

# Un plásmido de *Piscirickettsia* *salmonis* AY3800B codifica para resistencia a múltiples antimicrobianos

Harry Bohle, Horst Grothusen, Esteban Navas, José Saavedra y Marcos Mancilla\*  
Laboratorio de Diagnóstico y Biotecnología ADL Diagnostic Chile, Puerto Montt.  
\*mmancilla@adldiagnostic.cl

La resistencia a los antibióticos es un problema serio, tratado recientemente en una sesión especial de Naciones Unidas, la cual convocó a los líderes mundiales a delinear un plan de acción urgente (Anónimo, 2016a). Se calcula que al año mueren 700 mil personas por infecciones producidas por agentes resistentes a los antibióticos en todo el mundo (Anónimo, 2016b). La resistencia a los antibióticos también es un problema económico; de no tomar una acción seria e inmediata de aquí al 2050, los costos globales ascenderán a US\$ 100 trillones. La conexión del problema con la actividad del hombre está ampliamente demostrada. El aumento en la incidencia de infecciones humanas, producto de microorganismos resistentes está en estrecha relación con el uso de los antibióticos (Blair y col, 2015). Residuos depositados en el medio ambiente, pueden conllevar a la selección de bacterias ambientales que contienen marcadores o genes de resistencia a antibióticos, las cuales a su vez pueden transmitir dichos marcadores a bacterias patógenas humanas volviéndolas resistentes (Berendok y col, 2015).

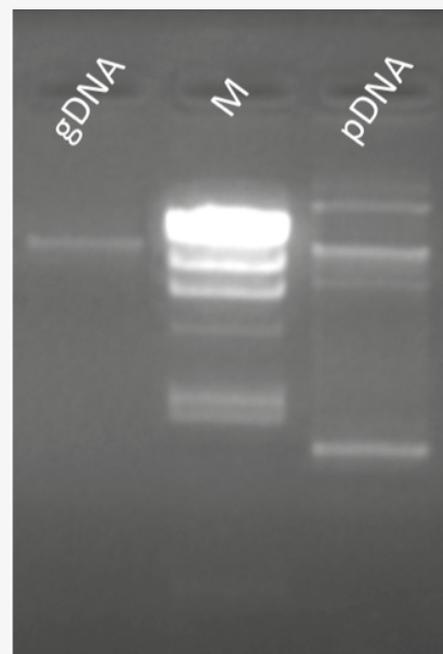
De las actividades humanas que requieren la utilización constante y, a veces, elevada de antibióticos, están las relacionadas con la producción animal. Este uso se justifica para mantener controladas las infecciones causadas por agentes patógenos, además de ser coherente con las directrices de bienestar animal que regulan las buenas prácticas de cultivo. En nuestro país, en los dos últimos años, la salmicultura ha demandado anualmente más de 500 toneladas métricas de estas moléculas, principalmente dos principios activos: florfenicol y oxitetraciclina (Sernapesca, 2015, 2016). Estas drogas están destinadas especialmente al tratamiento de brotes de *Piscirickettsiosis*, una enfermedad septicémica también conocida como *Septicemia Rickettsial Salmonidea* (SRS). Los brotes frecuentes de SRS, que afectan a los planteles de peces en fase de engorda, se traducen en mortalidades elevadas de no ser tratados con antibióticos rápidamente.

El escenario anterior probablemente ha ejercido una presión selectiva sobre la población silvestre de aislados de *P. salmonis*, permitiendo el surgimiento

de bacterias con un grado disminuido de susceptibilidad a los antibióticos. De hecho, un estudio publicado por nuestro laboratorio dio cuenta de la detección de aislados resistentes a quinolonas (ácido oxolínico, flumequina, QUI), florfenicol (FFC) y/u oxitetraciclina (OTC) (Henríquez y col, 2016). Para esta última droga, el valor detectado de concentración inhibitoria mínima (CIM) para ciertos aislados fue bastante elevada, situándose muy por encima del valor de corte establecido. Al contrastar este valor con el nivel plasmático que alcanza la droga en el pez (Elema y col, 1996), es posible predecir un fallo terapéutico de los tratamientos de OTC aplicados a brotes de SRS producidos por este tipo de aislado. El objetivo del presente estudio fue contribuir a entender la genética detrás del fenotipo resistente a OTC de *P. salmonis*.

Los marcadores de resistencia a antibióticos pueden ser cromosomales, o bien estar ubicados en elementos móviles como transposones, islas genómicas, integrones y plásmidos. Un estudio genómico realizado en la cepa *P. salmonis* LF-89 (ATCC VR-1361), ha identificado la

presencia de plásmidos (Pulgar y col, 2015), lo que sugiere la capacidad de la bacteria de adquirir material genético desde fuentes externas. No obstante, esta cepa muestra valores de CIM similares a cepas silvestres susceptibles a QUI, FFC y OTC (**Tabla 1**). En cambio, el aislado AY3800B, el cual se recuperó desde salmón Atlántico (*Salmo salar*) durante un brote ocurrido en la región de Aysén en 2013, es altamente resistente a OTC (CIM = 256 µg/ml). Consistente con lo observado hasta ahora, respecto de la resistencia a antimicrobianos de las cepas de *P. salmonis*, el aislado AY3800B es de tipo LF-89 (Saavedra y col, 2017). Para indagar acerca de la presencia de plásmidos, se realizó un análisis del contenido de ADN mediante purificación de ADN genómico y plasmidial en fracciones independientes. La **figura 1** muestra la presencia de varias moléculas en la fracción de ADN plasmidial del aislado AY3800B. Este resultado sugiere que AY3800B contiene plásmidos, al igual que otros aislados de *P. salmonis*. En efecto, la secuenciación y anotación completa del genoma de AY3800B realizada en la unidad de bioinformática de ADL, resultó en un



**Figura 1.** Perfiles de ADN genómico (carril gDNA) y plasmidial (carril pDNA) del aislado *P. salmonis* AY3800B. M, estándar fago  $\lambda$ /HindIII.

**Tabla 1.** Perfiles de susceptibilidad a antibióticos y características genéticas de aislados de *P. salmonis*.

Aislado	Genogrupo o cepa	CIM (µg/ml)	Tipo de replicón	Tamaño	G+C (%)	N° CDS	Descripción
LF-89 <sup>T</sup>	Tipo LF-89	QUI = 0,06 FFC = 0,5 OTC = 0,5	Cromosoma	~3,2 Mb	39,7	2.634	Genes esenciales, genes de virulencia.
			pSLF89-1	180 kb	38,9	138	La mayoría genes hipotéticos, junto con elementos de inserción (transposasas).
			pSLF89-2	33,5 kb	40,6	35	La mayoría genes hipotéticos y transposasas.
			pSLF89-3	51,5 kb	39,0	43	La mayoría genes hipotéticos y transposasas. Proteínas de fago.
			pSLF89-4	57,4 kb	37,3	63	La mayoría genes hipotéticos.
AY3800B	Tipo LF-89	QUI = 0,03 FFC = 0,5 OTC* = 256	Cromosoma	~3,2 Mb	39,7	3.031	Genes esenciales, genes de virulencia.
			p1PS10	60 kb	37,7	66	Componentes aparato conjugación. Genes hipotéticos. Sistema toxina-antitoxina.
			p2PS10	33,5 kb	40,6	41	Proteínas de fago, transposasas, genes hipotéticos.
			p3PS10	45,7 kb	55,0	52	Genes de resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas y estreptomina. Componentes de aparato de conjugación tipo T4SS.
			p4PS10	188 kb	39,1	222	En su mayoría genes hipotéticos. Proteínas de fago. Transposasas.

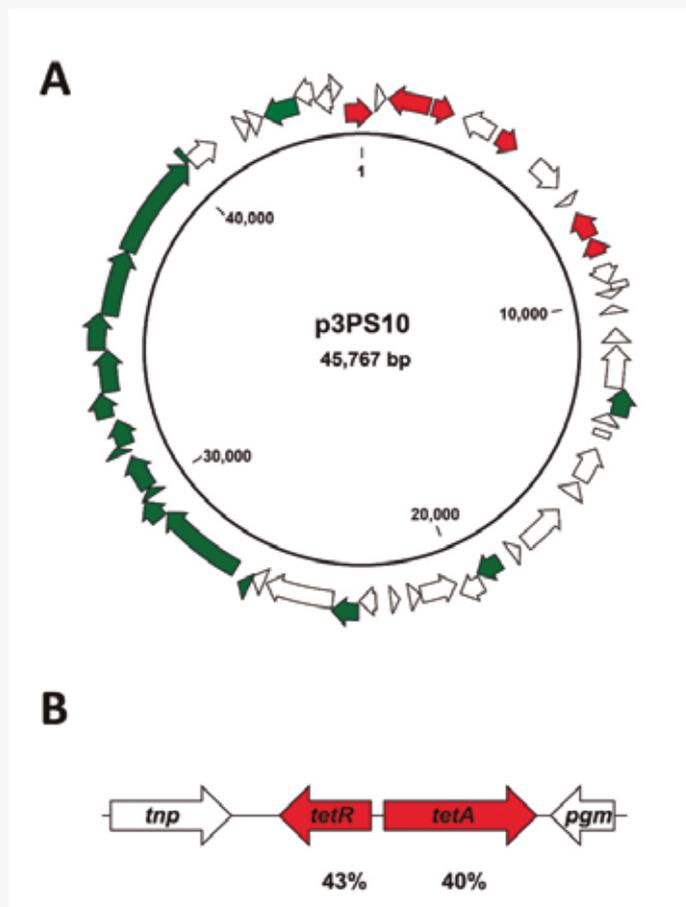
\*Resistencia a OTC según valor de corte epidemiológico reportado en Henríquez y col, 2016.

cromosoma de ~3,2 Mb, junto a cuatro plásmidos de 60, 33.5, 45.7 y 188 kb (**tabla 1**) (Bohle y col, 2017).

Un punto interesante de discutir es el contenido del plásmido p3PS10 del aislado AY3800B. La secuencia nucleotídica de este elemento posee un % G+C superior al compararlo con los otros elementos que componen su genoma (55% vs 39% en promedio). El contenido de G+C es un buen indicador de transferencia o adquisición horizontal de genes. La diferencia que muestra p3PS10 indica que pudo ser adquirido por el aislado AY3800B desde una fuente externa durante su evolución. Al comparar la secuencia de p3PS10, observamos que una parte importante (35 kb, sobre 99% de identidad) está relacionada con un plásmido encontrado en la cepa EIB202

de *Edwardsiella tarda*, un patógeno de peces. pEIB202 codifica para una serie de genes relacionados con resistencia a diversos antibióticos, además de un sistema de secreción que ayudaría a su transferencia fuera de la bacteria (Wang y col, 2009). Similar a pEIB202, p3PS10 contiene 52 secuencias codificantes (CDSs), de las cuales seis corresponden a determinantes genéticos ligados a la resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas y estreptomomicina (**Tabla 1**). Otras 16 CDSs corresponden a un sistema de secreción de tipo 4 (T4SS), funcionalmente asociado a aparatos de conjugación bacterianos encontrados en otros plásmidos capaces de auto transferirse. Un esquema de la organización genética del plásmido p3PS10 se muestra en **figura 2A**.

Cabe señalar que el determinante genético de resistencia a tetraciclinas encontrado en p3PS10, *tetAR*, presenta una similitud por sobre 40% a nivel de secuencia de aminoácidos respecto del encontrado en el plásmido pRAS1 (**figura 2B**). Este último, es responsable de conferir resistencia a OTC en una serie de aislados de *Aeromonas salmonicida* recuperados en Noruega, a finales de la década de los 80 (Sorum y col, 2003). Aunque el origen de p3PS10 es materia de especulación, lo cierto es que bacterias ambientales acuáticas resistentes a OTC, con valores de CIM similares o superiores a AY3800B, ya han sido aisladas (Miranda y Zemelman, 2002). Es interesante comentar que la diversidad de genes de resistencia a OTC en dichas bacterias ha sido definido (Miranda y col, 2003). Sin embargo, el determinante *tetAR* de p3PS10 no coincide con ninguno de los reportados en el citado estudio. Se requiere más investigación para aclarar este y otros aspectos más funcionales de la resistencia a los antibióticos por parte de *P. salmonis*. En este sentido, nuestro laboratorio ha incorporado, en la herramienta diagnóstica ATBPLEX®, la capacidad de detección (en tejido) de aislados de *P. salmonis* resistentes a OTC, lo cual permite no solo identificar el agente, sino también elegir la terapia antimicrobiana adecuada durante un brote de SRS. Utilizando esta herramienta, hemos detectado el DNA de aislados resistentes a OTC en peces afectados por SRS durante la temporada 2016. Por lo tanto, la potencial transmisibilidad en el ambiente marino de p3PS10 hace de este elemento una amenaza latente que, de ser transferido a otros hospederos, puede conferir fenotipos multirresistentes no sólo a *P. salmonis*, sino también a otros patógenos acuáticos. Nuestra investigación en curso permitirá definir este y otros aspectos de la biología de este plásmido •



**Figura 2.** Organización genética de A) p3PS10 y B) determinante de resistencia a tetraciclina. En rojo, genes relacionados a resistencia a antibióticos; en verde, genes que codifican un T4SS relacionado hipotéticamente con autotransferencia del plásmido. Número debajo de la CDS corresponde al % de similitud de secuencia (aminoácidos) con respecto al determinante de resistencia a tetraciclinas de pRAS1. Nomenclatura: tnp, transposasa; tetA, bomba de expulsión de tetraciclinas; tetR, regulador transcripcional; pgm, fosfoglucomutasa (parcial).

## Agradecimientos

Este trabajo forma parte de lo publicado por nuestro laboratorio en Bohle y col, 2017. Esta investigación se realizó con aportes del proyecto 14IDL2-30005, de la Corporación de Fomento de la Producción, Corfo.

## Referencias

- Anónimo. 2016a. United Nations high-level meeting on antimicrobial resistance. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/events/UNGA-meeting-amr-sept2016/en/>
- Anónimo. 2016b. Review on antimicrobial resistance. <https://amr-review.org/>
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Burgmann, H., Sorum, H., Norstrom, M., Pons, M.N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L. 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* 13: 310-317.
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13: 42-51.
- Bohle, H., Henríquez, P., Grothusen, H., Navas, E., Bustamante, F., Bustos, P., Mancilla, M. 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.
- Elema, M.O., Hoff, K.A. & Kristensen, H.G. 1996. Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. *Aquaculture* 143: 7-14.
- Henríquez, P., Kaiser, M., Bohle, H., Bustos, P. & Mancilla, M. 2016. Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *J Fish Dis*: 39, 441-448.
- Miranda, C.D., Zemelman, R. 2002. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212: 31-47.
- Miranda, C.D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., Roberts, M.C. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 883-888.
- Pulgar, R., Travisany, D., Zuniga, A., Maass, A. & Cambiazo, V. 2015. Complete genome sequence of *Piscirickettsia salmonis* LF-89 (ATCC VR-1361) a major pathogen of farmed salmonid fish. *J Biotechnol* 212: 30-31.
- Saavedra, J., Hernandez, 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 11 de enero.
- Sernapesca. 2015. Informe sobre Uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura Nacional 2014. [http://www.sernapesca.cl/presentaciones/Comunicaciones/Informe\\_Sobre\\_Uso\\_de\\_Antimicrobianos\\_2014.pdf](http://www.sernapesca.cl/presentaciones/Comunicaciones/Informe_Sobre_Uso_de_Antimicrobianos_2014.pdf).
- Sernapesca. 2016. Informe sobre Uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura Nacional 2015. [http://www.sernapesca.cl/presentaciones/Comunicaciones/Informe\\_Sobre\\_Uso\\_de\\_Antimicrobianos\\_2015.pdf](http://www.sernapesca.cl/presentaciones/Comunicaciones/Informe_Sobre_Uso_de_Antimicrobianos_2015.pdf)
- Sorum H, L'abee-Lund TM, Solberg A, Wold A. 2003. Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1285-1290.
- Wang Q, Yang M, Xiao J, Wu H, Wang X, Lv Y, Xu L, Zheng H, Wang S, Zhao G, Liu Q, Zhang Y. 2009. Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PLoS ONE* 4: e7646.

**PHARMAQ**  
part of **zoetis**

# ALPHA JECT LiVac<sup>®</sup> SRS

Primera vacuna viva atenuada que ayuda a controlar el síndrome de la Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) en el salmón del Atlántico, trucha arco iris y salmón Coho.



[www.pharmaq.com](http://www.pharmaq.com)

