

Diferencias epidemiológicas y fenotípicas de los aislados tipo EM-90 de *Piscirickettsia salmonis*

José Saavedra¹, Naybel Hernández¹, Andrea Osses², Alexis Cancino², Alejandro Castillo², Esteban Navas¹, Horst Grothusen¹, Harry Bohle¹, Fernando Bustamante¹, Patricio Bustos¹ y Marcos Mancilla^{1*}

¹Laboratorio de Investigación y Desarrollo, ADL Diagnostic Chile SpA, Puerto Montt. ²Laboratorio Sede Aysén, ADL Diagnostic Chile SpA, Puerto Aysén.

*mmancilla@adldiagnostic.cl

Piscirickettsia salmonis es considerada la única especie del género *Piscirickettsia*. Se trata de un patógeno Gram negativo, intracelular facultativo que produce Piscirickettsiosis o SRS (septicemia rickettsial del salmón). Si bien se reconoce ahora que la bacteria está relacionada a la clase γ -proteobacteria, inicialmente se clasificó dentro del orden Rickettsiales de las α -proteobacterias (Cvitanich y col., 1991). Estudios filogenéticos preliminares, llevados a cabo en unos pocos aislados, demostraron además que se podían distinguir dos genogrupos: los aislados tipo LF-89 y el aislado atípico EM-90 (Casanova y col., 2001). Este hallazgo, es decir, que los casos de SRS se deben a dos genogrupos de *P. salmonis*, vino a ser confirmado por estudios genómicos posteriores (Bohle y col., 2014) y por una publicación reciente basada en 19 aislados de campo chilenos (Otterlei y col., 2016). Sin embargo, datos epidemiológicos que demuestran la relevancia de los aislados tipo EM-90 en el contexto de piscirickettsiosis, así como también evidencia fenotípica sólida de la homogeneidad de este último grupo no se habían publicado. Por lo tanto,

esta investigación tuvo como objetivo esclarecer el papel que juegan los mencionados aislados en la situación actual de SRS.

La colección de aislados de *P. salmonis* que mantiene ADL, contenía a fines de 2015 un número significativo de aislados (N=507). Este número deriva de la recolección ininterrumpida de especímenes en el periodo 2010-2015, representando 163 centros de engorda, ubicados en 45 barrios de la X y XI regiones. Según la información que manejamos, esta colección es la más extensa y mejor caracterizada de su tipo. Utilizando una estrategia de tipificación basada en PCR similar a una descrita previamente (Mauel y col., 1996; Casanova y col., 2001), pero con modificaciones, logramos clasificar los aislados en dos genogrupos: clásicos, tipo LF-89 (**figura 1A**) y los de tipo EM-90 (**figura 1B**). Para sorpresa nuestra, ambos tipos de aislados se encontraban representados en una proporción muy similar, distribuidos geográficamente de forma amplia, lo que indica una prevalencia análoga (**figura 2A**). Al clasificar por hospedero, observamos

que los aislados tipo EM-90 afectan exclusivamente a salmón del Atlántico, en cambio los de tipo LF-89 producen SRS en las tres especies de salmónidos cultivados en Chile (**figura 2B**). Destacamos que la signología de SRS producida por ambos tipos de bacterias es indistinguible, aunque a nivel genómico presenten diferencias que se aproximan al punto de corte que establece especies distintas (resultados no publicados).

La colección de aislados también se caracterizó en base a susceptibilidad a los antibióticos. Un rasgo exclusivo de los aislados tipo EM-90 fue que resultaron todos susceptibles a los antibióticos ensayados. No así los de tipo LF-89, los que en su mayoría resultaron con un grado reducido de susceptibilidad tanto a quinolonas, florfenicol u oxitetraciclina (**Tabla 1**). Esto último resulta al menos curioso, ya que ambos tipos de cepas han estado probablemente sometidas a la misma presión selectiva por años. Para indagar más acerca de esta característica, tomamos un grupo de aislados de campo de tipo EM-90, junto a otros de tipo LF-89 y probamos la susceptibilidad a la acción del suero de salmones naïve, es decir, sin contacto previo con el patógeno. La actividad bactericida del complemento del suero da cuenta de diferencias a nivel de receptores de membrana externa, probablemente lipopolisacárido y proteínas externas (outer membrane proteins, OMPs). En efecto, observamos una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan las bacterias recuperadas luego de tres horas de exposición, siendo los aislados tipo LF-89 más resistentes (**Figura 3**). Esto también puede relacionarse a presencia de proteínas transportadoras asociadas a resistencia contra antibióticos (Sandoval y col., 2016)

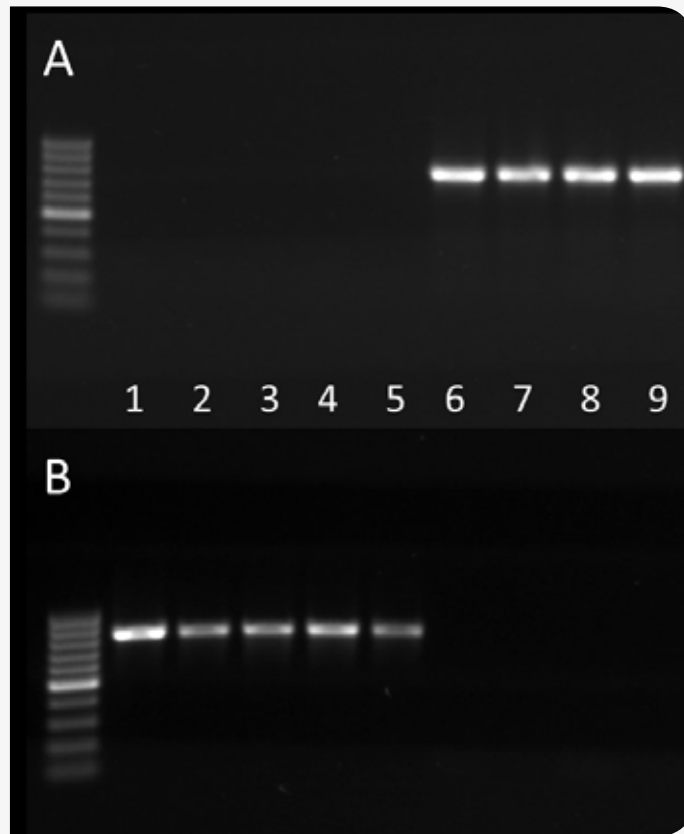


Figura 1. Tipificación de aislados de *P. salmonis* por PCR. A) resultados de PCR con partidores para detectar aislados tipo LF-89. B) partidores para aislados tipo EM-90. Dígitos indican los distintos aislados: 1-5, aislados tipo EM-90; 6-9, aislados tipo LF-89. A la izquierda de ambos paneles se observa el estándar de tamaño molecular. Condiciones del ensayo y partidores se describen en Saavedra y col., 2017.

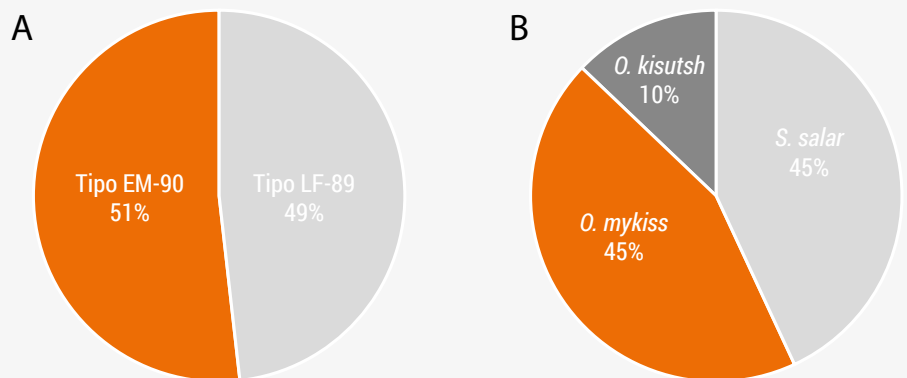


Figura 2. Distribución de aislados (N=507, periodo 2010-2015) de la colección de ADL según A) cepa, B) hospedero. En este último caso se consideran sólo los aislados tipo LF-89 (N=247), ya que los aislados tipo EM-90 se recuperaron exclusivamente de *S. salar*.

Tabla 1. Susceptibilidad a los antibióticos de cepas de *P. salmonis*. Nomenclatura utilizada: SUS, susceptible a las tres clases de antibióticos ensayados; QUI^R, susceptibilidad reducida a quinolonas (ácido oxolínico y flumequina); FFC^I, susceptibilidad reducida a florfenicol; OTC^R, susceptibilidad reducida a oxitetraciclina.

Fenotipo	SUS	QUI ^R	QUI ^R /FFC ^I	OTC ^R
Cepa				
Tipo LF-89*	27 (10,9)	176 (71,3)	24 (9,7)	20 (8,1)
Tipo EM-90	260	-	-	-

*Número entre paréntesis representa porcentaje.

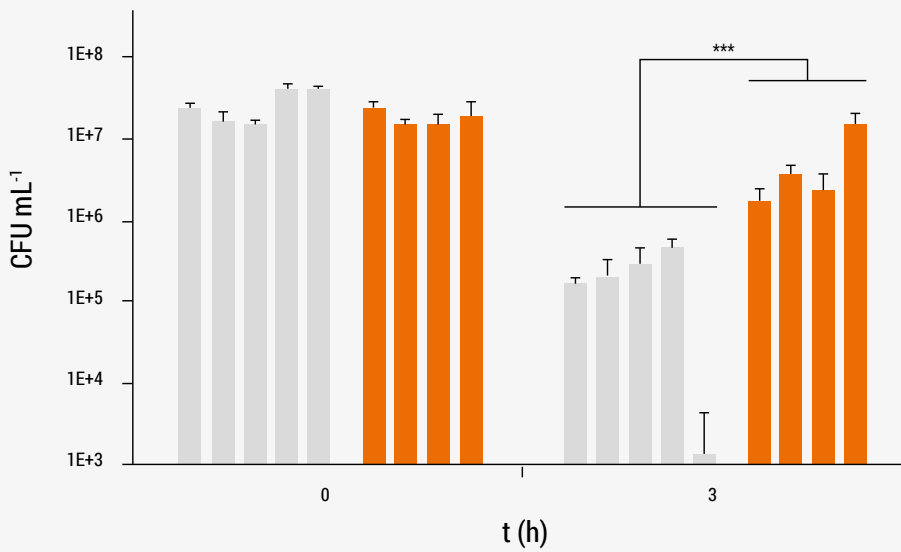


Figura 3. Susceptibilidad al suero naïve de *S. salar*. Se les extrajo suero a peces sin historial de SRS (cortesía de empresa Camanchaca S.A.). Distintos aislados tipo EM-90 (barras blancas) y tipo LF-89 (barras grises) se incubaron por 3 h, a 18°C. Luego, se recuperaron las bacterias y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (CFU) por volumen remanentes. La diferencia estadística se registró como *** ($P < 0,001$).

Respecto de características de cultivo de las cepas, se compararon las cinéticas de crecimiento en medios simples y complejos, variando además la temperatura en el mismo panel de aislados. Como era de esperarse, ambos tipos de bacteria crecieron a una temperatura permisiva de 18°C, en un medio que contenía suero bovino fetal. Sin embargo, los únicos que se desarrollaron a 22°C fueron los aislados tipo EM-90, bajo la misma condición nutricional (figura 4A). Por otra parte, cuando se utilizó un medio base sin suero llamado BM4 (Henríquez y col., 2013), los aislados tipo EM-90 resultaron ser menos exigentes que sus contrapartes tipo LF-89, creciendo bajo esta condición de forma óptima (figura 4B). Nuestros resultados contradicen lo reportado por Henríquez y col., ya que en dicho trabajo se describió

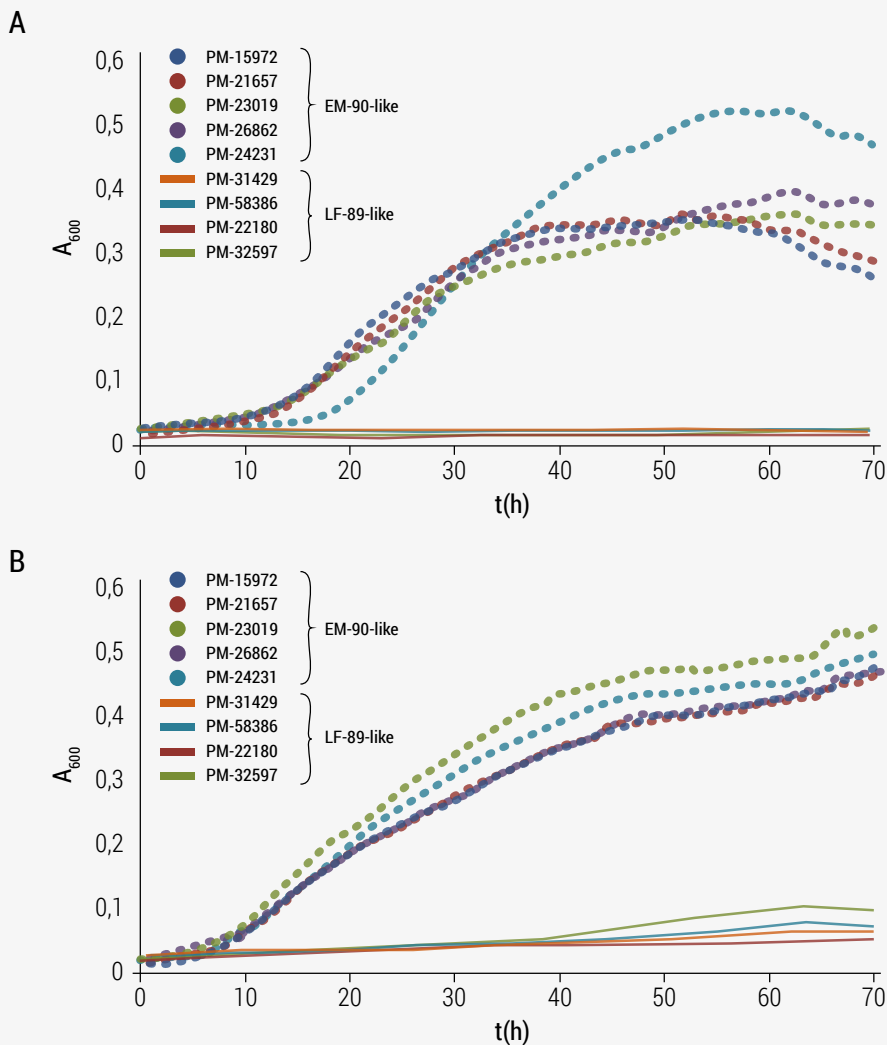


Figura 4. Curvas de crecimiento de aislados de *P. salmonis*: A) en medio complejo PSB a 22°C, B) en medio base BM4 a 18°C.

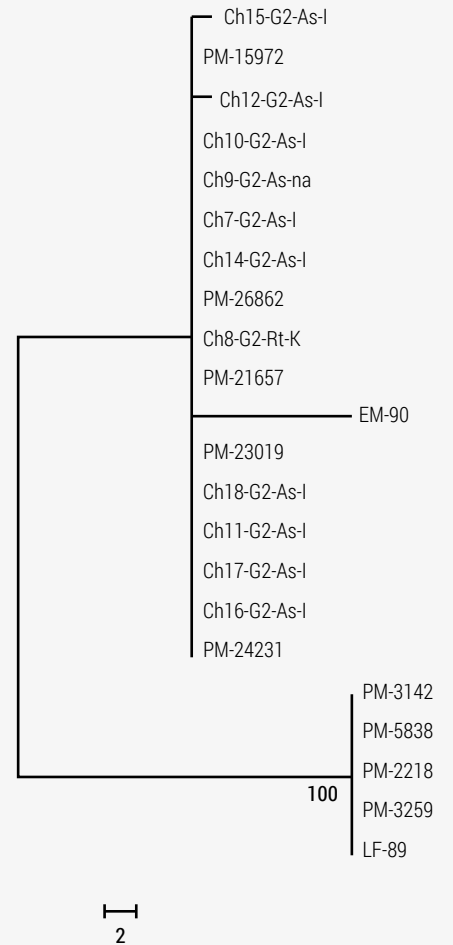


Figura 5. Árbol filogenético basado en máxima parsimonia de las secuencias 16S-ITS. Secuencias del grupo G2 del estudio de Otterlei y col. corresponden a las indicadas como ChN-G2-XX-Y, mientras que las utilizadas por Saavedra y col aparecen como PM-XXXX. El análisis incluyó secuencias de los aislados de referencia LF-89 y EM-90 presentes en GenBank.

que la cepa LF-89 fue capaz de crecer en medio de cultivo sin suero y a una temperatura incluso de 23°C.

Una similitud de nuestro estudio con el reporte de Cermaq, Noruega (Otterlei y col., 2016), fue precisamente las características de cultivo de los aislados tipo EM-90 mencionadas arriba. Los autores nombraron como G2 (G2 clade) a un grupo de aislados, nutricionalmente menos exigentes y capaces de crecer en un rango de temperatura entre 19-23°C. Al comparar las secuencias nucleotídicas del marcador 16S rRNA-ITS de aquellos aislados con los utilizados en este estudio, se observa que el denominado grupo G2 coincide con lo que describimos aquí como cepa tipo EM-90 (figura 5). Más aún, existe una solicitud de patente sobre esta cepa bacteriana, reivindicando su carácter “novel” (Duesund y Mendozas, 2015). Sin embargo, cabe señalar que se trata del mismo grupo homogéneo, cuyo miembro más conocido es la cepa atípica EM-90, secuencia que los autores no incluyeron en su análisis.

Resulta interesante comentar la incidencia de casos de SRS producidos por aislados de distintas cepas (figura 6). Observamos que la relación de casos producidos por aislados tipo EM-90/tipo LF-89 se mantuvo entre 2010-2014 con un predominio de la cepa tipo LF-89. No obstante, esta proporción cambió drásticamente en 2015, llegándose a duplicar los casos de SRS por aislados tipo EM-90. Producto de la anomalía climática que se ha venido registrando y que todos conocemos, cuya desviación alcanzó un máximo en 2015, pensamos que el aumento de la temperatura de los océanos afectó la incidencia de los casos de SRS. Lo anterior se correlaciona con la capacidad de crecimiento a temperaturas más cálidas que poseen los aislados tipo EM-90. Resulta paradójico que, de mantenerse esta tendencia y dada la susceptibilidad a los antibióticos que manifiestan estos aislados, es posible predecir una tasa de eficacia superior de los tratamientos antibióticos.

Resumiendo, podemos concluir que hemos demostrado que los aislados tipo EM-90 representan un grupo homogéneo y epidemiológicamente relevante en

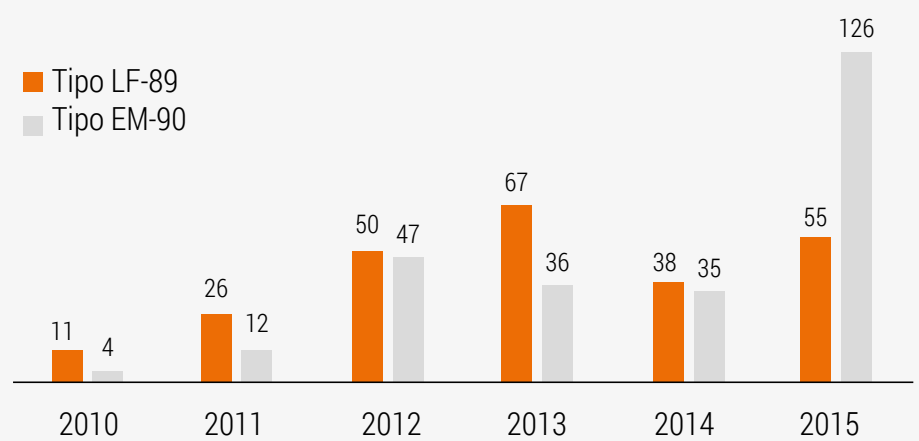


Figura 6. Incidencia de casos de SRS producidos por las cepas de *P. salmonis*.

el escenario actual de SRS. Lo anterior significa un cambio de paradigma de la enfermedad, el que sostenía hasta ahora que los brotes de SRS eran producidos por un único tipo de bacteria. De acuerdo a las características de cultivo, susceptibilidad a los antibióticos y suero de peces, y a la preferencia de hospedero manifestada por el salmón del Atlántico, proponemos que este grupo de aislados debe ser considerado no sólo como una cepa o colección de aislados, sino además, como una taxa superior o subespecie. Esperamos que nuestra investigación en curso valide la hipótesis taxonómica aquí presentada.

Agradecimientos

Este trabajo corresponde a parte de lo publicado por nuestro laboratorio en el estudio de Saavedra y col. Los autores agradecen el aporte de fondos del proyecto 14IDL2-30005, de la Corporación de Fomento de la Producción, CORFO.

Referencias

- 1) Bohle, H., Henríquez, P., Grothusen, H., Navas, E., Sandoval, A., Bustamante, F., Bustos, P. & Mancilla, M. (2014) Comparative genome analysis of two isolates of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* from different hosts reveals major differences in virulence-associated secretion systems. *Genome Announc*, 2, e01219-01214.
- 2) Casanova, A., Obreque, J., Sandino, A.M. & Jashes, M. (2001) tRNA genes were found in *Piscirickettsia salmonis* 16S-23S rDNA spacer region (ITS). *FEMS Microbiol Lett*, 197, 19-22.
- 3) Cvitanich, J.D., Garate, O.N. & Smith, C.E.

- (1991) The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J Fish Dis*, 14, 121-145.
- 4) Duesund, H., Mendozas, J. (2015). Novel *Piscirickettsia salmonis* isolate. Patent application WO2014198913A3 en <https://www.google.com/patents/WO2014198913A3>.
- 5) Henríquez, M., Gonzalez, E., Marshall, S.H., Henríquez, V., Gomez, F.A., Martinez, I. & Altamirano, C. (2013) A novel liquid medium for the efficient growth of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* and optimization of culture conditions. *PLoS One*, 8, e71830.
- 6) Mauel, M.J., Giovannoni, S.J. & Fryer, J.L. (1996) Development of polymerase chain reaction assay for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Dis Aquat Organ*, 26, 189-195.
- 7) Otterlei, A., Brevik, O.J., Jensen, D., Duesund, H., Sommerset, I., Frost, P., Mendoza, J., McKenzie, P., Nylund, A. & Apablaza, P. (2016) Phenotypic and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* from Chilean and Canadian salmonids. *BMC Vet Res*, 12, 55.
- 8) Sandoval, R., Oliver, C., Valdivia, S., Valenzuela, K., Haro, R.E., Sanchez, P., Olavarría, V., Valenzuela, P., Avendano-Herrera, R., Romero, A., Carcamo, J.G., Figueroa, J.E. & Yanez, A. (2016) Resistance-nodulation-division efflux pump *acrAB* is modulated by florfenicol and contributes to drug resistance in the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *FEMS Microbiol Lett*. Publicado online 15 de abril 2016.
- 9) Saavedra, J., Hernández, N., Osses, A., Castillo, A., Cancino, A., Grothusen, H., Navas, E., Henríquez, P., Bohle, H., Bustamante, F., Bustos, P. & Mancilla, M. (2017) Prevalence, geographic distribution and phenotypic differences of *Piscirickettsia salmonis* EM-90-like isolates. *J Fish Dis*. Publicado online el 11 de Enero.