

Indicadores para una salmonicultura más sustentable

Página 10



Fotomontaje: Evelyn Charles, Salmonexpert.

La nueva apuesta de
Benchmark Genetics Chile

Página 20



Entrevista a Marcos
Kulka, gerente general de
Fundación Chile

Página 26



Salmonicultura y
naciones originarias
en Canadá

Página 32



I+D: Mecanismos y
resistencia clínica de *P.
Salmonis* a los antibióticos

Página 62



Mecanismos y resistencia clínica de *Piscirickettsia salmonis* a los antibióticos

M. Mancilla*, J. Saavedra, M. Grandón, H. Bohle y P. Bustos
ADL Diagnostic Chile SpA, Puerto Montt, Chile.
*mmancilla@adldiagnostic.cl

Introducción

Actualmente existe mucha preocupación respecto del problema de la resistencia a los antibióticos en medicina humana. Es cada vez más frecuente escuchar que infecciones comunes se están volviendo difíciles de tratar, lo que las torna potencialmente mortales (WHO, 2015). Lo anterior responde al flujo de genes o marcadores de resistencia a los antimicrobianos (ARG, *Antimicrobial Resistance Gene*) desde bacterias ambientales a patógenos humanos, efecto potenciado por la presión selectiva que ejercen los antimicrobianos en diferentes ecosistemas (Cabello y col, 2016).

Aunque se ha especulado mucho acerca de esta ruta de diseminación, cabe señalar que aún no se ha demostrado científicamente. A nivel global, el aumento en la prevalencia de bacterias ambientales que transportan ARG se debe, en parte, a los volúmenes de antibióticos que se utilizan en actividades de producción animal, pero también a malas prácticas industriales (ej: tratamiento y disposición de residuos), como así mismo al abuso y automedicación por parte de los seres humanos (Cabello y col., 2016). Es por ello que para mitigar el impacto de los ARG se deben adoptar y aplicar medidas efectivas

que consideren los distintos aspectos y actores involucrados en esta cadena.

La salmonicultura, como actividad de producción animal, consume antibióticos a gran escala. En Chile, los brotes de piscirickettsiosis (SRS) en salmones en fase de engorda se tratan con antibióticos, y en múltiples ocasiones estas terapias son entregadas en conjunto con alimentos funcionales, como medida paliativa. No obstante, debido a la alta incidencia de la enfermedad y al hecho de que el agente causal, *Piscirickettsia salmonis*, se multiplica intracelularmente escapando de las defensas del hospedero, resulta a veces complejo controlar exitosamente la enfermedad; en algunos casos se requieren medidas extremas como las terapias parenterales (inyectables) que suelen ser más eficaces.

Desafortunadamente, o por fortuna según como se analice, existe una escasez notable de antibióticos factibles de usar en acuicultura, comparado con otras producciones animales, y estos, por lejos, se destinan mayoritariamente a tratar esta patología. Por lo tanto, el combatir, o más bien prevenir SRS, reducirá significativamente el consumo de estas drogas con toda la rebaja de costos e impacto ambiental que trae, además de los beneficios comerciales que conlleva.

El siguiente artículo tiene como objetivo revisar el estado del arte sobre la presencia de ARG en *P. salmonis* y comentar algunas brechas de conocimiento detectadas en esta materia.

Puntos o valores de corte (breakpoints)

Para la interpretación de un parámetro biológico se requiere un valor de referencia. Previo a ello, se establece una metodología estándar que, en el caso de la susceptibilidad a los antibióticos es, generalmente, la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Existen diversos criterios para definir valores de referencia o puntos de corte, aquellos de tipo epidemiológicos (Ecoff por sus siglas en inglés), los clínicos y los de tipo farmacológico. Sin embargo, quizás el más utilizado por su factibilidad de implementación a nivel de laboratorio es el Ecoff. Este valor permite discriminar las cepas silvestres o susceptibles (*wild-type*) de las no silvestres (*non-wild-type*).

Clasificar las bacterias en estas categorías sirve para identificar aquellas que contienen o han adquirido un mecanismo de resistencia, como es el caso de las bacterias no silvestres. Sin embargo, el hecho de que una bacteria sea no silvestre no necesariamente tiene una significancia clínica. Esta situación se ilustra mejor en el ejemplo de la **Figura 1**. En efecto, pueden producirse brotes causados por bacterias no silvestres para un fármaco determinado, pero si los tratamientos con dicho fármaco en condiciones productivas son efectivos, entonces la bacteria es clínicamente susceptible.

Lo anterior puede aplicarse a cepas de *P. salmonis* que han sido clasificadas como no silvestres para florfenicol ya que, hasta ahora y en lo formal, no se han reportado casos de pérdida de eficacia clínica para el tratamiento con este fármaco. De haberse observado una falla terapéutica en alguna oportunidad en campo, esto pareciera ser muy esporádico y pudiera ser atribuido a otras causales; en otras palabras, si excepcionalmente ocurrió una falta de respuesta al tratamiento con florfenicol, no hay evidencias científicas

que indiquen el surgimiento de cepas clínicamente resistentes a esta droga. Situación muy distinta a lo que ocurre para algunos aislados de *P. salmonis* con CIM elevadas para oxitetraciclina (128-256 µg/ml), bacterias aisladas desde brotes documentados con fallas terapéuticas a este fármaco (Saavedra y col., 2018).

La interpretación del valor de corte epidemiológico a menudo se presta para confusión, pero para efectos prácticos es necesario determinar los puntos de corte clínicos al conjunto de antibióticos disponibles para tratar infecciones bacterianas; una tarea compleja que involucra estudios de eficacia en el animal *target*. No obstante, el monitoreo y detección temprana del surgimiento de cepas resistentes recae, necesariamente, sobre la base de puntos de corte epidemiológicos bien definidos.

En este sentido, tanto nuestro grupo de investigación en ADL como el del

Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), hemos propuesto puntos de corte epidemiológicos a los antibióticos de uso corriente contra piscirickettsiosis (Henríquez y col., 2016; Contreras-Lynch y col., 2017), valores que se mueven en un rango similar en ambos estudios y que aparecen en la **Tabla 1**. Por supuesto, las diferencias se pueden adscribir a las metodologías empleadas, pero desde la perspectiva de la interpretación del resultado ambas son válidas utilizando sus respectivos protocolos.

Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

Nuestro laboratorio ha investigado desde hace varios años la presencia de marcadores de resistencia a antibióticos en *P. salmonis*. En un trabajo pionero, publicamos la comparación de secuencias de una zona denominada “Determinante de Resistencia a Quinolonas” o QRDR

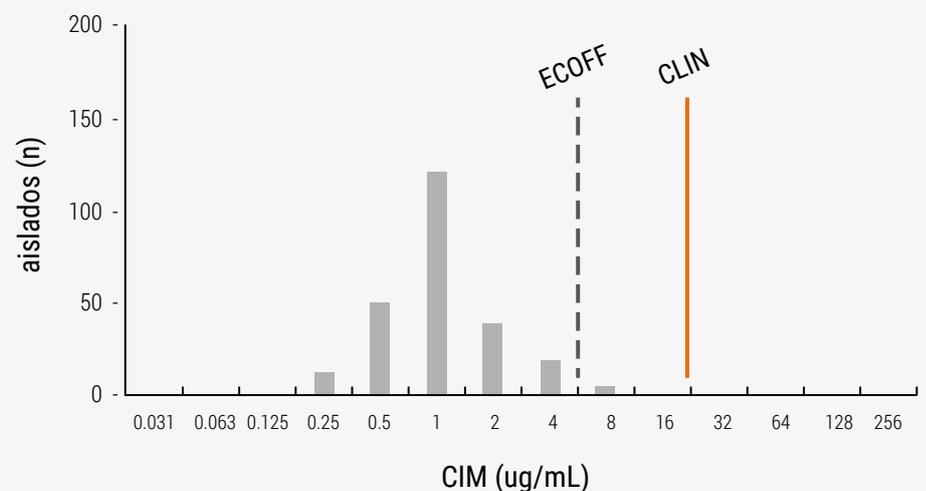


Figura 1. Diferencia entre valor de corte epidemiológico y clínico para un antibiótico ficticio. El valor de corte epidemiológico (Ecoff) se indica en línea discontinua, mientras que el valor de corte clínico (CLIN) aparece en rojo. Los brotes producidos por aislados considerados no silvestres (> 4.0 µg/ml), probablemente serán tratados exitosamente ya que son clínicamente susceptibles.

Tabla 1. Estudios que contienen valores de corte epidemiológicos de *P. salmonis* para distintos antibióticos.

Nº de aislados	Recolección (años)	Especie	Resultados	Referencia
292	2010-2014	<i>S. salar</i> <i>O. mykiss</i> <i>O. kisutch</i>	Se postulan ECOFF basados en CIM para quinolonas (ácido oxolínico y flumequina) > 0,25 µg/ml, florfenicol > 2,0 µg/ml y oxitetraciclina > 4,0 µg/ml	Henríquez y col., 2016
58	Desconocido	Desconocido	Se postulan valores ECOFF basados en CIM para florfenicol > 0,25 µg/ml y oxitetraciclina > 0,5 µg/ml	Contreras-Lynch y col., 2017

(*quinolone resistance-determining region*) del gen *gyrA* en un grupo de cepas susceptibles y otras no susceptibles. Este estudio nos permitió asociar una mutación de un único nucleótido al fenotipo no silvestre (Henríquez y col., 2015). A la fecha, a pesar de que una serie de marcadores genéticos determinan un fenotipo similar en otras especies bacterianas, incluso ambientales cercanas a sitios de acuicultura (Miranda y col., 2013; Miranda y Rojas, 2007), sólo hemos observado la mutación en *gyrA* en cepas de *P. salmonis* con CIM relativamente elevadas a quinolonas (2-8 µg/ml, rango que contrasta con el de las susceptibles 0,032-0,125 µg/ml).

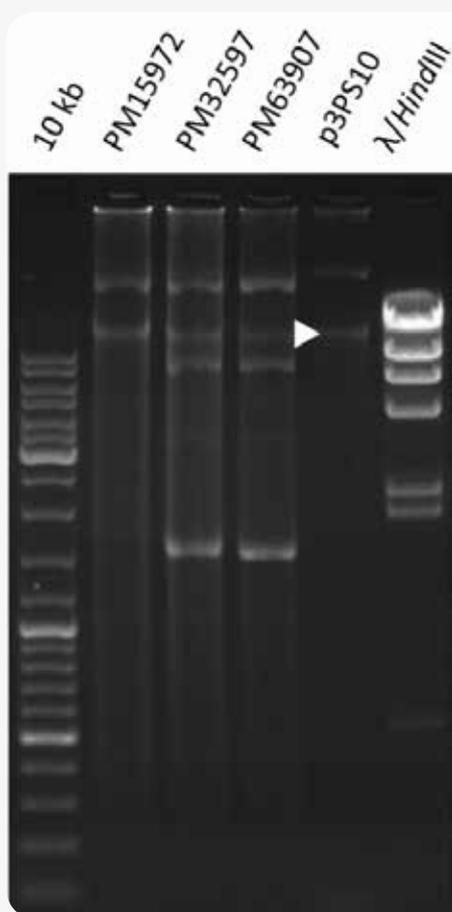


Figura 2. Purificación de DNA plasmidial desde distintos aislados de *P. salmonis*. Los tamaños moleculares son aparentes debido a la presencia de distintas formas de estos elementos. La punta de flecha indica la presencia del plásmido p3PS10 purificado desde una cepa *E. coli*, transconjugante de un experimento previo con cepa *P. salmonis* AY3800B. Esta última le transfirió el plásmido p3PS10 a la cepa *E. coli*.

El análisis de genomas de aislados no silvestres de *P. salmonis* descartó la presencia del marcador *qnr*, el cual se ha postulado como un gen diseminado en bacterias ambientales resistentes a quinolonas y en el ambiente marino (Tomova y col., 2015). Más tarde, nuestro grupo de trabajo propuso puntos de corte epidemiológicos para florfenicol y oxitetraciclina basados en un análisis de CIM de casi 300 aislados de *P. salmonis* (Henríquez y col., 2016). Este trabajo permitió identificar aislados no silvestres para ambas drogas.

Indagando sobre la causa del fenotipo no silvestre a florfenicol que presentaron algunos aislados, mediante un *screening* de PCR, no pudimos identificar marcadores de resistencia a este fármaco como *floR* (resultados no publicados). Nuestra hipótesis es que ciertos polimorfismos en genes que codifican proteínas de membrana estarían asociados a la reducida susceptibilidad que afecta a los aislados no silvestres estudiados. Esta idea coincide con trabajos publicados recientemente por otros autores (Cartes y col., 2016; Sandoval y col., 2016).

En el caso de los aislados no silvestres para oxitetraciclina, el secuenciamiento de la cepa AY3800B, la cual tiene una susceptibilidad reducida a esta droga *in vitro*, nos permitió identificar un plásmido de resistencia a múltiples antibióticos (Bohle y col., 2017).

Profundizando sobre la base genética del fenotipo, demostramos que el plásmido denominado p3PS10 es el responsable no solo de la resistencia a oxitetraciclina, sino también a otras clases de antibióticos como los aminoglicósidos y cloranfenicol (Saavedra y col., 2018). La importancia de este hallazgo radica en que aquellos aislados relacionados a AY3800B se recuperaron de brotes donde el tratamiento con oxitetraciclina falló. Por lo tanto, este es el primer reporte de aislados de *P. salmonis* clínicamente resistentes a un antibiótico. Más importante aún son los riesgos asociados a la diseminación de esta cepa, la cual se mantiene circunscrita a un área geográfica relativamente discreta.

¿Es importante el linaje genético (genogrupo) de *P. salmonis*?

Haciendo un análisis segmentado de los datos de CIM de 507 aislados de *P. salmonis* publicados por nuestro laboratorio (Saavedra y col., 2017), esto es, separando las CIM a florfenicol de acuerdo a si el aislado es tipo EM-90 (denominado arbitrariamente como genogrupo A) o tipo LF-89 (genogrupo B), inferimos que las primeras caen todas en la categoría de bacterias susceptibles, no así las de tipo LF-89 (Mancilla, 2018). Este “efecto de cepa” se extiende tanto a quinolonas como a oxitetraciclina. De hecho, generalizando, podemos decir que las cepas tipo EM-90, a la fecha, se mantienen en la categoría de silvestres o susceptibles; situación contraria a lo observado para los aislados tipo LF-89, los cuales han mostrado una evolución hacia la resistencia antibiótica.

Lo anterior, no asegura que los aislados tipo EM-90 se mantengan susceptibles en el tiempo, ya que la transferencia horizontal de genes, como ocurre usualmente con los plásmidos de resistencia, puede incluso llegar a generar cepas multirresistentes en un único evento. En este aspecto, enfatizamos la importancia que tiene hacer una vigilancia que incluya el aislamiento y caracterización por CIM de cepas, la única forma validada hasta ahora de detectar precozmente la resistencia a la acción de los antibióticos. Debemos enfatizar esto último porque las empresas, en general, suelen no solicitar este tipo de análisis, quedándose sólo con los resultados de PCR. Si bien esto forma parte de una tendencia mundial a la biomolecularización del diagnóstico, tiene sus desventajas, como lo acabamos de describir, y que por lo demás ha sido materia de debate en otros países. Por eso, el llamado es a hacer CIM de manera sistemática.

Transferencia horizontal de genes y surgimiento de nuevas variantes resistentes

Los aislados de *P. salmonis*, independiente

de su linaje genético, contienen un número variable de plásmidos, los cuales se encuentran en un número bajo de copias (**Figura 2**). El aislamiento de una cepa o conjunto de aislados de *P. salmonis* que contiene un plásmido de resistencia a múltiples antibióticos, abre una perspectiva nueva en el conocimiento de la enfermedad.

Este es el caso de la cepa AY3800B y aislados relacionados. Experimentos de conjugación llevados a cabo en ADL indicaron que el plásmido p3PS10 es capaz de movilizarse a otras bacterias como *Escherichia coli*, aunque a una baja tasa de transferencia (Saavedra y col., 2018). Otro aspecto relevante que estudiamos fue que el mismo elemento genético es capaz de “saltar” a otras cepas de *P. salmonis*. Esto último tiene relevancia en el surgimiento de nuevas cepas resistentes a uno o más antibióticos, lo que puede implicar resistencia a drogas alternativas.

Sin embargo, la adquisición de genes no está libre de costos para la bacteria y el hallazgo mencionado debe ser ponderado a la luz de la evidencia científica. De hecho, durante esta investigación, fallamos en transferir el plásmido a otras especies tales como *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio anguillarum* bajo condiciones de laboratorio (resultados no publicados).

Por lo tanto, el demostrar la movilización de un elemento en una especie no significa que éste se transferirá a otras. A veces, se cae en una excesiva simplificación del proceso de movilización de elementos genéticos de resistencia, dando por sentado su transferencia a otras especies.

Esto a menudo da pie a extrapolaciones o predicciones que no tienen una base sólida. Otro aspecto no menor es la capacidad de persistencia de dichos elementos, que en el caso de p3PS10, se mantiene incluso después de remover del medio de cultivo la presión selectiva que ejerce el antibiótico (**Figura 3**). Este

aspecto es importante a considerar cuando se planifican intervenciones para disminuir o revertir la aparición de resistencia.

Conclusiones

El uso de antibióticos *per se* ejerce una presión de selección de bacterias resistentes, siendo la generación de nuevas cepas un efecto colateral y de frecuencia reducida. En efecto, se han detectado genes de resistencia en ambientes relativamente prístinos, alejados de la intervención antropogénica (Buschmann y col., 2012; revisado en Miranda y col., 2018). Lo anterior quiere decir que no es requisito el sobreuso de antibióticos para encontrar bacterias resistentes en un nicho ecológico particular. En consecuencia, esto nos obliga a ser cuidadosos a la hora de postular un origen sobre la resistencia bacteriana, ya que no es un fenómeno que se manifiesta exclusivamente por el uso de antimicrobianos. Por otro lado, y

Antifouling y Coatings
de nueva generación

Productos de alto rendimiento,
aprobados para acuicultura.
Nuestra contribución al bienestar animal

Visítenos en AquaSur 2018 stand **A-102**

Steen-Hansen
steen-hansen.com

Argüden | photo © Steen-Hansen

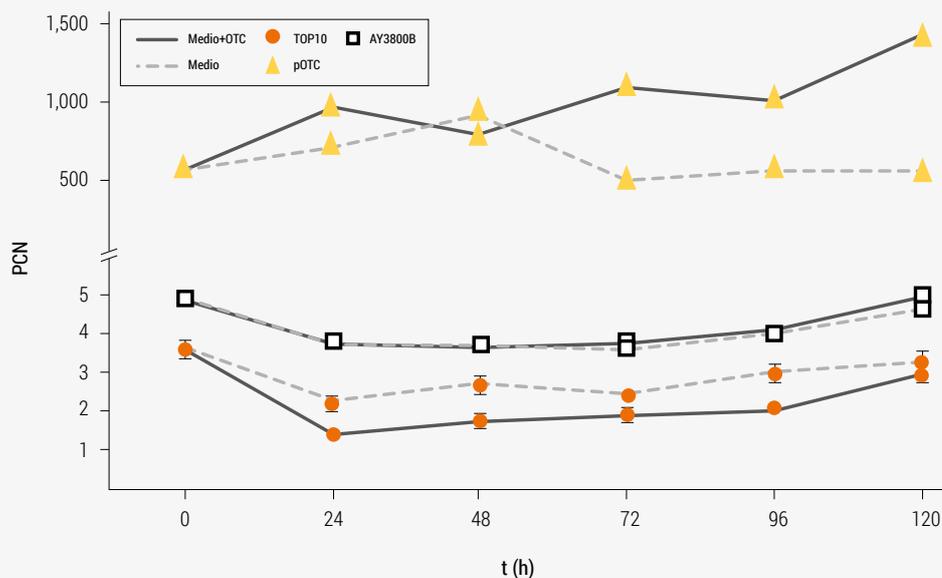


Figura 3. Cálculo del número de copias del plásmido p3PS10 bajo distintas condiciones de cultivo y hospederos. PCN: número de copia por bacteria; TOP10, cepa *E. coli* con plásmido p3PS10; pOTC, cepa *E. coli* con plásmido de alto número de copias que codifica el determinante de resistencia a tetraciclinas tet (tipo pCR2.1, Invitrogen); AY3800B, cepa *P. salmonis* que contiene p3PS10. Cuando se remueve el antibiótico del medio (líneas discontinuas), p3PS10 se mantiene de forma estable en sus respectivos hospederos, no así el plásmido de alto número de copias.

con nuestro limitado conocimiento de la biología de elementos móviles, el hecho de identificar genes de resistencia en un ambiente determinado no significa que estos necesariamente pasarán a bacterias patógenas humanas; el proceso parece ser más restrictivo. No obstante, la presencia de ARG como factor de riesgo no debe desestimarse.

Un aspecto que recae necesariamente en la salmicultura, especialmente para la nuestra, es el potencial desarrollo de resistencia clínica a florfenicol. La casi exclusiva dependencia de esta droga para los tratamientos contra SRS predice, en un futuro cercano, una reducción de la eficacia en las terapias con este antibiótico. Por ello, creemos importante mantenernos alertas, a través de la vigilancia activa, para detectar a tiempo situaciones que le confieren riesgo a nuestra industria en Chile. Muchos podrán pensar cuál es el sentido de la vigilancia y detección precoz si pareciera que nada puede hacerse al respecto, pero ello no es más que un mito.

Lo concreto es que una detección temprana sí permite implementar medidas correctivas dirigidas a minimizar los riesgos; un esfuerzo que es consistente con el plan de acción global

contra la resistencia a los antimicrobianos impulsado recientemente por la OMS, FAO y OIE (<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/Analysis-report-of-AMR-country-se/en/>). Esta tarea debe ser asumida como una responsabilidad compartida entre industria, profesionales de salud animal y autoridad regulatoria; esta materia es hoy más sensible que nunca en la historia de nuestra salmicultura, y por la misma razón nos debe instar a trabajar a todos de manera alineada en pos de garantizar la sustentabilidad de nuestra industria •

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al cofinanciamiento aportado por el proyecto 14IDL2-30005, de la Corporación de Fomento de la Producción (Corfo).

Referencias

Bohle, H., P. Henríquez, H. Grothusen, E. Navas, F. Bustamante, P. Bustos & M. Mancilla. 2017. The Genome Sequence of an Oxytetracycline-Resistant Isolate of the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis* Harbors a Multidrug Resistance Plasmid. *Genome Announc.*, 5, e01571-16.

Buschmann, A., A. Tomova, A. Lopez, M. Maldonado, L. Henríquez, L. Ivanova, F. Moy, H. Godfrey & F. Cabello. 2012. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine

environment. *PLoS One*, 7, e42724.

Cabello, F., H. Godfrey, A. Buschmann & H. Dolz. 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet. Infect. Dis.*, 7, e127-133.

Cartes, C., A. Isla, F. Lagos, D. Castro, M. Muñoz, A. Yanez, D. Hausmann & J. Figueroa. 2016. Search and analysis of genes involved in antibiotic resistance in Chilean strains of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish. Dis.*, 40: 1025-1039.

Contreras-Lynch, S., P. Smith, P. Olmos, M. Loy, W. Finnegan & C. Miranda. 2017. A Novel and Validated Protocol for Performing MIC Tests to Determine the Susceptibility of *Piscirickettsia salmonis* Isolates to Florfenicol and Oxytetracycline. *Front. Microbiol.*, 8: 1255.

Henríquez, P., H. Bohle, F. Bustamante, P. Bustos & M. Mancilla. 2015. Polymorphism in *gyrA* is associated to quinolones resistance in Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *J. Fish. Dis.*, 4: 415-418.

Henríquez, P., M. Kaiser, H. Bohle, P. Bustos & M. Mancilla. 2016. Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *J. Fish. Dis.*, 39, 441-448.

Mancilla, M. 2018. Commentary: A Novel and Validated Protocol for Performing MIC Tests to Determine the Susceptibility of *Piscirickettsia salmonis* Isolates to Florfenicol and Oxytetracycline. *Front. Microbiol.*, 9: 483.

Miranda, C., F. Godoy & M. Lee. 2018. Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. *Front. Microbiol.*, 9: 1284.

Miranda, C., A. Tello & P. Keen. 2013. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. *Front. Microbiol.*, 4: 233.

Miranda, C. & R. Rojas. 2007. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture*, 266: 39-46.

Saavedra, J., N. Hernandez, A. Osses, A. Castillo, A. Cancino, H. Grothusen, E. Navas, P. Henríquez, H. Bohle, F. Bustamante, P. Bustos & M. Mancilla. 2017. Prevalence, geographic distribution and phenotypic differences of *Piscirickettsia salmonis* EM-90-like isolates. *J. Fish. Dis.*, 40: 1055-1063.

Saavedra, J., M. Grandon, J. Villalobos-Gonzalez, H. Bohle, P. Bustos & M. Mancilla. 2018. Isolation, Functional Characterization and Transmissibility of p3PS10, a Multidrug Resistance Plasmid of the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Front. Microbiol.*, 9: 923.

Sandoval, R., C. Oliver, S. Valdivia, K. Valenzuela, R. Haro, P. Sanchez, V. Olavarría, P. Valenzuela, R. Avendaño-Herrera, A. Romero, J. Carcamo, J. Figueroa & A. Yanez. 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.* 363, fnw102.

Tomova, A., L. Ivanova, A. Buschmann, M. Riaseco, R. Kalsi, H. Godfrey & F. Cabello. 2015. *Antimicrobial resistance genes* in marine bacteria and human uropathogenic *Escherichia coli* from a region of intensive aquaculture. *Environ. Microbiol. Rep.* 7: 803-809.

World Health Organization, WHO. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance (<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>).