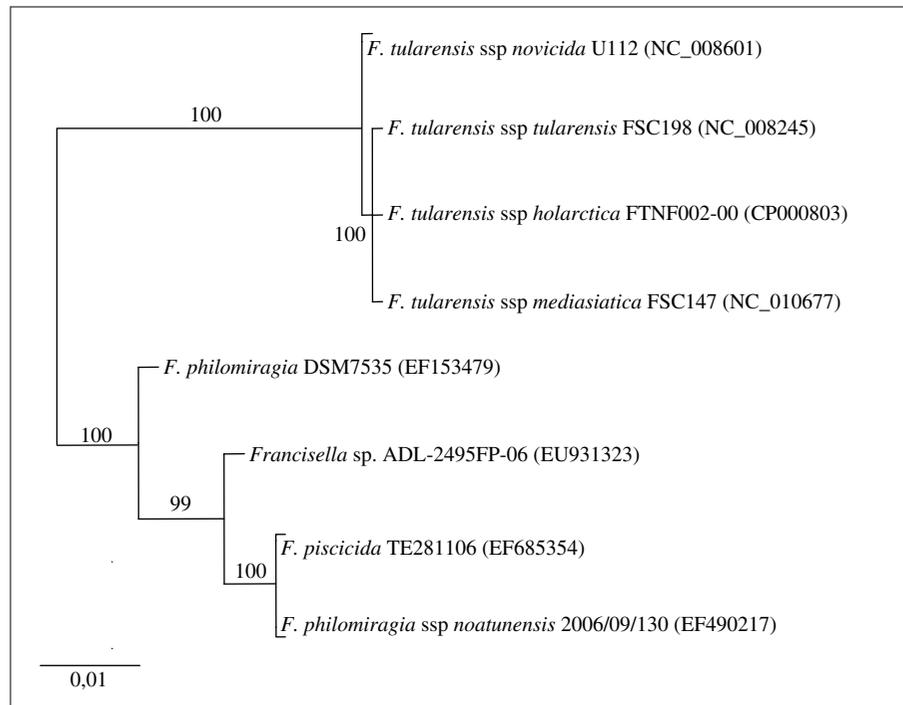


Figura 2a. Análisis filogenético entre los aislados de *Francisella* de salmón del Atlántico con otras *Francisella* usando las secuencias 16s+ITS+23s rDNA disponibles en GenBank.

Phylogenetic analysis between isolates of *Francisella* from Atlantic salmon and other *Francisella* using the sequences 16s+ITS+23s rDNA, available at GenBank.

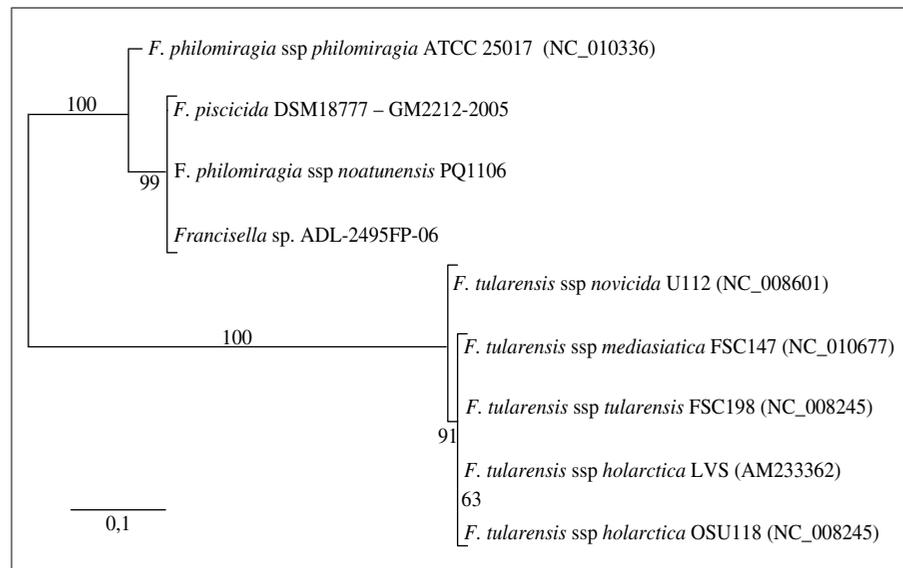


Figura 2b. Análisis filogenético multilocus entre los aislados de *Francisella* de salmón del Atlántico con otras *Francisella* usando las secuencias de los genes constitutivos *sdhA*, *fopA*, *lpnB*, *groEL* y *rpoB*.

Phylogenetic multilocus analysis between isolates of *Francisella* from Atlantic salmon and other *Francisella* using sequences of house-keeping genes *sdhA*, *fopA*, *lpnB*, *groEL* and *rpoB*.

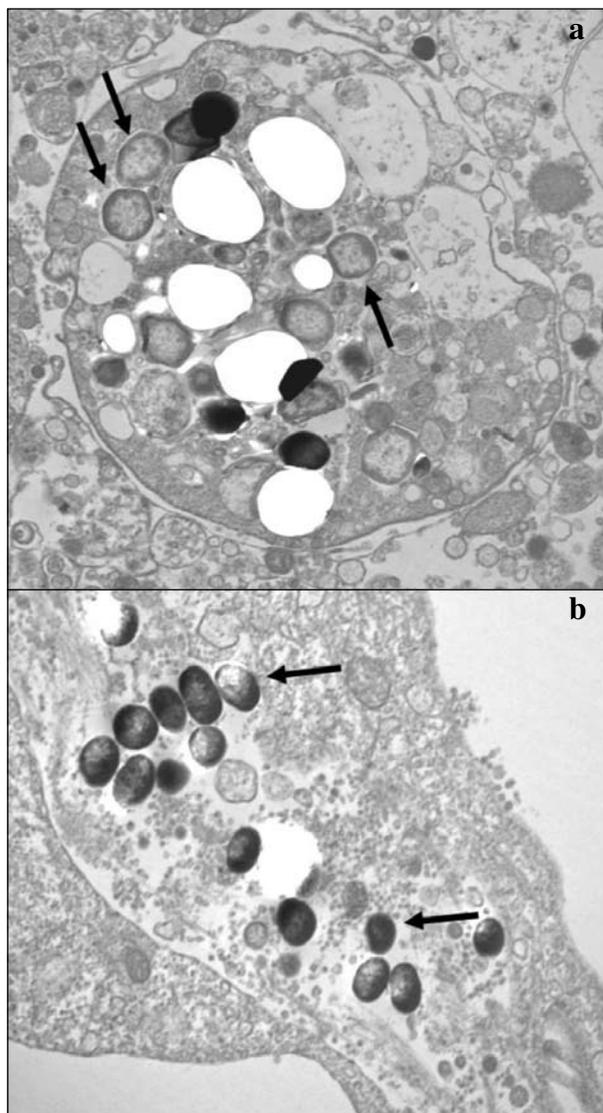


Figura 3. (a) Foto de microscopía electrónica de *F. philomiragia* aislados de salmón del Atlántico (flechas) formando agrupaciones dentro de un endosoma/fagosoma en el citoplasma de la línea celular OKE-1. (b) Estructuras cocoides y cocobacilares de las bacterias en el citoplasma de OKE-1

(a) Electronic microscopy photos of *F. philomiragia* isolated from Atlantic salmon (arrows) forming clusters inside an endosome/phagosome in the cytoplasm of cell line OKE-1. (b) Cocoid and rod shaped structures of bacteria (arrows) in the cytoplasm of OKE-1.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La secuencia nucleotídica del gen *16s* rDNA obtenida (número acceso: EU931323) del aislada fue analizada con el programa BLASTN y mostró 99% de similitud con *F. piscicida* TU101106 (EF685355), *F. philomiragia* ssp *noatunensis* 2006/09/130 (EF490217), *Francisella* sp. AF-01-2 (AY928388) y *F. philomiragia* ssp *philomiragia* ATCC 25015 (AY928394) y un 97% de similitud con *F. tularensis* ssp *tularensis* WY96-3418 (CP000608), *F. tularensis* ssp *novicida* U112 (CP000439), *F. tularensis*

ssp *mediasiatica* FSC 147 (CP000915) y *F. tularensis* ssp *holarctica* FTNF002-00 (CP000803). El análisis filogenético de los genes *16s+ITS+23s* rDNA del aislado mostró 100% de similitud con *F. piscicida* y *F. philomiragia* ssp *noatunensis*, 99% similitud con *F. philomiragia* ssp *philomiragia* y 97% de similitud con las subespecies de *F. tularensis*. Finalmente, el análisis multilocus de los genes constitutivos mostró 100% de similitud con *F. piscicida* y *F. philomiragia* ssp *noatunensis*, un 96% de similitud con *F. philomiragia* ssp *philomiragia* y un 84% de similitud todas las subespecies de *F. tularensis*.

DISCUSIÓN

Salmón del Atlántico cultivado en el lago Llanquihue presentó, sin precedentes en la acuicultura nacional, altas tasas de morbilidad y mortalidad por la bacteria entre junio (Birkbeck y col 2007) a diciembre del año 2006, con un comportamiento, signos y lesiones muy similares a las descritas por organismos similares a U2 (Birkbeck y col 2007), otras rickettsias (RLO) y a *Francisella* sp. detectadas en otras partes del mundo, como en tilapia en Costa Rica (Mauel y col 2007) y Hawaii (Mauel y col 2003), bacalao en Noruega (Nylund y col 2006, Ottem y col 2007^a), corvina blanca en California (Chen y col 2000), mero en Taiwán (Chen y col 1994) y U2 en puyes en Chile (Enríquez y col 1998).

Una inusual alza en la densidad de puyes (*Galaxias maculatus*) dentro y fuera de las balsas-jaulas con altos niveles de *F. philomiragia* en riñón, hígado y bazo (datos no mostrados), más la evidencia de transmisión horizontal entre el puye y salmón del Atlántico (Brossard 1999) en el caso de tratarse de U2, podría explicar la rápida diseminación en poco tiempo y la persistencia de los cuadros clínicos en casi todos los centros de cultivo de salmón del Atlántico presentes en el lago Llanquihue. Estos sucesos también han sido descritos en otros RLOs y *Francisella* sp., donde la transmisión horizontal es por contacto directo entre peces de la misma especie o diferentes especies o por medio de la misma agua (Chen y Chao 1994, Chen y col 1994, Mauel y col 2003) y en una amplia gama de peces de agua dulce y mar (Mauel y col 2007) y de temperaturas que van entre los 6 °C hasta los 26 °C (Nylund y col 2006, Mauel y col 2007).

El análisis histopatológico reveló un patrón muy similar a los ya descritos previamente en Chile en salmón del Atlántico afectados por U2 (Cvitanich y col 1995), con lesiones de tipo granulomatosas de distribución difusa y penetrantes en los diferentes tejidos del huésped con un tropismo por los fagocitos o células que cumplen función fagocítica, muy similar a lo observado por análisis histopatológicos descritos en otras especies como bacalao (Nylund y col 2006) y tilapia (Mauel y col 2003) afectados por *Francisella*. El análisis ultraestructural de la bacteria mostró un tamaño de 1 µm en su forma elongada, muy similar a lo observado en *F. philomiragia* con un tamaño menor a 1,5 µm pero

Cuadro 2. Cambios nucleotídicos de los genes *16s+ITS+23s* rDNA según las diferentes subespecies de *Francisella*. Secuencia de referencia (posición 1 a 1840), número de acceso GenBank DQ309246.

Nucleotides changes of the genes *16s+ITS+23s* rDNA in different subspecies of *Francisella*. Reference sequence (Position 1 to 1840) accession code DQ309246.

Especies bacterianas	Huésped	Posición (1-1840 <i>16s+ITS+23s</i> , referencia DQ309246)									
		166-191	215	431-433	550	1557	1589	1594	1673-1684	1726	1823
<i>F. philomiragia</i>	Salar	CTTTGT	G	GTA	A	A	G	A	---GTAATT---	C	A
<i>F. philomiragia</i> ssp <i>noatunensis</i>	Bacalao	CTTTGT	A	GTA	G	G	A	G	---GTAATT---	T	T
<i>F. philomiragia</i>	Tilapia	CTTTGT	G	GCA	G	A	A	G	---GTAATT---	C	A
<i>F. philomiragia</i> ssp <i>philomiragia</i>	Ratas	--TTAG	G	GTA	G	A	A	G	---GTAATT---	C	A
<i>F. Tularensis</i> ssp <i>tularensis</i>	Humanos	TTTCGG	G	TGG	G	A	A	G	TTTTAGGTTT	C	A
<i>F. Tularensis</i> ssp <i>novicida</i>	Humanos	TTTCGG	G	TGG	G	A	A	G	TTTTAGGTTT	C	A
<i>F. Tularensis</i> ssp <i>holarctica</i>	Humanos	TTTCGG	G	TGG	G	A	A	G	TTTTAGGTTT	C	A
<i>F. Tularensis</i> ssp <i>mediasiatica</i>	Humanos	TTTCGG	G	TGG	G	A	A	G	TTTTAGGTTT	C	A

Cuadro 3. Características fenéticas entre las diferentes subespecies y orígenes de *Francisella*. *F. philomiragia* (Chile = salmón del Atlántico, Noruega = bacalao del Atlántico, tilapia = Asia y Centroamérica) y *F. philomiragia* ssp *philomiragia* con *F. tularensis* = especie tipo.

Phenetic characteristics between different subspecies and origins of *Francisella*. *F. philomiragia* (Chile = Atlantic salmon, Norway = Atlantic cod, tilapia = Asia and Center of America) y *F. philomiragia* ssp *philomiragia* with *F. tularensis* = reference strain.

Característica	Chile	Noruega	Tilapia	<i>F. philomiragia</i>	<i>F. tularensis</i>
Temperatura	22	22	nd	37	37
TSA	No	Sí, Lento	No	Sí	Sí
BHI	No	Sí, Lento	No	Sí	Sí
Oxidasa	Negativo	Negativo	nd	Positivo	Positivo
NaCl 6%	No	Sí	nd	No	No

diferente a *F. tularensis* (Nylund y col 2006, Ottem y col 2007^a) que generalmente es menor a 0,5 μ m.

Por otra parte, una diferencia importante de los aislados bacterianos de salmón del Atlántico es que no crecen en medios con concentración de cloruro de sodio por sobre 2%, a diferencia de *F. piscicida* (Nylund y col 2007) o *F. philomiragia* ssp *noatunensis* (Mikalsen y col 2007) aislados de bacalao en Noruega y que crecen en agar nutriente al 6% NaCl (Ottem y col 2007^a); esto explica que la Francisellosis en bacalao se exprese en agua de mar sin problemas y también podría explicar que la enfermedad en salmón del Atlántico solo se exprese en agua dulce y que solo haya sido aislado, detectado en estuario y mar pero sin la expresión de la enfermedad. Otro antecedente relevante es el desarrollo óptimo de los aislados bacterianos entre 18 a 22 °C y un menor desarrollo a temperaturas inferiores a 15 °C, lo cual podría explicar el aumento en la incidencia de los casos durante la época de temperaturas más elevadas o años más calurosos.

Desde el punto de vista zoonótico, no se han registrado casos de infecciones accidentales en humanos de *F. philomiragia* aisladas de salmón del Atlántico o por las *Francisella* sp. aisladas desde peces en otras partes del mundo. Esto podría estar relacionado con la incapacidad que tienen estas fenovariantes de *F. philomiragia* de crecer a temperaturas más altas como 37 °C, a diferencia de *F. philomiragia* ssp *philomiragia* y todas las subespecies de

F. tularensis que crecen muy bien a 37 °C y que provocan enfermedades infecciosas en humanos y otros mamíferos terrestres. Las características fastidiosas en crecimiento de aislados bacterianos de salmón del Atlántico en líneas celulares y medios basados en agar o caldo son muy similares a las encontradas en *F. piscicida* (Nylund y col 2006) o *F. philomiragia* ssp *noatunensis* (Mikalsen y col 2007); sin embargo, son diferentes a *F. philomiragia* ssp *philomiragia* y las subespecies de *F. tularensis* que crecen en condiciones nutricionales mucho menos exigentes y en menor tiempo o diferentes incluso a las *Francisella* sp. detectadas en tilapia, las cuales no han podido ser aisladas tanto en líneas celulares como en medios basados en agar (Mauel y col 2007).

Desde el punto de vista filogenético, el análisis del gen *16s* rDNA (figura 1 y 2a) y de los genes constitutivos (figura 2b) mostraron que los aislados bacterianos de salmón del Atlántico pertenecen al grupo de las *F. philomiragia*, al igual que las *Francisella* sp. detectadas desde bacalao en Noruega o en tilapia en Costa Rica y Asia. El grupo *F. philomiragia* presenta dos subespecies definidas por el comité internacional de taxonomía y que corresponde a la especie tipo *F. philomiragia* quedando como *F. philomiragia* ssp *philomiragia* y *F. noatunensis*¹² (*F. piscicida*) quedando como *F. philomiragia* ssp *noatunensis*.

¹² Mikalsen J, 2008. Comunicación personal.

El análisis del alineamiento múltiple de secuencias reveló que en el *ITS* ubicado entre el gen *16s* y *23s* rDNA existe una zona comprendida entre la posición 1673 a la 1684 que diferencia claramente (cuadro 2) entre las especies tipo *F. philomiragia* de la *F. tularensis*; sin embargo, existen otras regiones como la comprendida entre la posición 166 a la 191 (cuadro 2) que diferencian *F. philomiragia* ssp *noatunensis* de *F. philomiragia* ssp *philomiragia* de ratas (Ottem y col 2007^b) y de las subespecies de *F. tularensis*. Más aún, otras posiciones como las 215, 1557, 1726, 1823 (cuadro 2) diferencian *F. philomiragia* de salmón del Atlántico con la firma o combinación “AGTT” de todo el resto de las especies de *Francisella* y que poseen “GACA” (cuadro 2) en esas mismas posiciones. Sin embargo, e independiente de las variaciones nucleotídicas encontradas dentro del grupo *F. philomiragia* (cuadro 2), el análisis filogenético (figura 1, 2a y 2b) reveló que las *Francisella*s aisladas en bacalao en Noruega, salmón del Atlántico en Chile y tilapia en Centroamérica y Asia, pertenecerían al mismo grupo de *F. philomiragia* ssp *noatunensis* (Mikalsen y col 2007), aunque fenéticamente las *Francisella*s aisladas en estos diferentes huéspedes, incluyendo salmón del Atlántico, presentan características propias diferentes a las encontradas entre los miembros de la misma subespecie (cuadro 3), por lo cual es necesario hacer más investigaciones filogenéticas con nuevos marcadores o filogenómica.

RESUMEN

Francisella philomiragia fue aislada de salmón del Atlántico cultivado en balsas-jaulas en el lago Llanquihue con brotes de una enfermedad granulomatosa con altas tasas de morbilidad y mortalidad acumuladas entre 5% a 20%. Los aislados bacterianos tienen 100% similitud con *F. philomiragia* ssp *noatunensis* o *F. piscicida* aislado de bacalao en Noruega, 99% de similitud con *Francisella* sp. detectado en tilapia en Asia y Centroamérica y 99% de similitud con la especie tipo *F. philomiragia* por análisis filogenético del gen *16s* rDNA.

REFERENCIAS

- Barns SM, CC Grow, RT Okinaka, P Keim, CR Kuske. 2005. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 71, 5494-5500.
- Birkbeck TH, M Bordevik, MK Froystad, A Baklien. 2007. Identification of *Francisella* sp. From Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *J Fish Dis* 30, 505-507.
- Bravo S, M Campos. 1989. Síndrome del salmón Coho. *Chile Pesquero* 54, 47-48.
- Brossard MA. 1999. Determinación experimental de la vía de contagio del agente U2 (RLO) aislado de puye (*Galaxias maculatus*) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Chen SC, MC Tung, SP Chen, JF Tsai, PC Wang, RS Chen, SC Lin, A Adams. 1994. Systematic granulomas caused by a rickettsia-like organism in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), from Southern Taiwan. *J Fish Dis* 17, 591-599.
- Chen MF, S Yun, GD Marty, TS McDowell, ML House, JA Appersen, TA Guenther, KD Arkush, RP Hedrick. 2000^a. A Piscirickettsia-like bacterium associated with mortality of white seabass *Atractoscion nobilis*. *Dis Aquat Org* 43, 117-126.
- Chen SC, PC Wang, MC Tung, KD Thompson, A Adams. 2000b. A Piscirickettsia like organism in grouper, *Epinephelus melanostigma*, in Taiwan. *J Fish Dis* 23, 415-418.
- Chern RS, CB Chao. 1994. Outbreaks of a disease caused by a rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. *Fish Pathol* 29, 61-71.
- Cvitanich J, O Gárate, C Silva, M Andrade, C Figueroa, C Smith. 1995. Isolation of a new rickettsia-like organism from Atlantic salmon in Chile. *FHS/AFS newsletter* 23, 1-3.
- Enríquez R, M Monras, A Ceballos, C Igor. 1998. Primer aislamiento de un organismo rickettsial desde *Galaxias maculatus* (puye). *Arch Med Vet* 30, 233-234.
- Fryer JL, CN Lannan, LH Garces, JJ Larenas, PA Smith. 1990. Isolation of a rickettsiales-like organisms from disease Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol* 25, 107-114.
- Fryer JL, CN Lannan, SJ Giovannoni, ND Word. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of a epizootic disease in salmonid fishes. *Int J Syst Bact* 42, 120-126.
- Higgins DG, PM Sharp. 1988. CLUSTAL: a Package for Performing Multiple Sequence Alignment in a Microcomputer. *Gene* 73, 237-244.
- Hollis DG, RE Weaver, AG Steigerwalt, JD Wenger, CW Moss, DJ Brenner. 1989. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J Clin Microbiol* 27, 1601-1608.
- Jensen WI, CR Owen, WL Jellison. 1969. *Yersinia philomiragia* sp.n., a new member of the *Pasteurella* group of bacteria, naturally pathogenic for the muskrat (*Ondatra Zibethica*). *J Bacteriol* 100, 1237-1241.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.
- Mauel MJ, DL Miller, K Frazier, AD Liggett, L Styer, D Montgomery-Brock, J Brock. 2003. Characterization of Piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. *Dis Aquat Org* 53, 249-255.
- Mauel MJ, E Soto, JA Moralis, J Hawke. 2007. A Piscirickettsiosis-like syndrome in cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Latin America with *Francisella* sp. as the pathogenic agent. *J Aquat Anim Health* 19, 27-34.
- Mikalsen J, AB Olsen, T Tengs, DJ Colquhoun. 2007. *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from framed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1960-1965.
- Nano FE. 1992. *Francisella*. In: Balows A, Trüper HG, Sworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, USA Pp 3987-3993.
- NCCLS. 2003. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline. NCCLS M49-A. 940 West Valey Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Nylund A, KF Ottem, K Watanabe, E Karlsbakk, B Krossøy. 2006. *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *Arch Microbiol* 185, 383-392.
- Ottem KF, A Nylund, E Karlsbakk, A Friis-Møller, B Krossøy. 2007^a. Characterization of *Francisella* sp., GM2212, the first *Francisella* isolate from marine fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*) *Arch Microbiol* 187, 343-350.
- Ottem KF, A Nylund, E Karlsbakk. 2007^b. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. Nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Arch Microbiol* 188, 547-550.
- Scoles GA. 2004. Phylogenetic analysis of the *Francisella*-like endosymbionts of Dermacentor ticks. *J Med Entomol* 41, 277-286.
- Sjøstedt AB. 2005. Family III. *Francisellaceae* fam. nov. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology. The gamma-proteobacteria*. 2nd ed. Vol II, Part B. Springer, New York, USA, Pp 199-200.