



LABD/NT5/JUNIO 2022

## **Programa Sanitario Especifico de Vigilancia y Control de Caligidosis.**

### **NORMA TÉCNICA**

#### **Nº5**

### **PROTOCOLO PARA LA VIGILANCIA ACTIVA DE LA SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA DE *Caligus rogercresseyi*, MEDIANTE ANÁLISIS MOLECULARES.**

Departamento De Salud Animal  
Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura  
Chile

## INDICE

<u>INDICE</u> .....	<u>2</u>
<u>I. Objetivo.</u> .....	<u>3</u>
<u>II. Alcance</u> .....	<u>3</u>
<u>III. Pruebas diagnósticas.</u> .....	<u>3</u>
1. Materiales y equipos .....	3
2. Toma de muestras para evaluación de sensibilidad farmacológica .....	4
3. Medición de expresión de genes relacionados con resistencia farmacológica.....	5
4. Cuantificación e interpretación de resultados .....	8
5. Informe de resultados .....	8
<u>IV. Referencias:</u> .....	<u>8</u>

## I. Objetivo.

Establecer el método de diagnóstico que deberá ser utilizado para la evaluación de la sensibilidad farmacológica de *Caligus rogercesseyi* a azametifos, deltametrina y cipermetrina.

## II. Alcance.

Las condiciones técnicas y procedimientos estandarizados que se establecen en el presente documento, serán aplicables durante el proceso de muestreo en los centros de cultivo de salmónidos y en los laboratorios de diagnóstico registrados que realicen la evaluación de la sensibilidad farmacológica de *Caligus rogercesseyi* a tres fármacos específicos: azametifos, deltametrina y cipermetrina, a través de métodos moleculares, exigido por el Programa Sanitario Específico de Control y Vigilancia de Caligidosis, según lo establecido en conformidad con el D.S. N° 319, de 2001, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, actualmente Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.

## III. Pruebas diagnósticas.

### 1. Materiales y equipos

- Solución RNA Later® (Ambion), o similar para preservación de muestras para extracciones de RNA
- Etanol absoluto (calidad PA)
- Pinzas anatómicas
- Cajas isotérmicas para transporte
- Bloques refrigerantes
- Reactivo Trizol® Reagent, o similar para extracción de RNA a partir de muestras animales
- Agarosa (en caso de utilizar cámara electroforética)
- Enzima DNase
- Sondas TaqMan® específicas (señaladas en Tabla 1)
- Kit de síntesis de cDNA
- Kit qPCR compatible con sondas

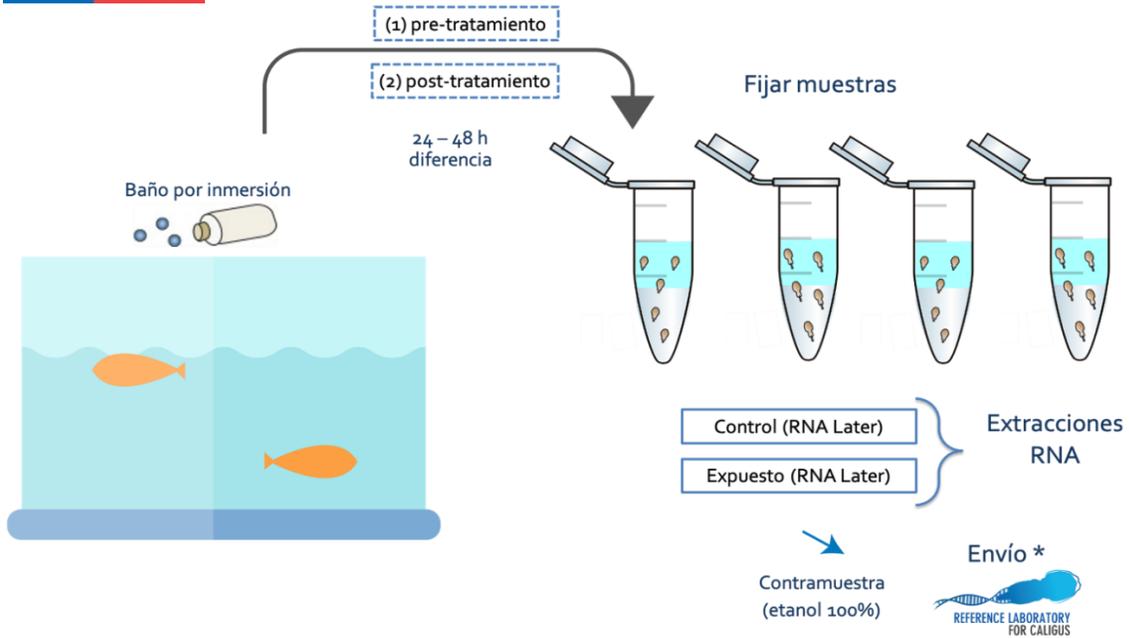
- Espectrofotómetro, o instrumento similar para cuantificar concentración y pureza de RNA
- Equipo de cuantificación de calidad de RNA, o alternativamente cámara electroforética para geles de agarosa
- Equipo de qPCR con al menos 4 canales (se requiere reacción en formato cuadruplex)

## **2. Toma de muestras para evaluación de sensibilidad farmacológica**

Previo a un tratamiento de baño de inmersión en el centro con algún producto que tenga como principio activo azametifos (50%), deltametrina o cipermetrina, se debe realizar un primer muestreo (pre-tratamiento) como máximo 24 horas antes del inicio de la terapia. Donde se debe seleccionar 10 hembras y 10 machos adultos de *Caligus rogercresseyi*, las cuales se deben fijar en solución RNA Later® (Ambion), o solución similar, en la proporción recomendada por el fabricante, que permita preservar ARN de manera íntegra.

Un segundo muestreo se debe realizar después de la aplicación del tratamiento correspondiente (muestreo post tratamiento), donde se debe seleccionar un segundo conjunto de muestras de 10 hembras y 10 machos adultos, fijando las muestras en la mismas soluciones y cantidades señaladas para las muestras pre-tratamiento. El muestreo post-tratamiento puede realizarse inmediatamente después del baño y hasta un plazo no mayor a 48 horas después del muestreo pre-tratamiento.

De las muestras fijadas, 5 machos y 5 hembras de cada tiempo de muestreo (previo al tratamiento y a posterior de éste) deben ser mantenidas en el laboratorio como contramuestras a -20°C, por un periodo no inferior a 15 días luego de emitidos y reportados los resultados y en caso que el servicio lo requiera serán enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para la Caligidosis para estandarización y validación de procedimientos moleculares (ver figura 1).



**Figura 1.** Esquema de muestreo para evaluación de sensibilidad farmacológica.

\*En caso de contar con muestras derivadas de un bioensayo para evaluación de sensibilidad de este fármaco, se pueden utilizar las muestras señaladas con la misma distribución de muestras, donde los grupos expuestos a azametifos deben ser los parásitos expuestos a la concentración terapéutica para este fármaco (100 ppb), o a la concentración más cercana. En tal caso las muestras deben encontrarse fijadas en solución preservante de ARN, y en caso de estar almacenadas debe ser a una temperatura no mayor a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3. Medición de expresión de genes relacionados con resistencia farmacológica

Las muestras deben ser transportadas en frío (hielo o bloques refrigerantes previamente congelados) al laboratorio donde se realizarán los análisis de expresión génica por RT- qPCR.

Los análisis de RT- qPCR se deben realizar utilizando la tecnología de sondas TaqMan® (Life Technologies), utilizando los genes y partidores específicos (tabla 1).

**Tabla 1.** Listado de genes y partidores relacionados a la respuesta de *C. rogercresseyi* a los fármacos antiparasitarios. (Sáez-Vera, et al., 2021).

Nombre	Gen	Función	Secuencia	Modificación*
Cytp450-F	<i>Citocromo p450</i>	Detoxificación	CGGATAGGAGCTTTTCTTGGAC	
Cytp450-R			CGGGCTATGCTACAACCTCC	
Cytp450-P			TCGGGATTCGTGGCCAGGACGT	5'FAM-3'BHQ1
Trypsin_2-F	<i>Tripsina 2</i>	Proteasa	CCGGCAAGGGTTCCATTTTG	
Trypsin_2-R			AGAATGTAAGTCCGCCACG	
Trypsin_2-P			CCCCAGAGTCACCTTGGC	5'TAMRA-3'BHQ2
ABCC-F	<i>Transportador ABCC</i>	Transportador	GGGAATGCGAAGGAGGTTGA	
ABCC-R			AACGCTGTGACGACCTTCAT	
ABCC-P			CCACAAGGAAAGGGGCCGAGG	5'ROX-3'BHQ2
b_tubulin-F	<i>Beta-tubulina</i>	Control qPCR	GGCAACAGCAACTACACAG	
b_tubulin-R			TCACCGTGATAGGTACCCGT	
b_tubulin-P			ACATGCAGGCTGGCCAATGCGG	5'HEX-3'BHQ1

\*En caso de que un proveedor no comercialice específicamente las mismas modificaciones, o estas no sean compatibles con un equipo particular que el laboratorio interesado desee utilizar, es posible reemplazar las combinaciones de fluoróforo y quencher. En tal caso, se exige que las combinaciones seleccionadas permitan la amplificación en formato quádruplex manteniendo el formato de 4 canales distintos en el equipo de qPCR. Las modificaciones realizadas deben ser informadas a SERNAPESCA para su autorización. En ningún caso se puede realizar otro tipo de modificación que altere la secuencia de nucleótidos presentada en la tabla 1.

La extracción de RNA se debe realizar a partir de las muestras fijadas utilizando el reactivo Trizol® Reagent (Ambion, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Alternativamente, se puede utilizar otro procedimiento experimental siempre que se logre obtener una concentración, pureza y calidad de RNA necesaria para un ensayo de qPCR.

Las extracciones se deben realizar a partir de 1 parásito.

El ARN extraído debe ser tratado con una enzima DNase siguiendo el protocolo del fabricante para eliminar contaminación por presencia de ADN en las muestras de ARN. Este paso se puede omitir si es que el kit de extracción de ARN ya conlleva tratamiento con DNase específica.

La concentración y pureza del ARN será determinada mediante un espectrofotómetro Nanodrop-One (NanoDrop® Technologies, Inc. USA), o equipo similar que mida índice de pureza 260/280, y 260/230.

La integridad del ARN será medida mediante electroforesis con un gel de agarosa desnaturalizante al 1.2%, alternatively se pueden utilizar equipos que mediante electroforesis capilar/digital cuantifican la calidad del RNA (índice RIN o similar). No obstante, los métodos cuantitativos para evaluar la calidad del RNA no son obligatorios, ya que se permite la evaluación cualitativa mediante el sembrado de muestras en geles de agarosa y una posterior corrida de electroforesis. Se recomienda que la corrida de electroforesis se realice con un voltaje de 100 volts durante 30 minutos.

Sólo se deben utilizar muestras con índices de pureza 260/280 y 260/230 sobre 1.8, y en las cuales se logren observar las bandas de 28 y 18S de ARN ribosomal en los geles de electroforesis. En el caso de cuantificación de la calidad de RNA, los valores de RIN deben ser superiores a 8.0.

La síntesis de cDNA se llevará a cabo con 40 ng de ARN utilizando kit de síntesis de primera hebra de cDNA que incluya la enzima transcriptasa reversa. El cDNA obtenido se utilizará para el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR. Alternativamente pueden usarse kits que permitan la síntesis de cDNA y la amplificación en un solo paso "One Step kit".

La medición de la expresión génica se realizará mediante una cuantificación relativa, utilizando el método de cuantificación  $\Delta \Delta CT$  comparativo. Para efectos de normalización se debe utilizar el control endógeno b-tubulina, el cual ha sido validado como tal en el estudio previo de genes de sensibilidad farmacológica en *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2015).

Al menos se deben cuantificar 3 réplicas técnicas (3 reacciones de PCR por muestra), de todas las muestras obtenidas (10 control y 10 parásitos expuestos a fármaco).

Cada reacción se debe realizar en un volumen de 20 $\mu$ L (o el recomendado por el fabricante) utilizando un kit compatible con las sondas (ejemplo KAPA Probe Fast qPCR Master Mix), siguiendo instrucciones del fabricante. Las reacciones deben contener 1 $\mu$ L (40ng) de cDNA, 0.2 $\mu$ L cada partidor (100nM), 0.25 $\mu$ L de sonda (125nM). Las corridas se deben realizar en un equipo de qPCR de al menos cuatro canales, programando correctamente cada modificación para poder realizar la reacción en una configuración de quadruplex (todos los genes en una misma reacción).

Las condiciones de amplificación son:

- (1) denaturación inicial de 3 min a 95 °C;
- (2) 40 ciclos de denaturación a 95°C por 10 seg, *annealing + extensión* a 60°C por 30 seg. Todas las reacciones deben considerar al menos tres réplicas técnicas.

#### 4. Cuantificación e interpretación de resultados

Esta actividad se debe realizar en planilla entregada por el Laboratorio de Referencia, en el cual se proporcionan los datos para luego hacer el cálculo de un índice de sensibilidad de manera automática.

Los valores de CT obtenidos se deben coleccionar para realizar la cuantificación por cada gen aplicando la fórmula  $\Delta \Delta CT$  comparativo. Esto significa restar al valor de CT del gen target el valor de CT del control endógeno. A cada valor obtenido se le debe restar el valor obtenido para una muestra de referencia, que en teoría puede ser cualquier muestra, pero recomendamos utilizar aquella que mostró el valor diferencial más alto en la primera operación. El valor obtenido se debe multiplicar por -1 y aplicar como exponente de 2 para obtener los valores de expresión por réplica.

Finalmente se debe expresar los valores como *fold change* de muestras expuestas sobre muestras control para evaluar la sensibilidad del grupo, esto es mediante de la división de los resultados obtenidos en la operación anterior. Esta operación se debe realizar en planilla tipo adjunta donde se indica cómo se ordenan las muestras, y la ponderación de cada gen para determinar si el parásito evaluado es susceptible o resistente. Los factores de ponderación para cada fármaco están contenidos en el archivo Excel adjunto.

#### 5. Informe de resultados

El informe de análisis de resultados de eficacia deberá ser enviado al correo [caligus@sernapesca.cl](mailto:caligus@sernapesca.cl), en un plazo no superior a 72 horas desde obtenidos los resultados. Para el informe se debe considerar la información detallada en el anexo N° 1.

### IV. Referencias:

Sáez-Vera, C., Núñez-Acuña, G., & Gallardo-Escárate, C. (2021). Sensitivity assessment to azamethiphos by time-to-response bioassay and biomarkers in the sea louse *Caligus rogercresseyi*. Aquaculture, 737340.

Valenzuela- Muñoz V, Gallardo Escárate C. 2015, Transcriptome mining: Multigene panel to test delousing drug response in the sea louse *Caligus rogercresseyi*, Marine Genomics 25 (2016; 103- 113)

## Anexo 1.

### Informe de resultados de laboratorios de diagnóstico

El informe de resultados de análisis de diagnóstico deberá contener, al menos a la siguiente información:

- Número de informe de análisis
- Cantidad de páginas
- Fecha de emisión
- Nombre del laboratorio de diagnóstico y sede, cuando corresponda.
- Nombre y RUT de responsable de muestreo.
- Solicitante de los análisis.
- Programa Sernapesca (PSEVC- Caligus) Nombre, ACS y código del centro de cultivo de origen.
- Número de jaula (identificación) de las muestras analizadas, cuando corresponda.
- Especie.
- Peso promedio
- Número de muestras, número de tubos e identificación
- Fecha y hora del muestreo (pre y post tratamiento).
- Fecha y hora de recepción de las muestras.
- Principio activo empleado en el tratamiento por inmersión
- Fecha y hora de la obtención de los resultados de análisis.
- Análisis realizados
- Tabla con CT de las muestras (ABCC, CytP450, Tryp-2 y b-tub)
- Resultados de los análisis (índice de sensibilidad).
- Metodología empleada.
- Información colectada en ambos muestreos (pre y post tratamiento) por el muestreador calificado: Temperatura del agua, Concentración de oxígeno y salinidad.
- Firmas autorizadas.
- Observaciones