Descripción de lesiones y estandarización de una técnica molecular para el diagnóstico de *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Karen Juliana Gutiérrez Bermón

Noviembre 2025

Nota del Autor

Trabajo de Grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Medicina Veterinaria

Universidad de Pamplona, Pamplona- Norte de Santander.

La correspondencia relacionada con este documento deberá ser enviada:

Karen.gutierrez@unipamplona.edu.co

Descripción de lesiones y estandarización de una técnica molecular para el diagnóstico de *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Trabajo de Grado como requisito para optar al título de Médico Veterinario

Director

Jesús Alberto Mendoza Ibarra DVM M. Sc.; Ph. D.

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Medicina Veterinaria

Universidad de Pamplona

Pamplona, Norte de Santander, Colombia

2025

Agradecimientos

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que me han apoyado en el camino para formarme como profesional. En especial, a Martha Bermón, quien ha estado a mi lado en cada momento y ha sido para mí una madre sin igual. Agradezco igualmente a todas las personas que contribuyeron a crear un ambiente agradable dentro del CEDIMOL y al profesor Jesús Alberto Mendoza, por su orientación y acompañamiento durante la tutoría de mi pasantía. Por último, pero no menos importante, agradezco a Heidy Albarracín por su compañía, los buenos momentos compartidos y por ser una gran amiga a lo largo de todos estos años.

Tabla de contenido

Resumen....9

Abstract....10

Introducción....11

Descripción del sitio de pasantía....12

Actividades a desarrollar durante la actividad práctica....13

Capítulo I....14

Planteamiento del problema....14

Justificación....16

Objetivos....17

Objetivo general....17

Objetivos específicos....17

Capítulo II....18

Revisión bibliográfica....19

Enfermedades bacterianas comúnes en Oncorhynchus mykiss....19

Mecanismos de inmunidad....20

Etiología....21

Taxonomía....22

Epidemiologia....23

Signos clínicos....23

Fisiopatología 24

Métodos diagnósticos 24

Capítulo III 28

Materiales y métodos 28

Área de estudio 28

Población 28

Muestreo 29

Diagnostico microbiológico 30

Extracción de ADN 30

PCR anidad de punto final 30

Capítulo IV 32

Resultados 32

Identificación y descripción de lesiones 32

Cuantificación y pureza del ADN 36

Reacción en cadena polimerasa 37

Discusión 42

Capítulo V 47

Conclusión 47

Recomendaciones 48

Referencias 50

Lista de figuras

Figura 1 Esquema representativo del sistema de defensa de la piel. 21

Figura 2 Etapas en el ciclo de amplificación de PCR anidada. 26

Figura 3 Disposición para la toma de muestras. 28

Figura 4 Procedimiento sistemático de la necropsia. 29

Figura 5 Procedimiento de conservación de muestras. 29

Figura 6 Manifestaciones cutáneas externas observadas en trucha arcoíris. 32

Figura 7 Patrones de hemorragia y necrosis cutánea. 33

Figura 8 Exoftalmia bilateral en ejemplares de trucha arcoíris. 34

Figura 9 Alteraciones de las branquias y el esqueleto en trucha arcoíris. 35

Figura 10 Alteraciones macroscópicas en los órganos internos de trucha arcoíris. 35

Figura 11 Productos con el primer protocolo 38

Figura 12 Productos con el segundo protocolo. 39

Figura 13 Productos de con todas las muestras. 40

Figura 14 Protocolo establecido con muestras restantes. 41

Figura 15 Protocolo en muestras por aislamiento de bacterias. 41

Lista de tablas

Tabla 1 Cuantificación y pureza de las muestras usando buffer de lisis con urea...36

Tabla 2 Cuantificación y pureza de las muestras usando buffer de lisis con SDS ..37

Tabla 3 Organización de los Pools.....38

Lista de anexos

Anexo 1 BLAST Cebador 20F. 60

Anexo 2 BLAST Cebador 1500R. 60

Anexo 3 BLAST Cebador PSY1. 61

Anexo 4 BLAST Cebador PSY2. 61

Resumen

Flavobacterium psychrophilum es una bacteria que afecta salmónidos y otras especies piscícolas incluyendo la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), causando la enfermedad bacteriana del agua fría (BCWD), caracterizada por lesiones dérmicas, exoftalmia, palidez branquial e incluso deformidades a nivel esquelético como escoliosis. En este estudio, se describen las lesiones compatibles con *Flavobacterium spp* y las pruebas iniciales para la estandarización de una prueba de PCR para la detección molecular de *F. psychrophilum* a partir de 33 muestras de tejido provenientes de ejemplares de truchícolas de Mutiscua y Pamplona. Inicialmente se evaluaron dos componentes diferentes para los tampones de lisis (urea y SDS) utilizados en la extracción de ADN, observando que el buffer con urea obtuvo mayores concentraciones de ADN, aunque presentó limitaciones durante la extracción con fenol-cloroformo debido a la inversión de fases causada por su elevada densidad. Se realizó una PCR anidada usando como cebadores externos 20F/1500R que amplifican una secuencia ribosomal 16S y como cebadores internos PSY1/PSY2, específicos para determinar *F. psycrophilum* optimizando la temperatura de anillamiento (Tm) a 55 °C, con la cual se obtuvo mejores resultados en cuanto a especificidad de amplificación. Adicionalmente, se desarrolló una PCR sobre muestras de bacterias aisladas en campo, encontrado solo amplificaciones de los genes ribosomales. Este trabajo representa un primer acercamiento y un importante aporte a la obtención de un método molecular para el diagnóstico de la enfermedad del agua fría que es un problema importante en las explotaciones truchícolas de la región.

Palabras clave. Estandarización, fenol-cloroformo, úlceras, cebadores, PCR anidada.

Abstract

Flavobacterium psychrophilum is a bacterium that affects salmonids and other fish species, including rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), causing bacterial cold water disease (BCWD), characterized by skin lesions, exophthalmos, gill paleness, and even skeletal deformities such as scoliosis. This study describes lesions consistent with *Flavobacterium spp*. and the initial tests for standardizing a PCR assay for the molecular detection of *F. psychrophilum* from 33 tissue samples obtained from rainbow trout in Mutiscua and Pamplona. Two different components were initially evaluated for the lysis buffers (urea and SDS) used in DNA extraction. The urea buffer yielded higher DNA concentrations, although it presented limitations during phenol-chloroform extraction due to phase inversion caused by its high density. A nested PCR was performed using as external primers the 20F/1500R primers, which amplify a 16S ribosomal sequence, and the PSY1/PSY2 as internal primers, specific for detecting *F. psychrophilum*. The annealing temperature (Tm) was optimized at 55°C, which yielded the best results in terms of amplification specificity. Additionally, a PCR was performed on samples of bacteria isolated in the field, revealing amplifications only of ribosomal genes. This work represents a first step and an important contribution to obtaining a molecular method for diagnosing cold-water disease, a significant problem in trout farms in the region.

Key Word. Standardization, phenol-chloroform, ulcers, primers, nested PCR.

Introducción

La medicina veterinaria es una rama de la medicina que se fundamenta en el estudio de la salud de los animales y, al mismo tiempo, afecta directamente a las personas. Esta se ocupa de investigar las razones, los mecanismos y las manifestaciones de las enfermedades que impactan a los animales, lo que resulta en tratamientos dirigidos basados en diagnósticos presuntivos y, posteriormente, definitivos. Por otro lado, la identificación, control y prevención de enfermedades infecciosas, cuidando tanto la salud pública como la salud de los animales.

La formación como médicos veterinarios debe mantener un equilibrio que permita relacionar todos los conocimientos adquiridos desde la investigación y el estudio al campo ya que, constituye un eje fundamental, al abordar la prevención, el control, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades animales. Este permite enlazar diferentes componentes desde la anatomía, fisiología y patología, lo que permite utilizar modelos inducidos de enfermedades en animales para comprender procesos. De esta manera, la investigación veterinaria trasciende fronteras, vinculándose con la seguridad alimentaria, la salud de los ecosistemas, la conservación de fauna, las zoonosis y la formulación de políticas públicas.

La oferta de medicina veterinaria en la Universidad de Pamplona, proporciona escenarios con desafíos individuales y grupales que permite orientar la formación de profesionales íntegros y críticos, capaces de generar impacto en la realidad sanitaria y productiva regional y nacional mediante la práctica e investigación.

El presente trabajo recoge la información realizada durante la pasantía de investigación en el Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL), institución que se ha consolidado como un

centro interdisciplinar de innovación científica. Este tiene como enfoque la estandarización de técnicas diagnósticas de alta especificidad y sensibilidad aplicables a enfermedades de interés humano y veterinario, contribuyendo no solo al fortalecimiento académico y científico, sino también al desarrollo regional.

Descripción del sitio de pasantía

El Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL) surgió en el año 2020 como respuesta a la emergencia sanitaria generada por la pandemia de COVID-19. Actualmente se encuentra avalado por el Instituto Nacional de Salud (INS), con el objetivo inicial de prestar servicios diagnósticos a la población para la detección del virus SARS-CoV-2 en la región. El laboratorio se encuentra en el segundo piso del edificio Eduardo Cote Lamus (EC), dentro del campus principal de la Universidad de Pamplona, lo que le permite brindar una mejor cobertura a nivel departamental en Norte de Santander.

El laboratorio posee un carácter interdisciplinar, al reunir profesionales y estudiantes de distintas áreas afines a las ciencias biomédicas, como Bacteriología, Microbiología, Biología y Medicina Veterinaria. Esta integración permite el desarrollo de proyectos de investigación con un enfoque amplio y colaborativo, bajo la dirección de Raúl Rodriguez, en conjunto con otros colabores como Jesús Alberto Mendoza, Diana Bohada y Reinaldo Gutierrez.

En cuanto a su infraestructura, el laboratorio se encuentra organizado en dos áreas principales: el área sucia y el área limpia. El área sucia incluye espacios destinados al área de toma y recepción de muestras, desembalaje e inactivación de muestras biológicas, extracción de ácidos nucleicos, y adicionalmente de otras áreas específicas como el cuarto de inmunofluorescencia,

electroforesis, inmunología y la zona central de trabajo. El área limpia incluye la zona de master mix, mezcla, amplificación y secuenciaciones de ácidos nucleicos, microbiología y área de lavado y desinfección. Además, el laboratorio dispone de mesones de trabajo equipados, oficinas administrativas, cuarto de reactivos y una sala de juntas que facilita reuniones, presentaciones, análisis de resultados y revisiones bibliográficas.

CEDIMOL destaca por ser un líder en investigación y diagnóstico molecular, con proyección internacional y compromiso con la salud pública impulsando la estandarización de pruebas diagnósticas en diversas enfermedades de interés para la medicina humana y veterinaria. Su labor se centra en diagnosticar estudiar y hacer seguimiento a enfermedades infecciosas, parasitarias y tropicales, promoviendo la investigación, fortaleciendo el talento humano, aplicando técnicas avanzadas de diagnóstico y desarrollando plataformas de información que apoyen la vigilancia epidemiológica regional y nacional.

Actividades a desarrollar durante la actividad práctica

Durante la pasantía en el Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL), se desarrollan actividades orientadas tanto al fortalecimiento de la formación investigativa como a la participación en los procesos propios del laboratorio. Una de las principales responsabilidades consiste en llevar a cabo un trabajo específico de investigación enfocado en el área de acuicultura, cuyo objetivo es generar aportes en identificación de enfermedades de origen infeccioso de truchas de agua dulce.

De manera complementaria, se colabora en las labores de apoyo indispensables para el funcionamiento del laboratorio, tales como el lavado, preparación y esterilización del material, garantizando la calidad y bioseguridad en cada procedimiento. Así mismo, se participa en

espacios académicos como la preparación de seminarios y la realización de clubes de revista, orientados al análisis crítico de los avances del trabajo de investigación y a la discusión de literatura científica actualizada.

A su vez, incluye la participación activa en los procesos investigativos que se adelantan dentro del CEDIMOL, contribuyendo al desarrollo de proyectos interdisciplinarios y fortaleciendo las competencias prácticas en el campo de la biología molecular y la medicina veterinaria. Finalmente, se asiste a las capacitaciones programadas por el laboratorio, lo que permite adquirir nuevos conocimientos para enriquecer la formación profesional desde una perspectiva investigativa.

Capítulo I

Planteamiento del problema

La acuicultura es actualmente el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo. En el 2022 más de la mitad de los productos acuícolas destinados al consumo humano eran provenientes de peces, quienes representaron alrededor del 65,2% de la producción acuícola global (Amillano-Cisneros et al., 2025). Dentro de este contexto, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es considerada como uno de los salmónidos cultivados más relevantes, teniendo una producción mundial de 981.239 toneladas de truchas en el 2020, de las cuales aproximadamente el 98% correspondieron a trucha arcoíris de cultivo, con un incremento cercano al 21% respecto al 2011 (EMOFA, 2023).

En Colombia, a pesar de tener un volumen de producción de truchas menor comparado a los principales países productores, se constituye como una actividad estratégica para la economía rural de las zonas altoandinas, donde las condiciones climáticas frías favorecen el desarrollo de

sistemas de cultivo intensivo (Alcántara-Jauregui et al., 2022). Estudios sobre sostenibilidad de la truchicultura colombiana reportan que es la tercera especie más producida en el país y que produjo alrededor de 1.771 toneladas de trucha arcoíris en el 2023, destinadas principalmente al mercado nacional y desarrolladas en sistemas alimentados por ríos y embalses de montaña (Mancera et al., 2025). Estos sistemas han demostrado que su intensificación, hacinamiento, variación en la temperatura y calidad del agua incrementa la susceptibilidad a brotes por enfermedades bacterianas, generando pérdidas significativas (Burgos, 2006; Amillano-Cisneros et al., 2025).

Recientes revisiones sobre brotes bacterianos entre 2010 y 2022 demuestran que las infecciones bacterianas son una de las principales amenazas para la producción, con un creciente número de microorganismos emergentes y oportunistas que afectan alevinos, juveniles y peces de engorde (Duman et al., 2025). En Colombia una revisión sobre enfermedades bacterianas en trucha arcoíris señala que en ambientes de agua dulce se han destacado patógenos como *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia spp*., *Weissella ceti* y *Lactococcus garvieae* reflejando la diversidad de agentes implicados (Alcántara-Jauregui et al., 2022). Además, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) reportó en el 2018, un evento de mortalidad en trucha arcoíris donde se identificó como problema de origen asociado una infección por *F. psychrophilum*.

El agente *F. psychrophilum* es un patógeno que produce principalmente lesiones cutáneas ulcerativas y necrosis muscular que es reportada cuando las condiciones de densidad, estrés y calidad de agua no son adecuadas, generando daños económicos debido a su dificultad en la comercialización del producto (Barnes & Brown, 2011).

Ante esta problemática, es necesario implementar métodos diagnósticos que permitan identificar el agente. Pese a que existen alternativas cono el diagnóstico clínico basado en las

lesiones y el aislamiento de cultivos específico, estos pueden verse limitados por la variación en la presentación clínica y el tiempo requerido para el crecimiento bacteriano. Es así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece una mayor sensibilidad y especificidad para la detección temprana de *F. psychrophilum* (León et al., 2009).

Justificación

El estudio de *F. psychrophilum* constituye una prioridad para la detección del patógeno en los sistemas de cultivo de acuicultura, dado que esta bacteria es responsable de importantes pérdidas económicas que pueden incurrir desde el 50% hasta el 90% de alevinos muertos en brotes agudos (Crump et al., 2005; Grasteau et al., 2015). Además, del impacto que presenta al ser un patógeno de alta propagación a través del agua dificultando el control y aumentando el costo de la producción (Grasteau et al., 2015).

A pesar de la importancia del diagnóstico de *F. psychrophilum* en la práctica cotidiana sigue dependiendo en gran medida de la observación de signos clínicos, el examen microscópico de tejidos y los medios de cultivo. Estudios señalan que, debido a la localización superficial de las lesiones, a las bajas concentraciones bacterianas en estadios tempranos y al crecimiento lento del microorganismo, las infecciones iniciales suelen pasar desapercibidas, generando falsos negativos y retrasando la toma de decisiones sanitarias (Strepparava et al., 2014). Además, experiencias nacionales muestran que incluso cuando se obtienen aislados con morfología compatible, las pruebas bioquímicas pueden no ser concluyentes para confirmar la identidad *de F. psychrophilum*, lo que limita la precisión diagnóstica basada solo en la microbiología clásica (Burgos, 2006).

Frente a este problema se plantea el uso de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual ofrece una alternativa eficaz para la

identificación precisa y temprana del agente etiológico (León et al., 2009). A su vez, se ha demostrado ser una técnica muy sensible y específica para la detección del agente, identificando el patógeno incluso con muestras de ADN con baja carga bacteriana sin necesidad de realizar aislamiento de cultivos (Strepparava et al., 2014).

Objetivos

Objetivo general

Estandarizar una prueba PCR para la detección de *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en explotaciones truchícolas.

Objetivos específicos

Describir los hallazgos principales asociados a la infección por *F. psychrophilum* en trucha arcoíris.

Extraer y cuantificar el ADN de muestras obtenidas de peces con lesiones compatibles con *F. psychrophilum*.

Optimizar las condiciones de la amplificación de la PCR usando diferentes protocolos para la detección de *F. psychrophilum*.

Capítulo II

Las enfermedades de origen bacteriano son una de las principales limitantes en la acuicultura, afectando el bienestar de los peces y generando pérdidas económicas significativas a nivel mundial (Johansen et al., 2011). Entre ellas, la infección causada por *Flavobacterium psychrophilum* que ha sido ampliamente reportada como una de las más relevantes en sistemas de cultivo de salmónidos, particularmente en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Nematollahi et al., 2003).

El *F. psychrophilum* es el agente etiológico de la enfermedad bacteriana del agua fría (Cold Water Disease, CWD) y el síndrome de la aleta caudal o Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS), patologías que se manifiestan con lesiones dérmicas, necrosis de aletas, y septicemia en estadios avanzados (Starliper, 2011). La detección temprana del patógeno es esencial para implementar medidas de control efectivas y reducir la propagación dentro de los sistemas de producción (Madetoja et al., 2002).

Las técnicas moleculares, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han demostrado alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de patógenos bacterianos acuáticos. Sin embargo, las variaciones en las condiciones de amplificación y la presencia de inhibidores en las muestras pueden afectar la eficacia de la detección (Toyama et al., 1994). Por tal, la PCR anidada surge como una herramienta que mejora la sensibilidad al realizar una segunda ronda de amplificación con un par de cebadores internos específicos (Izumi & Wakabayashi, 1997).

Este trabajo tiene como objeto principal estandarizar la técnica de PCR anidada para la detección de *Flavobacterium psychrophilum*, a partir de animales con lesiones compatibles debidamente descritas, con la enfermedad del agua fría, optimizando los parámetros de

extracción, las condiciones de temperatura y tiempo para lograr una identificación precisa y confiable del agente.

Revisión bibliográfica

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es uno de los salmónidos de cultivo más importantes a nivel mundial, constituyéndose como una fuente de proteína animal y de ingresos para la acuicultura de agua dulce. Diversas revisiones coinciden en que las enfermedades infecciosas, particularmente las bacterianas, se encuentran entre las principales amenazas para la sostenibilidad de estos sistemas, generando brotes recurrentes, alta mortalidad y pérdidas económicas considerables en granjas de trucha en Europa, Asia y América (Duman et al., 2025). A la vez, el uso intensivo de antimicrobianos en peces de cultivo ha contribuido al surgimiento de bacterias resistentes, lo que ha motivado un enfoque de Una Sola Salud y la búsqueda de estrategias de manejo basadas en la prevención, el diagnóstico temprano y alternativas al uso rutinario de antibióticos (Amillano-Cisneros et al., 2025).

Enfermedades bacterianas comúnes en Oncorhynchus mykiss

Las enfermedades bacterianas más comunes en esta especie suelen ser causadas por agentes como *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum* (enfermedad de aguas frías/RTFS) y *Flavobacterium columnare* (enfermedad columnar), *Renibacterium salmoninarum* y *Lactococcus garvieae* (Alcántara-Jauregui et al., 2022).

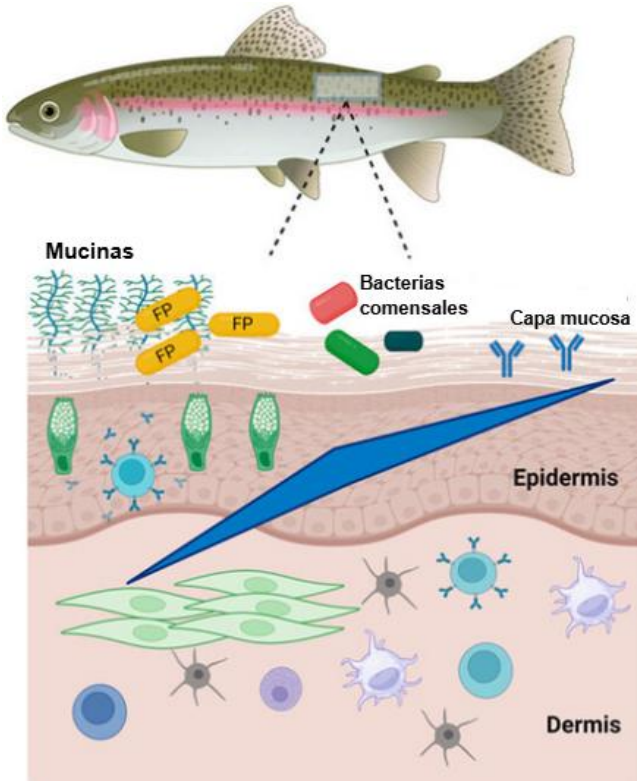
La ocurrencia de los patógenos es influenciada por el ambiente en donde, *F. psychrophilum* prospera en aguas frías (óptimo 10–14 °C) y suele causar brotes invernales, mientras que *Y. ruckeri* y *A. salmonicida* se asocian más a aguas cálidas o primavera-verano (Dalsgaard & Madsen, 2000).

Mecanismos de inmunidad

La mucosa epidérmica del pez es la primera barrera defensiva, la cual tiene moco cutáneo y branquial formando una capa física encargada de atrapar patógenos, con renovación constante que elimina microorganismos adheridos (Figura 1). Este moco contiene varias sustancias antimicrobianas: enzimas hidrolíticas (como la lisozima y proteasas) capaces de degradar paredes bacterianas, péptidos antimicrobianos (piscidinas, catelicidinas) que perforan membranas, lectinas y polianiones que aglutinan bacterias, además de anticuerpos (IgT/IgZ secretoras) y su complemento. Estudios citan que proteasas derivadas del moco juegan un rol protector importante en la resistencia innata de la trucha. Asimismo, las células epiteliales y leucocitos mucosos secretan moléculas protectoras, generan renovación celular lo que impide la fijación bacteriana. La inmunidad adaptativa (anticuerpos séricos e IgT/IgM mucosal) actúa secundariamente, pero la defensa temprana suele depender de estos componentes innatos en el moco (Vaibarova & Cizek, 2024).

Figura 1

Esquema representativo del sistema de defensa de la piel.



Nota. "FP" *Flavobacterium psychrophilum*. Tomado de Vaibarova, 2024.

Un moco abundante y rico en factores antimicrobianos dificulta la adhesión y colonización de bacterias por medio de inmunidad innata mucosal (complemento, lectinas, agocitos) actuando rápidamente en la superficie y neutralizando las bacterias antes de que invada tejidos profundos, pero cuando este moco se altera (por estrés, calidad deficiente del agua, etc.), aumenta la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Terova, et al., 2011; Easy & Ross, 2010)

Etiología

Flavobacterium psychrophilum es un bacilo gram negativo de 9,25 micras de diámetro aeróbico perteneciente a la familia *Flavobacteriaceae* en el filo *Bacteroidetes* la cual, incluye células flexibles, débilmente retráctiles, con motilidad deslizante mediante la secreción de polisacáridos, aunque esta característica varía entre cepas y puede ser difícil de observar

(Bernardet et al, 1996; Bernardet et al, 2002). Estas producen enzimas que degradan colágeno, fibrinógeno, caseína, gelatina, elastina y extractos de músculo de pescado, características que contribuyen a su patogenicidad (Nematollah, 2003). Además, es una enfermedad típica que suele ocurrir debajo de los 16 °C, siendo más prevalente y severa a 10°C (Starliper, 2011).

Esta bacteria es capaz de sobrevivir en aguas en movimiento como los ríos y arroyos durante muchos meses y adoptar una morfología diferente para mantenerse en las condiciones de inanición (Noga, 2010). Además, se ha descrito que los sedimentos encontrados en el hábitat del pez aumentan la supervivencia del microorganismo (Madetoja et al., 2002).

Taxonomía

La enfermedad ha recibido múltiples denominaciones a lo largo de su historia científica, incluyendo enfermedad del pedúnculo, enfermedad del agua fría en salmónidos adultos (CWD), enfermedad bacteriana del agua fría (BCWD) y síndrome del alevín de la trucha en juveniles de esta especie (RTFS) (Rangdale et al., 1996), reflejando tanto su evolución taxonómica como la diversidad de manifestaciones clínicas que presenta. Inicialmente descrita por Davis en 1946 en truchas arco iris y posteriormente aislada por Borg en 1960 desde salmón juvenil en el estado de Washington, la bacteria fue originalmente clasificada como *Cytophaga psychrophila* antes de recibir su denominación actual (Nematollah et al., 2003).

En los años 80 se la clasifica como *Flexibacter psychrophilus* (Bernardet & Grimont, 1989) y finalmente Bernardet et al. (1996) la transfieren al género *Flavobacterium,* Hoy pertenece al filo *Bacteroidetes,* familia *Flavobacteriaceae (*genus *Flavobacterium)* El cambio a *Flavobacterium* estuvo apoyado en hibridación de ARN-ribosomal que agrupa esta especie con otros *Flavobacterium* (Bernardet et al, 1996; Nematollahi, 2003)

Epidemiologia

Lo que inicialmente se consideró una enfermedad restringida al norte del continente americano, desde finales de los años 80 ha demostrado tener una distribución mundial que abarca Europa (Alemania, Francia, Dinamarca, Reino Unido, España, Finlandia), Australia, Japón y Chile (León et al., 2008). En la actualidad, es probable que la bacteria esté ampliamente diseminada a través del mundo (Ospina, 2016). En el contexto de América latina, particularmente en Colombia, los brotes más severos se encuentran en alevines y juveniles de trucha arco iris tanto en agua dulce como en agua de mar, con niveles de mortalidad reportados de hasta 90% en los peces más pequeños (Burgos, 2006).

Signos clínicos

Los síntomas iniciales de la enfermedad suelen ser apatía, pérdida de apetito y erosión de las puntas de las aletas, ya en casos avanzados se encuentra necrosis con exposición de órganos internos y de la musculatura (Waskiewicz et al, 2014). Estas manifestaciones clínicas pueden variar considerablemente según la edad y tamaño de los peces afectados; en alevines, la enfermedad puede causar erosión de la piel que cubre el saco vitelino con mortalidades de hasta 50%; en peces adultos, se observan lesiones características como pigmentación oscura en un lado del cuerpo, erosión del área del pedúnculo con exposición de la médula espinal y pérdida de la cola (Nematollah, 2003). En juveniles y adultos aparecen ampollas (úlceras a presión) en la pared lateral del cuerpo que forman ulceran profundas que llegan a exponer los músculos (Lumsden et al., 1996). Por otro lado, se pueden encontrar otras lesiones en otras partes del cuerpo además de la piel, generando como resultado exoftalmia, distensión abdominal con aumento de volumen de ascitis y branquias pálidas (Knupp & Lonch, 2023; Waskiewicz et al, 2014; Lorenzen et al. 1991).

En concentraciones bajas o animales portadores pueden no verse signos precisos, pero a nivel de los tejidos internos presentan hiperplasia branquial y congestión de órganos (hígado, bazo). Sin embargo, en la mayoría de los casos suele observarse esplenomegalia y hemorragias leves. Por otro lado, en las infecciones crónicas se nota palidez general (anemia), úlceras amarillentas con exudado, y a veces deformidades vertebrales (Madsen & Dalsgaard 1999; Madsen et al. 2001).

Fisiopatología

El agente ingresa principalmente por branquias y a través de la piel especialmente cuando existen factores predisponentes como inmunosupresion, mala calidad del agua o abrasiones cutáneas por medio del agua encontrada a bajas temperaturas (Nematollahi, 2003), aun así, no se tiene identificado un reservorio específico que disemine la enfermedad (Noga, 2010), aunque se cree que algunos peces portadores actúan como reservorio permitiendo que la bacteria persista intracelularmente en macrófagos del bazo, así como en gónadas y huevos fertilizados, lo que facilita la transmisión vertical y horizontal (Dalsgaard & Madsen, 2000).

El daño patológico se debe en gran parte a las enzimas proteolíticas capaces de degradar colágeno, fibrina, condroitín sulfato y extractos musculares, lo que facilita la destrucción del tejido conectivo del pez facilitando úlceras externas e invasión sistémica (Dalsgaard, 1993).

Métodos diagnósticos

Diagnóstico clínico

A través de las lesiones características encontradas a nivel epidérmico como erosiones epiteliales y pérdida de la continuidad del epitelio, se puede determinar cómo diagnostico presuntivo la enfermedad, sin embargo, es necesario de otros métodos diagnósticos que permitan

comprobar la presencia del microorganismo (Noga, 2010) debido a que los signos externos de la enfermedad son similares a los observados en otras enfermedades (León et al., 2008).

Diagnostico microbiológico

El cultivo en agar es un método de aislamiento que presenta un crecimiento lento el cual puede presentar inhibición o sobrecimiento de la bacteria (Távara et al., 2019). Este patógeno no suele crecer en agar regulares, sino que necesita nutrientes específicos, el método tradicional es el agar Cytophaga que contiene extracto de levadura y antibióticos para contribuir a la selectividad o variantes como TYES (triptona-levadura Ca-Mg) (Nematollahi et al., 2003). Estos deben tener un período de incubación de 5 a 12 días con una temperatura de 15 a 18°C, en donde crecen colonias pequeñas, lisas o ligeramente fibrosas, color amarillo/crema, a menudo con motilidad deslizante.

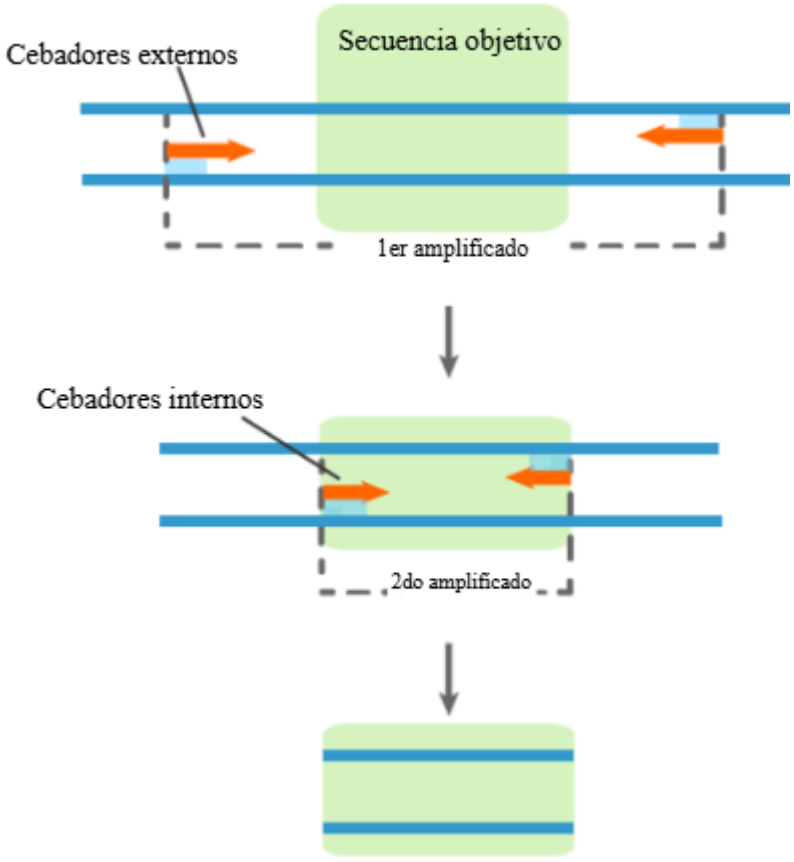
Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas para la identificación y detección de *Flavobacterium psychrophilum* en peces y en el ambiente acuícola, ya que permite amplificar fragmentos específicos de ADN bacteriano. En términos generales, la técnica se basa en ciclos sucesivos de desnaturalización, anillamiento y extensión, en la cual los cebadores diseñados para secuencias blanco del genoma de *F. psychrophilum* reconocen de forma específica el ADN bacteriano y permiten su amplificación exponencial (Toyama et al., 1994; Urdaci et al., 1998; Izumi et al., 2005; Crumlish et al., 2007; Strepparava et al., 2014; Ospina et al., 2016; Távara et al., 2019).

Figura 2

Etapas en el ciclo de amplificación de PCR anidada.

.



Nota. Tomado de abm, (s. f.) en Polymerase Chain Reaction (PCR) - Variations to the System.

A partir de la PCR convencional se han desarrollado protocolos de PCR anidada (nested PCR) dirigidos a aumentar la sensibilidad. En este enfoque se realizan dos rondas sucesivas de amplificación: primero se emplea un par de cebadores externos que amplifican un fragmento relativamente amplio del gen objetivo, luego el producto de esa reacción se utiliza como molde en una segunda PCR con un par de cebadores internos que reconocen una región del amplicón original (Perera & Acevedo, 2018) (Figura 2). Esta estrategia incrementa de manera notable la

capacidad de detectar el patógeno en tejidos, agua de cultivo y fluidos reproductivos, donde la cantidad de bacterias puede ser muy baja (Wiklund et al., 2000; Taylor & Winton, 2002).

La extracción de ADN es un paso fundamenta en la PCR. En el método de fenol-cloroformo, estos elementos funcionan como agentes caotrópicos para separar los lípidos y proteínas de los ácidos nucleicos, los cuales son precipitados con alcoholes (Castro et al., 2023). Luego, la concentración de ADN se mide utilizando espectrofotometría de luz UV a 260 nm, mientras que la pureza y la calidad se miden usando las razones A260/230 y A260/280, respectivamente (Foster, 2024). El cociente 260/280 indica la pureza del ADN o ARN respecto a proteínas, donde un valor cercano a 1.8 para ADN se considera óptimo; valores más bajos sugieren contaminación con proteínas o fenoles. El cociente 260/230 evalúa la presencia de contaminantes como sales, guanidinas o carbohidratos, y se considera ideal un valor entre 2.0 y 2.2 (Matlock, 2015).

La electroforesis es un componente final para visualizar la PCR convencional, en donde, se prepara un gel de agarosa con tampón (TBE). También se debe usar un marcador de peso molecular que permita estimar el tamaño de los fragmentos para tener una guía al cargar el ADN en los pocillos, este va a migrar hacia el ánodo (+) bajo el campo eléctrico separando los fragmentos (bandas) teniendo en claro que, las moléculas más pequeñas migran más rápido. Antes de la carrera eléctrica, se tiñe el gel con bromuro de etidio o SYBR para observar las bandas bajo luz UV (Foster, 2024).

Capítulo III

Materiales y métodos

Área de estudio

Las muestras fueron obtenidas en las piscícolas *Las Cascadas* y Finca *Plazuelas* ubicadas en la vereda La Plata del municipio de Mutiscua y la vereda Chichira del municipio de Pamplona, Norte de Santander respectivamente (Figura 3). Estos sistemas de cultivo utilizan agua proveniente del río La Plata en Mutiscua y el rio Pamplonita.

Figura 3

Disposición para la toma de muestras.



Nota. Zonas de preparación de los muestreos realizados. A. Muestreo ubicado en Mutiscua. B. Muestreo ubicado en Pamplona. Fuente propia.

Población

Se seleccionaron 33 ejemplares que presentaban alteraciones macroscópicas compatibles con *F. psychrophilum*. Los ejemplares seleccionados fueron sacrificados previa anestesia con aceite de clavo, en cumplimiento de las normas de bienestar animal.

La necropsia se realizó siguiendo la metodología descrita por Noga (2010) (Figura 4), en donde se identificó, describió y fotografió cada uno de los hallazgos macroscópicos encontrados en las estructuras externas e internas alteradas de cada uno de los peces.

Figura 4

Procedimiento sistemático de la necropsia.



Nota. A. Comienzo de la incisión y retiro de las branquias. B. Incisión realizada por la línea media. C. Exposición de órganos internos. Fuente propia.

Muestreo

Se realizó la toma de muestras para biología molecular y microbiología de 33 ejemplares de trucha arcoíris a partir de las lesiones compatibles con el patógeno. Estas muestras fueron almacenadas y conservadas en viales estériles de 500 ul de etanol absoluto hasta el posterior análisis en laboratorio (Figura 5). Las primeras 16 muestras se obtuvieron en la piscícola Las Cascadas y las 17 muestras restantes en la Finca Plazuelas.

Figura 5

Procedimiento de conservación de muestras.



Nota. A. Selección e incisión de la lesión. B. Muestra de tejido lesionado. C. Tejido en vial de conservación con alcohol absoluto. Fuente propia.

Diagnostico microbiológico

Las muestras bacterianas utilizadas en este estudio provienen de cultivos obtenidos por parte de un proyecto de investigación paralelo independiente. Se tomaron 10 muestras de aislamientos de cultivo a partir de agar cytophaga y se realizó la extracción de ADN utilizando el kit InviSorb® (Invitek Diagnostics), siguiendo las etapas indicadas por el fabricante (lisis, unión a matriz, lavado y elución). Las muestras se almacenaron a −20 °C hasta su procesamiento.

Extracción de ADN

La extracción de los tejidos se realizó siguiendo el método de extracción modificado de fenol-cloroformo (Muhammad et al., 2016; Köchl et al, 2018; Willemsen et al., 2020) utilizando dos buffers de lisis. Se tomaron 16 muestras de tejido provenientes de piscícolas Las cascadas y se procesaron bajo cabina de bioseguridad, dejándose en incubación con buffer de lisis (200 Mm Tris pH 7.4, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, 4.5 mM Urea) y 20 µg/mL de proteinasa K a 56 °C durante 20 horas. A las 17 muestras restantes provenientes de la finca la plazuela se le realizó el mismo procedimiento con un buffer de lisis diferente (100 mM Tris–HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS). Después se realizó la extracción orgánica fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó el ADN con acetato de sodio 3M y etanol frío. Todo el procedimiento con fenol cloroformo se realizó en cabina de bioseguridad.

La cuantificación y pureza del ADN se evaluó por medio de espectrofotometría determinando la cantidad de ADN y la relación entre las absorbancias de A260/280 y A260/230 usando NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

PCR anidad de punto final

Este protocolo se realizó siguiendo a Toyama et al (1994) y Crumlish et al (2007), utilizando como cebadores universales externos 20F: 5’-AGAGTTGATCATGGCTCAG-3’ y

1500R: 5’-GGTTCACTTGTTACGACTT-3’ (Anexo 1 y 2). Estos amplifican un fragmento correspondiente a la región del gen 16S rRNA. En la segunda ronda de amplificación, se emplearon los cebadores internos específicos para *F. psychrophilum* PSY1: 5’-CGATCCTACTTGCGTAG-3’ y PSY2: 5’-GTTGGCATCAACACACT-3’ (Anexo 3 y 4). Los cebadores fueron confirmados a partir la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) y analizados con herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST) para confirmar su especificidad y ausencia de complementariedades internas. Estos cebadores fueron sintetizados por Macrogen y reconstituidos en agua libre de nucleasas.

Se utilizó el MIX NZYTaq II 2× Green (NZYTech), (Taq ADN polimerasa, buffer de reacción, dNTPs, cofactores de $MgCl_2$ y colorantes de carga). Para cada reacción se preparó un volumen total de 25 µL, conformado por 12.5 µL de Master Mix 2×, 2.5 µL del cebador forward, 2.5 µL del cebador reverse, 5 µL de ADN molde y 2.5 µL de agua de grado molecular.

La PCR anidada se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones térmicas; en la primera ronda con una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, alineamiento a 55 °C por 1.5 minutos, extensión a 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Seguido de esto se tomaron 5 ul del primer amplificado y se realizó una segunda PCR con los cebadores PSY1 y PSY2 en las mismas condiciones de la primera PCR ya descrita.

Los productos amplificados de la PCR fueron procesados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, empleando tampón TBE (Tris-borato-EDTA, 10X). Al gel se incorporó 7 µL de colorante HidraGreen™ Safe Loading Buffer para la visualización del ADN y un marcador de peso molecular de 100 pb (BioLabs®). La corrida se realizó a 80 V durante 90 min. Tras la

corrida, los geles fueron visualizados en un transiluminador UV Invitrogen™ Safe Imager™ 2.0 y documentados mediante fotografías.

Capítulo IV

Resultados

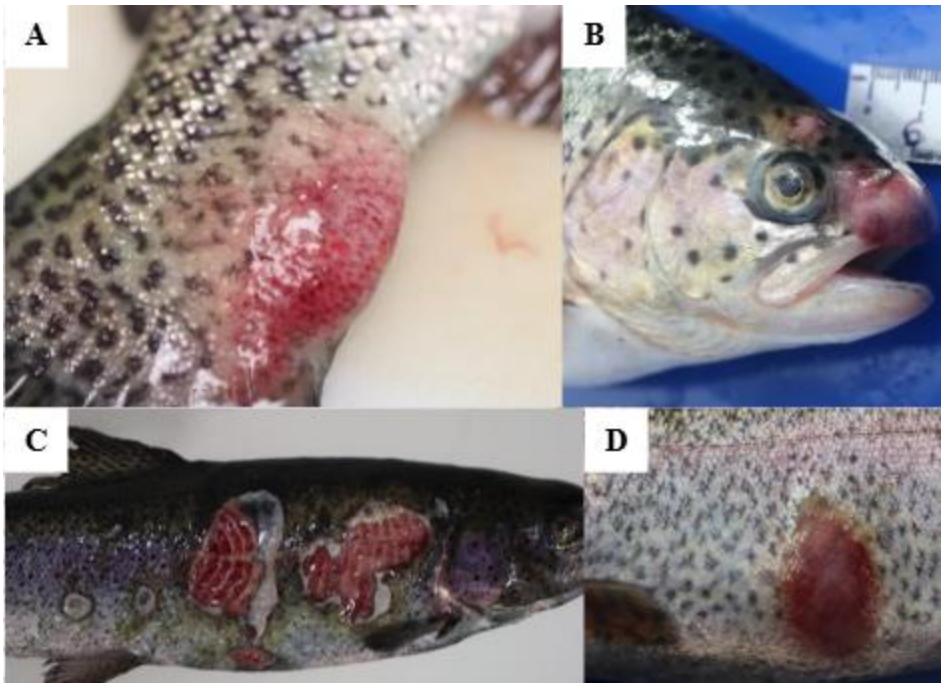
Identificación y descripción de lesiones

Las lesiones presentadas a continuación corresponden a los especímenes evaluados en los dos muestreos realizados, expuestos de forma integrada con el fin de sintetizar los hallazgos morfológicos más representativos.

El análisis macroscópico del tegumento reveló un patrón de compromiso cutáneo de carácter multifocal y progresivo, en donde las lesiones variaron en su profundidad y extensión, evidenciando desde la pérdida focal de continuidad epitelial hasta la destrucción masiva de tejido dérmico y muscular con ubicaciones en el labio superior y las zonas laterales del animal (Figura 6).

Figura 6

Manifestaciones cutáneas externas observadas en trucha arcoíris.



Nota. Fotografías con lesiones cutáneas en ejemplares de trucha arcoíris. A. Lesión con pérdida de continuidad epitelial localizada en la unión del pedúnculo caudal con la aleta causal. B. Lesión ulcerativa focalizada en la región cefálica. C. Ulcera severa caracterizada por decoloración y destrucción celular con exposición del tejido muscular, en el flanco lateral izquierdo. D. Lesión con hiperemia severa y erosión con aparente pérdida de la capa mucosa de la piel ubicada en la zona central del cuerpo. Fuente propia.

Las alteraciones en la vasculatura periférica son visibles en la superficie corporal, donde se registran lesiones hemorrágicas que adoptan distintas morfologías; desde pequeños focos (equimosis) en la zona lateral y ventral, hasta trazos alargados de hemorragia lineal. Complementariamente, se observó una erosión significativa y acortamiento del tejido cartilaginoso en la porción dorsal de la aleta caudal, dándole una apariencia de pérdida estructural (Figura 7C).

Figura 7

Patrones de hemorragia y necrosis cutánea.

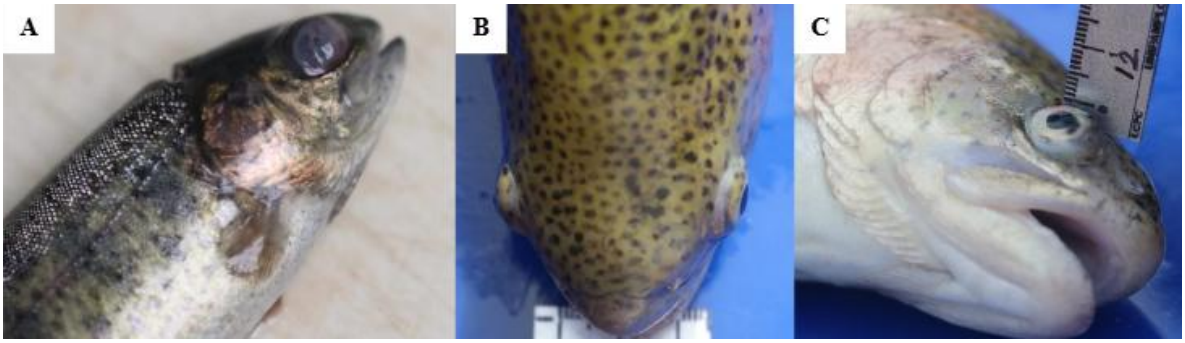


Nota. Manifestaciones circulatorias y lesiones del tegumento en truchas arcoíris. A. Hemorragia de patrón lineal que se extiende longitudinalmente a lo largo de la zona lateral derecha del ejemplar indicada con "*". B. Presencia de múltiples lesiones hemorrágicas (equimosis) en la zona lateral y en la proximidad de la aleta anal indicada con "*". C**.** Erosión y perdida de la porción dorsal de la aleta caudal. Fuente propia.

Las alteraciones estructurales a nivel ocular se caracterizaron por una protrusión marcada y simétrica (bilateral) del globo ocular más allá de los límites de la órbita (Figura 8B). Esta condición de exoftalmia confiere una apariencia de tensión y turgencia a los tejidos blandos que delimitan el ojo, modificando visiblemente el perfil cefálico del pez.

Figura 8

Exoftalmia bilateral en ejemplares de trucha arcoíris.

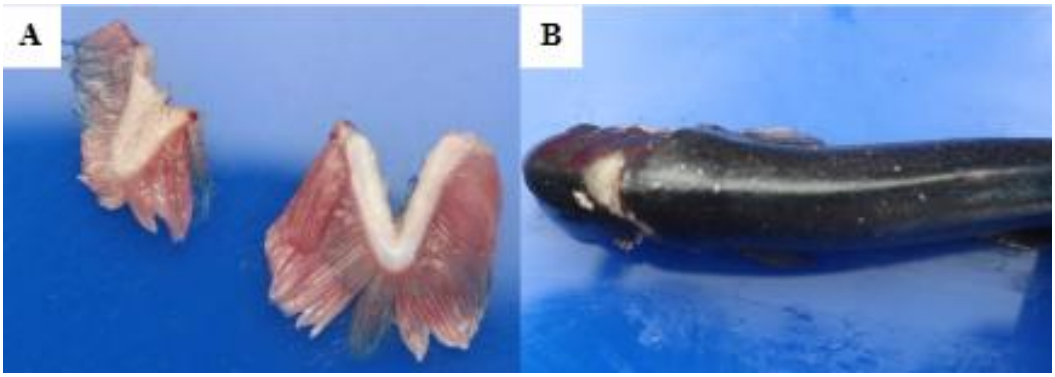


Nota. Protrusión anormal del globo ocular (exoftalmia). A. Exoftalmia en vista lateral dorso ventral con ligera opacidad ocular. B. Exoftalmia bilateral vista dorso ventral. C. Exoftalmia vista latero lateral. Fuente propia.

La evaluación de las estructuras internas, específicamente de los arcos branquiales, reveló una palidez generalizada en las branquias, lo que difiere de forma marcada de la coloración rojiza intensa de un tejido perfundido (Figura 9A). Además, la estructura esquelética evidencia una deformidad del eje vertebral, presentando una curvatura lateral compatible con escoliosis de grado perceptible, lo cual altera la alineación corporal normal del animal (Figura 9B).

Figura 9

Alteraciones de las branquias y el esqueleto en trucha arcoíris.

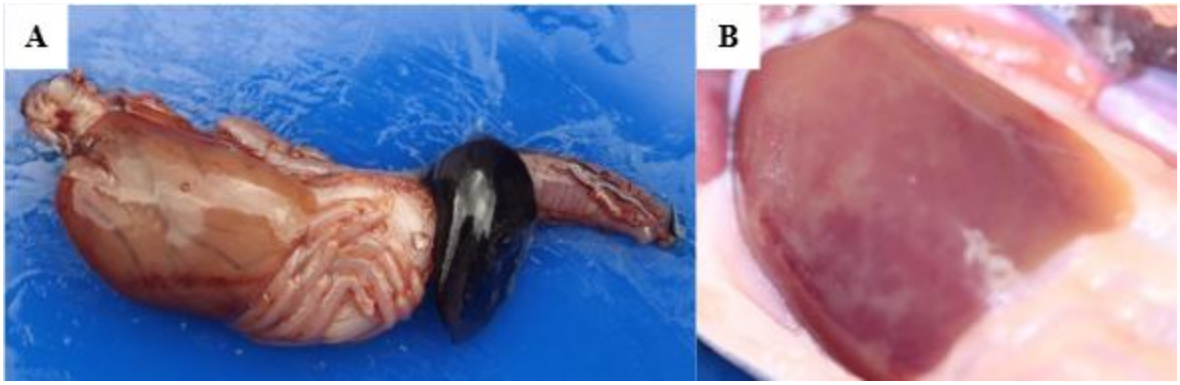


Nota. Fotografías con cambios patológicos estructurales en truchas arcoíris. A. Branquias (lamelas) con una coloración notoriamente más clara de lo normal (palidez branquial). B. Curvatura anormal del eje vertebral en el plano dorsal (escoliosis). Fuente propia.

La apertura de la cavidad celómica expone un incremento notable en el volumen de los órganos internos, destacando el bazo con un aumento notable en su tamaño y turgencia compatible con esplenomegalia. Por otro lado, el hígado exhibe variaciones patológicas en su coloración, desde una tonalidad amarillenta difusa compatible con leve grado de ictericia (Figura 10A), hasta una coloración rojiza oscura y acentuada determinada como congestión (Figura 10B), indicando alteraciones significativas en la apariencia de los órganos principales del paquete digestivo.

Figura 10

Alteraciones macroscópicas en los órganos internos *de trucha arcoíris*.



Nota. Órganos de la cavidad celómica de la trucha arcoíris que evidencian cambios patológicos en órganos internos. A. Paquete digestivo con hígado de coloración distribuida en un patrón difuso con una severidad de leve a moderada y un aumento del tamaño del bazo (esplenomegalia). B. Hígado con un patrón de coloración irregular que varía entre leve y leve congestión. Fuente propia.

Cuantificación y pureza del ADN

El buffer de lisis con urea se usó debido a su disponibilidad dentro del laboratorio, sin embargo, buscó el uso de un segundo buffer debido a las alteraciones observadas en el procedimiento. Se obtuvieron valores para las muestras procesadas con buffer de lisis de urea (Tabla 1) y con buffer de lisis de SDS (Tabla 2).

Tabla 1

Cuantificación y pureza de las muestras usando buffer de lisis de urea.

Buffer de lisis con urea			
Muestra	ADN (ng/µL)	A260/280	A260/230
1	1038.3	1.82	1.42
2	131.0	1.94	1.34
3	108.4	1.95	1.85
4	21.2	1.86	1.78
5	13.8	1.96	-1.79
6	6.1	4.49	0.53
7	31.3	2.06	3.71
8	120.8	1.86	0.69
9	11.4	2.42	-2.67
10	256.3	2.10	0.34
11	166.6	1.70	0.23
12	*	*	*

13	*	*	*
14	130.6	1.70	0.24
15	110.8	1.89	1.77
16	233.4	1.75	1.40

Nota. Valores obtenidos haciendo uso del espectrofotómetro de luz UV NanoDrop en el CEDIMOL. "*" muestras no procesadas.

Al procesar la extracción de las muestras con el buffer de lisis de urea, se presentó una inversión de la fase acuosa y orgánica lo que dio como resultado dificultad al intentar extraer la fase acuosa, ya que no se encontraba en la parte sobrenadante, sino en el fondo del tubo; esto impidió que se procesaran dos muestras (muestra 12 y 13).

Tabla 2

Cuantificación y pureza de las muestras usando buffer de lisis con SDS

Buffer de lisis con SDS			
Muestra	ADN (ng/μL)	A260/280	A260/230
17	570.0	1.96	2.14
18	763.0	1.92	2.24
19	43.7	1.59	1.27
20	154.1	1.92	2.06
21	20.5	1.44	0.97
22	14.0	1.84	0.96
23	408.8	1.59	1.72
24	581.4	1.94	2.10
25	467.6	1.92	2.35
26	192.4	1.93	2.4
27	564.3	2.00	2.38
28	231.8	2.00	2.45
29	83.0	1.92	2.54
30	410.0	1.97	2.34
31	6.3	2.18	1.76
32	68.7	1.97	3.45
33	200.3	1.91	2.16

Nota. Valores obtenidos haciendo uso del espectrofotómetro de luz UV NanoDrop en el CEDIMOL.

Reacción en cadena polimerasa

Para el procedimiento de la PCR se realizaron protocolos con muestras individuales y muestras agrupadas (pools), usando un total de 12 pools de todas las muestras obtenidas en

ambos muestreos (Tabla 3). Se justifica el uso de los pools debido a que la presencia del agente se determina por explotaciones.

Tabla 3

Organización de los Pools.

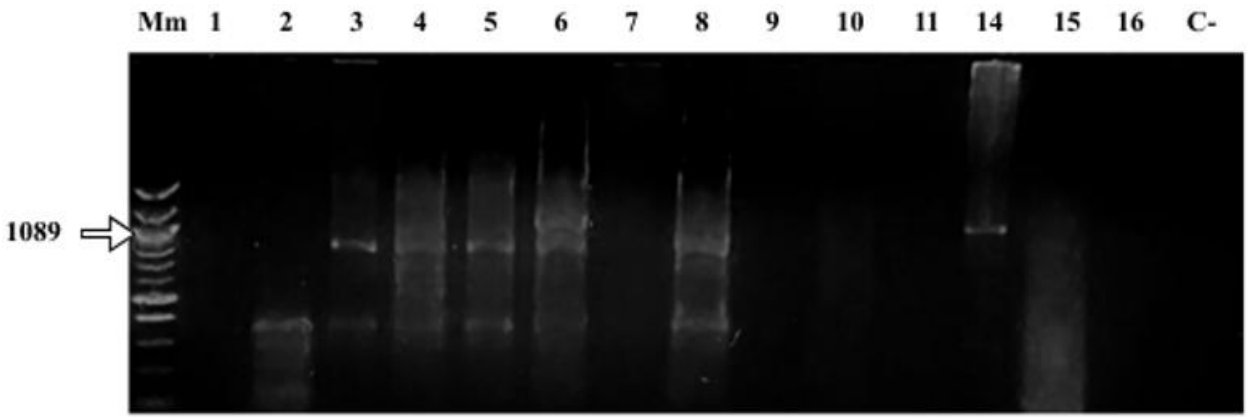
Pools	Muestras	Proveniencia
1	1, 2	Las cascadas.
2	3, 4, 5	
3	6, 7, 8	
4	9, 10, 11	
5	14, 15, 16	
6	2, 4 y 5	
7	17, 18, 19	La plazuela
8	20, 21, 22	
9	24, 24, 25	
10	26, 27, 28	
11	29, 30, 31	
12	32, 33	

Nota. Se repiten los pools de las muestras 3, 4 y 5.

El primer procedimiento se realizó con todas las muestras obtenidas de la extracción de ADN (en total 14 muestras) del primer muestreo, utilizando las condiciones de PCR dadas según Toyama et al (1994), las cuales utilizaban Tm de 45°C obteniendo bandas degradadas a lo largo del gel (Figura 11).

Figura 11

Productos con el primer protocolo

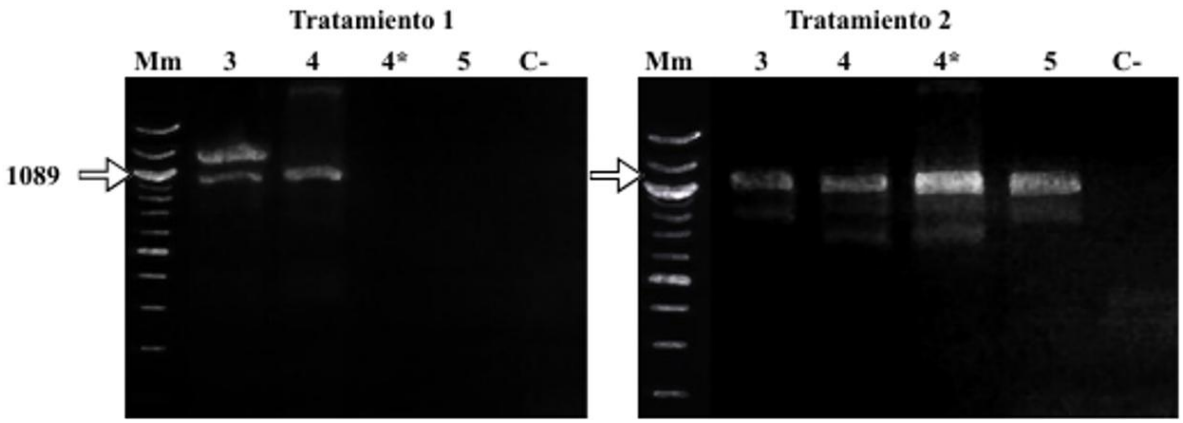


Nota. Amplicones degradados usando TM 45 °C. En cada pozo están las muestras individuales de tejido de la finca las cascadas señaladas en la Tabla 1. Pozo 1; Marcador de peso molecular, pozos 2 a 15; muestras 1 a 16 pozo 16; Control negativo.

Con el objeto de mejorar los resultados en la siguiente corrida se le realizó una modificación utilizando dos tiempos de melting distintos; 50 °C para el tratamiento 1 y 55 °C para el tratamiento 2 repitiendo solo las muestras positivas dadas en el primer resultado (muestras 3, 4 y 5), permitiendo como resultado una mejora en la observación de bandas compatibles con la presencia de *F. psychrophilum* para todas las muestras, siendo más significativa en aquellas muestras usadas con la temperatura más alta, en comparación con el tratamiento 1 que solo se observó en la muestra 3 y 4 (Figura 12).

Figura 12

Productos con el segundo protocolo.

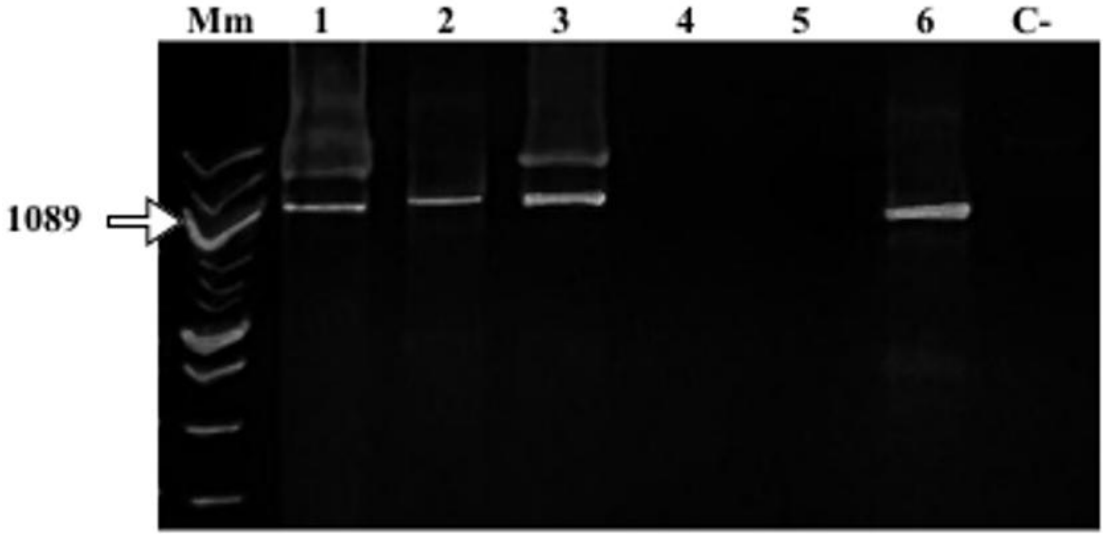


Nota. Amplicones obtenidos a partir de tres muestras (3,4 y 5) usando dos tratamientos; tratamiento 1 a 50°C y tratamiento 2 a 55 °C. Mm: Marcador molecular, C-: Control negativo, En cada pozo están las muestras agrupadas de tejido señaladas en la tabla 3. "*" indica la misma muestra 4 repetida. Pozo 1; Mm, pozo 2; muestra 3, pozo 3; muestra 4, pozo 4; muestra 4*, pozo 5; muestra 5, pozo 6; C-.

En la siguiente PCR se utilizó como Tm 55°C utilizando los pools del 1 al 6 (Tabla 3), obteniendo presencia de bandas para aquellas muestras desde 1 hasta las 8 (Figura 13).

Figura 13

Productos de amplificación utilizando los pools de muestras de la finca la cascada.

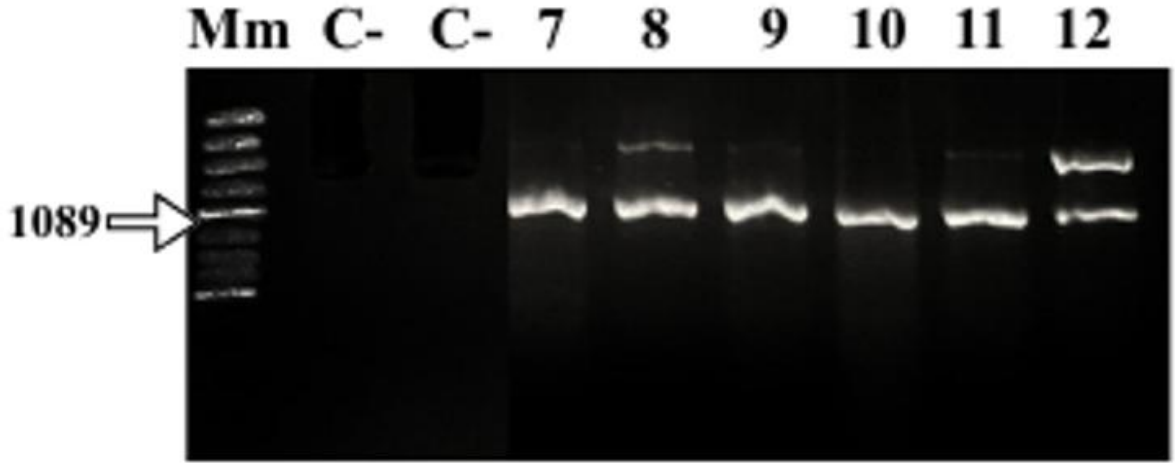


Nota. Amplicones usando TM 55 °C por medio de pools del primer muestreo. Mm: Marcador molecular. C-: Control negativo. Pozo 1; Mm, pozo 2; pool 1, pozo 3; pool 2, pozo 4; pool 3, pozo 5; pool 5, pozo 6; pool 6, pozo 7; C-.

El procedimiento con las muestras de la finca La plazuela, fueron realizados utilizando las muestras en pools y con la temperatura de melting a 55°C (Figura 14).

Figura 14

Resultado de la amplificación de muestras de pools de la finca La plazuela

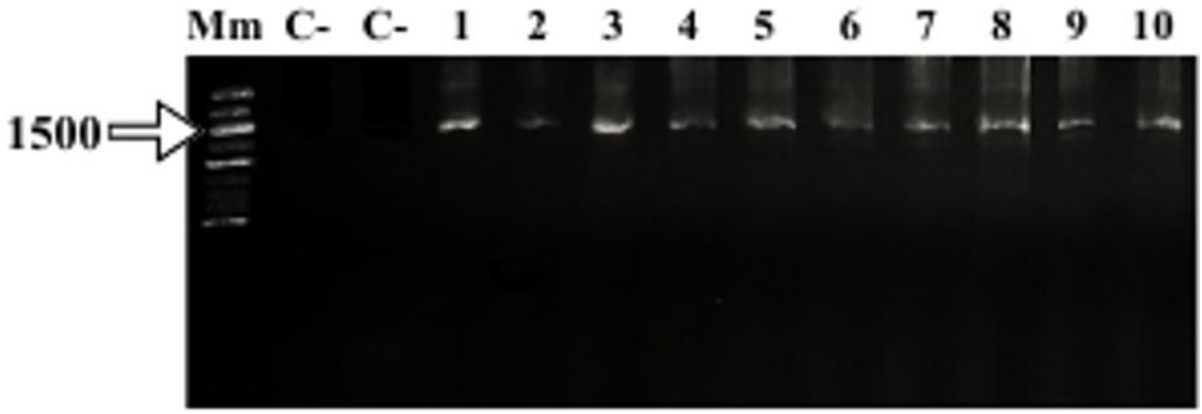


***Nota*.** Amplicones usando TM 55 °C por medio de pools del segundo muestreo. Mm: Marcador molecular. C-: Control negativo. Pozo 1; Mm, pozo 2; C-, pozo 3; C-, pozo 4; pool 7, pozo 5; pool 8, pozo 6; pool 9, pozo 7; pool 10, pozo 8; pool 11, pozo 9; pool 12.

A partir de las diez muestras obtenidas de aislamientos de cultivos se realizaron pruebas individuales utilizando el mismo protocolo establecido, obteniendo bandas solo a nivel de 1500 pb (Figura 15).

Figura 15

Protocolo en muestras por aislamiento de bacterias.



***Nota*.** Amplicones usando TM 55 °C por medio de muestras individuales. Mm: Marcador molecular. C-: Control negativo. Pozo 1; Mm, pozo 2; C-, pozo 3; C-, pozo 4; muestra 1 de bacterias, pozo 5; muestra 2 de bacterias, pozo 6; muestra 3 de bacterias, pozo 7; muestra 4 de bacterias, pozo 8; muestra 5 de bacterias, pozo 9; muestra 6 de bacterias, pozo 10; muestra 7 de bacterias, pozo 11; muestra 8 de bacterias, pozo 12; muestra 9 de bacterias, pozo 13; muestra 10 de bacterias.

Discusión

Los hallazgos encontrados en el presente trabajo partieron desde el análisis de las lesiones características generadas por el patógeno *Flavobacterium psychrophilum* hasta el estudio y protocolo de un método molecular de diagnóstico como medio para determinar la presencia de este agente en las explotaciones truchiculas.

La evaluación de lesiones reveló alteraciones macroscópicas considerablemente consistentes con las manifestaciones patológicas de la Enfermedad del Agua Fría Bacteriana, donde los hallazgos documentados incluyen lesiones cutáneas profundas, hemorragias y compromiso sistémico visceral (Starliper, 2011; Park et al., 2023).

El hallazgo recurrente de úlceras cutáneas, en el pedúnculo caudal y en la región de la cabeza, se estableció como un signo esencial en los reportes de flavobacteriosis, aun así, la aparición de estas lesiones deriva de la capacidad del patógeno para generar la destrucción activa del tejido (Vaibarová & Čížek, 2022). Debido a que el *F. psychrophilum* posee factores de

virulencia esenciales, tales como enzimas proteolíticas, cuya función es actuar degradando la matriz extracelular del huésped y el tejido conectivo.

La acción bacteriana provoca un desgaste en el tejido cartilaginoso y dérmico de la aleta. Este tipo de fenómeno se reporta en alevines y peces jóvenes, siendo una de las presentaciones más severas de la enfermedad (Knupp & Loch, 2023). De forma distinta, la escoliosis leve detectada en este trabajo constituye una manifestación de carácter crónico o subagudo que se debe considerar. Aunque la deformidad esquelética no siempre es un signo que acompaña a la fase aguda, su presencia ha sido reconocida en salmónidos que logran sobrevivir a infecciones tempranas de *F. psychrophilum* (Cipriano & Holt, 2005; Dalsgaard, 1993).

Los hallazgos viscerales encontrados proporcionan la evidencia más contundente de la diseminación bacteriana interna, siendo la exoftalmia un signo distintivo de la septicemia (Starliper, 2011). Simultáneamente, la esplenomegalia y las alteraciones hepáticas (ictericia/congestión) halladas en la necropsia confirman la severidad de la infección; el agrandamiento del bazo se presenta como una respuesta inmunológica, dado que este órgano linfoide incrementa su actividad de filtrado celular en el intento de eliminar la carga bacteriana explicando las alteraciones encontradas en este trabajo (Knupp & Loch, 2023; Park et al., 2023). A pesar, de la compatibilidad de las lesiones, es necesario tener una confirmación mediante una prueba directa bien sea por microbiología o por PCR.

La relación entre la presencia de *F. psychrophilum* y las lesiones clínicas en peces no permite una correlación clara de la enfermedad. Debido a que, estudios han encontraron que tanto truchas con lesiones cutáneas evidentes como individuos asintomáticos han resultado positivos para el ADN de *F. psychrophilum* mediante PCR (Távara et al., 2019). Este hallazgo sugiere que

la presencia del patógeno puede no manifestarse siempre en forma de lesiones visibles indicando una posible colonización subclínica.

En cuanto a la técnica de PCR, es importante inicialmente estandarizar la técnica de extracción de ADN a partir de tejidos de peces. Esta se inicia con una etapa de lisis celular que se puede dar por detergentes aniónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS) que facilita la liberación del ADN al desnaturalizar proteínas y capturar lípidos (Tan & Yiap, 2009). Por otro lado, la urea suele emplearse como un potente agente desnaturalizante o en combinación con agentes caotrópicos, que son sales altamente concentradas. Sin embargo, la utilización de estos compuestos puede estar asociada a problemas en la separación de fases durante la extracción, especialmente cuando el protocolo involucra la remoción de proteínas mediante solventes orgánicos como lo sucedido en este trabajo (Zamora, 2019).

El problema observado en este estudio, donde la fase acuosa se ubicó en la zona inferior; determina una limitación reconocida en este tipo de metodologías debido a que altas concentraciones de sales o agentes caotrópicos pueden alterar la densidad de la fase acuosa, impidiendo la correcta separación bifásica (acuosa-orgánica) y la recuperación del ADN purificado a partir de la fase acuosa (Herzer, 2001).

Los resultados de la espectrofotometría mostraron que ambos buffers de lisis tuvieron un buen rendimiento de ADN. PSin embargo, en el caso del buffer de urea estuvo acompañado por una baja pureza, evidenciada por los valores A260/230 que fueron consistentemente bajos o negativos, indicando una contaminación significativa con sales caotrópicas, fenol residual o polisacáridos lo que puede afectar finalmente el desarrollo de la PCR (Foster, 2024).

La amplificación inicial de la PCR empleando el protocolo de Toyama et al. (1994), dirigidos al gen 16S rRNA con una temperatura de anillamiento de 45 °C, resultó en productos

degradados y bandas inespecíficas (Izumi et al., 2005). Este patrón sugiere una amplificación inespecífica a partir del ADN bacteriano de otras especies propias de la microbiota ambiental presente en los tejidos de trucha arcoíris asociada a las lesiones debido a la naturaleza de la PCR anidada, como ha sido descrito por Toyama et al (1994).

Se ha demostrado por parte de otros autores, que la modificación de la temperatura a 55 °C mejora la resolución de las bandas (Taylor & Winton, 2002), reafirmando como las condiciones de la temperatura de melting, influyen de forma directa en la calidad de las bandas. Estos autores tras ajustar de manera sistemática la concentración de $MgCl_2$ y la temperatura de anillamiento, obtuvieron un incremento en la sensibilidad.

Esta limitación en la degradación de las bandas fue compartida por quienes también utilizaron PCR anidada sobre el gen 16S en muestras ambientales y observaron amplificaciones ambiguas que comprometían la interpretación, por ello, optaron por cambiar la diana genética hacia el gen gyrB, logrando una amplificación más específica y una resolución filogenética superior (Izumi et al., 2005).

Por otro lado, algunos autores han optado por otros diseños de PCR anidada basándose en la región espaciadora intergénica 16S–23S (ISR) con el fin de detectar portadores asintomáticos de *F. psychrophilum* en fluidos ováricos y bazo (Baliarda et al., 2002). No obstante, esto demuestra cómo la elección de la diana y la configuración de los cebadores se adapta al tipo de muestra y al propósito del ensayo.

La detecteción de *F. psychrophilum* en tejido y muestras ambientales (agua de estanques), ha tenido reportes de detección exitosa a concentraciones muy bajas del patógeno empleando el sistema 16S–23S con cebadores universales seguidos por específicos, y aunque no detallan ajustes

de temperatura como en este trabajo, su éxito dependió de la calidad del ADN extraído y la concentración inicial (Wiklund et al., 2000).

Otros autores enfrentaron obstáculos al momento de detectar el patógeno a partir de tejidos en formol y parafina, por lo cual, se tuvieron que adaptar a un protocolo de extracción de ADN (Crumlish et al., 2007), evidenciando que el tipo de muestra impone condiciones críticas sobre la calidad del ADN y la eficiencia de amplificación.

Por otro lado, en este estudio, el ADN extraído directamente de tejidos de piel amplificó bandas compatibles con *Flavobacterium psychrophilum*, mientras que en el ADN obtenido de los aislamientos bacterianos solo se observó en el fragmento universal del 16S (1500 pb) y no la banda específica. Esto puede deberse a la dificultad de aislamiento siendo este un patógeno de difícil cultivo y con la posibilidad de que las colonias recuperadas puedan corresponder a bacterias acompañantes que crecieron mejor que *F. psychrophilum* (Burgos, 2006).

Algo muy similar fue descrito por Zamora et al. (2009) donde aislaron 52 colonias con morfología típica de *F. psychrophilum* en agar TGE; todas amplificaron el fragmento universal en la primera PCR de la técnica anidada, pero ninguna amplificó en la segunda PCR específica para *F. psychrophilum*, sin embargo, al hacer la secuenciación este los ubicó dentro del género *Flavobacterium*, con 95,4–96,3 % de similitud con *F. psychrophilum*. Dejando en evidencia de que la ausencia de la banda de 1089 pb en el ADN procedente de cultivos bacterianos no necesariamente implica ausencia del patógeno en el pez sino a un fracaso de aislamiento.

En el contexto de la truchícultura colombiana, donde las herramientas de diagnóstico molecular en campo aún son escasas, el principal aporte de este estudio radica en demostrar la viabilidad de un protocolo de PCR anidada específico para *F. psychrophilum* más accesible a la realidad de las truchícolas de Norte de Santander.

Se considera como limitación de este estudio que a pesar de que se pudieron obtener bandas compatibles con las descritas para los protocolos desarrollados, a falta de tiempo se hace necesario la confirmación mediante protocolos de secuenciación que serán desarrollados como continuación de este trabajo, permitiendo verificar con más exactitud la identidad del agente etiológico y relacionar los hallazgos con los informes de otros investigadores. A pesar de estas restricciones, la investigación constituye un primer acercamiento al problema y establece las bases para seguir con la caracterización molecular y microbiológica en etapas posteriores, donde se añadirán estos análisis complementarios y se aumentará el número de muestras.

Capítulo V

Conclusión

Los hallazgos clínicos y anatomopatológicos observados en los ejemplares evaluados fueron compatibles con un cuadro de enfermedad bacteriana de agua fría asociada a *Flavobacterium psychrophilum* donde las lesiones erosivas en piel y aletas, la palidez branquial, la esplenomegalia y las alteraciones hepáticas documentadas coinciden con las características descritas para esta infección en salmónidos en sistemas de producción intensiva. La presencia de estas lesiones, junto con la sintomatología observada, permitió establecer una correlación entre el estado clínico de los peces y la sospecha etiológica inicial.

La comparación de dos métodos de extracción de ADN reveló diferencias en cuanto a rendimiento y pureza. Aunque el tampón de urea permitió obtener mayores concentraciones de ADN, el procedimiento presentó dificultades en la fase de extracción orgánica, comprometiendo la reproducibilidad y, en algunos casos, la calidad del material genético. Por otro lado, la extracción mediante SDS mostró ser más consistente y adecuada para su posterior uso en reacciones de PCR,

evidenciando la importancia de seleccionar una técnica que asegure la estabilidad y calidad del ADN para diagnósticos moleculares.

La aplicación de una PCR anidada permitió amplificar fragmentos asociados a *F. psychrophilum*, lo que respalda la presencia del agente bacteriano en algunos de los ejemplares analizados. No obstante, la aparición de bandas inespecíficas y la variabilidad entre corridas indican la necesidad de continuar optimizando las condiciones de amplificación y los controles utilizados. De manera general, los resultados de este estudio confirman el valor del diagnóstico molecular como herramienta complementaria para la vigilancia sanitaria en sistemas de piscicultura, pero también resaltan la necesidad de estandarizar los procedimientos con el fin de aumentar su sensibilidad y especificidad.

Recomendaciones

Se recomienda estandarizar el método de extracción de ADN utilizando protocolos que minimicen la presencia de contaminantes y aseguren la integridad del material genético, priorizando el método SDS/proteinasa K o, alternativamente, kits comerciales validados para microbiología acuícola. Asimismo, es necesario implementar controles negativos de extracción y controles positivos conocidos en cada corrida de PCR con el fin de reducir el riesgo de falsos negativos o positivos asociados a contaminación o amplificación inespecífica. La confirmación mediante secuenciación de los amplicones resultaría especialmente útil para fortalecer la confiabilidad diagnóstica.

Desde el punto de vista de mejoramiento metodológico, se sugiere evaluar el uso de qPCR como alternativa diagnóstica debido a la mayor sensibilidad y capacidad para cuantificar carga bacteriana en conjunto con la secuenciación del genoma amplificado. Además, es pertinente ampliar el número de muestras y realizar muestreos periódicos para evaluar la dinámica temporal

de la infección dentro del sistema de producción, incluyendo matrices adicionales de otras partes de tejido e incluso de muestras de sangre.

En términos de manejo productivo, se recomienda reforzar medidas de bioseguridad orientadas a la reducción del estrés, la disminución de densidades de cultivo, el mejoramiento de la calidad del agua y la reducción de manejos traumáticos durante el proceso de selección y clasificación. La vigilancia permanente del estado sanitario del plantel y la capacitación del personal técnico en la identificación temprana de signos clínicos permitirán intervenir de manera oportuna y reducir el impacto productivo asociado a la enfermedad.

Referencias

Abm. (s. f.). Polymerase Chain Reaction (PCR) - Variations to the System. Tomado de https://info.abmgood.com/polymerase-chain-reaction-pcr-variations.

Alcántara-Jauregui, F. M., Martínez-Salazar, E. A., & Contreras-Rendón, S. (2022). Enfermedades bacterianas y sus agentes etiológicos en acuicultura de agua dulce en Colombia. Revista MVZ Córdoba, 27(3), e2387. https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/2387/4753.

Amillano-Cisneros, J. M., Fuentes-Valencia, M. A., Leyva-Morales, J. B., Savín-Amador, M., Márquez-Pacheco, H., Bastidas-Bastidas, P. d. J., Leyva-Camacho, L., De la Torre-Espinosa, Z. Y., & Badilla-Medina, C. N. (2025). Effects of Microorganisms in Fish Aquaculture from a Sustainable Approach: A Review. *Microorganisms*, *13*(3), 485. https://doi.org/10.3390/microorganisms13030485.

Baliarda, A., Faure, D., & Urdaci, M. C. (2002). Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen Flavobacterium psychrophilum. *Journal of applied microbiology*, *92*(3), 510–516. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01554.x.

Barnes, M. E. & Brown, M. L. (2011). A review of Flavobacterium psychrophilum biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. *The Open Fish Science Journal*, 4: 40-48. http://dx.doi.org/10.2174/1874401X01104010040.

Bernardet, J. F., Nakagawa, Y., Holmes, B., & Subcommittee On The Taxonomy Of Flavobacterium And Cytophaga-Like Bacteria Of The International Committee On Systematics Of Prokaryotes (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*(Pt 3), 1049–1070. https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-1049.

Bernardet, J.F. & Grimont, P.A. (1989). Deoxyribonucleic Acid Relatedness and Phenotypic Characterization of Flexibacter columnaris sp. nov., nom. rev., Flexibacter psychrophilus sp. nov., nom. rev., and Flexibacter maritimus Wakabayashi, Hikida, and Masumura. *Microbiology Society*. Vol 39. https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-346.

Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., (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). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 46, 128–148. https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-128.

Burgos, A. (2006). Detección molecular de flavobacterium psychrophilumen trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) cultivada en el lago Guamuéz municipio de Pasto República de Colombia. *Revista electrónica de ingeniería en producción acuícola* Vol 2. Recuperado de https://revistas.udenar.edu.co/index.php/reipa/article/view/1617/1975.

Castro-Rojas, C., Tere-Peña, C., Arias-Cortés, M. (2023). Guide on Polymerase Chain Reaction (PCR) for assuring validity of its results. *Instituto Nacional de Metrología.* 132 pp. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14178.24009.

Cipriano, R. C. & Holt, R. A. (2005). Flavobacterium psychrophilum, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. *Fish Disease Leaflet.* No. 86. Recuperado de https://freshwater-aquaculture.extension.org/wp-content/uploads/2019/08/USFWS_Coldwater_disease.pdf.

Crumlish, M., Diab, A. M., George, S., & Ferguson, H. W. (2007). Detection of the bacterium Flavobacterium psychrophilum from a natural infection in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), using formalin-fixed, wax-embedded fish tissues. *Journal of fish diseases*, *30*(1), 37–41. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00779.x.

Crump, E. M., Burian, J., Allen, P. D., & Kay, W. W. (2005). Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from Flavobacterium psychrophilum. *Microbiology (Reading, England)*, *151*(Pt 9), 3127–3135. https://doi.org/10.1099/mic.0.28140-0.

Dalsgaard, I. & Madsen, L. (2000). Bacterial pathogens in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *Journal of Fish Diseases*, 23: 199-209. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00242.x.

Dalsgaard, I. 1993. Virulence mechanisms in Cytophaga psychrophila and other Cytophaga-like bacteria pathogenic for fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 3: 127-144. https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90032-7.

Duman, M., Altun, S., Saticioglu, I. B., & Romalde, J. L. (2025). A review of bacterial disease outbreaks in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) reported from 2010 to 2022. *Journal of fish diseases*, *48*(9), e13886. https://doi.org/10.1111/jfd.13886.

Easy, R. H., & Ross, N. W. (2010). Changes in Atlantic salmon Salmo salar mucus components following short- and long-term handling stress. *Journal of fish biology*, *77*(7), 1616–1631. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02796.x.

European Market Observatory for Fisheries and Aquacukture Products (EMOFA). (2023). Large Trout In The EU. Tomado de https://eumofa.eu/documents/20124/35623/PTAT_Large%2Btrout.pdf/4923045b-73a7-e7ce-16ec-bd33301286a8?t=1686569699668.

Foster, B. (2024). A Guide to DNA and RNA Quantification and Quality. *Technology Networks*. Tomado de https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/a-guide-to-dna-and-rna-quantification-and-quality-392900.

Grasteau, A., Guiraud, T., Calvez, S., Chesneau, V., Le Hénaff, M., et al. (2015). Evaluation of Glutaraldehyde, Chloramine-T, Bronopol, Incimaxx Aquatic and Hydrogen Peroxide as Biocides against Flavobacterium psychrophilum for Sanitization of Rainbow Trout Eyed Eggs. *Journal of Aquaculture Research and Development.* 6. 6-13. http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000382.

Herzer, S. (2001). DNA purification. En Gerstein, A. S. (Ed.), Molecular biology problem solver: A laboratory guide. *Wiley-Liss* pp. 167-195. https://doi.org/10.1002/0471223905.ch7.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2018). El ICA atendió la notificación de mortalidad de trucha arcoíris en Nariño. Recuperado de https://www.ica.gov.co/noticias/ica-notificacion-mortalidad-trucha-arcoiris.

Izumi, S., & Wakabayashi, H. (1997). Use of PCR to detect Cytophaga psychrophila from apparently healthy Juvenile ayu and coho salmon eggs. *Fish Pathology*, *32*(3), 169-173. https://doi.org/10.3147/jsfp.32.169.

Izumi, S., Fujii, H., & Aranishi, F. (2005). Detection and identification of Flavobacterium psychrophilum from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *Journal of fish diseases*, *28*(9), 559–564. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00663.x.

Johansen, L., Jensen, I., Mikkelsen, H., Bjørn, P., Jansen, P., & Bergh, O. (2011). Disease interaction and pathogens exchange between wild and farmed fish populations with

special reference to Norway. *Aquaculture*, *315*(3–4), 167–186. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.014.

Knupp, C., & Loch, T. P. (2025). Immersion challenge of three salmonid species (family Salmonidae) with three multilocus sequence typing variants of Flavobacterium psychrophilum provides evidence of differential host specificity. *Journal of fish diseases*, *48*(8), e13889. https://doi.org/10.1111/jfd.13889.

Köchl, S., Niederstätter, H., Parson, W. (2005). DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol-Chloroform Method and Real-Time PCR. In: Carracedo, A. (eds) Forensic DNA Typing Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 297. Humana Press. https://doi.org/10.1385/1-59259-867-6:013.

León, J., Ávalos, R., & Ponce, M. (2008). Flavobacterium psychrophilum y su patología en alevines de Onchorhynchus mykiss del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Revista Peruana de Biología*, *15*(2), 117-124. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332008000200019&lng=es&tlng=es.

Lorenzen, E., Dalsgaard, I., Bernardet, J. (1997). Characterization of isolates of Flavobacterium psychrophilum associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies. *Dis Aquat Org.* 31:197-208. https://doi.org/10.3354/dao031197.

Lumsden, J. S., Ostland, V. E. & Ferguson, H. W. (1996). Necrotic myositis in cage cultured rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), caused by Flexibacter psychrophilus. *Journal of Fish Diseases* 19: 113–119. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1996.tb00689.x.

Madetoja, J., Dalsgaard, I., & Wiklund, T. (2002). Occurrence of Flavobacterium psychrophilum in fish-farming environments. *Diseases of aquatic organisms*, *52*(2), 109–118. https://doi.org/10.3354/dao052109.

Madsen, L. & Dalsgaard, I. (1999). Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture*. 171: 41–48. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00427-X.

Madsen, L. J. Arnbjerg, and I. Dalsgaard. (2001). Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum): experiments with Flavobacterium psychrophilum and oxytetracycline. *Aquacult*. Res. 32: 235–241. https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00552.x.

Mancera, L. P., Gordillo, R. F., Albarracín, N., y Piza, A. C. (2025). Certificación kosher en la industria acuícola colombiana: Caso de implementación en la trucha arcoíris (Onchorhynchus mykiss). *Región Científica*, 4(2), 2025505. https://doi.org/10.58763/rc2025505.

Matlock, B. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fisher Scientific. Recuperado de https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf#:~:text=A%20low%20A260%2FA230%20ratio%20may,the%20same%20pH%20and%20of.

Muhammad, H., Iqbal, Z., Iqbal, M. U., Younas, T., & Bashir, Q. (2016). An efficient method for DNA isolation from fish fin. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, *53*(4), 843-850. https://doi.org/10.21162/PAKJAS/16.3998.

Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F & Haesebrouck, F. (2003). Flavobacterium psychrophilum infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. Pag 563–574. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00488.x.

Noga, E. (2010). Fish Disease: Diagnosis and Treatment. *Wiley Blackwell*. Pag 107-177. https://doi.org/10.1002/9781118786758.ch8.

Ospina, J., Betancur, J., Montoya, A., Correa, L. (2016). PCR Y qPCR PARA DETECCIÓN DE Aeromonas salmonicida Y Flavobacterium psychrophilum EN Oncorhynchus mykis. *Revista Investigacion Pecuaria.* Recuperado de https://revistas.udenar.edu.co/index.php/revip/article/view/2901/3449.

Park, J., Roh, H., Lee, Y., Lee, J.-Y., Kang, H.-Y., Seong, M. J., Kang, Y., Heo, Y. U., Kim, B. S., Park, C.-I., & Kim, D.-H. (2023). Characterization and Pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum* Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Korea. *Microorganisms.* https://doi.org/10.3390/microorganisms11102546.

Perera, C., Acevedo, A. (2018). Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. *Revista de Salud Animal*. Vol. 40, No. 3. Recuperado de https://censa.edicionescervantes.com/index.php/RSA/article/view/990.

Rangdale, R. E., Richards, R. H. & Aldeman, D. J. (1996). Isolation of Cytophaga psychrophila, causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surface of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Bulletin of the European Association of Fish pathologists*, 16:63-67. Recuperado de https://www.eafp.org/download/1996-Volume16/Issue%202/1996%20Vol%2016%20No%201_63.pdf.

Starliper, C. (2011). Bacterial coldwater disease of fishes caused by Flavobacterium psychrophilum. *Journal of Advanced Research*. Volume 2, Issue 2, pag 97-108. Tomado de: https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.04.001.

Strepparava, N., Wahli, T., Segner, H., & Petrini, O. (2014). Detection and quantification of Flavobacterium psychrophilum in water and fish tissue samples by quantitative real time PCR. *BMC microbiology*, *14*, 105. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-105.

Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of biomedicine & biotechnology*, *2009*, 574398. https://doi.org/10.1155/2009/574398.

Távara, C., Serrano, E., Tafalla, C., Burga, C. & Llanco, L. (2019). Identificación molecular de Flavobacterium psychrophilum y caracterización de las alteraciones cutáneas en la trucha arcoíris (Oncorhynchus mikyss) procedente de Puno, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *30*(4), 1762-1769. https://doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17149.

Taylor, P. & Winton, J. (2002). Optimization of Nested Polymerase Chain Reaction Assays for Identification of *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, and *Flavobacterium psychrophilum*, *Journal of Aquatic Animal Health*, Vol 14, Issue 3. Pag 216–224. https://doi.org/10.1577/1548-8667(2002)014%3C0216:OONPCR%3E2.0.CO;2.

Terova, G., Cattaneo, A. G., Preziosa, E., Bernardini, G., & Saroglia, M. (2011). Impact of acute stress on antimicrobial polypeptides mRNA copy number in several tissues of marine sea bass (Dicentrarchus labrax). *BMC immunology*, *12*, 69. https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-69.

Toyama, T., Kita-Tsukamoto, K., & Wakabayashi, H. (1994). Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathology, 29*(4), 271–275. https://doi.org/10.3147/jsfp.29.271.

Urdaci, M. C., Chakroun, C., Faure, D., & 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*(7), 519–530. https://doi.org/10.1016/s0923-2508(98)80006-5.

Vaibarová, V., & Čížek, A. (2024). Supposed Virulence Factors of *Flavobacterium psychrophilum*: A Review. *Fishes*, *9*(5), 163. https://doi.org/10.3390/fishes9050163.

Waskiewicz, A & Irzykowska, L. (2014). Flavobacterium spp. – Characteristics, Occurrence, and Toxicity. *Encyclopedia of Food Microbiology (2th Editio*n). Pag 938-942. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00126-9.

Wiklund, T., Madsen, L., Bruun, M. S., & Dalsgaard, I. (2000). Detection of Flavobacterium psychrophilum from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of applied microbiology*, *88*(2), 299–307. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00959.x.

Willemsen, D., Cui, R., Reichard, M., Valenzano, D. (2020) Intra-species differences in population size shape life history and genome evolution. *eLife* 9:e55794. https://doi.org/10.7554/eLife.55794.

Zamora, L., Palacios, A., Palacios, L., Rodriguez, V., Sanchez, L., Dominguez, L., & Fernandez-Garayzabal, J. (2009). Aislamiento y caracterización de flavobacterias en alevines de trucha arcoíris con sintomatología clínica compatible con RTFS. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Pag 334-335. Recuperado de https://www.visavet.es/es/aislamiento-y-

caracterizacion-de-flavobacterias-en-alevines-de-trucha-arcoiris-con-sintomatologia-clinica-compatible-con-rtfs/34=1023/.

Zamora, V. (2019). Estandarización de las técnicas de Extracción, Cuantificación y Electroforesis de ARN para su incorporación al Manual de Bioquímica Celular y de los Tejidos I. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. Recuperado de https://tesiunamdocumentos.dgb.unam.mx/ptd2019/marzo/0787015/0787015.pdf.

Anexos

Anexo 1

BLAST Cebador 20F.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01ES1G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	524	JF664250.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01AQ9F7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	532	JF666473.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01DS4V8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	476	JF636314.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01BCUNV 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	520	JF672346.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01B47E7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	519	JF678933.1
Vibrio atlanticus strain SYM11-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Vibrio atlanticus	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	1453	ON025983.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01ET8DM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	487	JF644133.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01DKX6Y 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	514	JF662668.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01B1JCU 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	521	JF614966.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01EY817 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	486	JF656558.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01BLKTD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	518	JF676747.1
Uncultured Spirochaetes bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: M15-Ba16	uncultured Spirocha…	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	875	LC473855.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01CMJCH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	521	JF622128.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01AOHKD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	516	JF672587.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01EA5YM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	463	JF649226.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01BVD0N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	485	JF634997.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01DU9VV 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	518	JF617667.1
Uncultured bacterium clone GDIC2IK01CPYUO 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	38.2	38.2	100%	6.2	100.00%	516	JF639796.1

Anexo 2

BLAST Cebador 1500R.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Streptomyces sp. CG4 chromosome, complete genome	Streptomyces …	36.2	36.2	100%	25	100.00%	9942351	CP163525.1
Reyranella sp. strain S403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Reyranella sp.	36.2	36.2	100%	25	100.00%	1445	KY176946.1
Paenarthrobacter sp. JL.01a chromosome, complete genome	Paenarthrobac…	36.2	36.2	100%	25	100.00%	4404497	CP104877.1
Microbispora hainanensis strain NBC_00253 chromosome, complete genome	Microbispora h…	36.2	36.2	100%	25	100.00%	8801664	CP108086.1
Eragrostis tef cultivar Dabbi chromosome 2A	Eragrostis tef	36.2	36.2	100%	25	100.00%	35425885	CP137584.1
Microbispora hainanensis strain NBC_00196 chromosome, complete genome	Microbispora h…	36.2	36.2	100%	25	100.00%	8855727	CP108129.1
Microbispora hainanensis strain NBC_00254 chromosome, complete genome	Microbispora h…	36.2	36.2	100%	25	100.00%	8796808	CP108085.1
Microbispora bryophytorum JCM 31772 DNA, complete genome	Microbispora b…	36.2	36.2	100%	25	100.00%	7872740	AP040087.1
Microbispora sp. CA-137427 chromosome, complete genome	Microbispora s…	36.2	36.2	100%	25	100.00%	10062553	CP191962.1
PREDICTED: Manis javanica uncharacterized lncRNA (LOC140844552), ncRNA	Manis javanica	34.2	34.2	94%	97	100.00%	779	XR_012123068.1
Monochroa lucidella genome assembly, chromosome: 2	Monochroa luci…	34.2	34.2	94%	97	100.00%	18474881	OZ311147.1
Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain CFBP7319 chromosome, complete genome	Xanthomonas …	34.2	34.2	94%	97	100.00%	4750772	CP033181.1
Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain CFBP1948 chromosome, complete genome	Xanthomonas …	34.2	34.2	94%	97	100.00%	4674931	CP033185.1
Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain AXO1947, complete genome	Xanthomonas …	34.2	34.2	94%	97	100.00%	4674975	CP013666.1
PREDICTED: Panthera uncia polyamine modulated factor 1 binding protein 1 (PMFBP1), transcript …	Panthera uncia	34.2	34.2	94%	97	100.00%	6299	XM_049622526.1
Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain CFBP7324 chromosome, complete genome	Xanthomonas …	34.2	34.2	94%	97	100.00%	4723924	CP033177.1
Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain CFBP7321 chromosome, complete genome	Xanthomonas …	34.2	34.2	94%	97	100.00%	4717270	CP033180.1
Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain MAI99 chromosome, complete genome	Xanthomonas …	34.2	34.2	94%	97	100.00%	4698819	CP019088.1

Anexo 3

BLAST Cebador PSY1.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Flavobacterium columnare strain ARS-1 clone GIA-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	KC912669.1
Flavobacterium columnare strain GA-02-14 clone GIII-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	KC912665.1
Viola epipsila genome assembly, chromosome: 8	Viola epipsila	34.2	34.2	100%	97	100.00%	85897223	OZ274347.1
Viola epipsila genome assembly, chromosome: 7	Viola epipsila	34.2	34.2	100%	97	100.00%	85649230	OZ274289.1
Viola suecica genome assembly, chromosome: 4	Viola suecica	34.2	34.2	100%	97	100.00%	91797836	OZ274321.1
Flavobacterium columnare strain GA-02-14 clone GIII-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	KC912666.1
Flavobacterium columnare strain PT-14-00-151 clone GIIB-15 16S ribosomal RNA gene, partial seq…	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	KC912661.1
Flavobacterium columnare NBRC 100251 = ATCC 23463 16S ribosomal RNA, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	NR_118577.1
Viola suecica genome assembly, chromosome: 7	Viola suecica	34.2	34.2	100%	97	100.00%	85003800	OZ274324.1
Flavobacterium columnare strain F10-HK-A clone GI/II-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	KC912682.1
Flavobacterium columnare NBRC 100251 = ATCC 23463 16S ribosomal RNA, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	NR_118576.1
Streptomyces sp. SudanB25_2051 genome assembly, chromosome: c1	Streptomyces …	34.2	34.2	100%	97	100.00%	6621320	OZ186787.1
Flavobacterium columnare NBRC 100251 = ATCC 23463 16S ribosomal RNA, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	NR_118580.1
MAG TPA_asm: Caudoviricetes sp. isolate ctOz547, partial genome	Caudoviricetes…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	49328	BK032491.1
Viola epipsila genome assembly, chromosome: 5	Viola epipsila	34.2	34.2	100%	97	100.00%	89647663	OZ274287.1
Flavobacterium columnare NBRC 100251 = ATCC 23463 16S ribosomal RNA, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	NR_118582.1
Flavobacterium columnare strain ALG-00-530 clone GII-17 16S ribosomal RNA gene, partial seque…	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	KC912655.1
Flavobacterium columnare NBRC 100251 = ATCC 23463 16S ribosomal RNA, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1254	NR_118581.1

Anexo 4

BLAST Cebador PSY2.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Flavobacterium psychrophilum strain FPS-S6-R14 chromosome	Flavobacteriu…	34.2	205	100%	97	100.00%	2860588	CP095709.1
Flavobacterium psychrophilum strain FPS-S6-R2 chromosome	Flavobacteriu…	34.2	205	100%	97	100.00%	2860535	CP095216.1
Flavobacterium psychrophilum strain FPS-S6-R4 chromosome	Flavobacteriu…	34.2	205	100%	97	100.00%	2860573	CP095222.1
3_Tms_b3v08	Timema monik…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	73460	OB796127.1
2_Tcm_b3v08	Timema califor…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	437266	OE179198.1
Flavobacterium psychrophilum strain FPS-S6-C1 chromosome, complete genome	Flavobacteriu…	34.2	205	100%	97	100.00%	2860598	CP095210.1
4_Tbi_b3v08	Timema bartmani	34.2	34.2	100%	97	100.00%	64359	OD568437.1
3_Tms_b3v08	Timema monik…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	474498	OB793018.1
5_Tge_b3v08	Timema genevi…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	19400	OE847294.1
Flavobacterium sp. strain OR_7-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	756	OQ546428.1
5_Tge_b3v08	Timema genevi…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	163225	OE840685.1
Flavobacterium psychrophilum strain 2022-469 chromosome, complete genome	Flavobacteriu…	34.2	205	100%	97	100.00%	2858044	CP176802.1
4_Tte_b3v08	Timema tahoe	34.2	34.2	100%	97	100.00%	50288	OE005708.1
5_Tge_b3v08	Timema genevi…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	737921	OE839122.1
4_Tte_b3v08	Timema tahoe	34.2	34.2	100%	97	100.00%	24405	OE008333.1
Flavobacterium psychrophilum strain 160401-1/5N-R2 chromosome	Flavobacteriu…	34.2	205	100%	97	100.00%	2827738	CP095030.1
Flavobacterium psychrophilum strain FPS-F33 chromosome	Flavobacteriu…	34.2	205	100%	97	100.00%	2860508	CP059708.1
Flavobacterium psychrophilum strain CN36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Flavobacteriu…	34.2	34.2	100%	97	100.00%	1349	OR253695.1