

**Control de microorganismos patógenos de pez cebra (*Danio rerio*)
utilizados en experimentación en colonias de Argentina**

**Control of pathogenic microorganisms of zebrafish (*Danio rerio*) used
in experimental colonies in Argentina**

DOI: 10.53499/sfjeasv4n2-002

Received in: May 1st, 2024

Accepted in: Jun 30th, 2024

Juan Martín Laborde

Dr. en Ciencias Veterinarias por la Facultad de Ciencias. Veterinarias de la Universidad
Nacional de La Plata
Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE), Facultad de Ciencias. Veterinarias
– Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Bs As, Argentina
La Plata. Argentina
juanmartinlaborde@gmail.com

Martín Carriquiriborde

Lic. en Ciencias Naturales por la Facultad de Ciencias. Naturales de la Universidad
Nacional de La Plata
Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE), Facultad de Ciencias. Veterinarias
– Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Bs As, Argentina
La Plata. Argentina
mcarriq66@gmail.com

Johana Almirón

Médica en Ciencias Veterinarias por la Facultad de Ciencias. Veterinarias de la
Universidad Nacional de La Plata
Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE), Facultad de Ciencias. Veterinarias
– Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Bs As, Argentina
La Plata. Argentina
almironjoha35@gmail.com

Silvana Milocco

Médica en Ciencias Veterinarias por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la
Universidad Nacional de La Plata
Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE), Facultad de Ciencias. Veterinarias
– Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Bs As, Argentina
La Plata. Argentina
silvananora@msn.com

Fabrizio Maschi

Dr. en Ciencias Veterinarias por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad
Nacional de La Plata
Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE), Facultad de Ciencias. Veterinarias
– Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Bs As, Argentina
La Plata. Argentina
fmaschi@gmail.com

Miguel Ayala

Dr. en Ciencias Veterinarias por la Fac. Cs. Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata

Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE), Fac. Ciencias. Veterinarias – Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Bs As, Argentina

La Plata. Argentina
miguel3866@gmail.com

RESUMEN

El pez cebra, *Danio rerio* actualmente se considera como modelo animal en ensayos de desarrollo embrionario, análisis de la función genética y mutagénesis. Las características que posee la especie tales como una alta fecundidad, fertilización externa y mecanismos moleculares del desarrollo del embrión similares a todos los vertebrados, permitieron que el pez cebra se haya convertido gradualmente en el modelo vertebrado inferior más utilizado luego del ratón. Muchos de los microorganismos que afectan a esta especie capaces de alterar los resultados en las investigaciones son patógenos primarios y/u oportunistas que pueden causar infecciones subclínicas pero que en condiciones de estrés, técnicas de manejo deficientes y mala calidad del agua pueden desarrollar enfermedad. Los signos de infección pueden incluir una ligera disminución en la eficiencia reproductiva, una reducción en el apetito o el crecimiento y/o un aumento en la mortalidad en las colonias.

Los peces utilizados en investigación con un status sanitario desconocido pueden ser un riesgo potencial para la salud de las personas que los utilizan y dar resultados experimentales erróneos, dificultades para la repetición de las experiencias y la utilización innecesaria de mayor número de animales para demostrar significación estadística. En nuestro país son varias las instituciones públicas y privadas que utilizan este modelo animal en sus investigaciones pero no se tiene registro de controles sanitarios en las colonias de peces por falta de laboratorios de diagnóstico que los realicen. El objetivo de este trabajo fue conocer el status sanitario de las colonias de producción e investigación del pez cebra en nuestro país mediante la implementación de un control sanitario con técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de cultivo bacteriológico de acuerdo con una lista de los patógenos más prevalentes en esta especie consensuada internacionalmente. Los resultados hallados en un total de 60 peces provenientes de bioterios públicos y privados de nuestro país, mediante la utilización de técnicas de diagnóstico moleculares demostraron que el 50% de las colonias de peces analizadas están contaminadas con *Mycobacterium spp*, 100% con *Aeromonas hydrophila*, 33% con *Ichthyophthirius multifiliis*, 33% con *Pseudoloma neurophylia* y por cultivo bacteriológico se determinó la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y *P. aeruginosa* en el 90% de las muestras. Las especies de *Mycobacterium spp*, son patógenos potencialmente zoonóticos y *Mycobacterium marinum* es la especie con mayor frecuencia en infecciones zoonóticas en humanos. Las conclusiones en referencia a los resultados obtenidos recomiendan la implementación de un programa de control sanitario en las instalaciones del pez cebra, para mitigar los riesgos y asegurar que los resultados obtenidos de las investigaciones estén libres de variables no controladas.

Palabras clave: pez cebra, PCR, control sanitario.

ABSTRACT

The zebrafish, *Danio rerio*, is currently considered as an animal model in embryonic development assays, gene function analysis and mutagenesis. The characteristics possessed by the species such as high fecundity, external fertilization and molecular

mechanisms of embryo development similar to all vertebrates, allowed the zebrafish to gradually become the most widely used lower vertebrate model after the mouse. Many of the microorganisms affecting this species capable of altering research outcomes are primary and/or opportunistic pathogens that can cause subclinical infections but under conditions of stress, poor husbandry techniques and poor water quality can develop disease. Signs of infection may include a slight decrease in reproductive efficiency, a reduction in appetite or growth and/or an increase in colony mortality.

Fish used in research with an unknown sanitary status can be a potential health risk for the people who use them and give erroneous experimental results, difficulties for the repetition of experiments and the unnecessary use of a greater number of animals to demonstrate statistical significance. In our country there are several public and private institutions that use this animal model in their research, but there is no record of sanitary controls in fish colonies due to the lack of diagnostic laboratories that perform them. The objective of this work was to know the sanitary status of zebrafish production and research colonies in our country by implementing a sanitary control with molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and bacteriological culture according to an internationally agreed list of the most prevalent pathogens in this species. The results found in a total of 60 fish from public and private bioterics in our country, through the use of molecular diagnostic techniques showed that 50% of the fish colonies analyzed were contaminated with *Mycobacterium spp*, 100% with *Aeromonas hydrophila*, 33% with *Ichthyophthirius multifiliis*, 33% with *Pseudoloma neurophylia* and by bacteriological culture the presence of *Pseudomonas fluorescens* and *P. aeruginosa* was determined in 90% of the samples. *Mycobacterium spp.* are potentially zoonotic pathogens and *Mycobacterium marinum* is the species with the highest frequency in zoonotic infections in humans. The conclusions in reference to the results obtained recommend the implementation of a sanitary control program in zebrafish facilities to mitigate the risks and ensure that the results obtained from the research are free of uncontrolled variables.

Keywords: zebrafish, PCR, sanitary control.

1 INTRODUCCION

El pez cebra, *Danio rerio* actualmente está considerado como un modelo animal para múltiples ensayos: en desarrollo embrionario, ecotoxicología, transgénesis, análisis de la función genética y mutagénesis. Las características que posee como ser una alta fecundidad, fertilización externa y mecanismos moleculares del desarrollo del embrión similares a todos los vertebrados, permitieron que el pez cebra se haya convertido gradualmente en el modelo vertebrado inferior de elección.

Muchos de los patógenos que afectan al pez cebra y pueden alterar los resultados en las investigaciones son patógenos primarios y/u oportunistas y que pueden causar infecciones subclínicas pero que en condiciones de estrés, técnicas de manejo deficiente y la mala calidad del agua pueden desarrollar enfermedad. Los signos de infección pueden

incluir una ligera disminución en la eficiencia reproductiva, una reducción en el apetito o el crecimiento y/o un aumento en la mortalidad en las colonias.

Dentro de los agentes patógenos en peces utilizados en experiencias, se encuentran las especies de *Mycobacterium spp*, que son patógenos potencialmente zoonóticos y *Mycobacterium marinum* es la especie con mayor frecuencia en infecciones zoonóticas en humanos.

2 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue el relevamiento de agentes patógenos y la implementación de un control sanitario mediante técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de cultivo bacteriológico de acuerdo a una lista de los patógenos más prevalentes en esta especie para conocer el status sanitario de las colonias de producción e investigación de pez cebra en nuestro país.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de peces se obtuvieron de instituciones públicas y privadas de nuestro país muestras (pescados) para realizar un control sanitario en los mismos. Los peces fueron sometidos a eutanasia en cada institución y luego enviados congelados (-10 °C) hasta el laboratorio (LAE) donde fueron analizados para los agentes patógenos seleccionados.

El procedimiento estándar al recibir a los animales consistió en realizar una anamnesis detallada mediante un cuestionario diseñado para tal fin, que debieron llenar los responsables de las instituciones involucradas. La planilla de encuesta se elaboró de acuerdo a los criterios establecidos por el programa de vigilancia de la salud de los animales y en las recomendaciones internacionales de la Consejo Internacional para la Ciencia Animal de Laboratorio (ICLAS) y la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio (FELASA).

El tamaño de la muestra fue determinado por la fórmula estadística: $A = \alpha \log\text{-log} / (1-P)$

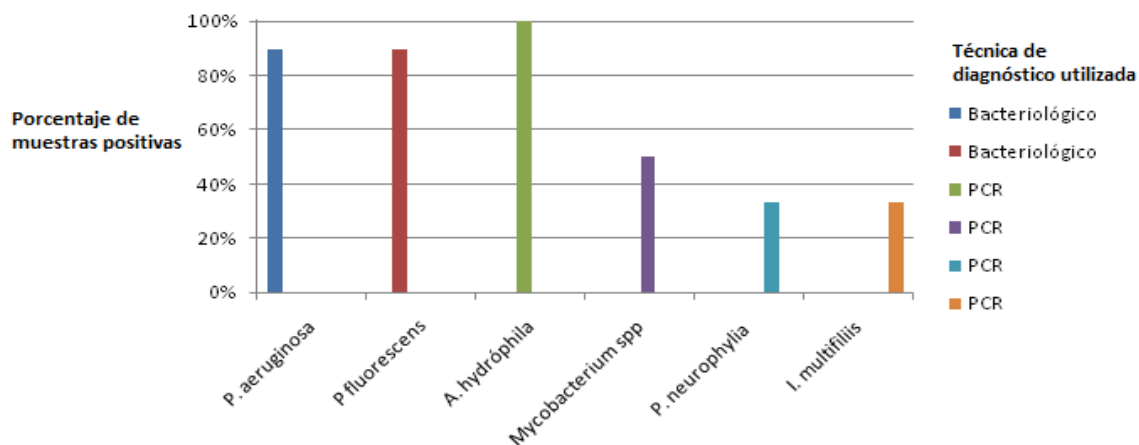
A = tamaño muestra, P = porcentaje de animales infectados en la colonia y α = límite de confianza. Siendo P = 0.25, α = 0.05 y A = 10 animales, la probabilidad de detectar al menos un animal positivo en la muestra evaluada fue del 95%.

El número de instituciones que producen y/o trabajan con peces cebra en nuestro país son escasas (6 bioterios de peces cebra). Se determinó que el número de muestras

representativo de cada institución fue de 10 ejemplares, entonces el número total de animales controlados fue de 60 peces (1 año de edad) para la investigación de agentes patógenos por observación al microscopio óptico, como también el cultivo bacteriológico en placas de agar. Los animales fueron procesados para la toma de muestras y se realizaron cultivos bacteriológicos en agar Cetrimide y por técnicas moleculares (PCR convencional).

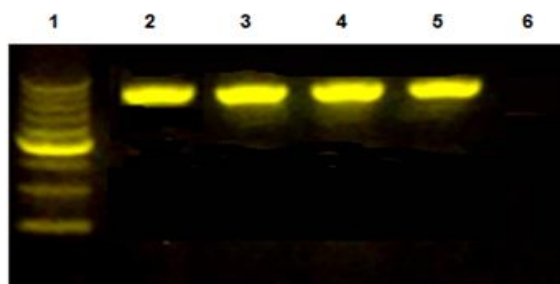
Control sanitario en Pez Cebra (<i>Danio rerio</i>)	
Bacterias	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	PCR
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	PCR
<i>Flavobacterium columnare</i>	PCR
<i>Mycobacterium</i> spp. (<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. avium</i>)	PCR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cultivo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR/Cultivo
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultivo
Parásitos	
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	PCR
<i>Pleistophora hyphessobryconis</i>	PCR
<i>Pseudocapillaria tomentosa</i>	PCR

Tabla de los agentes patógenos controlados y la técnica utilizada.



Porcentaje de muestras positivas de los diferentes agentes patógenos hallados en las muestras controladas y la técnica utilizada.

Control de *Mycobacterium spp.* por PCR en gel de agarosa (1,5%) y transiluminador de luz azul



Columna 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Biodinamics);
Columna 2: Muestra n° 1; **Columna 3:** muestra n°2;
Columna 4: muestra n°3; **Columna n°5:** control positivo *Mycobacterium spp.*; **Columna n°6:** control negativo.

4 RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados hallados en un total de 60 peces provenientes de bioterios públicos y privados de nuestro país, mediante la utilización de técnicas de diagnóstico moleculares demostraron que el 50% de las colonias de peces analizadas están contaminadas con *Mycobacterium spp.*, 100% con *Aeromonas hydrophila*, 33% con *Ichthyophthirius multifiliis*, 33% con *Pseudoloma neurophylia* y por cultivo bacteriológico se determinó la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y *P. aeruginosa* en el 90% de las muestras. Las especies de *Mycobacterium spp.*, son patógenos potencialmente zoonóticos y *Mycobacterium marinum* es la especie con mayor frecuencia en infecciones zoonóticas por peces de laboratorio en humanos. De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que es recomendable la implementación de un programa de control sanitario en las instalaciones del pez cebra, para prevenir los riesgos que conlleva usar animales contaminados y evitar variables experimentales en los resultados de las investigaciones.

REFERENCIAS

- Astrofsky, K.M., C.M. Harper, A.B. Rogers, and J.G. Fox. 2002. Diagnostic techniques for clinical investigation of laboratory zebrafish. *Lab Animal* 31: (3): 41- 45.
- Astrofsky, K.M., M.D. Schrenzel, R.A. Bullis, R.M. Smolowitz, and J.G. Fox. 2000. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium* spp. Infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rerio*) facilities. *Comp. Med.* 50:666-672.
- Collymore C., Crimm J., Lieggi G. Recommendations for Health Monitoring and Reporting for Zebrafish Research Facilities. Volume 13, Supplement 1, 2016.
- Dickerson, H.W. and D.L. Dawe. 1995. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans*. In P.T.K. Woo (ed.) *Fish Diseases and Disorders Vol. 1. Protozoan and Metazoan Infections*. pp. 181-228. CAB Intl. Publ., Wallingford, Oxon, England.
- Kent, M.L., J. K. Bishop-Stewart, J. L. Matthews, and J.M. Spitsbergen. 2002. *Pseudocapillaria tomentosa*, a nematode pathogen of zebrafish (*Danio rerio*) kept research colonies and associated neoplasms. *Comp. Med.* 52; 362-367.
- Kent, M.L., J.L. Matthews, J. K. Bishop-Stewart, C. M. Whipps, V. Watral, M. Poort, L. Bermudez. 2004. Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities. *Comp. Biochem. Physiol -Part C (Toxicol. Pharmacol.)*. 138: 383-390.
- Kent, M.L., S.W. Feist. C. Harper, S. Hoogstraten-Miller, J.M. Law, J.M. Sánchez-Morgado, R.L. Tanguay, G.E. Sanders, J.M. Spitsbergen, and C.M. Whipps. 2009. Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities. *Comp. Biochem. Physiol Part C (Toxicol. Pharmacol.)* 149: 240-248.
- Kent, M.L., and J.L. Bishop-Stewart. 2003. Transmission and tissue distribution of *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) of zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Dis.* 26:1-4.
- Moyer T, et al. Susceptibility of zebra fish *Danio rerio* to infection by *Flavobacterium columnare* and *F. johnsoniae*. *Dis Aquat Organ.* (2007) Jun 7;76(1):39-44. doi: 10.3354/dao076039. PMID: 17718163.
- Varga, Z.M., Murray, K.N. (2016) Health monitoring and disease prevention at the Zebrafish International Resource Center. *Methods in cell biology.* 135:535-51