

NOTA TÉCNICA N°2

20 Marzo 2023



*Somos Experiencia, Compromiso & Innovación*

## **FURUNCULOSIS ATÍPICA: actualización sobre el agente causal y la respuesta a antimicrobianos**



Elaborado por:  
Area Asistencia Técnica & Area I+D+i

A mediados del 2022, ADL Diagnostic Chile realiza la primera alerta en agua dulce de Furunculosis Atípica en salmón del Atlántico (Salmonexpert, 22.05.22).

Desde su primera detección en Chile, hace ya casi 28 años, la casuística de esta enfermedad/agente ha tenido oscilaciones a través de los años, no obstante la mayor parte del tiempo ha estado casi erradicada, como consecuencia de la efectividad de las vacunas existentes, incorporadas desde el 2002.

Sin embargo, desde el segundo semestre del 2021 se comenzó a observar un importante incremento en la detección del agente causal y/o de la enfermedad, casi todos ellos en agua dulce (pisciculturas de flujo abierto y recirculación), afectando a poblaciones de diversa talla, desde alevines hasta smolt, e incluso post-smolt. Una parte de estos casos debió ser controlada mediante quimioterapia (florfenicol u oxitetraciclina), ya sea oral o mediante vía intraperitoneal.



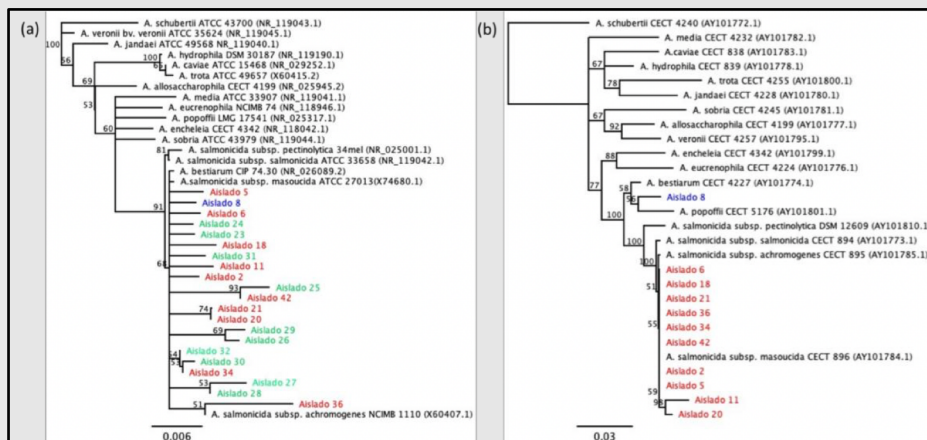
Durante el segundo semestre del 2022, la problemática emergente motivó al laboratorio a la generación de un acuerdo de investigación conjunta entre los especialistas del laboratorio, liderado por el Dr. Marcos Mancilla, Director del Area de I+D+i, y el Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología en Acuicultura de la Universidad Andrés Bello (UNAB), liderado por el Dr. Rubén Avendaño-Herrera (y científico del INCAR). El estudio contempló el trabajo con una fracción importante de la colección de 54 aislados de ADL obtenidos desde 2013 a mayo de 2022, abordando tres objetivos fundamentales: 1) la caracterización genotípica y fenotípica de aislados de *Aeromonas salmonicida* atípica, obtenidos desde diversos centros de cultivo y áreas geográficas, 2) estudiar la respuesta *in vitro* de estos aislados a Florfenicol y Oxitetraciclina a través de la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), y finalmente, c) mejorar u optimizar el algoritmo diagnóstico en ADL. Parte de estos aislados fueron obtenidos de casos que presentaron signología clínica característica de la enfermedad con brotes asociados y otros en condición subclínica.

### **Respecto de la caracterización**

Los resultados indicaron que todos los aislados confirmados por PCR como pertenecientes al grupo de *A. salmonicida* atípica, comparten la misma huella genómica con una similitud del 100%, independiente del método de tipificación empleado.

Se descartó además, la presencia de *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, agente causal de la Furunculosis clásica o típica, presente en el hemisferio norte, detectándose únicamente la versión atípica de la subespecie.

Con la excepción de un aislado que se posiciona junto a la cepa NCIMB 1110 de la especie *A. salmonicida subsp. achromogenes*, todos los restantes aislados se posicionaron más cercanos a *A. salmonicida subsp. masoucida* ATCC 27013. Esto es importante de destacar ya que por años se pensaba que probablemente la subespecie más frecuente en Chile era *achromogenes*.



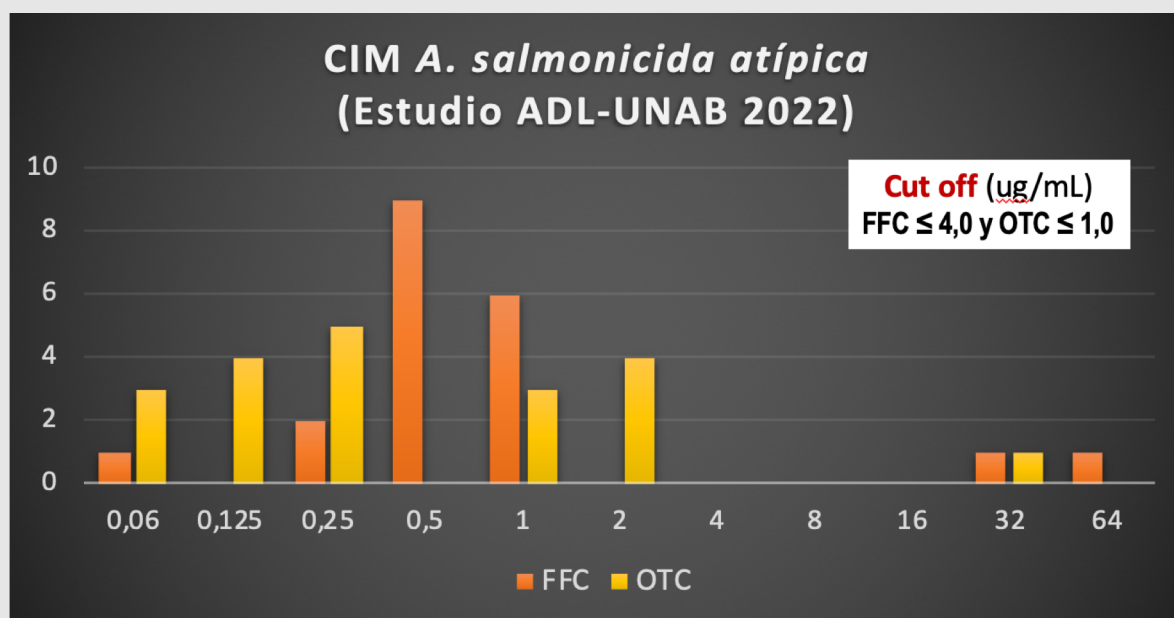
Árboles filogenéticos enraizados basados en 16S ARNr (a), *gyrB* (b), que muestran relaciones en el género *Aeromonas*.

## Respuesta bacteriana a antimicrobianos

Los resultados mostraron también que la mayoría de los aislados son del tipo *wild-type* o silvestres, es decir susceptibles a los antimicrobianos testeados. No obstante, aparecen aislados “non-wild-type” (NWT), del total, 2 aislados expresan dicha condición para FFC y 4 para OTC.

Solo 2 de ellos tienen susceptibilidad reducida notoria a ambos antibióticos, pudiendo ser considerados muy probablemente como resistentes. La tabla de abajo muestra los resultados obtenidos, de los cuales se calcula el cut-off o valor de corte para ambos antibióticos, siendo para FFC  $\leq 4,0$  ug/mL y para OTC  $\leq 1,0$  ug/mL.

Para los efectos del estudio, el porcentaje de *non wild-type* para FFC es de 10% y para OTC es de 5%.



De acuerdo con los datos actualizados en el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para *Aeromonas salmonicida* atípica, la CIM de los aislados chilenos para Florfenicol y Oxitetraciclina se mueven en valores cercanos a los encontrados en este estudio.

## Consideraciones finales

- a. Es importante señalar que, si bien la casuística de *A. salmonicida* atípica en la actualidad ha ido paulatinamente bajando, esta enfermedad aún representa ser un desafío importante en agua dulce, en especial en RAS, no sólo por las pérdidas que podría generar sino también por la necesidad de usar antibióticos, en especial afectando a aquellas poblaciones cuyo objetivo comercial es ser “libres de antibióticos”.
- b. La utilización de vacunas (inmersión) tempranamente en agua dulce ha contribuido a reducir los casos clínicos, de manera que esta práctica resulta ser beneficiosa y necesaria, complementándose con la vacuna polivalente inyectable que busca prevenir los casos en mar. No es necesario que hayan casos clínicos o positividad en el centro de agua dulce para que se usen las vacunas de inmersión, consideramos que debería ser una práctica habitual, no es necesario ni adecuado esperar a estar positivos para comenzar a implementarla, los riesgos de introducir el agente al centro existen y como tal es conveniente adoptar políticas rigurosas.
- c. El uso de antibiogramas para testear la susceptibilidad o resistencia de esta bacteria frente a los antimicrobianos, si bien es una práctica necesaria y habitual , en este caso, a la fecha, no proporciona resultados objetivos, se presentan desviaciones, semejante a *Tenacibaculum spp* y *R. salmoninarum*; por lo que es necesario que se desarrollen investigaciones para validarla como tal. La técnica válida para estos propósitos es la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la que sólo puede realizarse a partir de aislados bacterianos.

## Consideraciones finales (cont)

- d. Es relevante mantener una permanente vigilancia epidemiológica, no sólo realizada en peces sino buscando el agente causal en otros reservorios. El uso de ADLMag<sup>®</sup>, técnica inmunomagnética desarrollada por ADL hace algunos años, que posee una sensibilidad superior al qPCR en más de 1.000 veces, ha permitido eventualmente detectar el agente en agua, biofiltro y estanques de traslado.
- e. La experiencia nos indica que hay que poner muy especial atención al estrés como un importante gatillante de la enfermedad, en especial cuando éste es de origen múltiple y se presenta de manera simultánea, como por ejemplo: alta densidad + esmoltificación, alta densidad y vacunación, etc.
- f. Ciertamente, como todos sabemos, la clave está en implementar altos estándares de bioseguridad, lo que permitirán minimizar de manera importante los riesgos.

- Nilsson WB, Gudkovs N & Strom MS (2006). Atypical strains of *Aeromonas salmonicida* contain multiple copies of insertion element ISAsa4, useful as a genetic marker and a target for PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 70, 209–217.
- Yamamoto, S., & Harayama, S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48, 813–819.
- Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ & Martínez-Murcia AJ (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 875–883.
- Kahlmeter, G., Brown D.F., Goldstein F.W., MacGowan A.P. Mouton, J.W., Osterlund, A., Rodloff, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P., Vatopoulos, A. (2003). European harmonitazi3n of MIC breakpoints for antimicrobial suscetibility testing of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 145-148. doi 10.1093/jac/dkg312.
- Miller, R. A., Reimschuessel, R. (2006). Epidemiologic cutoff values for antimicrobial agents against *Aeromonas salmonicida* isolates determined by minimal inhibitory concentration and diameter of zone of inhibition data. *American Journal of Veterinary Research*, 67(11), 1837-1843. doi 10.2460/ajvr.67.11.1837
- Godoy, M., Gherardelli, V., Heisinger, A., Fernández, J., Olmos, P., Ovalle, L., ... & Avendaño-Herrera, R. (2010). First description of atypical furunculosis in freshwater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *Journal of fish diseases*, 33(5), 441-449