



Situación actual de la Evaluación de Susceptibilidad Bacteriana (ESB) en la salmonicultura nacional

Sergio Contreras Lynch

Departamento Salud Hidrobiológica

Instituto de Fomento Pesquero - IFOP

23 de Mayo de 2014



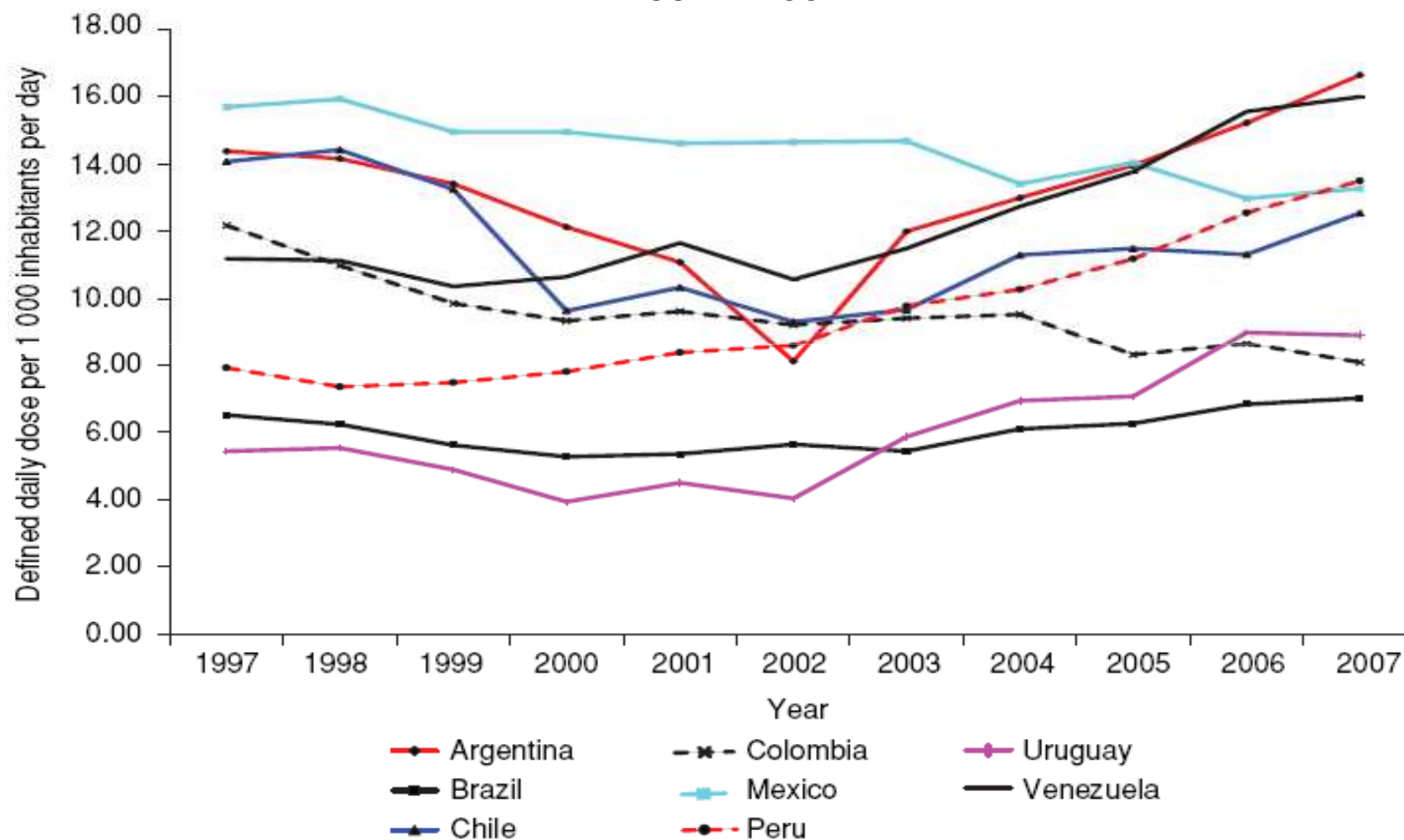


Agenda

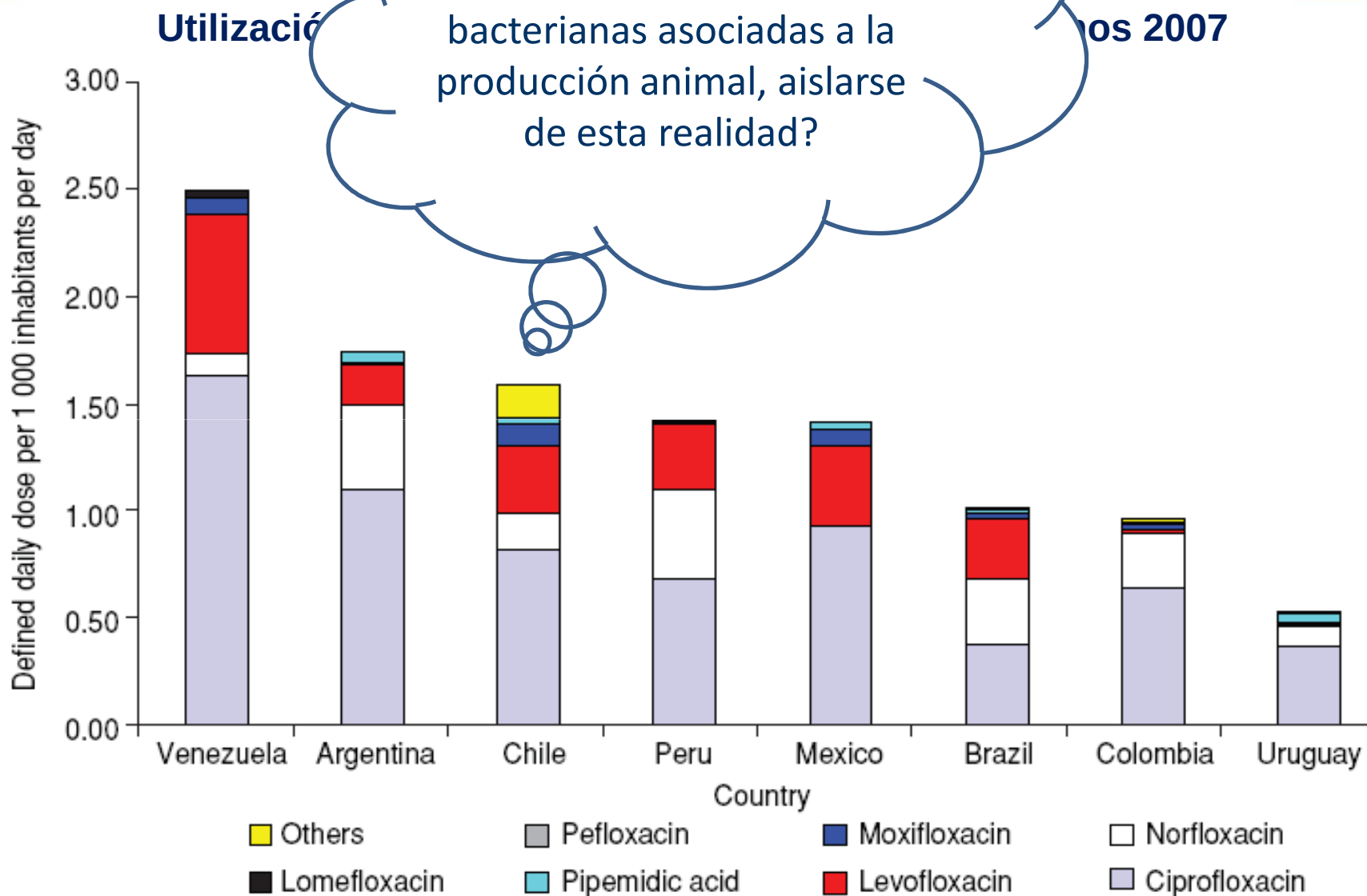
- ✓ Importancia de la ESB en la industria
- ✓ Definiciones
- ✓ El desafío de diferenciar poblaciones bacterianas resistentes/susceptibles
- ✓ Implementación de métodos para evaluar *Piscirickettsia salmonis*
- ✓ Desafíos
- ✓ Conclusiones



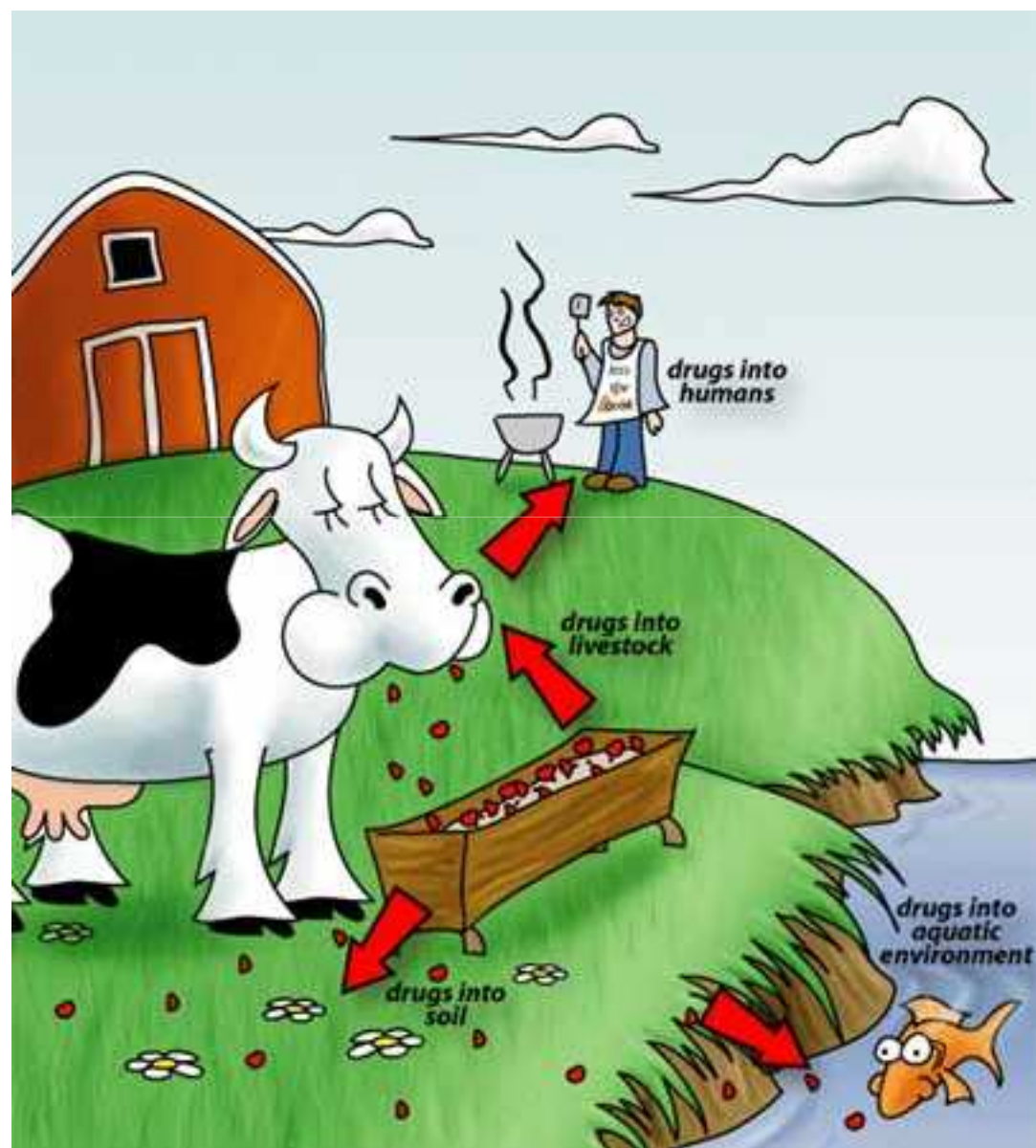
Tendencias en la utilización de antibióticos en países latinoamericanos 1997 – 2007



Fuente: Wirtz VJ, Dreser A, Gonzales R. 2010. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American Countries, 1997–2007. Rev Panam Salud Publica;27(3):219–25.



Fuente: Wirtz VJ, Dreser A, Gonzales R. 2010. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American Countries, 1997–2007. Rev Panam Salud Publica;27(3):219–25.



Antimicrobianos en Acuicultura

Principios activos asociados a los productos autorizados para su uso en acuicultura

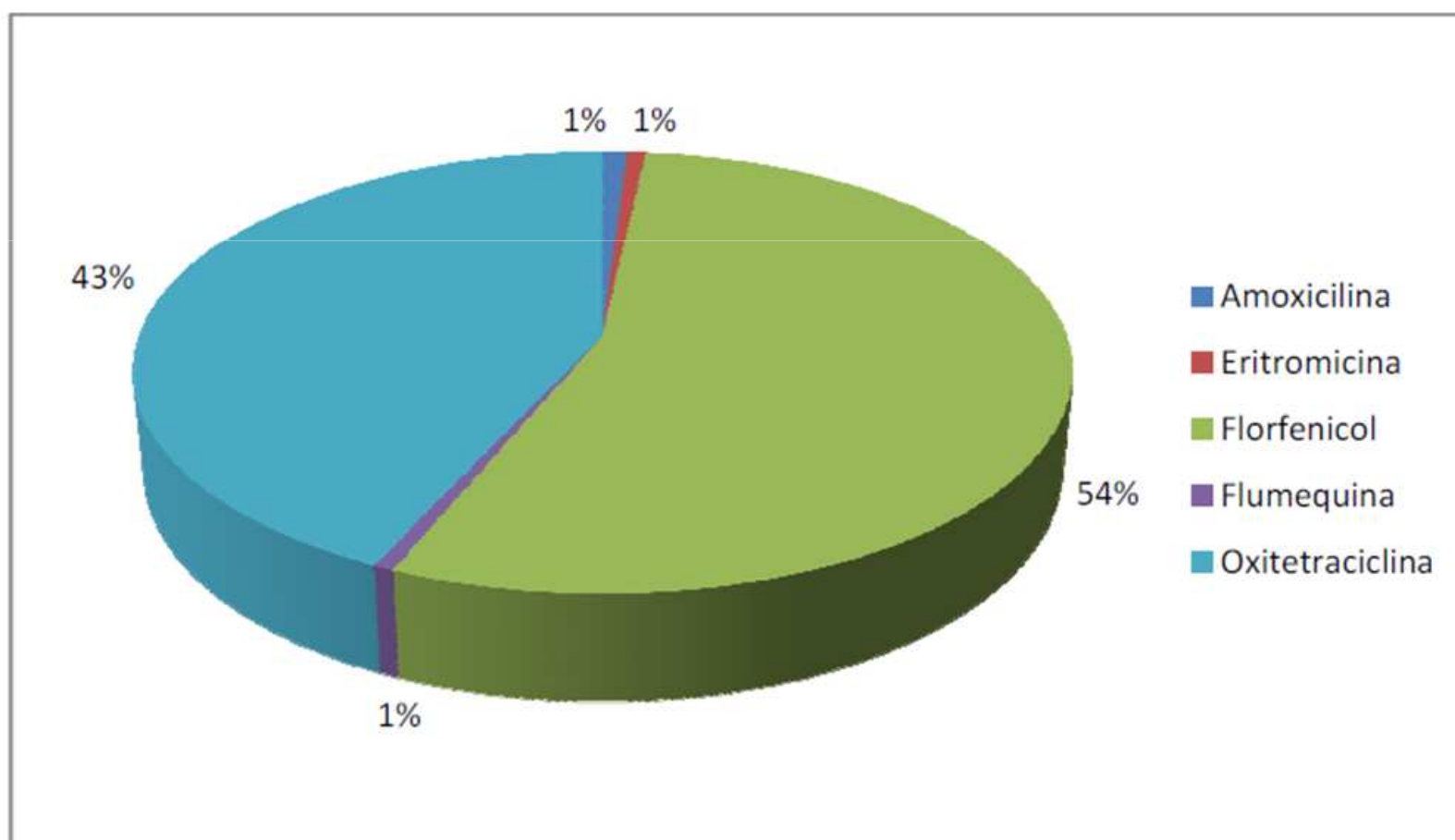
Principio activo	
Ácido clavulánico	
Amoxicilina	
Eritromicina	
Florfenicol	Glucosaminoglicanos
Flumequina	Fluoroquinolonas
Oxitetraciclina	Tetraciclinas

¿Es posible hacer sostenible de antimicrobianos en acuicultura, alternativas terapéuticas?



Antimicrobianos en Acuicultura

Utilización relativa de sustancias antimicrobianas, según tipo de fármaco
(Sernapesca, 2012).





Antimicrobianos en Acuicultura

Producción* (toneladas cosechadas), consumo de antibióticos (en Ton.) y porcentaje relativo de consumo durante el período 2005-2012.

Año	Cosecha (Ton)	Consumo antibióticos (Ton)	% Consumo de antibióticos relativo a la producción
2005	614.435	242,36	0,04
2006	647.302	341,41	0,05
2007	600.862	379,79	0,06
2008	630.647	333,98	0,05
2009	474.174	183,46	0,04
2010	467.456	143,17	0,03
2011	649.744	206,8	0,03
2012	827.203	337,99	0,04

(*): De acuerdo al Anuario Estadístico de Pesca.



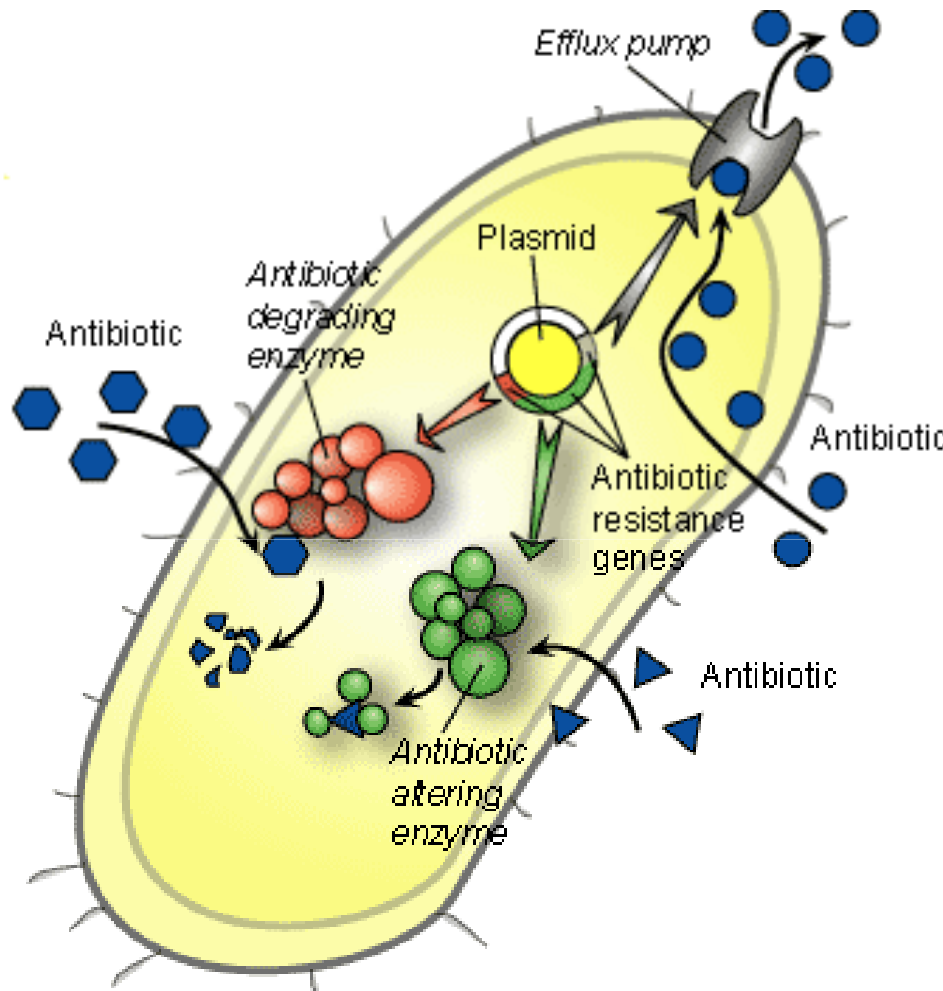
La salmonicultura es una actividad económica relevante en Chile.

La aplicación de tratamientos (antimicrobianos) en la producción es una decisión económica.

El productor aplica una terapia solo si realmente cree que existe una opción real de reducir las pérdidas, con un determinado método y hecha una evaluación costo/beneficio.



Resistencia bacteriana



- (Resistencia adquirida o extrínseca)
- ✓ Especies bacterianas, normalmente susceptibles a ciertos fármacos, expresan cambios a través de diferentes mecanismos, que revierten esa condición.
 - ✓ Pérdida de la capacidad del fármaco de tratar o curar la enfermedad causada por dicho patógeno.

Breaking news



NATURE | SEPTEMBER 2011 | VOL. 477 | pp 457-461

Antibiotic resistance is ancient!!

Vanessa M. D'Costa, Christine E. King, Lindsay Kalan, Mariya Morar, Wilson W. L. Sung, Carsten Schwarz, Duane Froese, Grant Zazula, Fabrice Calmels, Regis Debruyne, G. Brian Golding, Hendrik N. Poinar & Gerard D. Wright.

El estudio reveló la presencia de genes que codifican resistencia en muestras de sedimento de la Era del Pleistoceno tardío, vale decir, de 30.000 años de antigüedad.

A través de técnicas de biología molecular, se identificaron genes *tetM*-related, *bla* and *vanX*. Adicionalmente, se corroboró su funcionalidad.

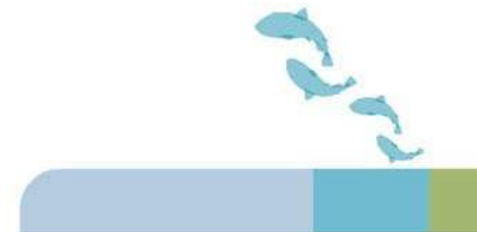




Si la bacteria es resistente al antimicrobiano utilizado, la terapia NO reducirá las pérdidas

La información de **resistencia / sensibilidad** de la bacteria blanco es un dato clave para el proceso de decisión de tratar / no tratar

¿Como podemos entregar esta información a los productores en terreno?



Determinación de **resistencia** involucra dos etapas



Desarrollo de
protocolos estándar de
laboratorio, apropiados
para medir
susceptibilidad
in-vitro

Desarrollo de criterios de
interpretación que
permitan dar sentido a
los resultados de las
pruebas de laboratorio
entregadas
(sensible/resistente)





Las técnicas de laboratorio capaces de generar una medida cuantitativa de susceptibilidad bacteriana son relativamente simples y han sido empleadas desde hace más de 50 años

**Difusión en placa
(antibiogramas)**

**Concentración
Mínima Inhibitoria
(CMI-MIC)**



Difusión en placa



- Corresponde a una placa que contiene una concentración conocida de antibiótico de interés, enfrentado al crecimiento del microorganismo blanco.
- Se incuba y mide el diámetro de cualquier zona de inhibición del crecimiento.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI-MIC)

- Incorpora crecientes concentraciones de antibióticos en un medio de crecimiento (sólido o líquido).
- Se incuba, y se determina la más baja concentración que inhibe el crecimiento.

Ambos métodos son similares en sensibilidad y precisión





El productor no necesita una medida cuantitativa de susceptibilidad

Necesita un respaldo para tomar la decisión de **tratar o no tratar**

Requiere saber si hay una buena probabilidad de si la terapia propuesta **funcionará** o si hay buenas razones para sospechar que esta **fallará**

¿La bacteria es clínicamente resistente o sensible?

Definiciones



- ***Breakpoints (puntos de quiebre)***: Son concentraciones discriminatorias de cada antimicrobiano utilizado en la interpretación de los resultados de los ensayos de susceptibilidad, para definir a las cepas bacterianas de una especie determinada como susceptible, intermedio o resistente al fármaco ensayado. Se asocian a la respuesta **in vivo-clínica**.
- ***Cut-offs (valores de corte)***: Corresponden a valores de corte epidemiológicos, que definen si un microorganismo es definido como silvestre (wild-type, WT) y carece de mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos. Están definidos por estudios **in vitro**.





¿Dónde y cómo establecer el
Breakpoint y/o el **Valor de corte** para
un determinado patógeno
bacteriano?



Una cepa bacteriana es “clínicamente resistente”

Susceptibilidad in vivo
(Farmacodinámica - PD)

La naturaleza de la **terapia**
(Farmacocinética - PK)

El estado de salud
del **pez**



Alternativa 1

Obtener breakpoint clínicos por PK/PD

Los modelos PK/PD no han sido desarrollados para tratamientos **metafilácticos** de poblaciones

En la salmonicultura nacional no se ha obtenido ningún tipo de información histórica de PK que podrían ser utilizable a futuro

Difícilmente esta aproximación generará **breakpoints clínicos** para patógenos en acuicultura dentro de los próximos años

¿Y entonces que hacemos?



Alternativa 2

Correlacionar
las mediciones de susceptibilidad
obtenidas en los laboratorios
con
éxito/falla de una terapia en terreno





Resultados ideales

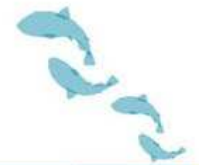
MIC	Success	Failure
0.25	6	
0.5	7	
1	4	
2	3	2
4	1	5
8		2
16		3



Resultados clínicos reales en Chile



- Muy pocos datos han sido publicados – se requieren muchos estudios de caso.
- Falta de un régimen de tratamiento estandarizado.
- Diversidad de las condiciones ambientales.
- Dificultad para cuantificar éxito terapéutico.



En consecuencia

Es poco probable que puedan ser desarrollados en los próximos años **breakpoints** (valores de cut-off clínicamente validados) para bacterias acuáticas



¿Y en el caso de *P. salmonis*?

- Escaso conocimiento del patógeno (biología, patogenia, fisiopatogenia, mecanismos de virulencia, variantes, etc..)
- Sin estudios históricos de PD-PK.
- Sin bases de datos históricas y estandarizadas de resultados terapéuticos.
- Sin un medio de cultivo estandarizado y universal.
- Es intracelular “facultativo”.



Mejor aproximación actual

Establecer valores de **cut-off basados** completamente en las mediciones de distribuciones de susceptibilidad

Valores de Corte (cut-off) “Epidemiológicos (microbiológicos) “

ECO o CO_{WT}



Valores de cut-off epidemiológicos (microbiológicos)

ECO o CO_{WT}

Muy sensible – No hay resistencia

WILD TYPE (WT)

NO hay razones para sospechar que la terapia fallará

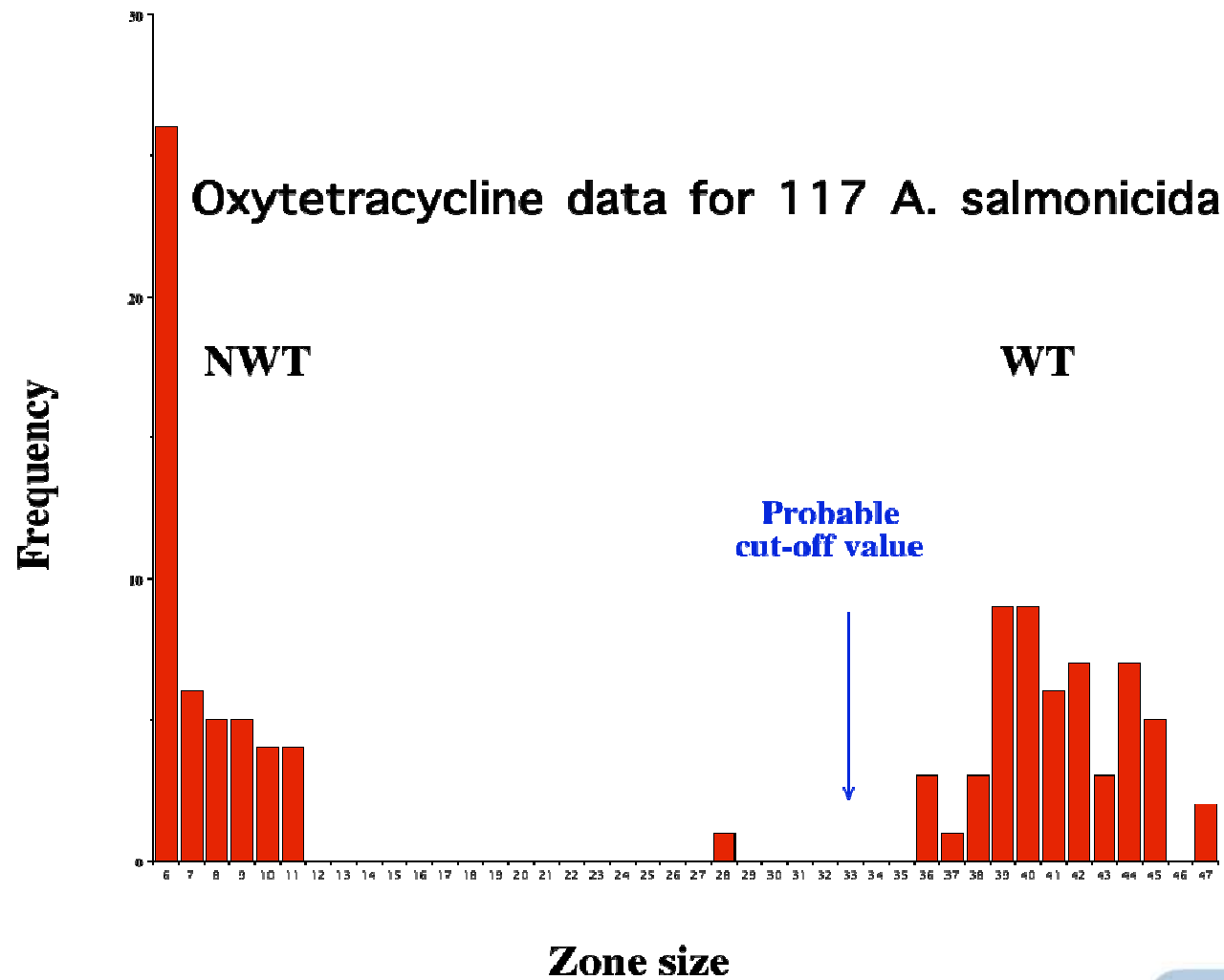
No completamente sensible – Existen algunas formas de resistencia

NON WILD TYPE (NWT)

Existen razones para sospechar que la terapia podría fallar – hay argumentos para retrasar o no iniciar el inicio de la terapia



Distribución de mediciones de susceptibilidad in-vitro





Aplicación teórica de CO_{WT}

Tamaño de la zona	$> CO_{WT}$	$< CO_{WT}$
Clasificación de la cepa	WT	NWT
Recomendación	Tratar	No tratar



Problemática



¿Podemos utilizar el CO_{WT} como parámetro **universal e independiente del laboratorio?**

¿Pueden estos CO_{WT} ser establecidos por la Autoridad pertinente?

¿Pueden éstos ser aplicados a datos producidos por todos los laboratorios que usan el mismo protocolo de **técnica de evaluación?**





¿Qué se espera al aplicar los CO_{WT} ?

Que **diferentes** laboratorios clasifiquen la misma cepa en la misma categoría (WT/NWT)

Que permita a todos los **laboratorios identificar correctamente** cepas con un bajo nivel de resistencia

Que un mismo laboratorio coloque una misma cepa en la misma categoría (WT/NWT) a **diferentes** tiempos



Porcentaje de laboratorios utilizando valores de cut-off propios para *Aeromonas salmonicida* comparado con el valor sugerido por CLSI

Zone size	OXA	FLU	FLO	OTC	SFX
10-11	1				
12-13	2			1	1
14-15	2				
16-17	1	1	1	2	9
18-19	1	3	5	12	6
20-21		2	4	2	1
22-23			1	1	
24-25	1	1	2		1
26-27	1	2			
28-29				1	3
30-31		2	1	1	
32-33		1	1	1	1
34-35					2
36-37					
38-39				1	
major error	100%	100%	87%	82%	71%

Fuente: Estudio personal efectuado por P. Smith para laboratorios de Reino Unido.

	ENR	SXT	AO	FFC	UB	E	AML	OTC
Resistente (R)	<=17	<=10	<=10	<=16	<=20	<=13	<=16	<=10
Intermedio (I)	18-21	11-15	-	17-20	21-24	14-17	-	11-18
Sensible (S)	=>22	=>16	=>11	=>21	=>25	=>18	=>17	=>19

Leyenda: ENR= enrofloxacin, SXT= sulfatrimetoprim, AO= Acido oxolinico, FFC= florfenicol, UB= flumequina, E= eritromicina, AML= amoxicilina, OTC= oxitetraciclina, Aisl= Aislamiento/total de peces

Informe de Laboratorio



Situación actual de los métodos CLSI para ESB de patógenos en acuicultura



	Protocolos de pruebas y criterios de QC	Criterio interpretativo
<i>Aeromonas salmonicida</i>	+	+
<i>Aeromonas</i> spp	+	
<i>Edwardsiella</i> spp	+	
<i>Flavobacterium</i> spp	+/-	
<i>Photobacterium</i> spp.	?	
<i>Streptococcus</i> spp.	?	
<i>Vibrio</i> spp.	?	
<i>Yersinia</i> spp.	+	
<i>Piscirickettsia salmonis</i> <i>Francisella</i> spp Rickettsia like organisms		



Generando los Valores de Corte (Cwt) para *Piscirickettsia salmonis*





Table 3. Standard Methods for Disk Diffusion Susceptibility Testing of Aquatic Bacterial Pathogens

Organisms	Medium	Incubation
Group 1: Nonfastidious bacteria^a		
Enterobacteriaceae	MHA	22 °C (24-28 h and/or 44-48 h) or 28 °C (24-28 h)
<i>Aeromonas salmonicida</i> (nonpsychrophilic strains)		
<i>Aeromonas hydrophila</i> and other mesophilic aeromonads		
<i>Pseudomonas</i> spp.		
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		
<i>Shewanella</i> spp.		
Vibrionaceae and related bacteria (nonobligate halophilic strains)		

Footnote

- a. Only Group 1 organisms have a standardized disk diffusion susceptibility testing method.



Table 4. Potential Modifications for Disk Diffusion Susceptibility Testing of Aquatic Bacterial Pathogens

Organisms	Medium	Incubation
Group 2: Vibrionaceae and Photobacteriaceae (obligate halophilic strains)	MHA + 1% NaCl	22 °C (24-28 h and/or 44-48 h) or 28 °C (24-28 h and/or 44-48 h)
Group 3: Gliding bacteria		
<i>Flavobacterium columnare</i>	Diluted MHA (1:7)	28 °C (24-28 h and/or 44-48 h)
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Diluted MHA +	15 °C (44-48 h and/or 68-72 h)
<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	supplementation ^a	
Group 4: Streptococci		
<i>Lactococcus</i> spp., <i>Vagococcus salmoninarum</i>	MHA + 5% sheep blood	22 °C (44-48 h + CO ₂ if necessary for growth)
<i>Streptococcus</i> spp., <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> , and other streptococci	MHA + 5% sheep blood	28 °C (24-28 h and/or 44-48 h + CO ₂ if necessary for growth)
Group 5: Other fastidious bacteria		
Psychrophilic <i>Aeromonas salmonicida</i> strains	MHA	15 °C (44-48 h)
<i>Vibrio salmonicida</i> and <i>Moritella viscosa</i>	MHA + supplementation ^a	15 °C (6 days)
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Diluted MHA (1:7) + inorganic ion supplementation	25 °C (24-28 h)
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Unknown	15 °C
<i>Mycobacterium</i> spp. and <i>Nocardia seriolae</i>	See CLSI/NCCLS standard M24	See CLSI/NCCLS standard M24
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Chocolate MHA	35 ± 2 °C





Requerimientos para generar COwt

- ✓ Obtener un número apropiado de cepas desde diferentes ACS, ambientes, órganos de peces, y especies desde brotes en centros de cultivo de la industria nacional.
- ✓ Seleccionar un medio de cultivo apropiado.
- ✓ Seleccionar los antimicrobianos a evaluar.
- ✓ Seleccionar cepas de referencia y control (ATCC® ?).
- ✓ Definir sistemas de control de calidad internos.





Cepas de *P. salmonis* evaluadas

- ✓ IFOP posee un cepario a la fecha, de 144 cepas de *P. salmonis* aisladas desde diferentes ACS, regiones, órganos y especies.
- ✓ 65 cepas fueron seleccionadas para el análisis.



Selección del medio de cultivo



15°C
22°C
24°C
10 cepas
5 times
30 días



AAM utilizados



Oxytetracyclin

Furazolidone

Florfenicol

Oxolinic Acid

Amoxicillin



Enrofloxacin

Eritromicin

Sulfa/trimethoprim

Streptomycin

Flumequine



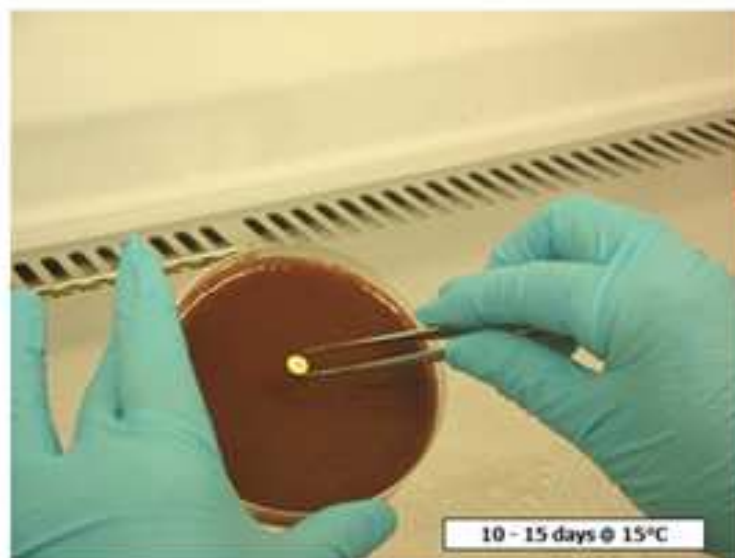
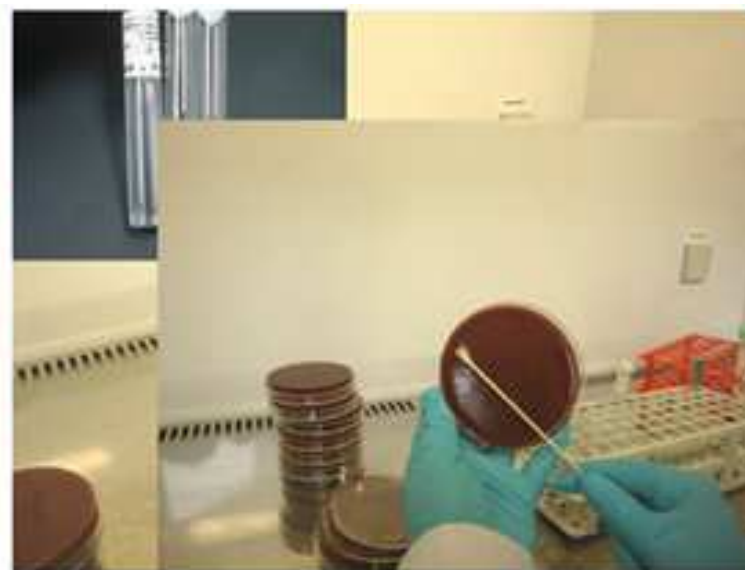
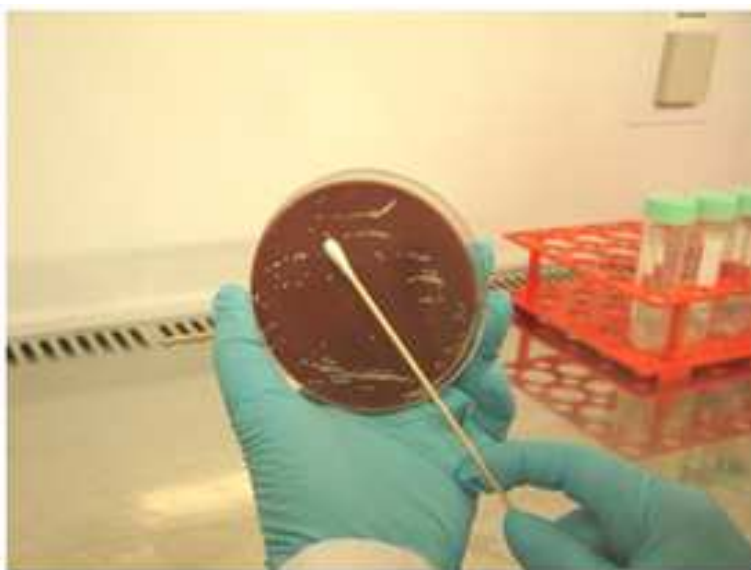
Cepas de referencia ATCC®



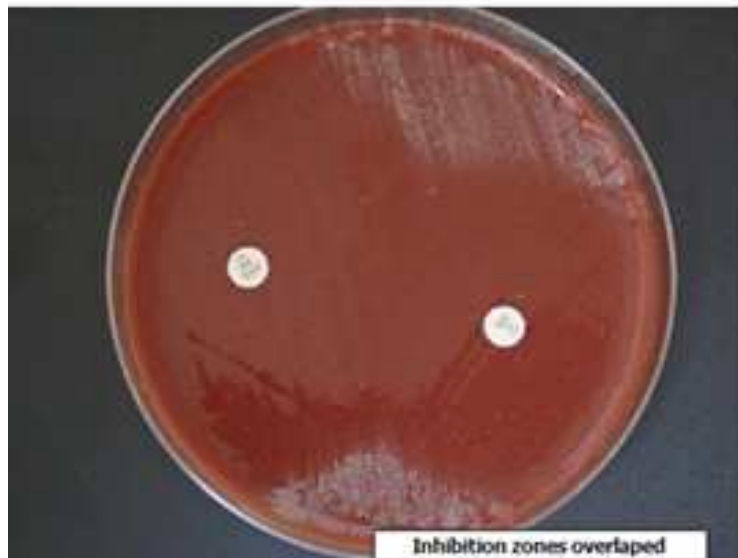


Pruebas de difusión en placa para *P. salmonis*





Resolviendo problemas

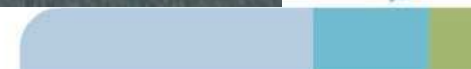




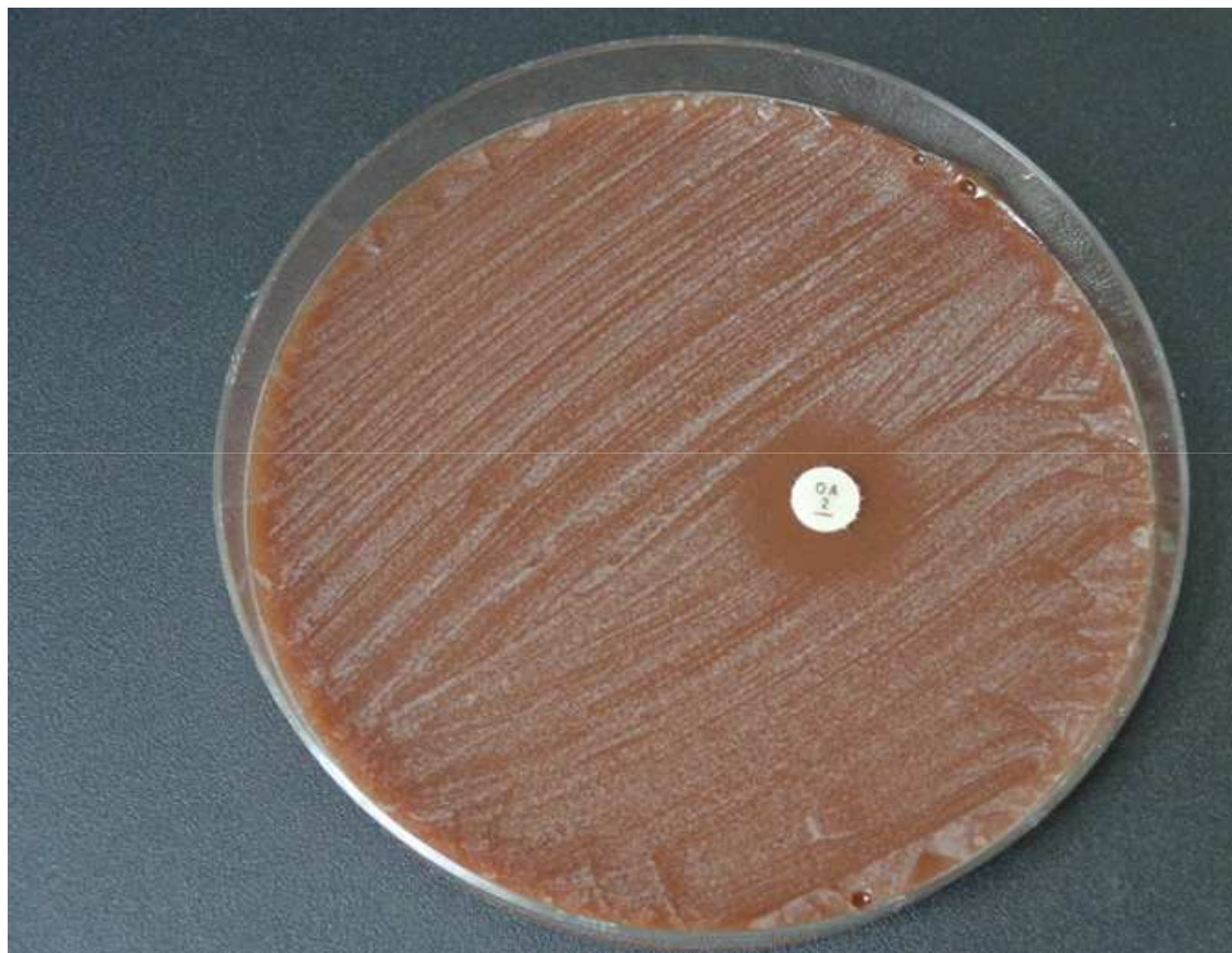
Mejorando las condiciones

- ✓ La temperatura de incubación se elevó a 18°C.
- ✓ Se trabajó solo con 5 AAM.
- ✓ Se dispuso de solo 1 sensidisco por placa.
- ✓ Todas las mediciones se efectuaron digitalmente.

















Resultados post modificaciones

- ✓ El tiempo de crecimiento se redujo a un promedio de 8 días.
- ✓ Las zonas de inhibición se volvieron claras y bien definidas para una mejor medición.
- ✓ La medición digital produjo datos más reales de las zonas de inhibición.



Generando los valores de corte (Cwt)



- ✓ Se analizaron los datos de 65 cepas de *P. salmonis* para la determinación de los puntos de corte epidemiológicos (cut-offs) de los halos de inhibición generados por florfenicol (FFC), amoxicilina (AML), ácido oxolínico (OA), flumequina (UB) y oxitetraciclina (OT).
- ✓ Se aplicó la Interpretación Normalizada de Resistencia (Kronvall G. 2003 and Kronvall et al. 2003) .



Ventajas de la Interpretación Normalizada de Resistencia (NRI)



Cada laboratorio aplica el método a sus propios datos para establecer sus propios CO_{WT}

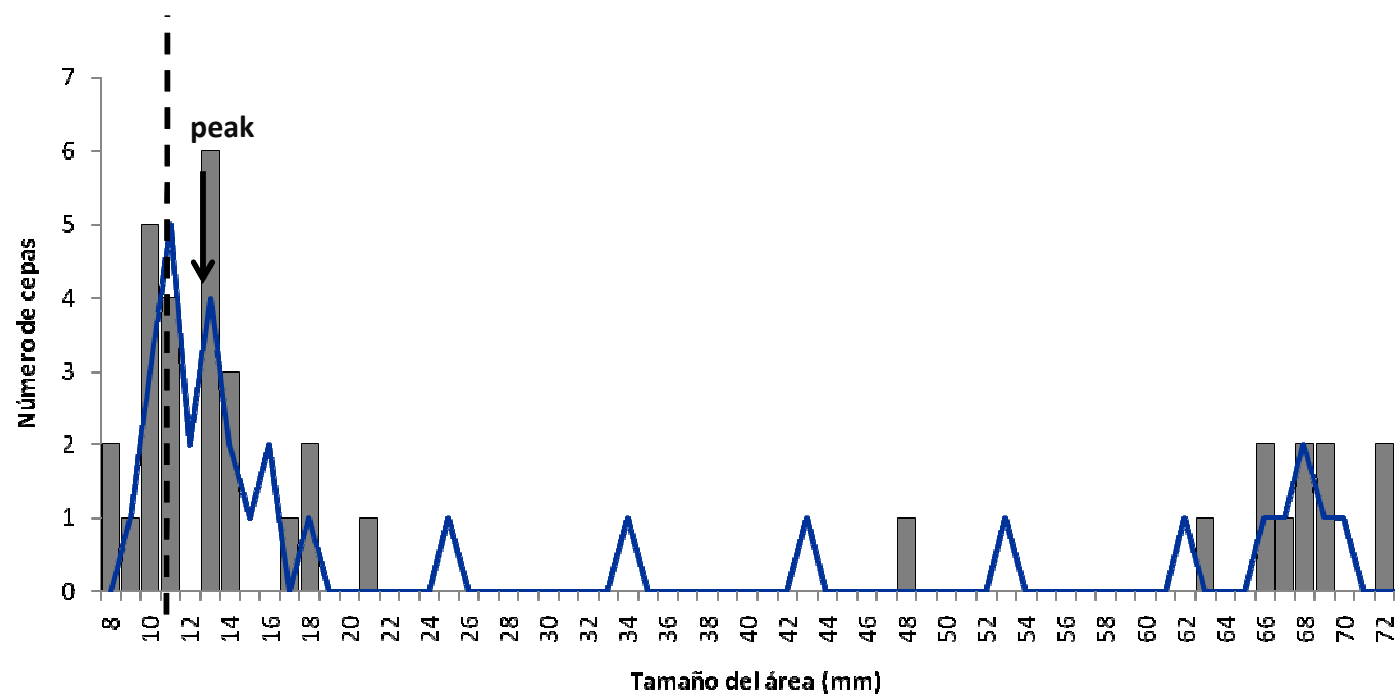
Elimina los problemas de la variación inter-laboratorio

Enfrenta bien las situaciones de niveles bajos de resistencia

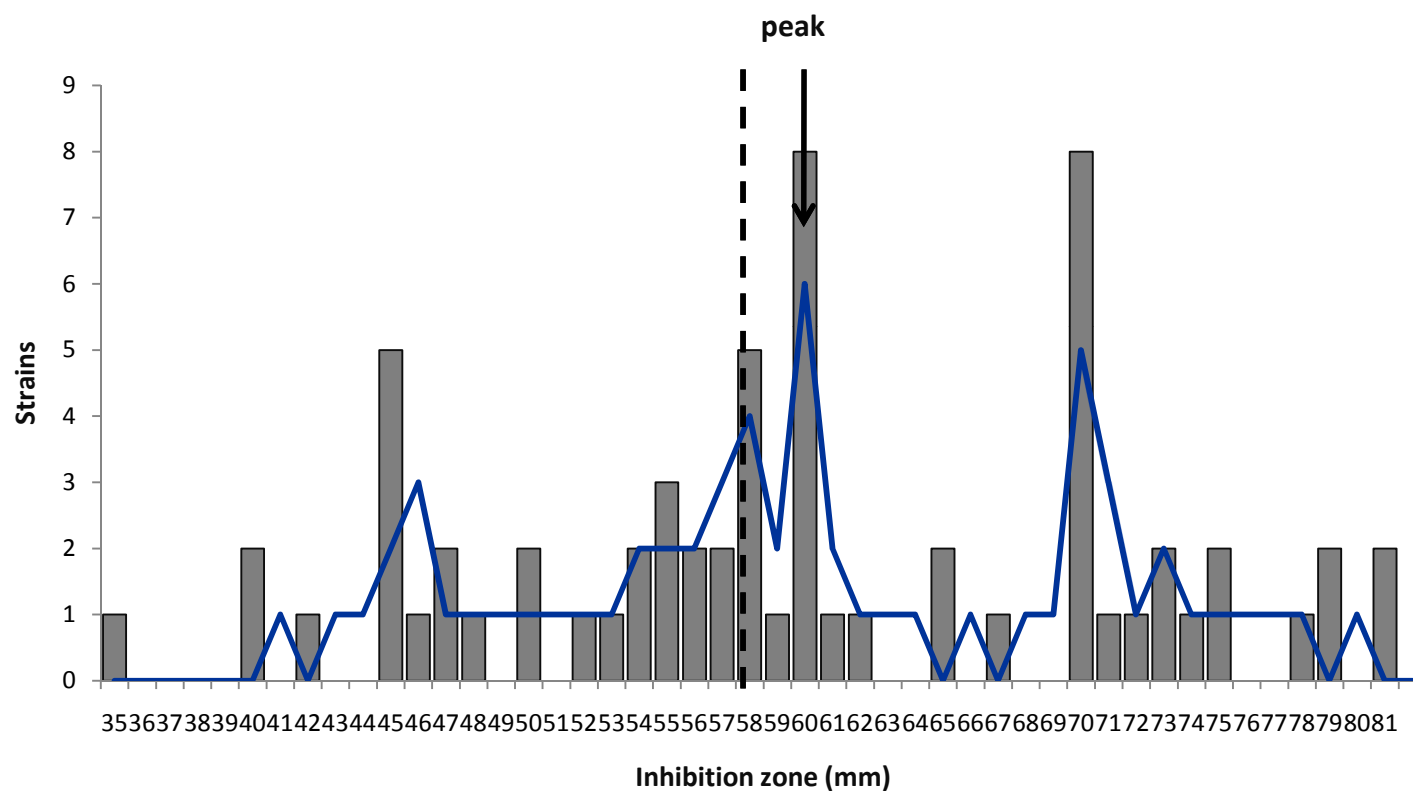
Mantiene la consistencia en los resultados a través del tiempo



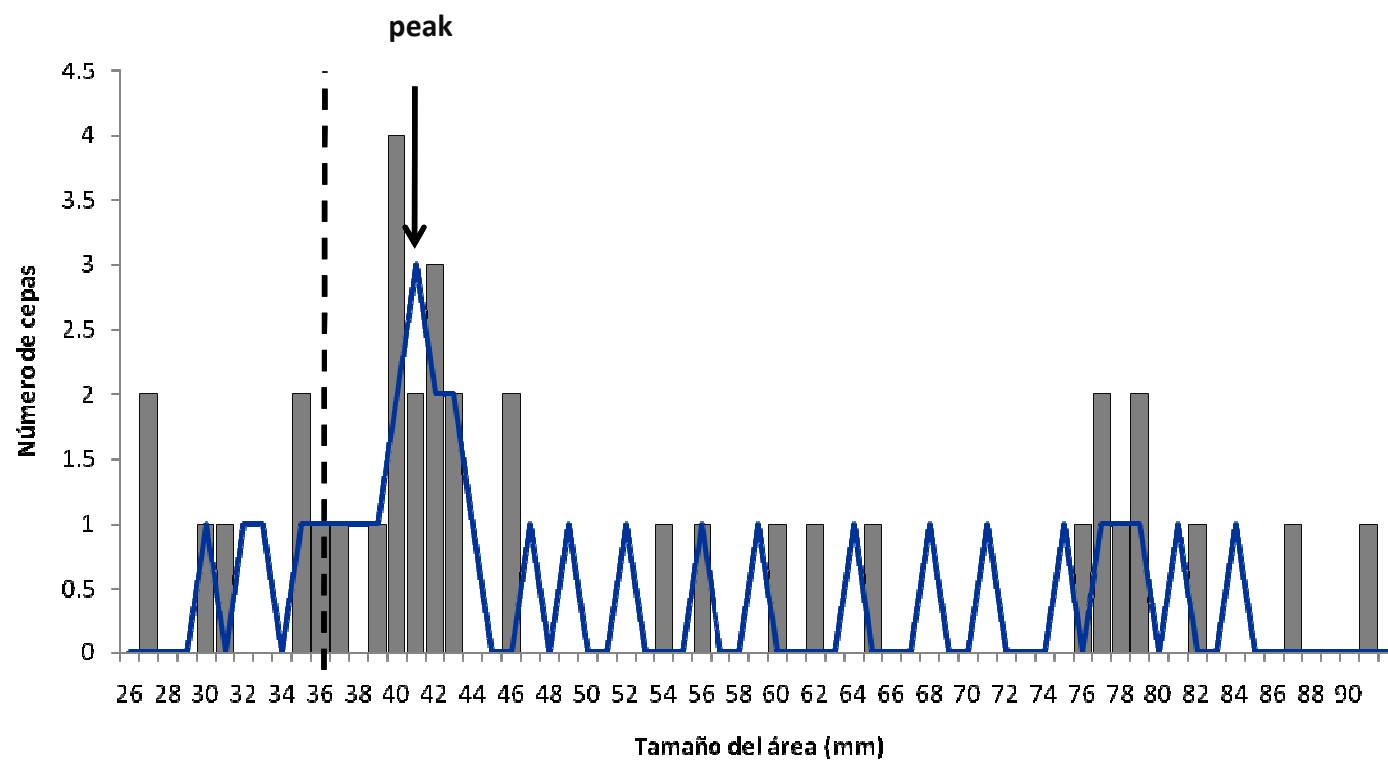
OXOLINIC ACID



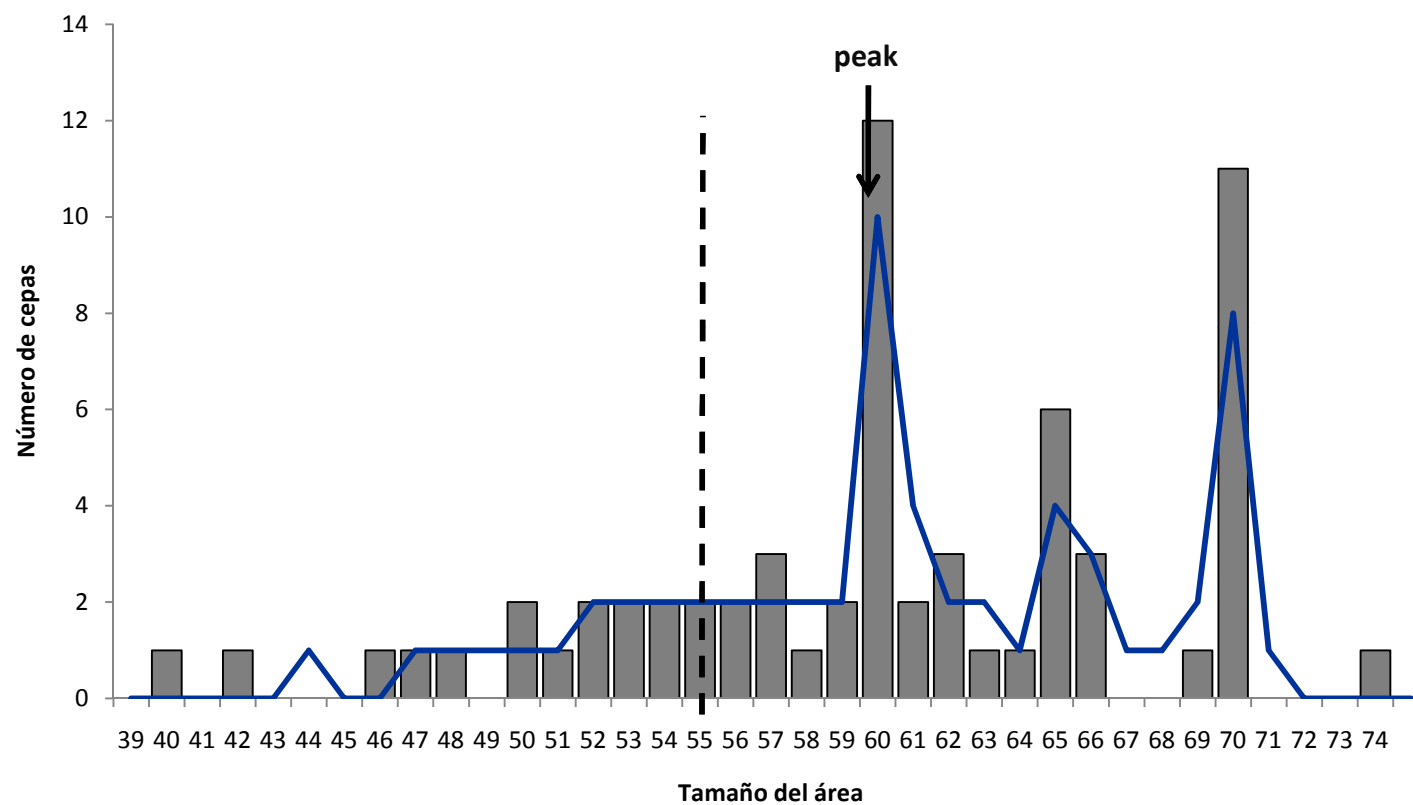
FLORFENICOL



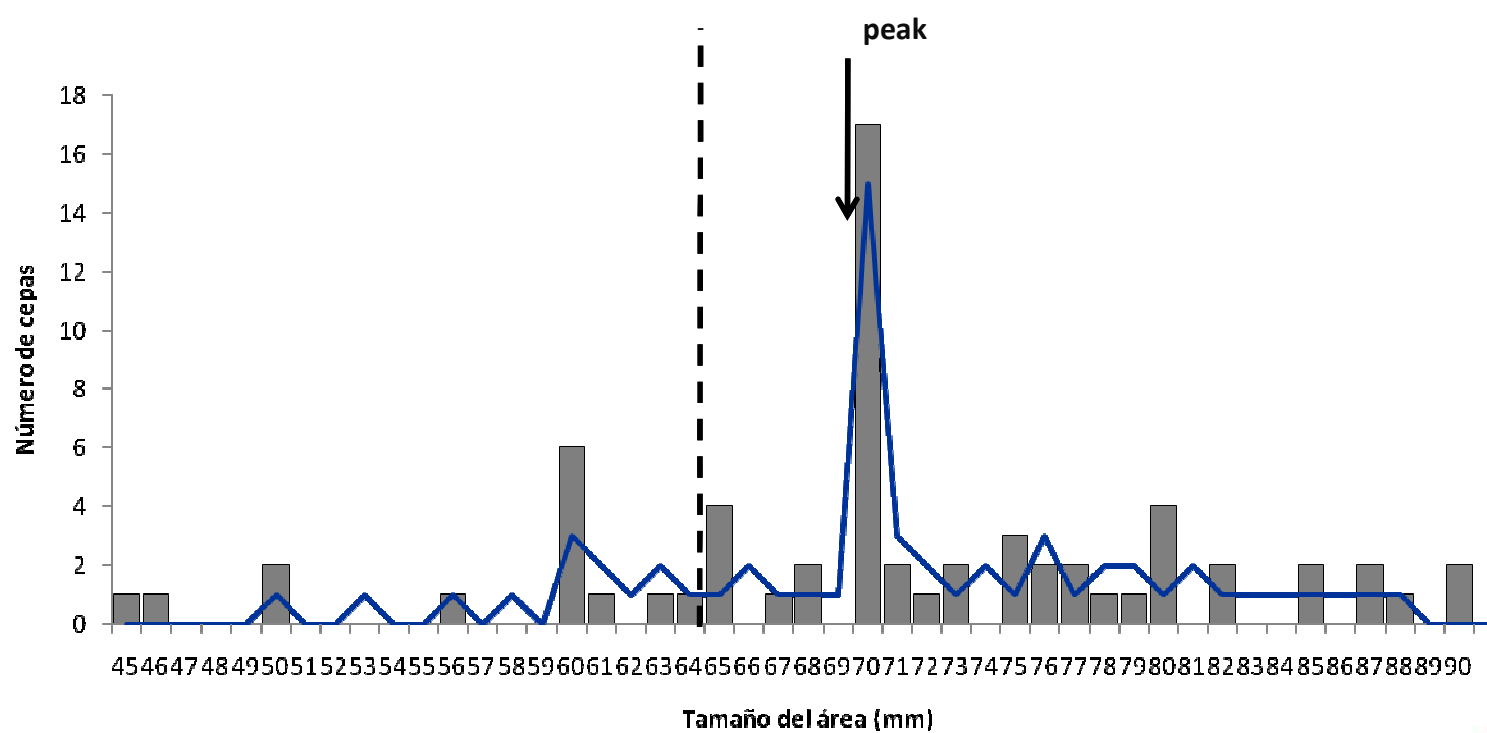
FLUMEQUINE



AMOXICILIN



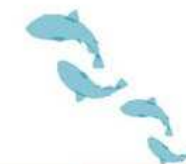
OXYTETRACYCLINE





Normalized Resistance Interpretation (NRI) for *Piscirickettsia salmonis* strains

Agent	Concentration (ug)	Strain number	Cut Off (mm)	WT (%)
Florfenicol	30	65	≥ 58	39(60)
Amoxicillin	25	65	≥ 56	49(75)
Oxolinic Acid	2	65	≥ 25	37(57)
Flumequine	30	65	≥ 54	34(52)
Oxytetracycline	30	65	≥ 65	51(78)



Con todos estos antecedentes, ¿cómo interpretamos los CO_{WT} ?

Asumimos que la terapia siempre tendrá una buena probabilidad de controlar una infección generada por una cepa WT (muy sensible)

Esto se cumple solo si dosis utilizada es adecuada y bien entregado en el tiempo





Aplicación de los CO_{WT}

Tamaño de la zona	$> CO_{WT}$	$< CO_{WT}$
Clasificación de la cepa	WT	NWT
Recomendación	Tratar	No tratar



Conclusiones



- ✓ La resistencia bacteriana es un fenómeno universal y transversal, debemos convivir con ella, y generar mecanismos de vigilancia y eventualmente control.
- ✓ A través del estudio efectuado se entrega una primera propuesta de definición de valores de corte para *P. salmonis*.
- ✓ Cada unidad o lab. debiese determinar sus propios valores de corte mediante este método, y de acuerdo a sus propias condiciones de trabajo.
- ✓ Se hace imprescindible la ejecución de acuerdos y pruebas inter-labs para avanzar en estas materias.
- ✓ El próximo paso es correlacionar estos datos con resultados de CMI para *P. salmonis* (en desarrollo).

Lo que necesitamos.....



- ✓ Deberemos generar un Programa Nacional de Monitoreo de la Resistencia Bacteriana, de acuerdo a lo definido por OIE.
- ✓ Aplicar métodos de acuerdo a la realidad de la industria salmonicultora nacional.
- ✓ Que los laboratorios puedan producir datos de susceptibilidad precisos y con un significado para los productores.
- ✓ Que los resultados se entreguen en los tiempos que permitan una influencia en las decisiones de tratamiento.
- ✓ Mejorar la comunicación y lenguaje técnico de lo que estamos entregando a los productores.



Agradecimientos



Departamento de Salud Hidrobiológica – IFOP

**Especialmente: BM Paola Olmos, Encargada de Laboratorios
Mic. Ma Eugenia Loy, Pruebas microbiológicas
MV Fernando Schulze, Análisis estadístico**



Agradecimientos



Dr. Peter Smith por su importante y continuo apoyo





Situación actual de la Evaluación de Susceptibilidad Bacteriana (ESB) en la Salmonicultura nacional

Sergio Contreras Lynch

Departamento Salud Hidrobiológica

Instituto de Fomento Pesquero - IFOP



FAQs



- ✓ ¿Puede o porqué no utilizan técnicas de BM para monitorear la resistencia bacteriana?
- ✓ A través del medio sólido utilizado, ¿pueden estar evaluando cepas seleccionadas o clones de la misma?
- ✓ ¿Existen métodos para evaluar resistencia bacteriana a través de cultivos celulares?

