



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EVALUACIÓN DEL FLORFENICOL COMO AGENTE
TERAPÉUTICO PARA EL CONTROL DE *Aeromonas* spp. EN
ESTURIONES RUSOS (*Acipenser gueldenstaedtii*)**

Alejandro Perretta

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2021**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EVALUACIÓN DEL FLORFENICOL COMO AGENTE
TERAPÉUTICO PARA EL CONTROL DE *Aeromonas* spp. EN
ESTURIONES RUSOS (*Acipenser gueldenstaedtii*)**

Alejandro Perretta

Dr. Gonzalo Suárez
Director de Tesis

Dra. Nora Mestorino
Co-directora de Tesis

2021

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Rodrigo Puentes; PhD
Departamento de Microbiología
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República - Uruguay

Gabriel Gutkind; PhD
Departamento de Microbiología, Inmunología y
Biotecnología
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires – Argentina - CONICET

Manuel Ibarra; PhD
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Química
Universidad de la República - Uruguay



Unidad de Posgrados -Oficina de Posgrados-

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Doctorado

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 19 de febrero de 2021

Tribunal: Dr. Rodrigo Puentes (Presidente), Dr. Gabriel Gutkind,
Dr. Manuel Ibarra

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
2.992.214-8	PERRETTA, Alejandro	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Rodrigo Puentes (Presidente)

FIRMA

Dr. Gabriel Gutkind

Dr. Manuel Ibarra

NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. – 6 o S.S.S. – 12

Dedicatoria

*A mis padres, Cristina y Rodolfo
quienes con su ejemplo de vida me han enseñado
a levantarme después de cada caída para seguir luchando
por mis objetivos, siempre con sinceridad y sin traicionar mis principios*

Agradecimientos

- A Gonzalo Suárez y Nora Mestorino, gracias por guiarme en este proceso y compartir conmigo tanto conocimiento.
- A Gonzalo Suárez, quién además de dirigir esta tesis me acompañó en cada paso y colaboró hombro a hombro en todas las actividades. Este doctorado me regaló un gran amigo.
- A Silvana Alvariza, gracias por la enorme colaboración que me brindaste en el laboratorio de Farmacología cuando las cosas no salían y no salían.
- A “la Peco” y “el Cabeza”, gracias por la paciencia y la colaboración en todas las actividades que llevé a cabo en el laboratorio de Farmacología.
- A Andrés Pérez, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y colaborar en la puesta a punto de algunas técnicas.
- A Daniel Conijeski y todo el personal de la empresa Esturiones del Río Negro, gracias por permitirme trabajar en el establecimiento y colaborar en todas las actividades que llevamos a cabo allí.
- A mi familia: Valeria, Anaclara, Federico; gracias por estar siempre a mi lado y brindarme tanto amor a pesar de que en ciertos momentos tenga que dedicarle más tiempo al trabajo que a ustedes

INDICE

Resumen	1
Summary	2
1. Introducción y antecedentes específicos	3
2. Planteamiento del problema	5
3. Hipótesis	8
4. Objetivo general	8
4.1. Objetivos específicos	8
5. Estrategia de la investigación	9
6. Capítulo I	
Perfil de resistencia a los antimicrobianos en bacterias patógenas aisladas de esturiones cultivados en Uruguay	10
7. Capítulo II	
Bases genéticas de la resistencia al florfenicol en <i>Aeromonas</i> spp. aisladas de peces cultivados en Uruguay	15
8. Capítulo III	
Farmacodinamia del FFL en <i>Aeromonas</i> spp.: efecto de la temperatura de cultivo y la resistencia genética al fármaco	20
9. Capítulo IV	
Farmacocinética del FFL en <i>Acipenser gueldenstaedtii</i> : efecto de la temperatura ambiente, la dosis y la vía de administración	33
10. Consideraciones finales	44
11. Referencias bibliográficas	45
Anexo 1	
Artículo 1: Sustento al Capítulo I de la tesis	54
Anexo 2	
Artículo 2: sustento al Capítulo I de la tesis	59
Anexo 3	
Artículo 3: sustento al Capítulo II de la tesis	76

RESUMEN

Nuestro país es el principal productor de esturiones del hemisferio sur y uno de los diez mayores productores de caviar a nivel mundial. En piscicultura, al igual que en otras producciones animales, el estrés que implican las condiciones intensivas de cultivo conlleva al desarrollo de enfermedades, hecho que se ve agravado para el caso de la cría de esturiones en Uruguay, debido al estrés térmico sufrido por estos animales de clima frío en los meses cálidos de la zona neotropical. El desarrollo de epizootias por *Aeromonas* spp. móviles es la principal enfermedad infecciosa que afecta esta producción en nuestro país. Dichos brotes han sido tratados de forma empírica con diversos antimicrobianos de entre los cuales el florfenicol (FFL) se destaca por haber resultado efectivo y ser uno de los tres únicos fármacos aprobados por la FDA. Tomando como hipótesis de trabajo que la no existencia de una terapéutica adecuada para el tratamiento de estas afecciones era un factor predisponente al desarrollo de resistencia antimicrobiana y que la temperatura ambiente jugaba un rol preponderante tanto en la farmacodinamia como en la farmacocinética de la droga, nos planteamos el objetivo general de establecer el perfil de resistencia a los antimicrobianos que presentan las bacterias patógenas que se aíslan de esturiones cultivados en Uruguay y realizar una caracterización farmacocinética/farmacodinámica del empleo de florfenicol en *Acipenser gueldenstaedtii* como agente terapéutico frente a *Aeromonas* spp., teniendo en cuenta la estacionalidad del cultivo. La determinación de perfiles de sensibilidad a distintos antimicrobianos de uso común en la piscicultura nacional permitió detectar la existencia de aislamientos fenotípicamente resistentes al FFL, los cuales a su vez son portadores del gen de resistencia a los anfenicoles *floR*. A partir de los estudios farmacodinámicos fue posible comprobar una relación directa entre la temperatura de cultivo de los microorganismos en estudio y el efecto inhibitorio del crecimiento del FFL, de manera tal que, a 15°C la concentración inhibitoria mínima (CIM) es de dos a seis veces menor que a 25° ó 35°C, lo que a su vez se ve reflejado en un aumento considerable en el diámetro del halo de inhibición. Por otra parte, a partir del estudio de la cinética de muerte bacteriana en presencia de FFL fue posible observar un efecto sinérgico entre el tiempo de exposición y la temperatura de cultivo, de modo tal que a temperaturas elevadas (25° a 35°C), el tiempo de exposición prolongado (24 a 48 horas) potencia el efecto del fármaco. Convalida la información los datos diferenciales obtenidos en la simulación de los perfiles y parámetros farmacocinéticos a diferentes temperaturas, vías de administración y posologías. La presente tesis plasma los aspectos más relevantes a la hora de instaurar la terapéutica con FFL en el control de *Aeromonas* spp. móviles en esturiones rusos en las condiciones que se realiza la piscicultura en Uruguay.

SUMMARY

Uruguay is the main producer of sturgeon in the southern hemisphere and one of the top ten caviar producers worldwide. In fish farming, as in other animal productions, the stress implied by the intensive farming conditions, leads to the development of diseases, a fact that is aggravated in the case of sturgeon's farming in Uruguay, due to the thermal stress suffered by these cold weather animals in the warm months of the neotropical region. The development of epizootics by motile *Aeromonas* spp. is the main infectious disease that affects this production in the country. These outbreaks have been empirically treated with various antimicrobials, among which florfenicol (FFL) stands out, both for being effective and for being one of the only three drugs approved by the FDA. Taking as a working hypothesis that the lack of an adequate therapeutics for the treatment of these conditions was a predisposing factor to the development of antimicrobial resistance and that temperature played a preponderant role in both the pharmacodynamics and the pharmacokinetics of the drug, we propose the general objective of establishing the antimicrobial resistance profiles of the pathogenic bacteria that are isolated from sturgeons from Uruguay and carrying out a pharmacokinetic/pharmacodynamic characterization of the use of FFL in *Acipenser gueldenstaedtii* as a therapeutic agent against *Aeromonas* spp., taking into account the seasonality also. The determination of sensitivity profiles to different antimicrobials commonly used in the Uruguayan aquaculture allowed us to detect the existence of isolates phenotypically resistant to FFL, which in turn are carriers of the *floR* gene. From the pharmacodynamic studies it was possible to verify a direct relationship between the culture temperature of the microorganisms under study and the growth inhibitory effect of the FFL, in such a way that, at 15°C, the minimum inhibitory concentration (MIC) is two to six times less than at 25° or 35°C, which in turn is reflected in a considerable increase in the zone diameter. On the other hand, from the study of the kinetics of bacterial kill in presence of FFL it was possible to observe a synergistic effect between the exposure time and the culture temperature, such that at high temperatures (25° to 35°C), the time prolonged exposure (24 to 48 hours) enhances the effect of the drug. The information is validated by the differential data obtained in the pharmacokinetic profiles and parameters at different temperatures and routes of administration. This thesis shows the most relevant aspects when establishing FFL therapy in the control of motile *Aeromonas* spp. in Russian sturgeon under the Uruguayan farming conditions.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El acelerado crecimiento de la población mundial durante el último siglo ha exigido el desarrollo de nuevas tecnologías en la producción agroindustrial para hacer frente a la demanda creciente de alimento, tanto para consumo humano como animal. En ese sentido, la acuicultura ha sido una de las actividades de producción animal que se ha expandido notoriamente en las últimas décadas, superando en ritmo de crecimiento anual (8%) al resto de las producciones animales. Teniendo en cuenta el desarrollo del sector y el colapso o sobreexplotación de muchas de las pesquerías comerciales a nivel mundial; en la actualidad, casi el 50% de los productos acuáticos que se consumen a nivel mundial provienen de la acuicultura (FAO, 2016).

Si bien la acuicultura no es la actividad pecuaria más representativa en Uruguay, la misma ha sido declarada de interés nacional por la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) en 1996, y a partir del año 2007 se ha implementado en nuestro país, con el apoyo de FAO, un "Plan Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura". El crecimiento de esta actividad en Uruguay se ha evidenciado por la instalación de varias pisciculturas a diferentes escalas y en distintas zonas del país, lo cual también refleja lo ocurrido a nivel mundial en los últimos años (Uruguay, 2008).

En la actualidad existen varios establecimientos de producción de peces ornamentales ubicados principalmente en Montevideo, a diferencia de los establecimientos de producción de peces para consumo humano que se localizan en el interior del país (Carnevia *et al.*, 2013). De las especies de peces con destino a la alimentación humana que se producen en Uruguay, se destaca ampliamente la cría de esturiones, ya sea por la inversión en infraestructura realizada en cada emprendimiento, como por los volúmenes de producción manejados. En 2018 se alcanzaron volúmenes de venta de alrededor de 6,5 toneladas de caviar y 73 toneladas de carne que superaron los dos millones de dólares (DINARA, 2018).

El cultivo de esturión se autorizó en nuestro país en el año 1994, momento a partir del cual se instala la primera piscicultura en aguas del Río Negro en el departamento de Durazno (localidad de Baygorria). En 2001 se logra la primera venta de caviar en el mercado regional y en 2002 se produce la primera exportación de caviar uruguayo a Estados Unidos. A partir de 2009 se instala una segunda empresa en San Gregorio de Polanco (Tacuarembó) y en el 2011 se instala una tercera empresa en Palmar (Flores). Las especies que se explotan en nuestro país son originarias de ríos y lagos de zonas frías de Asia y Europa, el esturión siberiano (*Acipenser baerii*), el esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) y el esturión sterlet (*Acipenser schrenckii*).

En la actualidad, los *Acipenseriformes* se encuentran en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) bajo la categoría amenazado. La pesca de captura y el comercio de sus productos está prohibido por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y

Flora Silvestres (*The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, CITES), aceptándose solamente productos procedentes de criaderos autorizados (Bronzi *et al.*, 2019).

Los dos productos obtenidos a partir del cultivo de esturión en nuestro país son el caviar y la carne, los cuales se destinan casi en su totalidad a la exportación. Nuestro país es el mayor productor de esturiones del hemisferio sur y el octavo productor mundial de caviar (Bronzi *et al.*, 2019). Según el último Boletín Estadístico Pesquero de DINARA, en el año 2014 la biomasa de esturiones en producción alcanzó los 600.250 kg, registrándose un volumen de faena de 190.000 kg de carne y 7.072 kg de caviar (DINARA, 2014; FAO, 2016).

Al igual que en otras producciones animales, en los establecimientos de piscicultura intensiva suelen ocurrir epizootias por diversos patógenos, dentro de los que se destacan por su prevalencia e importancia las bacterias Gram negativas (Austin y Austin, 2007). En nuestro país, las bacterias aeromonadales móviles (*Aeromonas* spp.) representan el grupo de patógenos que ha generado más problemas en el cultivo de esturión y otras pisciculturas, habiéndose diagnosticado epizootias con elevadas mortandades que han puesto en peligro la rentabilidad de zafra completas, además de representar un potencial problema de salud para los operarios de las piscigranjas debido al potencial zoonótico de estos microorganismos (Perretta *et al.*, 2007; Letamendía *et al.*, 2009).

Ante estos eventos y debido a la carencia de medidas profilácticas, los productores han recurrido al empleo de antimicrobianos, obteniendo resultados terapéuticos variables, debido, entre otras causas, al desconocimiento de la posología y a una escasa información con sustento farmacológico aplicado al cultivo de esturiones (carencia de estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos integrados). Esto conduce a la necesidad de profundizar el conocimiento de la terapéutica racional de los antimicrobianos en estos peces, considerando a su vez el riesgo de desarrollo de resistencia antimicrobiana, como un aspecto relevante a investigar para la Salud Animal y Pública.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la piscicultura mundial la administración masiva de antimicrobianos para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades bacterianas se ha asociado al desarrollo de resistencia antimicrobiana en varias especies de microorganismos (Cabello *et al.*, 2013). Las bacterias aeromonadales móviles representan uno de los principales problemas infecciosos para la piscicultura mundial de agua dulce. Debido al escaso desarrollo de medidas preventivas para las epizootias ocasionadas por este grupo de bacterias, históricamente se ha empleado el uso de antimicrobianos asociados al alimento (raciones medicadas); ya sea con una finalidad preventiva o como un tratamiento específico de infecciones desencadenadas (Austin y Austin, 2007). En nuestro país se reporta un elevado porcentaje de resistencia antimicrobiana en las cepas de aeromonadales móviles aisladas de organismos acuáticos de cultivo. Teniendo en cuenta que el 82,3% de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. son resistentes a tres o más antimicrobianos, es de esperar que los mismos provengan de ambientes con presión de selección por antimicrobianos (Perretta *et al.*, 2019).

La farmacodinamia de un antimicrobiano, en términos de efecto farmacológico, se puede evaluar determinando la mínima concentración efectiva requerida para inhibir el crecimiento bacteriano (CMI [efecto específico]), mientras que para la farmacocinética determinamos el estudio de los parámetros del proceso farmacocinético (C_{max} [Concentración máxima alcanzada], ABC [área bajo la curva concentración en función del tiempo], entre otros). La caracterización de ambas, desencadenan el estudio de modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD), los cuales permiten predecir e interpretar la evolución temporal de las concentraciones (*in vivo*) y el impacto de dichas concentraciones a nivel bacteriológico (CMI *in vitro*). El análisis integrado de los índices PK/PD que surgen de la interrelación de las concentraciones tisulares en función del tiempo y la CMI en los diferentes tejidos (C_{max}/CMI ; ABC/CMI y $T > CMI$ [tiempo en que la concentración se mantiene por encima de la CMI]), proporciona elementos para una mejor interpretación de los potenciales fenómenos de distribución tisular, eficacia y resistencia antimicrobiana a un fármaco en particular (Ahmad *et al.*, 2016; Mouton *et al.*, 2005).

En gran parte de las especies de peces cultivadas, existe desconocimiento de la farmacocinética y farmacodinamia de las diferentes formas farmacéuticas disponibles de antimicrobianos, siendo muchas de ellas utilizadas *off-label* sin una indicación para uso en peces (Smith *et al.*, 2008). Esto ha conducido al empleo de forma irresponsable, fuera de rótulo y sin una base de diagnóstico previo. A lo que se le suma la carencia de la industria de la piscicultura de contar con una amplia gama de productos aprobados para un importante número de especies y enfermedades en piscicultura (FAO, 2016).

Teniendo en cuenta esto, la FDA, autoriza el uso en acuicultura únicamente a los antimicrobianos Dihidrato de Oxitetraciclina (uso en el alimento o por aplicación en

inmersión), Florfenicol (uso en alimento) y Sulfadimetoxine/Ormetoprim (uso en alimento). Hasta el momento la aplicación de los antimicrobianos que realizan los piscicultores en nuestro país, se ha basado en el conocimiento empírico y en la disponibilidad/accesibilidad de productos veterinarios comerciales registrados en el Uruguay o en la región.

A partir del año 2015 los productos derivados de la acuicultura nacional integran el "Programa Nacional de Residuos Biológicos" del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, según resoluciones N° 076/2015 y 077/2015 de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA); esto implica que todos los establecimientos de acuicultura habilitados deben declarar los específicos zooterápicos que emplean, especificando nombre comercial, principio activo, volumen utilizado y circunstancias de empleo, así como también mantener la trazabilidad indicando el número de registro del específico en el Departamento de Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino" (DILAVE).

Teniendo en cuenta la factibilidad de disponer de formulaciones registradas en Uruguay, sumado al sustento técnico que aportan los estudios de resistencia antimicrobiana realizados sobre las cepas bacterianas aisladas en los últimos 10 años en la acuicultura nacional (Carnevia *et al.*, 2013; Perretta *et al.*, 2019) y en base a la complementariedad de las recomendaciones internacionales, se detectó que el empleo de la familia de los anfenicoles podría presentar un potencial beneficio como herramienta terapéutica para esta rama de la producción animal.

Florfenicol (FFL) es la principal molécula representante de la familia de los anfenicoles. Se destaca como principales acciones el efecto antimicrobiano bacteriostático y un amplio espectro sobre microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. A pesar de pertenecer a la misma familia y poseer un rango de actividad similar al del cloranfenicol, FFL presenta como ventaja el carecer de riesgo de inducir anemia por aplasia medular en el hombre y una mayor actividad frente a cepas resistentes al cloranfenicol. En la actualidad, se encuentra disponible en diversos países para su administración oral en piscicultura (Florfenicol 50%, Aqua-Flor®, MSD, México), siendo este a su vez uno de los antibióticos de amplio espectro aceptados por EMA y FDA para uso en piscicultura.

La dosis recomendada para administración oral es de 10 mg/kg de peso vivo/día durante 10 días (FDA, 2008). La biodisponibilidad a la dosis oral de 10 mg/kg a una temperatura de 10°C alcanza el 96,5%, con una vida media de 12,2 horas en el salmón (Martinsen *et al.*, 1993). En truchas el tiempo medio de residencia es de 21 horas alcanzando una C_{max} de 3,23 µg/ml (Pinault, 1997). Sugiriendo que para mantener concentraciones efectivas para los principales patógenos en peces, incrementos de dosis de 20-30 mg/kg cada 24 horas serían las indicaciones recomendadas.

Si bien la información que existe al respecto en *Acipenseriformes* es escasa, Wang *et al.* (2012) reportaron que con la administración de 15 mg/kg (incremento del 50% de

la dosis sugerida) por vía oral a 22°C, la vida media se alcanza a las 31,2 horas, con valores de $C_{\max}$ y Volumen de distribución de 3,4 µg/ml y de 3,2 L/kg, respectivamente. Una dosis similar de 15 mg/kg por vía oral durante 12 días, fue también sugerida para ser utilizada en cultivos de Tilapia (Gaikowski *et al.*, 2010). Lo que indica claramente, que existen importantes diferencias de acuerdo a la especie, temperatura del cultivo y posología empleada en la terapéutica del FFL en piscicultura.

3. HIPÓTESIS

Existen aislamientos resistentes a los antimicrobianos de uso común en piscicultura entre las bacterias patógenas que afectan a los esturiones que se cultivan en Uruguay

Los parámetros farmacodinámicos del florfenicol en *Aeromonas* spp. son afectados por la temperatura de cultivo y la acción de proteínas codificadas en genes de resistencia específicos

Los parámetros farmacocinéticos del florfenicol en *Acipenser gueldenstaedtii* son afectados por la vía de administración y la temperatura de cultivo.

4. OBJETIVOS GENERAL

Establecer el perfil de resistencia a los antimicrobianos que presentan las bacterias patógenas que se aíslan de esturiones cultivados en Uruguay y realizar una caracterización farmacocinética/farmacodinámica del empleo de florfenicol en *Acipenser gueldenstaedtii* como agente terapéutico frente a *Aeromonas* spp., teniendo en cuenta la estacionalidad del cultivo.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1.1. Establecer el perfil de resistencia a los antimicrobianos de uso común en piscicultura en un número representativo de aislamientos de los principales patógenos que afectan a los esturiones cultivados en Uruguay.

4.1.2. Identificar los mecanismos genéticos de resistencia al FFL que poseen los aislamientos de *Aeromonas* spp. que se obtienen de esturiones cultivados en Uruguay.

4.1.3. Establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de FFL en aislamientos de *Aeromonas* spp. sensibles y resistentes al fármaco y determinar el efecto de la temperatura de cultivo sobre las mismas.

4.1.4. Determinar el efecto del FFL y la temperatura de cultivo sobre la cinética de crecimiento bacteriano en *Aeromonas* spp. sensibles y resistentes al fármaco.

4.1.5. Desarrollar y validar la metodología analítica para la detección y cuantificación de FFL en suero de *Acipenser gueldenstaedtii* por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

4.1.6. Caracterizar la farmacocinética del FFL en *Acipenser gueldenstaedtii* y determinar el efecto que tiene la temperatura ambiente, la dosis y la vía de administración sobre los principales parámetros farmacológicos.

4.1.7. Establecer los parámetros del modelo PK/PD del FFL en *Acipenser gueldenstaedtii* a diferentes vías de administración y temperaturas de cultivo.

5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se abordó en cuatro etapas sucesivas, de modo tal que la información generada en una etapa sirvió de antecedente y sustento para la ejecución de la experiencia siguiente.

En la **primera etapa** se evaluó la necesidad de ajustar los modelos terapéuticos que se están empleando en la piscicultura nacional a partir de la determinación de perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias patógenas aisladas de esturiones de cultivo, suponiendo que los esquemas terapéuticos inadecuados podrían estar favoreciendo el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. Para ello se realizó antibiograma en 59 aislamientos, obtenidos entre 2010 y 2020, de los dos principales grupos de bacterias patógenas que afectan estos peces en nuestro país (*Aeromonas* spp. y *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis*).

Tomando como modelo de trabajo a las especies del género *Aeromonas* y al antimicrobiano florfenicol, en una **segunda etapa** de trabajo se realizaron estudios *in silico* e *in vitro* para determinar tanto la presencia/ausencia de genes de resistencia al FFL como los principales parámetros farmacodinámicos de este fármaco en este grupo bacteriano, teniendo en cuenta la influencia de la temperatura de cultivo y la resistencia al FFL.

La **tercera etapa** consistió en la realización de estudios *in vivo* con esturiones de producción en las instalaciones de la piscigranja *Black River Caviar*. A los animales se les administró FFL por vía intravenosa, intraperitoneal y oral para determinar la farmacocinética de la droga mediante cuantificación de la droga en suero obtenido a partir de sangrados seriados entre las 0 y 96 horas del tratamiento a dosis única. Esta experiencia se implementó por duplicado, en invierno y verano, para determinar los efectos de la temperatura ambiente sobre la cinética del fármaco.

Por último, en la **cuarta etapa**, se confeccionó un modelo informático integrando los datos farmacodinámicos y farmacocinéticos para la estimación del esquema terapéutico ideal para el control de *Aeromonas* spp. en *Acipenser gueldenstaedtii*.

6. CAPÍTULO I

Perfil de resistencia a los antimicrobianos en bacterias patógenas aisladas de esturiones cultivados en Uruguay

Este capítulo de sustenta en las siguientes publicaciones:

- Perretta, A.; Antúnez, K. y Zunino, P. 2019. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias aeromonadales móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo). 55:4-8.
- Perretta, A.; Quartiani, N. y Suárez, G. 2020. Antimicrobial resistance profiles in pathogenic bacteria isolated from sturgeons cultured in Uruguay. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*, sometido en Diciembre 2020.

Hipótesis

Existen aislamientos resistentes a los antimicrobianos de uso común en piscicultura entre las bacterias patógenas que afectan a los esturiones que se cultivan en Uruguay

Objetivo

Caracterizar los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de un número representativo de aislamientos de *Aeromonas* spp. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) obtenidos entre los años 2010 y 2020 muestreos de esturiones de la acuicultura uruguaya

Materiales y Métodos

Se emplearon un total de 40 aislamientos de *Aeromonas* spp. (*A. allosaccharophila* 2.5%, *A. bestiarium* 2.5%, *A. caviae* 2.5%, *A. hydrophila* 67.5%, *A. punctata* 10% y *A. veronii* 15%) y 19 aislamientos de SDSE. Los mismos se obtuvieron entre 2010 y 2020 de órganos internos (principalmente cerebro y riñón anterior) de esturiones enfermos o asintomáticos del género *Acipenser* (*Acipenser baerii*, *Acipenser gueldenstaedtii* y *Acipenser schrenkii*) cultivados en Uruguay. Después de una identificación fenotípica primaria empleando los kits API 20NE® y API 20Strep® (BioMerieux), los aislamientos de *Aeromonas* spp. y de SDSE se identificaron genéticamente mediante secuenciación y BLAST de los genes *gyrB* (Yañez *et al.*, 2003) y ARNr 16S (Yang y Li, 2009) respectivamente. Se determinó la sensibilidad a los antimicrobianos ampicilina (AMP, 10 µg), enrofloxacin (ENO, 30 µg), eritromicina (ER, 15 µg), florfenicol (FL, 30 µg), oxitetraciclina (OT, 30 µg) y sulfametoxazol-trimetoprima (SXT 19: 1) por el método de difusión en disco, siguiendo el manual VET03/VET04-S2 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Los criterios de sensibilidad para *Aeromonas* se tomaron del manual CLSI M45 (CLSI, 2015a) y para SDSE, del manual CLSI M100-S25 (CLSI, 2015b). Las cepas tipo *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966®, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658® y *Escherichia coli* ATCC 25922® se utilizaron como control de calidad en todos los ensayos.

Complementariamente se determinó el índice de multirresistencia (MAR), calculado como la relación entre el número de antimicrobianos a los que un aislamiento es

susceptible y el número de antimicrobianos evaluados para el aislamiento. Valores del índice MAR mayores o iguales a 0,2 son indicativos de aislamientos con un alto riesgo de proceder de ambientes donde se hace uso habitual de antimicrobianos (Krumperman, 1983).

La significancia de las diferencias entre los perfiles de susceptibilidad y entre los índices MAR se estableció mediante un Test de Chi-cuadrado con un nivel de confianza del 95%. El cálculo de *odds ratio* se estableció entre la razón de probabilidad de ocurrencia de cepas susceptibles/resistentes entre *Aeromonas* spp. y SDSE. Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* R versión 4.0.3 (RStudio Inc.).

Resultados

El porcentaje de aislamientos que son genéricamente resistentes o susceptibles a los antimicrobianos utilizados en este estudio se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1: Porcentaje de aislamientos de *Aeromonas* spp. y *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* (SDSE) obtenidos de esturiones cultivados en Uruguay y que son genéricamente susceptibles y resistentes a los antimicrobianos

	Perfiles de susceptibilidad			Odds Ratio Perfiles		
	N	<i>Aeromonas</i> spp. N=141 ¹	SDSE N=110 ¹	p-valor ²	OR ³	95% IC ³
Perfiles	251			0.007		
Resistente		28 (19%)	36 (33%)			
Susceptible		113 (81%)	74 (67%)			
Aislamientos						
<i>Aeromonas</i> spp.					—	—
SDSE					0,47	0,28: 0,80

¹Estadístico presentado: número de halos de inhibición (%)

²Tests estadístico realizado: test de independencia Chi-cuadrado

³OR = Odds Ratio, IC=intervalo de confianza

El número de aislamientos de SDSE resistentes (33%) es comparativamente más alto que el de *Aeromonas* spp. (19%) (p=0,007). Teniendo en cuenta que la probabilidad de ocurrencia de un aislamiento de *Aeromonas* spp. es 47% menor a la de probabilidad de ocurrencia de un aislamiento de SDSE (p=0,005), es de esperar que la probabilidad de ocurrencia de resistencia en SDSE sea aproximadamente del doble de la probabilidad de encontrar resistencia en *Aeromonas* spp.

Ninguno de los antimicrobianos utilizados fue completamente eficaz frente a todos los aislamientos de *Aeromonas* evaluados, destacándose que enrofloxacin fue el más efectivo (89%) y florfenicol el menos efectivo (73%) contra estas bacterias (tabla 2).

Table 2: Perfiles de resistencia a los antimicrobianos en *Aeromonas* spp. aisladas de esturiones de cultivo

	N	Perfiles de susceptibilidad en <i>Aeromonas</i> spp.			
		ENO, N=36 ¹	FL, N=33 ¹	OT, N=37 ¹	SXT, N=35 ¹
Perfiles	141				

Resistente	4 (11%)	9 (27%)	8 (22%)	7 (20%)
Susceptible	32 (89%)	24 (73%)	29 (78%)	28 (80%)

¹ Estadístico presentado: número de halos de inhibición (%)

ENO: enrofloxacin, FL: florfenicol, OT: oxitetraciclina y SXT: sulfametoxazole-trimetoprim.

A su vez, todos los aislados de SDSE fueron susceptibles a enrofloxacin y sulfametoxazole-trimetoprim, mientras que ampicilina y oxitetraciclina fueron los antimicrobianos menos efectivos frente a este microorganismo (68% de aislamientos resistentes) (tabla 3).

Table 3: Perfiles de resistencia a los antimicrobianos en *Streptococcus dysgalactiae* subespecies *dysgalactiae* aislados de esturiones de cultivo

	N	Perfiles de susceptibilidad en SDSE					
		AMP, N=19 ¹	ENO, N=19 ¹	ER, N=19 ¹	FL, N=15 ¹	OT, N=19 ¹	SXT, N=19 ¹
Perfiles	110						
Resistente		13 (68%)	0 (0%)	5 (26%)	5 (33%)	13 (68%)	0 (0%)
Susceptible		6 (32%)	19 (100%)	14 (74%)	10 (77%)	6 (32%)	19 (100%)

¹ Estadístico presentado: número de halos de inhibición (%)

AMP: ampicilina, ENO: enrofloxacin, ER: eritromicina, FL: florfenicol, OT: oxitetraciclina and SXT: sulfametoxazole-trimetoprim.

El porcentaje de aislamientos de SDSE multirresistentes fue 1,76 veces mayor que el de *Aeromonas* spp. ($p < 0,001$) y la probabilidad de encontrar un aislamiento de SDSE multirresistente fue 4,85 veces mayor que la de encontrar uno de *Aeromonas* spp. ($p < 0,001$) (tabla 4). Los valores de control de calidad estuvieron dentro del rango apropiado para CLSI.

Table 4. Índices de multirresistencia a los antimicrobianos (MAR) en aislamientos de *Aeromonas* spp. y *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* (SDSE) obtenidos de esturiones de cultivo

	N	Aislamientos multirresistentes (MAR>0.2)			Odds Ratio MAR	
		<i>Aeromonas</i> spp., N=40 ¹	SDSE, N=19 ¹	p-valor ²	OR ³	p-valor
MAR	59	18 (45%)	15 (79%)	<0.001		
Aislamientos						
<i>Aeromonas</i> spp.					—	—
SDSE					4.85	2.91, 8.35

¹ Estadístico presentado: número de aislamientos multirresistentes (% del total)

² Test estadístico realizado: test de independencia Chi-cuadrado

³ OR = Odds Ratio, IC = intervalo de confianza

Discusión

El desarrollo acelerado que ha tenido el cultivo de esturiones en los últimos años no ha sido acompañado por la generación de conocimiento en algunas áreas clave, tales como la terapéutica. En este sentido, y a pesar de que las enfermedades infecciosas han sido reconocidas como la principal limitación para el desarrollo de esta industria (Mugetti *et al.*, 2020), se destaca la escasez de información sobre terapia antimicrobiana y resistencia bacteriana.

Según nuestros hallazgos, entre el 20% y el 30% de las bacterias aisladas de esturiones de cultivo son resistentes a algún antimicrobiano, lo que no solo afecta la

efectividad de los tratamientos metafilácticos, incluso podría impactar el microbioma natural del medio ambiente, tanto en el entorno como a distancia de la piscigranja (Cabello et al., 2013).

El impacto ambiental del uso de antimicrobianos en esta producción acuática se podría apreciar también en el elevado número de aislamientos multirresistentes encontrados (45-79%), ya que un aislamiento multirresistente es aquel que proviene de ambientes con uso habitual de antimicrobianos. La misma situación podría estar ocurriendo con el microbioma en sedimentos, columna de agua y/o en organismos vivos que ocupen el mismo cuerpo de agua, ya que todos estarían sujetos a la misma presión de selección. En este sentido, cabe señalar que la transferencia horizontal de genes entre microorganismos en el medio acuático es extremadamente habitual e incluye algunos mecanismos muy dispersivos, tales como el transporte de ADN desnudo por corrientes de agua (Domingues *et al.*, 2012).

En relación a esto, y destacando la importancia de este tema para la salud, Reverter *et al.* (2020) encontraron recientemente una fuerte correlación entre los índices MAR de la acuicultura y los índices MAR de aislamientos clínicos de humanos, lo que sugiere que el consumo de antimicrobianos por parte de los seres humanos, el ganado y la acuicultura contribuye a un *pool* común de resistencia a los antimicrobianos.

La estreptococosis es una enfermedad emergente en la acuicultura con una alta mortalidad de animales susceptibles (> 50%) causada por un grupo de bacterias zoonóticas (Osman et al., 2017). Si bien las principales especies descritas como patógenos de peces son *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* (Shoemaker *et al.*, 2017), la importancia de SDSE ha aumentando en las últimas décadas tanto para mamíferos como para peces (Abdelsalam *et al.*, 2013), incluidos los esturiones (Yang y Li, 2009; Salogni *et al.*, 2010).

A pesar de esto, casi no hay información sobre la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de SDSE obtenidos de peces. En dos reportes provenientes de criaderos de esturiones de China e Italia, Yang y Li (2009) y Salogni *et al.* (2010), encontraron aislamientos de SDSE sensibles a anfenicoles, cefalosporinas, penicilinas, quinolonas y sulfametoxazol-trimetoprim y resistentes a aminoglucósidos y tetraciclinas. Estos perfiles de resistencia, en parte de acuerdo con nuestros hallazgos, son similares a los encontrados en aislamientos de SDSE obtenidos de pacientes humanos de Japón y Taiwán (Ikebene *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007).

La septicemia de *Aeromonas* móviles es una de las enfermedades infecciosas más comunes en los esturiones (Santi *et al.*, 2018). Este grupo bacteriano, también zoonótico y altamente asociado al agua, ha sido severamente afectado en las últimas décadas debido a la presencia de antimicrobianos en aguas residuales y de la acuicultura (Janda y Abbott, 2010). Varios genes de resistencia clínicamente relevantes tienen su origen en bacterias acuáticas [p.ej. *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac[6']*-

Ib-cr, *mef* (C), *mef* (G), *tet* (G)], destacando que, el gen emergente *floR*, ampliamente diseminado en patógenos humanos (Santos y Ramos, 2018), ha sido hallado por nosotros en algunos de los aislamientos de *Aeromonas* spp. utilizados en este estudio (datos no publicados).

Si bien los reportes de sensibilidad a los antimicrobianos son más abundantes para *Aeromonas* aisladas de esturiones que los correspondientes a SDSE, en la información existente no se aprecia un patrón de resistencia claro, compartido por diferentes granjas, aunque la resistencia a penicilinas y tetraciclinas y la sensibilidad a anfenicoles, cefalosporinas y quinolonas parecen ser una constante entre varios autores (Meng *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2015; Ture *et al.*, 2018; Ranjbar *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta que tanto el florfenicol como el sulfametoxazol-trimetoprim son antimicrobianos aprobados por la FDA para su uso en acuicultura, y que, según nuestros resultados, tienen una eficacia de entre el 73% y el 100% frente a los principales patógenos del esturión, su uso podría ser recomendado, aunque cabe señalar que la falta de estudios farmacométricos en esturiones imposibilita determinar la efectividad de estas terapias.

Es importante resaltar que la necesidad del uso de antimicrobianos en la acuicultura debe ir acompañada de estudios tanto farmacológicos como ambientales, de manera tal que permitan minimizar los efectos nocivos del uso de los mismos tanto para la industria como para la salud.

7. CAPÍTULO II:

Bases genéticas de la resistencia al florfenicol en *Aeromonas* spp. aisladas de peces cultivados en Uruguay

Este capítulo de sustenta en las siguiente publicacion:

- Perretta, A.; Mestorino, N. y Suárez, G. 2020. *floR* mediated florfenicol resistance in motile *Aeromonas* and its effect on the zone diameter cut off value. Journal of Applied Microbiology, sometido en Diciembre 2020.

Hipótesis

La resistencia fenotípica al florfenicol que presentan algunos aislamientos de *Aeromonas* spp. provenientes de peces cultivados en Uruguay, es debida a que pueden evadir la acción del fármaco mediante proteínas específicas que son codificadas en su genoma, a diferencia de lo que ocurre con los aislamientos fenotípicamente susceptibles.

Objetivos

Determinar la presencia/ausencia del gen *floR* en aislamientos de *Aeromonas* spp. fenotípicamente sensibles y resistentes al florfenicol obtenidos de peces cultivados en Uruguay y su relación con el diámetro de halo de inhibición.

Materiales y Métodos

Origen de los aislamientos

Se emplearon un total de 33 aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de peces cultivados en Uruguay, previamente identificados y caracterizados (Perretta *et al.*, 2018) (*A. allosaccharophila* 2.5%, *A. bestiarium* 2.5%, *A. caviae* 2.5%, *A. hydrophila* 67.5%, *A. punctata* 10% y *A. veronii* 15%).

Análisis moleculares

Se extrajo ADN de todos los aislamientos analizados mediante el empleo del *kit DNEasy Blood and Tissue*® de Qiagen según especificaciones del fabricante y se amplificó el gen 16S ARNr de cada extracción para corroborar el procedimiento y poner a punto la técnica. La presencia/ausencia del gen de resistencia al florfenicol, *floR*, se determinó por PCR en todos los aislamientos mediante el empleo de dos juegos de *primers* en reacciones independientes con el fin de asegurar la cobertura ya que se emplean dos familias bacterianas diferentes. Entonces, de acuerdo con Gordon *et al.* (2008) se utilizó el juego de *primers*: *floR1* (5'-CCCGCTATGATCCAACTCAC-3') y *floR2* (5'-ACCCACATCGGTAGGATGAA-3') desarrollados para miembros de *Aeromonadaceae* (803 pb del tamaño esperado de amplicón) y *FLO1* (5'-AATCACGGTGCCACGCT-3') y *FLO2* (5'-CGCCGTCATTCTTCACCTTC-3') desarrollado por Bolton *et al.* (1999) para miembros de *Enterobacteriaceae* (215 pb). Se consideró un aislamiento como no portador del gen *floR* cuando se obtuvieron resultados negativos en tres PCR independientes (electroforesis en gel de agarosa al

1%, teñido con Gelred®). Las dos hebras de cada amplicón obtenido fueron secuenciadas por MacroGen™. La edición y el ensamblaje se realizaron utilizando el software MegaX (Stecher *et al.*, 2020) y la identidad de cada secuencia consenso se determinó mediante BLASTp®.

Perfil de susceptibilidad al florfenicol

Se determinó el perfil de susceptibilidad al florfenicol para cada uno de los aislamientos de campo y cepas tipo mediante el método de difusión en placa según protocolo del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014) empleando una temperatura de cultivo de 25°C. Las cepas tipo *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966®, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658® y *Escherichia coli* ATCC 25922®, se emplearon como control de calidad de las técnicas de laboratorio y control negativo en las técnicas moleculares.

Con los datos obtenidos se calculó el punto de corte *wild type* (COWt) para esta población bacteriana por el método de Interpretación Normalizada de la Resistencia (NRI) (Kronvall *et al.*, 2003) mediante el empleo del *software Automatic_NRI-disc diffusion_V01β.xlsm*. El NRI calcula el COWt basándose en el hecho de que el histograma de diámetros de halos de inhibición, para cualquier población normal y susceptible, de cualquier especie bacteriana, no se ve afectado por la presencia de bacterias resistentes dentro del mismo histograma.

Resultados

A partir de la amplificación del gen 16S ARNr se puso a punto la PCR para las 36 extracciones de ADN realizadas. El gen *floR* fue detectado únicamente en los aislamientos de *Aeromonas hydrophila* H8 (número de acceso: MF629149) y H9 (MF629148) y el aislamiento de *Aeromonas veronii* V3 (MF629678).

El aislamiento H8 se obtuvo de *Poecilia reticulata* (guppy), H9 se aisló de *Acipenser gueldenstaedtii* (esturión ruso) y V3 fue aislado de *Acipenser baerii* (esturión siberiano).

En la figura 1 se muestra una corrida electroforética donde se aprecian los amplicones obtenidos a partir del empleo de los *primers* descritos por Gordon *et al.* (2008) para Aeromonadacea.

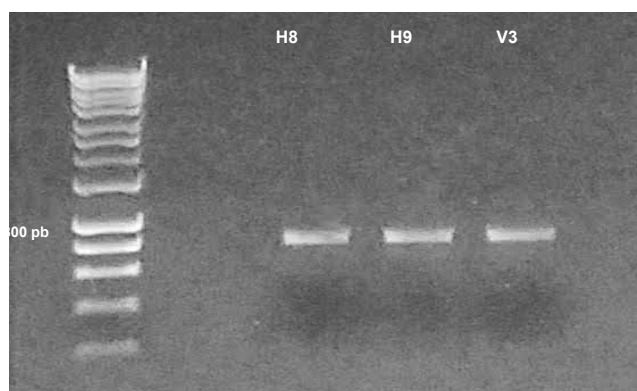


Figura 1: Corrida electroforética en la que se aprecian los amplicones obtenidos de la PCR con *primers* específicos para el gen *floR* en aislamientos de *Aeromonas hydrophila* (H8 – H9) y *A. veronii* (V3) (agarosa al 1%).

Las secuencias obtenidas a partir de estos amplicones (724 nucleótidos) coincidieron en un 100% con otras secuencias del gen *floR* depositadas en el GenBank. Los números de acceso para las secuencias generadas a partir de este estudio son: MT375487 para el aislamiento H8, MT375488 para H9 y MT375489 para V3. Las secuencias de *floR* de H8 y H9 son idénticas entre sí y difieren en un único nucleótido cuando se comparan con la secuencia de V3 (sustitución de A por G en la posición 545), lo que implicaría la sustitución del aminoácido Ala por Gly en la proteína transcripta.

En la tabla 1 se presentan los resultados del análisis de susceptibilidad al florfenicol realizado sobre los aislamientos analizados.

Tabla 1: Perfiles de sensibilidad al florfenicol en aislamientos de *Aeromonas* spp. que poseen (H8, H9 y V3) y carecen del gen *floR* (Sensibles y cepas tipo)

Aislamientos	<i>floR</i>	DH (mm)	
		Media $\pm$ de	Moda; rango
<i>Aeromonas</i> spp.	No	31,0 $\pm$ 3,8	30; 23-39
H8 – H9 – V3	Si	8,6 $\pm$ 0,8	8; 8-10
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966®	No	30,3 $\pm$ 0,6	30; 30-31
<i>A. s. salmonicida</i> ATCC 33658®	No	29,7 $\pm$ 0,6	30; 29-30
<i>E. coli</i> ATCC 25922®	No	24,0 $\pm$ 1,7	23; 23-26

DH: diámetro de halo de inhibición
de: desvío estándar

El punto de corte calculado por el método NRI es: $COwt \geq 29$ mm. En dicho cálculo se incluyeron todos los aislamientos de campo (incluidos los *floR*⁺) y se exceptuaron las cepas tipo (n=82 halos de inhibición). En la figura 2 se muestran los histogramas de frecuencias para la población de datos con (a) y sin (b) la inclusión de los aislamientos resistentes, nótese cómo el %NRI no se ve afectado. La media de la distribución NRI es de 35,5 $\pm$ 2,5 mm (diámetro de halo de inhibición $\pm$ desvío estándar).

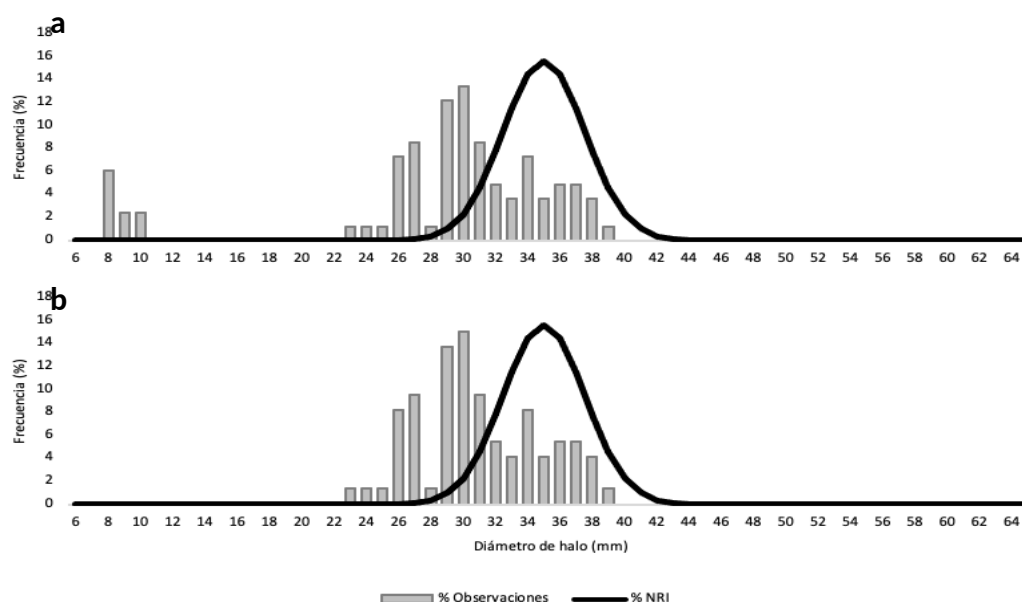


Figura 2: Histogramas donde se presentan frecuencias de diámetros de halos de inhibición de florfenicol en aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de peces cultivados en Uruguay. **a:** población de aislamientos sensibles y resistentes, **b:** únicamente aislamientos sensibles (NRI: interpretación normalizada de la resistencia).

Discusión

A partir del análisis de aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de varias especies de peces ornamentales y de consumo cultivados en Uruguay, el gen *floR* fue detectado en el 9,1% (3/33) de los casos. Si bien este valor puede considerarse bajo, el hallazgo debe tenerse en consideración teniendo en cuenta el escaso desarrollo que posee la acuicultura en Uruguay. En este sentido Verner-Jeffrey *et al.* (2009) encuentran un valor similar [13% (3/23)] en *Aeromonas* spp. aisladas de peces ornamentales de varios países y Silva *et al.* (2018) encuentran un 58,3% de aislamientos de *Aeromonas* spp. *floR*⁺ en peces cultivados en Brasil, alertando de la presión de selección a la que está sometidos estos microorganismos y el riesgo de pérdida del florfenicol como herramienta terapéutica.

El gen *floR* se considera emergente y ampliamente diseminado entre bacterias patógenas de humanos y animales (Cabello *et al.*, 2013). Las *Aeromonas* de Uruguay que poseen este gen (H8, H9 y V3), son a su vez multirresistentes (amoxicilina - ácido clavulánico, eritromicina, oxitetraciclina, florfenicol, sulfametoxazole-trimetropim) lo que podría estar indicando la adquisición del mismo a través de transferencia horizontal, dado que *floR* suele formar parte de plásmidos de multirresistencia, tal como pAB5S9 [*floR/sul2/strA-strB/tetR-tet(Y)*] hallado en *Aeromonas bestiarum* resistente a anfenicoles, estreptomycin, tetraciclinas y sulfonamidas (Gordon *et al.*, 2008). Varios plásmidos portadores de *floR* han sido hallados en varias partes del mundo, sobre todo en bacterias patógenas de animales (da Silva *et al.*, 2017), aunque también está descrita la integración de este gen en el cromosoma (Schwarz *et al.*, 2004).

Si bien *floR* ha sido identificado previamente en aislamientos de *Aeromonas hydrophila* obtenidos de guppies (Verner-Jeffrey *et al.*, 2009), los estudios que se han realizado hasta el momento en esturiones de cultivo han dado resultados negativos para la presencia de este gen (Michel *et al.*, 2005), por lo que este sería el primer registro de *floR* en esta piscicultura, hecho que es llamativo dado el desarrollo que ha tenido la acuicultura de estas especies en los últimos años (Bronzi *et al.*, 2019) y el uso extensivo de florfenicol que se hace en la acuicultura mundial (Miranda y Rojas, 2007).

Basados en que el CO_{wt} hallado en nuestra investigación es ≥ 29 mm, podemos decir que el 68,3% de las *Aeromonas* spp. aisladas de peces cultivados en Uruguay poseen un fenotipo de susceptibilidad *wild type* para el florfenicol, mientras que, el 10,1% de los aislamientos con fenotipo *non wild-type* (NWT) son *floR*⁺. Los restantes aislamientos NWT (21,6%) poseen un rango de diámetros de halo de inhibición que van de los 23 a los 28 mm. Fernández-Alarcón *et al.* (2010) encuentran que únicamente el 21,6% de bacterias resistentes al FFL aisladas de la acuicultura chilena poseen el gen *floR*, adjudicando la resistencia en el resto de las bacterias a la existencia de bombas de eflujo inespecíficas.

Existe una enorme discrepancia en los valores de CO_{wt} reportados por distintos investigadores, por lo que las generalizaciones no son posibles. Al respecto, Smith, P. (2006) encuentra un rango de diferencias de hasta 17 mm en los valores de CO_{wt} de FFL en bacterias patógenas de peces, analizando datos procedentes de 18 países. En este sentido, Smith *et al.* (2007) sugieren que los puntos de corte obtenidos a partir de disco difusión tienen aplicabilidad para cada laboratorio, pero no son aplicables universalmente.

Son necesarios más estudios tendientes a determinar las bases moleculares de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias aisladas de la acuicultura uruguaya, de particular interés son aquellos aislamientos multirresistentes que podrían estar albergando plásmidos de multirresistencia u otros elementos móviles del genoma relacionados. Por otra parte, aumentar el número de perfiles de resistencia con nuevos aislamientos permitirá dar mayor precisión a parámetros tales como el CO_{wt}

8. CAPÍTULO III:

Farmacodinamia del FFL en *Aeromonas* spp.: efecto de la temperatura de cultivo y la resistencia genética al fármaco

Hipótesis

El efecto antimicrobiano del florfenicol sobre *Aeromonas* spp. variará en función de la temperatura de cultivo de las bacterias y sus mecanismos de resistencia, lo que se verá reflejado en parámetros farmacodinámicos tales como la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración bactericida mínima (CBM), el diámetro de halo de inhibición (DD) y la cinética de muerte bacteriana.

Objetivos

Determinar los principales parámetros farmacodinámicos del florfenicol en *Aeromonas* spp. tanto resistentes como susceptibles y el efecto que la temperatura de cultivo tiene sobre los mismos

Materiales y Métodos

Origen y almacenamiento de los aislamientos

Se emplearon 33 aislamientos de campo de seis especies de *Aeromonas* móviles [*A. allosaccharophila* (2/33), *A. bestiarium* (2/33), *A. caviae* (1/33), *A. hydrophila* (12/33), *A. punctata* (5/33) y *A. veronii* (11/33)] obtenidos previamente de peces de cultivo (Perretta *et al.*, 2018). Entre los mismos que se incluyen tres aislamientos resistentes al FFL debido a la presencia del gen *floR* (*A. hydrophila* H8 y H9 y *A. veronii* V3) (ver Capítulo II). A su vez se emplearon las siguientes cepas tipo como control de calidad en las técnicas de laboratorio: *A. hydrophila* ATCC 7955®, *A. salmonicida* subespecie *salmonicida* ATCC 33658® y *Escherichia coli* ATCC 25922®. Todos los aislamientos se hallaban almacenados a -80°C en caldo LB (caldo base Luria Bertani, Invitrogen™) con 20% de glicerol previo a su empleo en este trabajo.

Ensayos de concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración bactericida mínima (CBM) y disco difusión (DD)

La CIM de florfenicol se determinó mediante el método de microdilución en caldo para todos los aislamientos, siguiendo las instrucciones de los manuales M07-A9 (CLSI, 2012) y VET04-A2 (CLSI, 2014) del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Brevemente, se realizaron diluciones seriadas 1:2 de florfenicol en MHB (caldo Muller-Hinton, Oxoid™) en placas estériles de 96 pocillos, cubriendo concentraciones de 512 µg.mL⁻¹ a 0,125 µg.mL⁻¹ de antimicrobiano. Posteriormente, cada pocillo se inoculó con una suspensión bacteriana a una concentración de aproximadamente 5x10⁵ UFC.mL⁻¹. Se utilizaron dos filas de cada placa como controles de la esterilidad del medio de cultivo y la viabilidad del inóculo, respectivamente. Todos los procedimientos se realizaron por triplicado, el valor de CIM de un aislamiento se determinó como la moda de sus réplicas. Las CIM se determinaron después de 24 horas de incubación a 15°, 25° o 35°C de temperatura.

La CBM se determinó de acuerdo con el protocolo descrito en el manual M26-A de CLSI (1999), para aislamientos de campo tanto sensibles como resistentes al FFL. El volumen total contenido en todos los pocillos sin crecimiento aparente en las placas de CIM (sin turbidez apreciada a simple vista), se sembró sobre una placa de TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid TM) para realizar el recuento total de colonias después de incubar durante 24-48 horas a 25°C. Se consideró CBM a la concentración mínima de FFL capaz de disminuir en tres órdenes de magnitud el número de bacterias inicialmente inoculadas (de 10^5 a 10^2 CFU.mL⁻¹ en nuestro caso).

Luego de inocular las placas de CIM y dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación, cada uno de los inóculos previamente utilizados fue sometido a pruebas de susceptibilidad por disco difusión, de acuerdo con el manual M45-P de CLSI (CLSI, 2005). Para ello, hisopados de inóculo se sembraron por triplicado en placas de agar Muller Hinton (MHA, Oxoid TM), en el centro de las cuales se colocó un disco con 30 µg de FFL (BBL). Después de 24 a 48 horas de incubación a 15°, 25° o 35°C se midió el diámetro de los halos de inhibición con una apreciación de milímetros.

Cinética de muerte bacteriana

Siguiendo las instrucciones del manual M26-A de CLSI (1999), se determinó la tasa de sobrevivencia de *Aeromonas* a lo largo del tiempo frente a una concentración fija de FFL, mediante el conteo del número de bacterias viables en varios intervalos de tiempo. Para ello, se cultivaron aislamientos de campo tanto resistentes como susceptibles y las cepas tipo a 15°, 25° o 35°C en MHB con FFL en concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM previamente determinada para cada uno. Después de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas posinoculación, se tomó una muestra de cada medio de cultivo para estimar el número de bacterias por el método de recuento total en placa. Con el fin de reducir las interferencias en la susceptibilidad antimicrobiana derivadas de la fase de crecimiento del inóculo (CLSI, 1999), todos los medios de cultivo fueron inoculados con bacterias en la fase logarítmica de crecimiento, determinadas previamente en ensayos preliminares.

En todos los casos, la concentración bacteriana de los inóculos utilizados se ajustó mediante espectrofotometría y se corroboró mediante el recuento total en placa de diluciones seriadas por triplicado.

Análisis de datos

Los resultados se analizaron de acuerdo a técnicas estadísticas descriptivas y estudios de distribución. De acuerdo a la naturaleza de la variable, se estimó la media y su desviación estándar o los valores de percentil 50, 90 y rango. Para determinar la significancia de las diferencias se aplicó un análisis de ANOVA o Kruskal Wallis, con sus correspondientes test confirmatorios. La cinética de muerte bacteriana se ajustó a un modelo de análisis de regresión lineal previa normalización logarítmica de la variable.

Los parámetros farmacodinámicos (E_{max} , ED_{50}) se determinaron mediante el ajuste del modelo de sigmoideo inhibitorio, considerando el valor de la pendiente o la

diferencia en logarítmicos de las curvas de muerte en función a la CIM. En todos los test se consideró un nivel de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se realizaron con el *software* R versión 4.0.3 (RStudio Inc.).

Resultados

En las tablas 1 y 2 se presentan los resultados de los ensayos de concentración inhibitoria mínima, concentración bactericida mínima y disco difusión para *A. hydrophila* y *A. veronii* respectivamente.

Tabla 1: Principales parámetros farmacodinámicos del efecto de florfenicol a diferentes temperaturas de cultivo sobre aislamientos de *Aeromonas hydrophila* sensibles y resistentes al mismo

<i>Aeromonas hydrophila</i>								
	<i>floR</i> ⁻				<i>floR</i> ⁺			
	15°C, N=33	25°C, N=33	35°C, N=33	p- valor ¹	15°C, N=6	25°C, N=6	35°C, N=6	p- valor ¹
CIM	0,250 (0,250)	0,5 (0,5)	0,5 (1)	<0,001	16 (24)	64 (64)	32 (64)	0,002
(CBM)	[0,125:0,250]	[0,25:1]	[0,25:1]		[16:32]	[32:64]	[32:64]	
[min:max]								
DD	47,4	32,6	28,4	<0,001	9,5	8,2	9,8	0,005
media (ds)	(2,8)	(4,3)	(2,2)		(0,8)	(0,4)	(1,0)	

¹test estadístico empleado: Kruskal-Wallis; ANOVA

CIM: concentración inhibitoria mínima (µg.mL⁻¹); CBM: concentración bactericida mínima (µg.mL⁻¹); DD: diámetro de halo de inhibición (mm). Valores expresados como Percentil 50 (Percentil 90) [Rango].

floR: gen de resistencia a los anfenicoles, (+) presente, (-) ausente

Tabla 2: Principales parámetros farmacodinámicos del efecto de florfenicol a diferentes temperaturas de cultivo sobre aislamientos de *Aeromonas veronii* sensibles y resistentes al mismo

<i>Aeromonas veronii</i>								
	<i>floR</i> ⁻				<i>floR</i> ⁺			
	15°C, N=30	25°C, N=30	35°C, N=30	p- valor ¹	15°C, N=3	25°C, N=3	35°C, N=3	p- valor ¹
CIM	0,125	0,75 (1)	0,5 (1)	<0,001	8 (14)	32 (32)	32 (32)	0,044
(CMB)	(0,250)	[0,125:1]	[0,25:1]		[8:16]	[32:32]	[16:32]	
[min:max]	[0,125:1]							
DD	47,9	30,3	29,5	<0,001	12,0	10,0	10,3	0,022
media (ds)	(3,6)	(2,3)	(1,6)		(0,0)	(1,0)	(0,6)	

¹test estadístico empleado: Kruskal-Wallis; ANOVA

CIM: concentración inhibitoria mínima (µg.mL⁻¹); CBM: concentración bactericida mínima (µg.mL⁻¹); DD: diámetro de halo de inhibición (mm). Valores expresados como Percentil 50 (Percentil 90) [Rango].

floR: gen de resistencia a los anfenicoles, (+) presente, (-) ausente

Nótese que para ambas especies de *Aeromonas* (tablas 1 y 2), tanto la dispersión de los datos como el efecto de la temperatura sobre los parámetros farmacodinámicos se ven afectados por la presencia o ausencia del gen *floR* en los aislamientos analizados.

También es interesante destacar que los parámetros farmacodinámicos evaluados se diferencian según se trate de la temperatura mínima testeada (15°C) o el conjunto de las correspondientes más elevadas (25°C y 35°C).

En la tabla 3 se presentan los resultados de los ensayos de concentración inhibitoria mínima, concentración bactericida mínima y disco difusión para las cepas tipo empleadas.

Tabla 3: Principales parámetros farmacodinámicos del efecto de florfenicol a diferentes temperaturas de cultivo sobre distintas cepas tipo

	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7955®			<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658®			<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922®		
	15°C, N=3	25°C, N=3	35°C, N=3	15°C, N=3	25°C, N=3	35°C, N=1	15°C, N=3	25°C, N=3	35°C, N=3
CIM	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,125	-	4	4
(CMB)	(0,25)	(0,5)	(0,9)	(-)	(-)	(-)		(-)	(-)
[min:max]	[0,25:0,25]	[0,5:0,5]	[0,5:1]	[0,25:0,25]	[0,5:0,5]			[4:4]	[4:4]
DD	48,0	27,0	24,7	42,3	29,6	-	-	24,0	23,3
media (ds)	(1,0)	(6,1)	(0,6)	(1,5)	(0,5)			(1,7)	(1,5)

CIM: concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$); CBM: concentración bactericida mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$); DD: diámetro de halo de inhibición (mm)

Los **valores de ECOff** para la **CIM** a diferentes temperaturas, calculados sobre el total de los aislamientos de campo son los siguientes:

- . 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 15°C
- . 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 25°C y 35°C

Los **valores de ECOff** para **DD** a diferentes temperaturas, calculados sobre el total de los aislamientos de campo son los siguientes:

- . 43,7 $\pm$ 6,1mm a 15°C
- . 30,9 $\pm$ 3,8mm a 25°C
- . 28,1 $\pm$ 2,3 mm a 35°C

El gráfico de la figura 1 corresponde a los resultados del análisis comparativo entre los promedios de los diámetros de halo de inhibición para el conjunto de aislamientos *floR*⁺ y *floR*⁻ de las especies *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii*. Nótese que no se aprecian diferencias entre los valores correspondientes a los aislamientos *floR*⁺ para ambas especies y a todas las temperaturas. En cambio, para el caso de los aislamientos *floR*⁻ existe una clara separación entre los valores obtenidos a 15°C y el resto de los mismos, existiendo diferencias a su vez entre los 25° y 35°C para el caso de *A. hydrophila*.

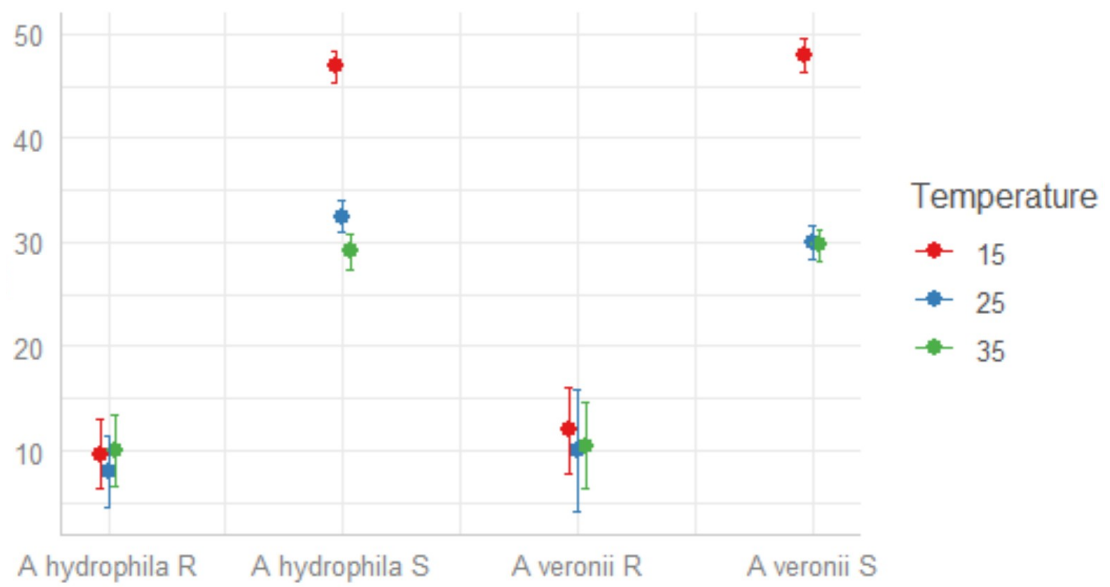


Figura 1: Análisis comparativo entre los diámetros (mm) de halo de inhibición de florfenicol para *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii* que poseen (R) o carecen (S) del gen *floR* y a diferentes temperaturas de cultivo. Los valores se expresan en media $\pm$ DS.

El grafico de la figura 2 corresponde a los resultados descriptivos (LogUFC.mL⁻¹ vs. tiempo) para aislamientos sensibles (H1 y V1) y resistentes (H8 y V3) al florfenicol tanto de *Aeromonas hydrophila* (H) como de *Aeromonas veronii* (V) a diferentes tiempos de exposición al florfenicol (0 a 48 horas), distintas concentraciones del mismo (0 a 8 veces la CIM de cada aislamiento analizado) y tres diferentes temperaturas de cultivo (15°, 25° y 35°C).

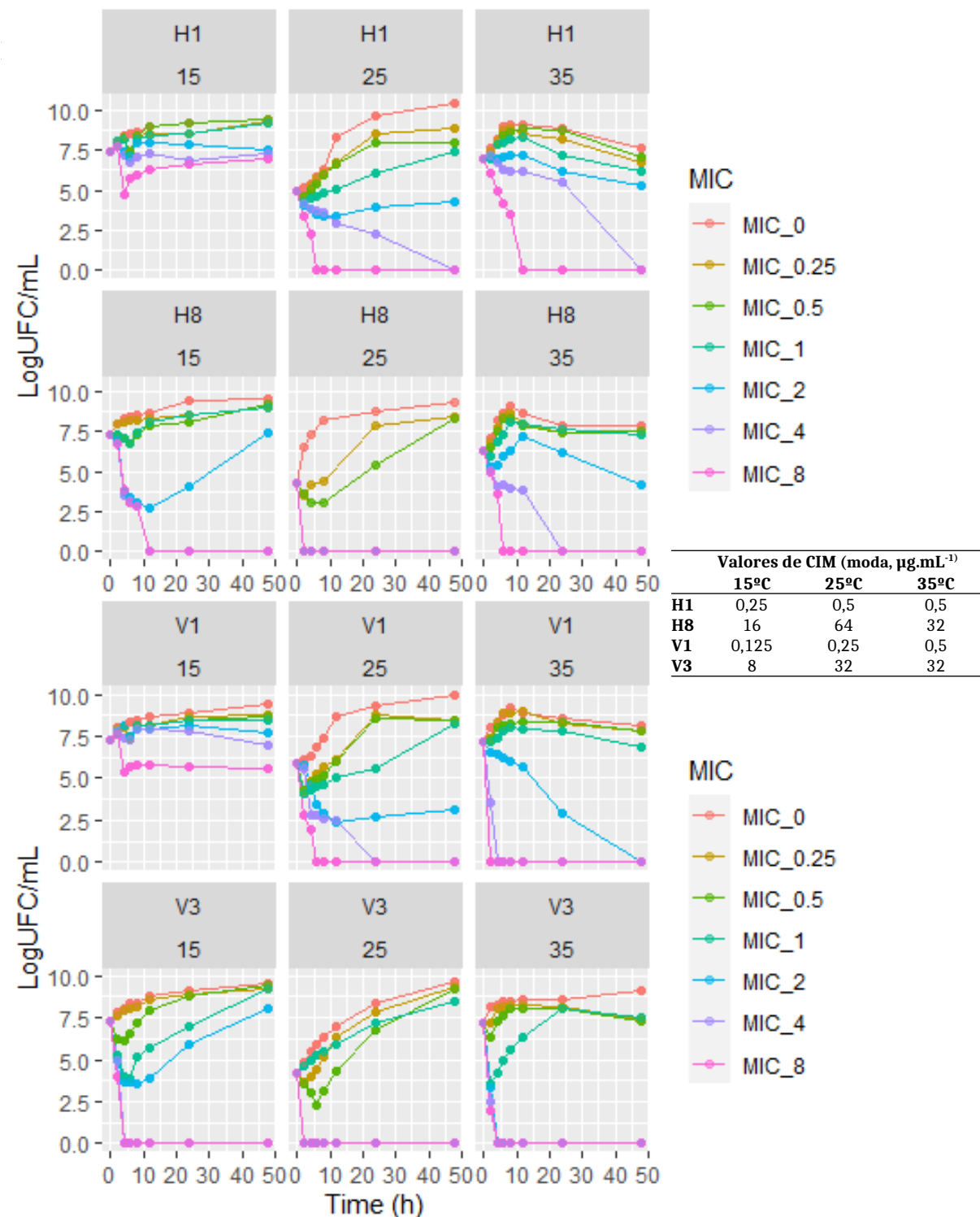


Figura 2: Curvas de cinética de muerte bacteriana en las que se aprecia el efecto combinado del florfenicol a distintas dosis (MIC 0 a 8), el tiempo (0 a 50 horas de cultivo) y la temperatura de cultivo (15°C, 25°C ó 35°C), sobre la sobrevivencia de aislamientos de *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii*, tanto sensibles (H1 y V1 respectivamente) como resistentes (H8 y V3) al fármaco [MIC: concentración inhibitoria mínima (µg.mL⁻¹)].

La figura 3 corresponde al análisis de la velocidad en la cinética de muerte de las primeras seis horas en las curvas de muerte que se observan en la figura 2. Este sector del gráfico representa, la cinética de crecimiento bacteriano ajustada a una función lineal (mejor criterio de ajuste del modelo), lo cuál nos permite determinar un valor de CIM derivado del modelo que describe las curvas, considerando el valor predicho en donde la función indique una pendiente cero corresponderá al valor de concentración de FFL que inhibe el crecimiento bacteriano (CIM teórica [CIMt])

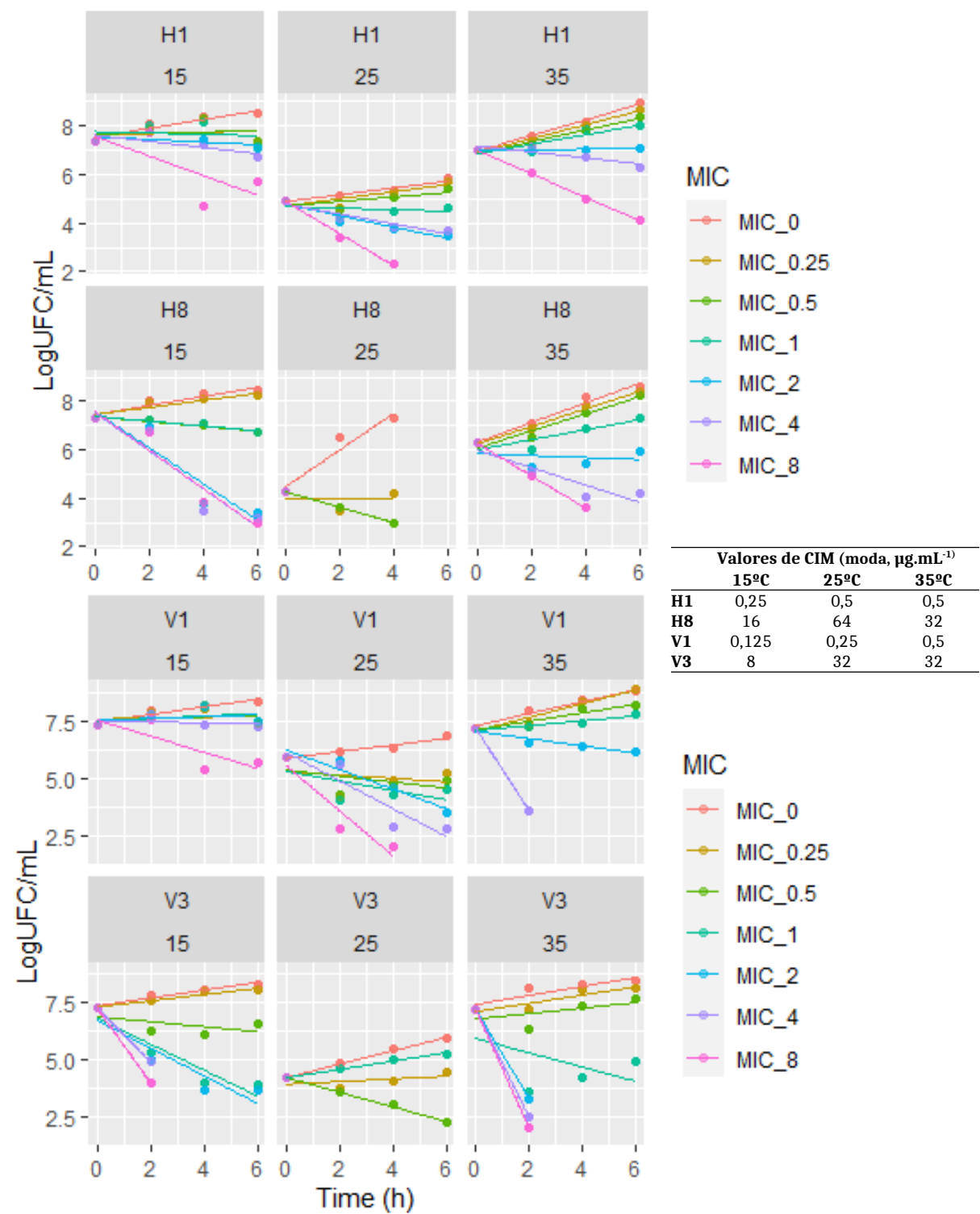


Figura 3: detalle de las primeras seis horas en las curvas de cinética de muerte bacteriano donde se aprecia el efecto combinado del florfenicol a distintas dosis (MIC 0 a 8), el tiempo (0 a 6 horas de cultivo) y la temperatura de cultivo (15°C, 25°C ó 35°C), sobre la sobrevivencia de aislamientos de *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii*, tanto sensibles (H1 y V1 respectivamente) como resistentes (H8 y V3) al fármaco [MIC: concentración inhibitoria mínima (µg.mL⁻¹)].

En la tabla 4 se muestran tanto la CIM determinada mediante el método de microdilución en caldo (CIM de laboratorio), como a partir del modelo matemático que describe la cinética en las primeras seis horas de cultivo (CIM teórica).

Tabla 4: valores de CIM de florfenicol en *Aeromonas hydrophila* (H1 y H8) y *Aeromonas veronii* (V1 y V3) obtenidos en el laboratorio y calculados a partir del modelo de cinética de muerte bacteriana a diferentes temperaturas de cultivo (15°C, 25°C ó 35°C)

		CIM de laboratorio (moda, $\mu\text{g.mL}^{-1}$)			CIM teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	<i>floR</i>	15°C	25°C	35°C	15°C	25°C	35°C
H1	no	0,25	0,5	0,5	0,24	0,49	1,24
V1	no	0,125	0,25	0,5	0,41	0,045*	0,96
H8	si	16	64	32	13,2	17,2*	59,2
V3	si	8	32	32	2,24*	42,5	23,6

*valores fuera del intervalo de confianza

floR: gen de resistencia al florfenicol

En la figura 4 se presentan las curvas de dosis respuesta para aislamientos sensibles y resistentes al florfenicol tanto de *Aeromonas hydrophila* como de *Aeromonas veronii* transcurridas 6, 12, 24 y 48 horas de exposición a distintas concentraciones de FFL.

Nótese que para los aislamientos sensibles de ambas especies (H1 y V1) se aprecia un incremento en la potencia en función del tiempo sobre la acción del FFL en la sobrevivencia bacteriana, de modo tal que, a tiempos de exposición al fármaco prolongados (48 horas) es necesaria una menor concentración de FFL para obtener el mismo efecto, independientemente de la temperatura de cultivo.

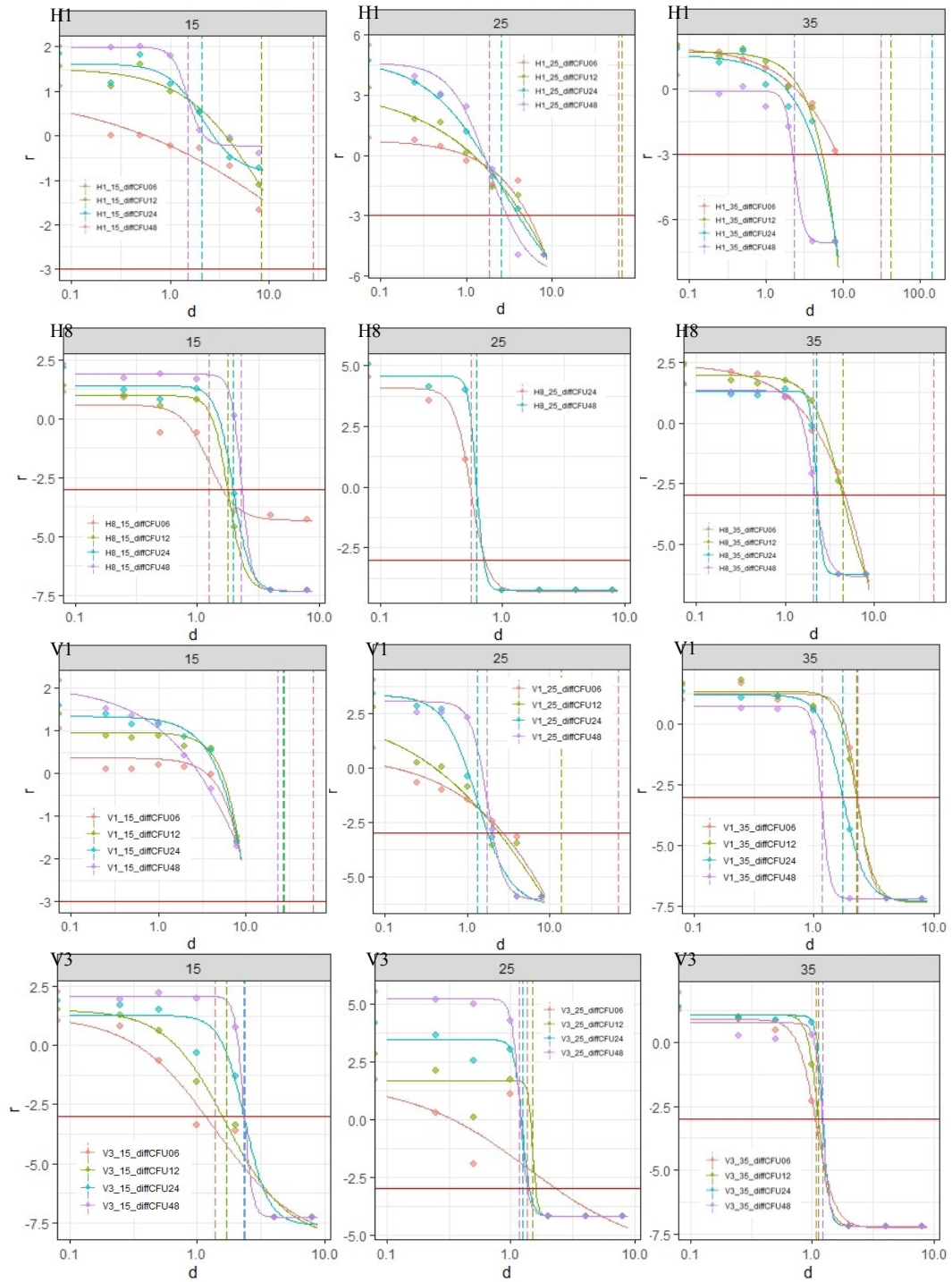


Figura 4: Curvas de dosis ($d = \mu\text{g.mL}^{-1}$) respuesta ($r =$ orden de magnitud de diferencias de CFU.mL^{-1} a tiempo 0) de florfenicol sobre *Aeromonas hydrophila* (H) y *A. veronii* (V) sensibles (H1 y V1) y resistentes (H8 y V3) a distintas temperaturas y tiempos de incubación. Las líneas punteadas verticales corresponden al punto de inflexión de cada función (ED_{50}), la línea roja horizontal corresponde a una disminución en tres órdenes de magnitud del número de bacterias inicialmente inoculadas (de 10^5 a 10^2 CFU.mL^{-1}).

En la figura 5 se presentan las curvas de cinética de muerte bacteriana para las cepas tipo *A. salmonicida* subespecie *salmonicida* ATCC 33658® y *Escherichia coli* ATCC 25922®. Nótese que el crecimiento de *A. s. salmonicida* es nulo a 35°C, así como lo es el crecimiento de *E.coli* a 15°C.

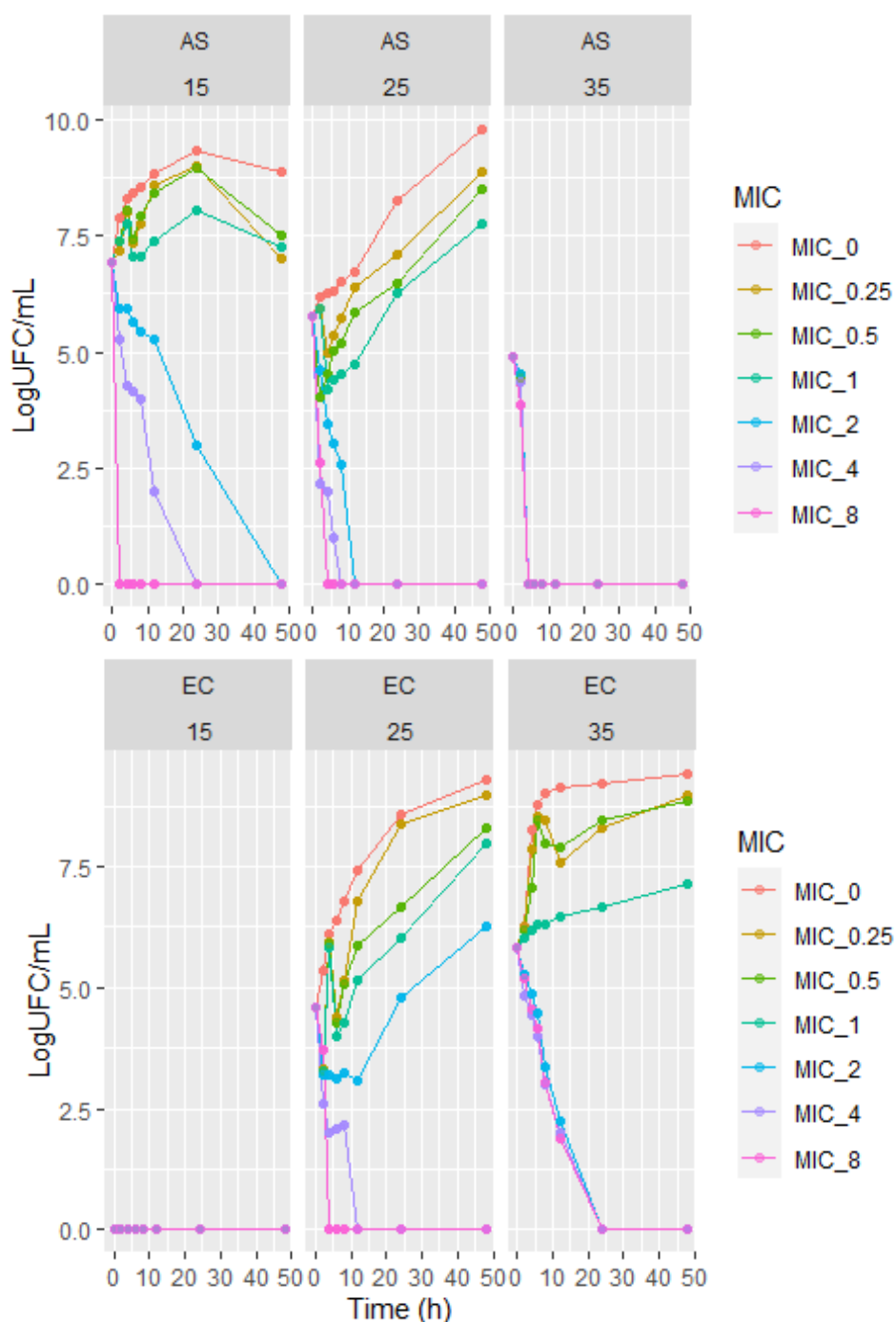


Figura 5: Curvas de cinética de muerte bacteriana en las que se aprecia el efecto combinado del florfenicol a distintas dosis (MIC 0 a 8), el tiempo (0 a 50 horas de cultivo) y la temperatura de cultivo (15°C, 25°C ó 35°C), sobre la sobrevivencia de las cepas tipo *A. salmonicida* subespecie *salmonicida* ATCC 33658® y *Escherichia coli* ATCC 25922® al fármaco (MIC: concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)).

Discusión

A partir del análisis de 33 aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de distintas especies de peces cultivados en nuestro país, tanto de consumo como ornamentales, fue posible establecer los valores de CIM, CMB y DD de florfenicol a tres diferentes temperaturas de cultivo, lo que permitió determinar tanto los puntos de corte epidemiológico para nuestra piscicultura, como la realización de hallazgos hasta el momento no descritos en la literatura. En ese sentido, este es el primer estudio en el que se encuentra una relación directa entre la temperatura de cultivo de *Aeromonas* móviles y la concentración inhibitoria mínima de florfenicol.

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana es de particular importancia para la acuicultura, debido a que la efectividad de los tratamientos contra bacterias patógenas de organismos acuáticos depende en gran medida de la adaptación de las dosis, tanto a la cinética del fármaco en animales ectotermos como al efecto de los mismos sobre los microorganismos (Martinsen *et al.*, 1992; 1993; Michel y Blanc, 2001).

Basados en nuestros resultados, existe un efecto directo de la temperatura de cultivo sobre la concentración de FFL necesaria para inhibir el crecimiento de aislamientos de *A. hydrophila* y *A. veronii* sensibles al fármaco. A una temperatura de 15°C la concentración necesaria para inhibir el crecimiento es dos a seis veces menor que a temperaturas mayores (25° y 35°), lo que se ve reflejado a su vez en un aumento promedio de entre 17 y 18 mm en los diámetros de halo de inhibición.

Por otra parte, si bien el escaso número de aislamientos *floR*⁺ impide la realización de test estadísticos confiables para establecer la significancia de los hallazgos, es interesante destacar que, en este caso también se observa un efecto directo de la temperatura sobre la CIM, siendo ésta cuatro veces menor a 15°C, semejante a lo observado en los aislamientos *floR*⁻, aunque en este caso el aumento en el diámetro de los halos de inhibición es menos notorio, ya que va de los 0,5 a 2 mm según la especie de *Aeromonas* que se trate.

Desde el punto de vista fisiológico, la temperatura ejerce un efecto directo sobre la capacidad de penetración de un fármaco en el interior de la célula bacteriana, ya sea que el mismo ingrese mediante difusión pasiva o mediante mecanismos activos de membrana (Michel y Blanc, 2001). Teniendo en cuenta esto, es de esperar que a bajas temperaturas sean necesarias mayores concentraciones del fármaco para obtener el mismo efecto de inhibición del crecimiento que se obtiene a temperaturas más elevadas, lo que contrasta con los hallazgos realizados en el marco de esta tesis.

La disminución de la actividad de un fármaco a bajas temperaturas de cultivo ha sido reportada para *Aeromonas* previamente por Martinsen *et al.* (1992), quienes encuentran que los valores de CIM para varias quinolonas (enrofloxacin, sarafloxacin, flumequin y ácido oxolínico) disminuyen conforme la temperatura de cultivo aumenta, siendo alrededor del doble a temperaturas elevadas (4° vs. 15°C). Para estos autores, dichos hallazgos pueden deberse tanto a la difusión

transmembrana disminuida por la temperatura, como a la menor tasa de crecimiento bacteriano que dificultaría la acción de las quinolonas sobre la ADN girasa. Por otra parte, estos mismos autores encuentran que la oxitetraciclina tiene un efecto inverso al que presentan las quinolonas, siendo la CIM a 4°C superior a la desarrollada a 15°C. Esto podría ser explicado por alteraciones de los transportadores específicos para el fármaco o por un modo de acción temperatura-dependiente de los ribosomas, mismo sitio de acción de los anfenicoles.

Las notorias diferencias en los valores promedio de CIM entre aquellos aislamientos que poseen o carecen del gen *floR* no han sido reportadas hasta el momento, siendo de hecho escasos los estudios donde se establecen valores de CIM de FFL para *Aeromonas* y menos aún a diferentes temperaturas de cultivo. A pesar de ello, en dos estudios independientes en los que se determina el punto de corte epidemiológico mediante el mismo método que se emplea en esta tesis (Smith y Kronvall, 2014; Baron *et al.*, 2017) se reporta una CIM de 2 mg.L⁻¹, igual al valor hallado por nosotros para temperaturas de 25° y 35°C. Aunque, por otra parte, tanto Godoy *et al.* (2008), como Duman *et al.* (2020) hallan valores de punto de corte epidemiológico de 4 mg.L⁻¹ en *Aeromonas* aisladas de pisciculturas brasileras y turcas respectivamente.

Teniendo en cuenta los valores de ECOff diferenciales según temperatura hallados en este estudio, es interesante destacar que el porcentaje de aislamientos con fenotipo salvaje para el FFL (*wild type*: *wt*) difiere según la temperatura para una misma población bacteriana. De este modo, cuando se cultivan a 15°C, el 69,7% de los aislamientos de campo analizados poseen fenotipo *wt*, mientras que, cultivados a 25-35°C, el 93,4% de los mismos aislamientos desarrollan un fenotipo *wt*. En este sentido, Duman *et al.* (2020), hallan un elevado porcentaje de aislamientos no *wt* (*nwt*) (25,5%) entre *Aeromonas* de Turquía, atribuyéndolo al excesivo uso de antimicrobianos que se hace en todo el país.

Los estudios de cinética de muerte bacteriana son escasos para los aeromonadales móviles y no existen registros en la literatura que hagan referencia al FFL. Este es la primera ocasión en la que se pone a punto la técnica para el estudio de la cinética de muerte bacteriana en *Aeromonas* móviles expuestas al florfenicol. Complementa aún más la originalidad del estudio, el enfoque observacional desde dos perspectivas validadas, la primera enfocada en la determinación dinámica de las diferencias en las velocidades de la cinética de muerte bacteriana (primeras 6 horas), mientras que la segunda establece el criterio de punto final (*end-point*).

A partir del modelo farmacodinámico desarrollado en este estudio fue posible determinar valores de CIM teóricos para cada una de las situaciones, los cuales en algunos casos concuerdan con los obtenidos en el laboratorio. Al igual que ocurre con otras bacterias (Foerster *et al.*, 2015) los parámetros farmacodinámicos en *Aeromonas* difieren según se trate de aislamientos sensibles o resistentes al fármaco en estudio.

Otro punto a destacar es el efecto en las siguientes 6 a 48 horas de exposición, no descrito hasta el momento, donde se visualiza el efecto potenciador de la actividad del FFL sobre *Aeromonas* móviles que tiene el tiempo de exposición al fármaco, independientemente de la temperatura de cultivo. En líneas generales, este hallazgo indicaría que el FFL es un antimicrobiano tiempo dependiente, si bien ha sido catalogado en varias ocasiones como concentración dependiente por otros autores (De Haas *et al.*, 2002; Sidhu *et al.*, 2013).

En ambas situaciones de exposición, se visualiza un efecto positivo de la respuesta a el incremento de las concentraciones o el incremento en el tiempo de exposición del FFL. Este punto inclinaría la perspectiva en la definición de una acción del FFL para *Aeromonas* móviles en las primeras 6 horas de exposición o en las 48 horas subsiguientes. Nuestros hallazgos podrían estar confirmando un comportamiento mixto, concentración-dependiente y tiempo-dependiente para el FFL en *Aeromonas* móviles.

A partir de esta primera aproximación a la farmacodinamia del florfenicol en *Aeromonas* móviles sensibles y resistentes al fármaco fue posible establecer nuevos parámetros farmacológicos, hasta el momento no determinados, a la vez de obtener resultados novedosos en lo que respecta a la influencia de la temperatura de cultivo sobre dichos parámetros.

En base a estos hallazgos y la carencia de información detectada en la bibliografía, queda clara la necesidad de generar conocimiento en este campo de la ciencia, de importancia tanto básica como aplicada.

9. CAPÍTULO IV

Farmacocinética del FFL en *Acipenser gueldenstaedtii*: efecto de la temperatura ambiente, la dosis y la vía de administración

Hipótesis

El FFL describe en el esturión una farmacocinética comparable a la observada en otras especies de peces, con un efecto relevante en los parámetros farmacocinéticos dependientes de la vía de administración del fármaco y la temperatura ambiente a la que se encuentren los animales.

Objetivos

Caracterizar la farmacocinética poblacional del florfenicol en esturiones rusos y determinar el efecto de la temperatura de cultivo y la vía de administración en los parámetros farmacocinéticos.

Materiales y Métodos

Estudios in vivo

Las experiencias con animales se llevaron a cabo en las instalaciones de la empresa *Black River Caviar* ubicada en la localidad de Baygorria, Durazno. Se emplearon juveniles de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) procedentes de un mismo desove de manera de disminuir el efecto de variabilidad genética poblacional en la población en estudio. Se formaron tres grupos de 36 animales cada uno ($2,2 \pm 0,3$ kg). Cada grupo se alojó en una unidad de cultivo de 2000 litros de volumen total con circulación continua de agua y recibió uno de los siguientes tratamientos con florfenicol: vía intravenosa 10 mg.kg^{-1} (IV), vía intraperitoneal 10 mg.kg^{-1} (IP) y vía oral 10 mg.kg^{-1} (OR). Considerando que no existe una formulación aprobada para uso en peces, la formulación utilizada para los grupos IV e IP, fue elaborada en el laboratorio de Farmacología en base a la dilución del principio activo estándar en DMSO (33 mg/mL). La elección del vehículo se realizó en base al de mayor efecto inocuo para su administración endovenosa/intraperitoneal y al coeficiente de solubilidad reportado para FFL en DMSO (50 mg/mL). Por practicidad y exactitud en la dosificación se estableció $0,3 \text{ mL.kg}^{-1}$ como volumen a administrar a cada pez. Para la administración oral se utilizó una sonda orogástrica, de manera de asegurar la ingesta de la dosis, depositando una premezcla constituida con ración más el producto comercial de uso específico para peces (Aquafen®; 50%; MSD; México). Todos los animales fueron identificados mediante chip electrónico y pesados previo a recibir los tratamientos. Luego de dosificados, se realizó el sangrado seriado por punción de la vena caudal entre los 30 minutos y las 96 horas postratamiento. De acuerdo a las recomendaciones para estudios de farmacocinética poblacional y a la factibilidad del diseño experimental, cada animal aportó entre 2 y 4 puntos en la determinación del perfil completo de concentraciones del grupo. Posteriormente, se separó el plasma de la sangre obtenida y se congeló a -80 grados hasta su procesamiento en el laboratorio. Cada experimento se realizó a 15 grados de temperatura del agua (invierno) y 25 grados (verano) y por duplicado.

Extracción de florfenicol desde plasma de esturión ruso

A continuación, se transcribe brevemente el protocolo empleado para la extracción de FFL desde plasma de esturion ruso, el mismo fue desarrollado en el marco de esta tesis:

- Tomar 300 uL de plasma a analizar y fortificar con 20 uL de una solución de Tiamfenicol (7010 ng/mL) como estandar interno de la técnica
- Vortear 30 segundos
- Agregar 300 uL de Acetona
- Vortear 30 segundos y centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm
- Tomar el sobrenadante y agregar 1200 uL de Acetato de Etilo
- Vortear 30 segundos y centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm
- Tomar la capa superior y evaporar a 60 grados
- Retomar el evaporado con 250 uL de fase móvil (75:25 Agua:Acetonitrilo)

Condiciones cromatográficas para cuantificación de FFL por HPLC

Para la cuantificación de FFL se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Dionex Ultimate 3000 HPLC, Thermo Fisher Scientific, United States). Para el sistema se empleó una columna Phenomenex®Luna C18 (5 m, 100°A, 150 mm × 4,6 mm, Phenomenex, código de referencia: 00F-4252- E0-BV) como fase estacionaria invertida. La fase móvil fue una mezcla de 75:25 Agua:Acetonitrilo bombeada a un flujo de 1 mL/min a 37°C. La longitud de Detección de UV se estableció en 325 nm.

La curva de calibración demostró la linealidad en el rango de 50 a 1000 ng/mL mediante el ajuste de un modelo de regresión lineal de mínimos cuadrados y siendo el coeficiente de correlación $r = 0.997$. Los errores de los valores de concentración fueron inferiores al 15%. Siendo, el límite inferior de cuantificación (LLOQ) establecido como la concentración más baja medida con un CV < 20% una precisión de $\pm 20\%$ y una recuperación absoluta $\geq 70\%$. Los valores de concentración inferiores a 50 ng/mL (LLOQ) no se consideraron para el análisis cinético de los datos experimentales.

Análisis de farmacocinética poblacional

Para el ajuste del modelo de farmacocinética poblacional se utilizó el software Monolix (Monolix version 2020R1. Antony, France: Lixoft SAS, 2020). Los parámetros farmacocinéticos se ajustaron a un modelo farmacocinético estructural de 1 compartimiento y constantes de absorción/eliminación de primer orden. Para el grupo OR el mejor ajuste se alcanzó con el agregado del parámetro de tiempo de latencia (Tlag). Los valores de variabilidad interindividual (omega) y la variabilidad residual (b) representaron los de mejor ajuste. Se integró en el ajuste del modelo final las covariables temperatura y vía de administración, así como el ajuste de los parámetros por el peso de los animales. Finalmente, se constató la bondad de ajuste mediante la inspección visual y la Exploración Predictiva Visual (VPC) y numérica (NPC).

Resultados

En la figura 1 se presentan los gráficos de los valores de concentración individual agrupados (n=36) de FFL en plasma de esturión vs. tiempo postratamiento IV, IP y OR a 15° (TEMP_B) y 25°C (TEMP_A) de temperatura ambiente.

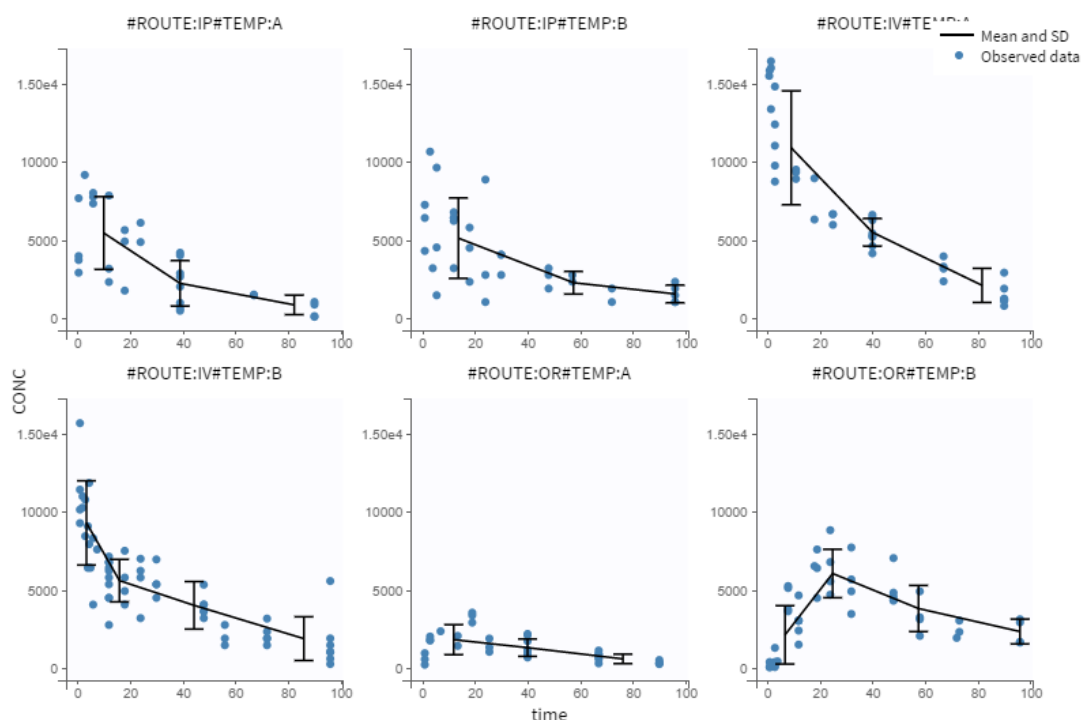


Figura 1: Gráficos de concentración de FFL (media $\pm$ DS) vs. tiempo postratamiento dosis única en esturiones rusos (n=36) mantenidos a 15°C (B) o 25°C (A) de temperatura de cultivo. Los puntos representan el valor individual a determinado tiempo de muestreo. La línea representa la tendencia media descriptiva del grupo. Cada animal aporta de 2 a 4 determinaciones en todo el tiempo de muestreo.

Del perfil de concentración que representa cada grupo, luego de agrupar cada determinación individual y visualizarla como un único grupo, se describe un comportamiento similar y acorde a la vía de administración empleada. Las tres vías de administración se muestran en concordancia para ajustar a un modelo similar. Complementariamente, se visualiza el efecto diferencial de la temperatura dentro de cada vía de administración.

Se inicia el estudio mediante la exploración de distintos modelos estructurales, entre un modelo de ingreso IV o extravascular, con 1 o 2 compartimientos, con absorción de orden cero o primero, eliminación lineal o Michaelis-Menten y la inclusión o no de un Tlag. Para la selección del mejor modelo se aplicó los criterios de mejor ajuste y la selección de modelos (log-likelihood (OFV) o *Bayesian Information Criteria* (BIC)). El resultado final determinó que el modelo estructural final que mejor representa los datos experimentales sea un modelo simultáneo para las tres vías de administración con 1 compartimiento y eliminación lineal, incluyendo un Tlag en la administración oral (BIC=4154 / OFV=4046). Del estudio de las covariables se determinó que la temperatura debe ser incluida dentro de la variabilidad de los parámetros de biodisponibilidad (F), constante absorción para el grupo OR (k_a),

volumen de distribución (V) y Clearance (Cl). A su vez, la variable transformada log [peso/media (kg)] también contribuyó al mejor ajuste en la determinación del Cl. Finalmente el mejor ajuste del error en el modelo es el proporcional (b).

En la tabla 1 se presentan los parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados para la administración de FFL por vía IV, IP y OR a baja y alta temperatura que se establecieron para el modelo estructural ajustado.

Tabla 1: Estimación de parámetros poblacionales y el error residual estándar (%) para Florfenicol (10mg.kg⁻¹) luego de la administración endovenosa (EV), intraperitoneal (IP) y oral (OR), a baja (TEMP_B, 15°C) y alta (25°C) temperatura en esturión ruso.

	Valor medio del parámetro	Desvío estándar	Coefficiente de variación (%)
Efectos fijos			
F_IP_pop	0,616	0,115	18,6
beta_F_IP_TEMP_B	1,34	0,682	48,9
F_OR_pop	0,264	0,0256	9,68
beta_F_OR_TEMP_B	3,65	1,01	27,9
ka_IP_pop	8,47 h ⁻¹	8,57	101,01
ka_OR_pop	0,25 h ⁻¹	0,066	26,37
beta_ka_OR_TEMP_B	-1,39 h ⁻¹	0,269	-21,34
Tlag_pop	0,278 h	0,179	64,44
V_pop	1,926 L.kg ⁻¹	0,126	6,56
beta_V_TEMP_B	0,235 L.kg ⁻¹	0,082	35,18
Cl_pop	0,046 L.h ⁻¹	0,0017	3,8
beta_Cl_LogtWEIGHT	0,88 L.h ⁻¹	0,182	20,5
Desvío estandar de los efectos aleatorios			
omega_F_IP	1,52	0,27	17,56
omega_F_OR	0,25	0,13	51,96
omega_ka_IP	1,32	0,78	59,31
omega_ka_OR	0,24	0,17	72,61
omega_Tlag	1,77	0,45	25,67
omega_V	0,18	0,05	26,01
omega_Cl	0,15	0,04	24,14
Error de la modelización de parámetros			
b	0,26	0,02	7,56

F: biodisponibilidad; ka: constante de absorción; Cl: clearance; Tlag: tiempo de retardo; V: volumen de distribución; IP: intraperitoneal; OR: oral; TEMP_B: temperatura baja (15°C); pop: poblacional; beta_X: covariable del efecto de la TEMP_B en el parámetro

En los gráficos de la figura 2 se valida de forma visual utilizando la exploración predictiva visual (VPC) (1000 simulaciones Monte Carlo) a partir del modelo desarrollado y representando la distribución de los datos originales con los que se desarrollo en modelo. Los gráficos obtenidos mediante el VPC indican que el modelo es adecuado debido a que la mayoría de los datos experimentales se

encuentran distribuidos aleatoriamente a lo largo del tiempo entre los intervalos de predicción definidos.

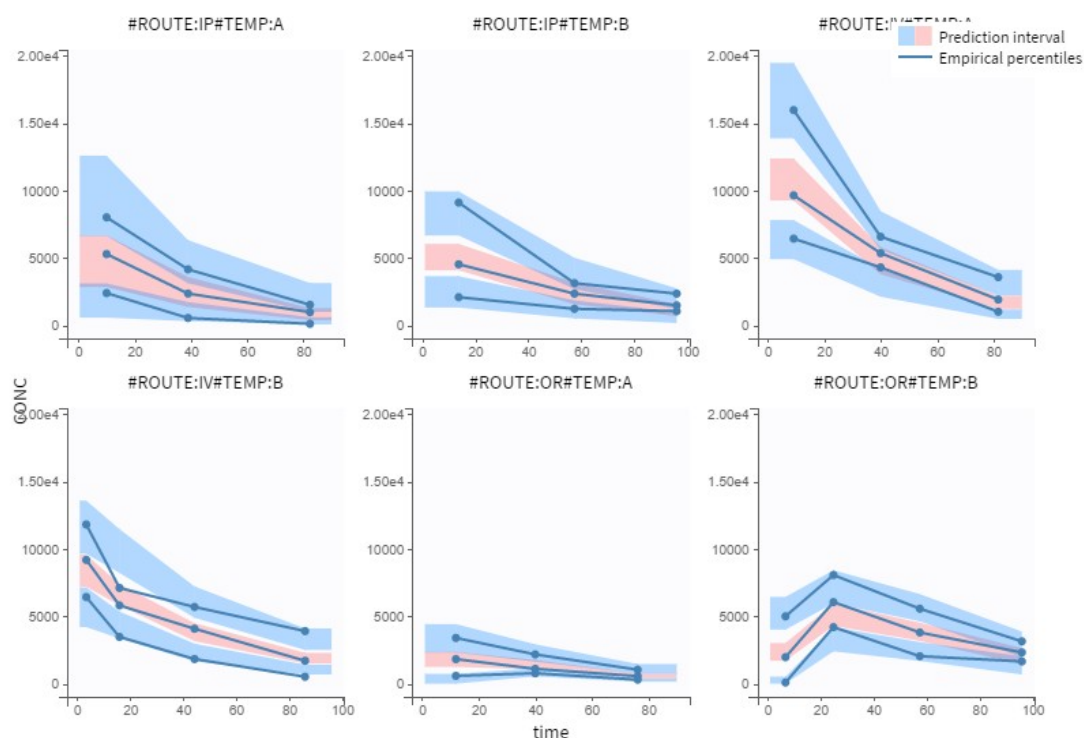


Figura 2: gráficos de Exploración Predictiva Visual (VPC) para la concentración de FFL vs. tiempo postratamiento a dosis única (10mg/kg) por vía IV, IP y OR en esturiones rusos mantenidos a 15°C (B) o 25°C (A) de temperatura de cultivo

En la figura 3 se observan los gráficos de residuales vs. tiempo y residuales vs. concentración para cada uno de los tratamientos llevados a cabo. Nótese que los mismos se distribuyen aleatoriamente en torno al cero.

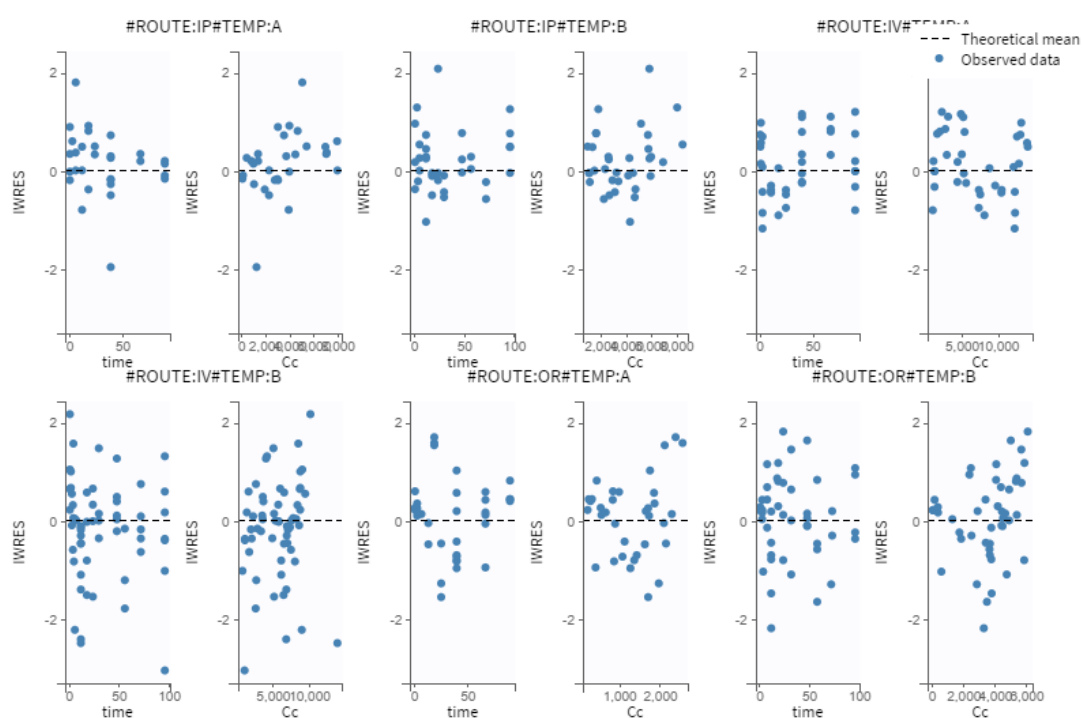


Figura 3: gráficos de residuales vs. concentración de FFL y residuales vs. vía de administración generados a partir del ajuste de modelo farmacocinético en esturiones rusos mantenidos a 15°C (B) o 25°C (A) de temperatura de cultivo.

La figura 4 corresponde a las funciones de densidad de cada uno de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir del modelo.

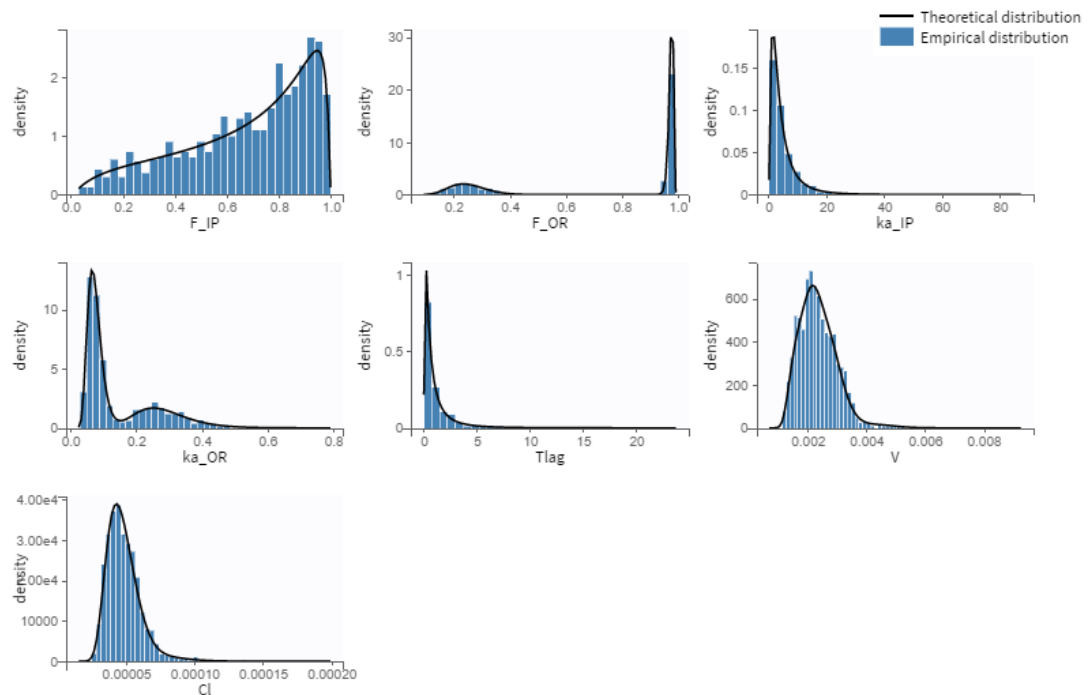


Figura 4: Funciones de densidad de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir del modelo en esturiones rusos dosificados con florfenicol y mantenidos a diferentes temperaturas de cultivo (15° y 25°C).

En la figura 5 corresponde a la distribución de la predicción (CI95%) de las concentraciones de FFL a partir del modelo

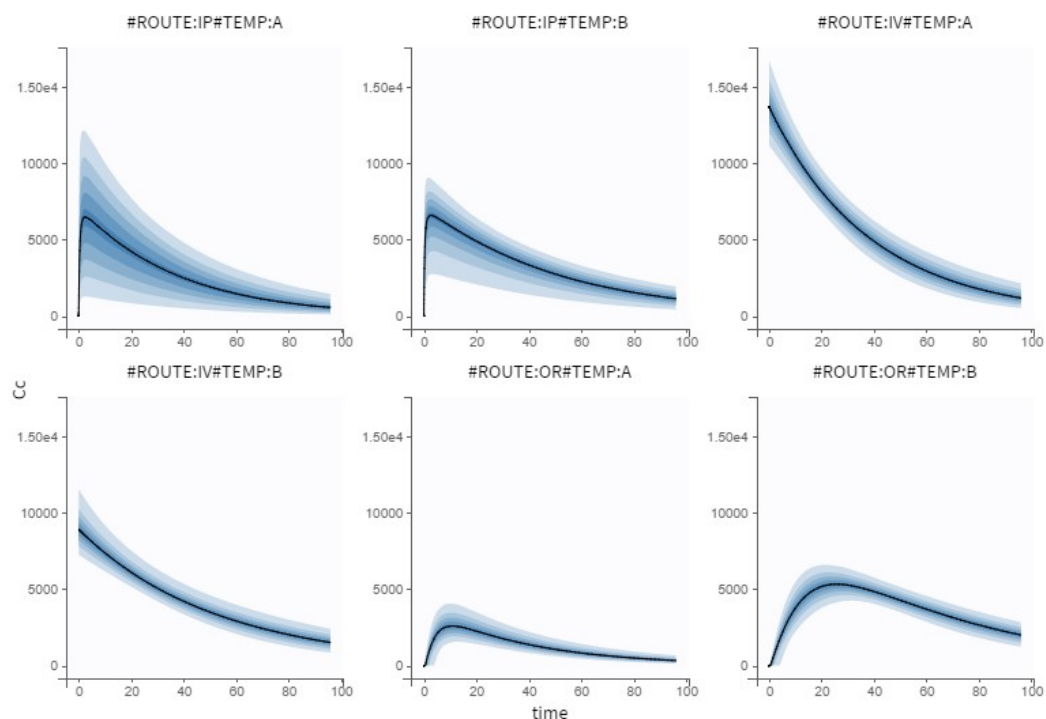


Figura 5: gráficos de distribución de la predicción de las concentraciones de FFL vs. tiempo postratamiento a dosis única (10mg/kg) por vía IV, IP y OR en esturiones rusos mantenidos a 15°C (B) o 25°C (A) de temperatura de cultivo

En la figura 6 se presenta la simulación del modelo para 100 animales por cada grupo, donde se visualiza la distribución de la predicción (CI95%) de las concentraciones de FFL a partir del modelo y los límites de corte de la CIM *cuttoff* a 15, 25 y 35°C.

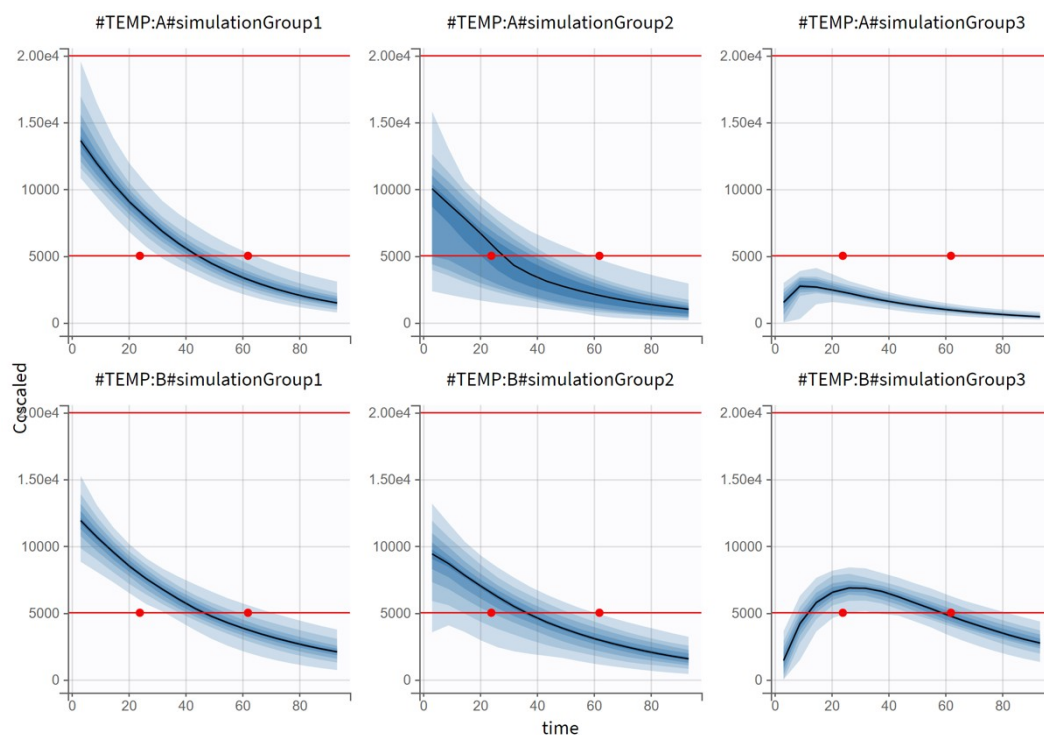


Figura 6: Gráficos de simulación (n=100) de la distribución de la predicción de las concentraciones de FFL vs. tiempo postratamiento a dosis única (10mg/kg) por vía IV (Group 1), IP (Group 2) y OR (Group 3) en esturiones rusos mantenidos a 15°C (B) o 25°C (A) de temperatura de cultivo. La línea roja indica la CIM *cuttoff* a 15°C (0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y a 25-35°C (2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los puntos rojos indican los tiempos límites (24 y 62 h) para mantener concentraciones superiores a la CIM *cuttoff* a 15°C por la vía IP y OR a distintas temperaturas.

En las figuras 7 y 8 se presentan los gráficos correspondientes a la simulación del modelo para los mismos 100 animales por cada grupo, pero con distintos criterios posológicos a dosis múltiple, donde se visualiza la distribución de la predicción (CI95%) de las concentraciones de FFL a partir del modelo y los límites de corte de la CIM *cuttoff* a 15, 25 y 35°C.

En la figura 7 únicamente dosificamos nuevamente los animales de acuerdo a los cortes establecidos en el modelo de dosis única. Estableciendo un esquema de tratamiento para la vía IP de dosificaciones cada 24 horas a diferencia de la vía OR en la cuál la dosificación se realizaría nuevamente a las 48 horas. Visualizamos que el esquema terapéutico planteado sería el adecuado para mantener niveles superiores a los indicados como CIM *cuttoff* a 15°C en ambas vías de administración. No obstante, no podrían aplicarse para temperaturas superiores a 25°C.

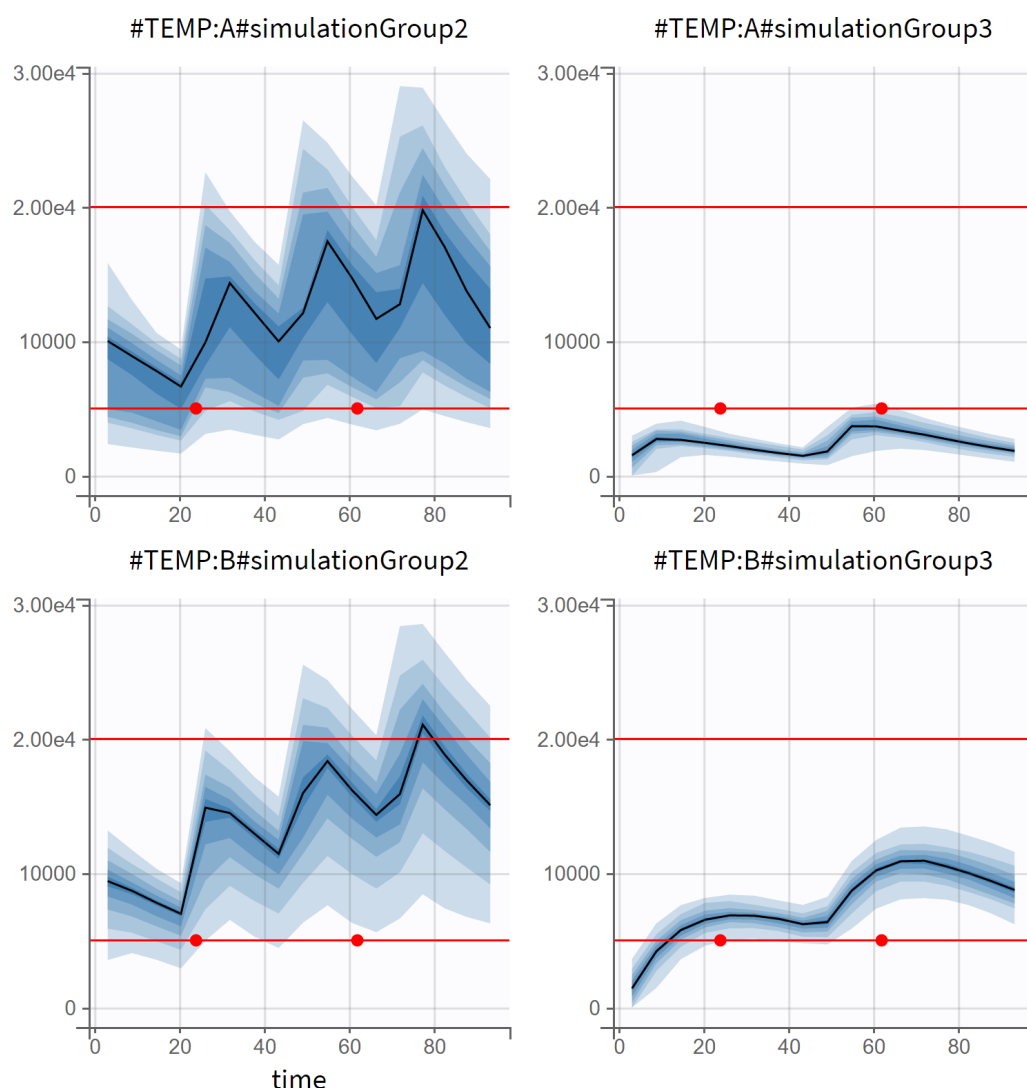


Figura 7: Gráficos de simulación (n=100) de la distribución de la predicción de las concentraciones de FFL vs. tiempo postratamiento a dosis múltiple (10mg/kg) por vía IP (cada 24 horas, Group 2) y OR (cada 48 horas, Group 3) en esturiones rusos mantenidos a 15°C (B) o 25°C (A) de temperatura de cultivo. La línea roja indica la CIM *cutoff* a 15°C (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) y a 25-35°C (2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Los puntos rojos indican los tiempos límites (24 y 62 h) a dosis única para mantener concentraciones superiores a la CIM *cutoff* a 15°C por la vía IP y OR a distintas temperaturas.

Los gráficos de la figura 8 corresponden a la respuesta del modelo frente a una modificación mayor, proponiendo la dosificación reiterada sumado a un incremento en las dosis. A diferencia de la anterior propuesta, para la vía IP mantuvimos el régimen de dosificación, pero incrementamos al doble la dosis empleada (20 mg.kg^{-1}) con el agregado de una dosis de ataque de 30 mg/kg para alcanzar rápidamente niveles superiores a los CIM *cutoff* para temperaturas superiores a 25°C. Para el caso de la vía OR las dosis debieron aumentarse aún más alcanzando los 80 mg.kg^{-1} dosis ataque + 40 mg.kg^{-1} cada 24 horas para lograr el objetivo de superar las CIM *cutoff* para temperaturas superiores a 25°C.

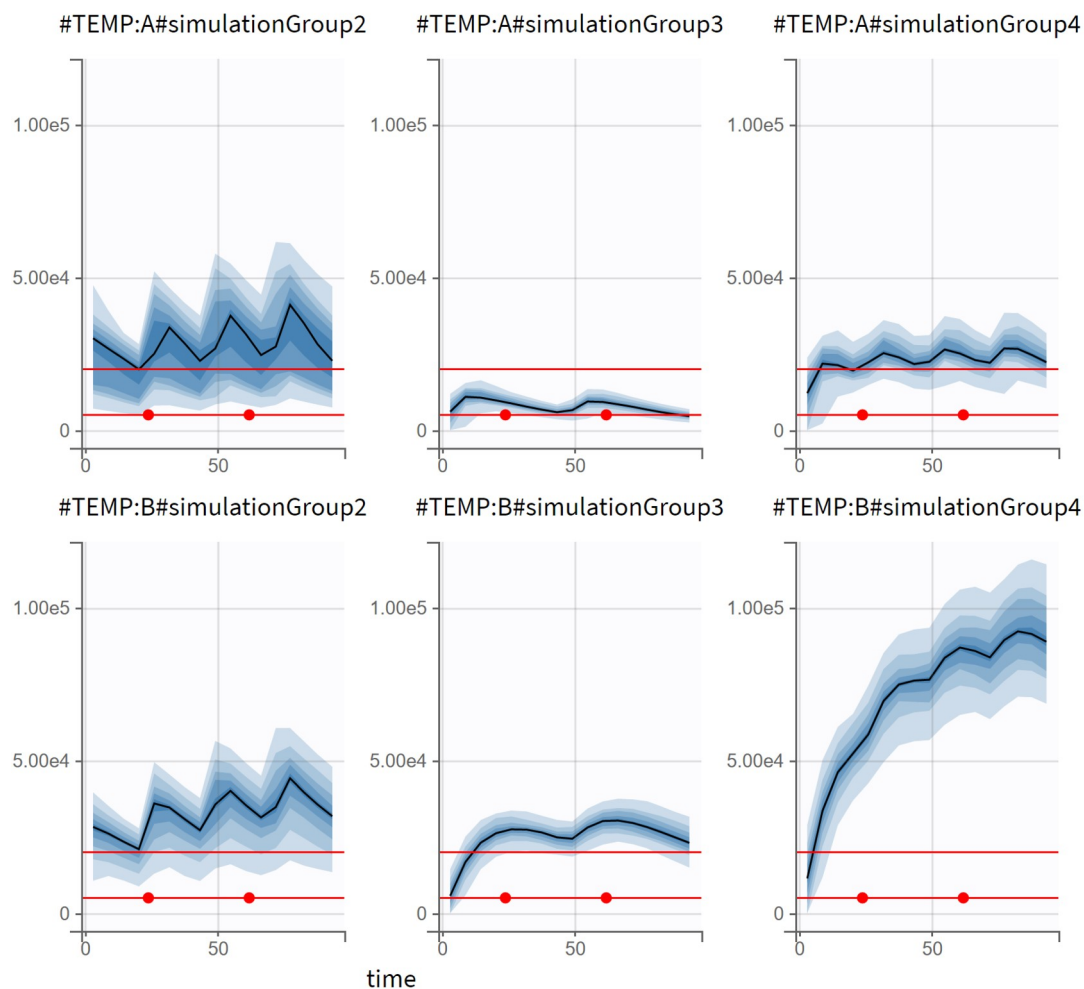


Figura 8: Gráficos de simulación (n=100) de la distribución de la predicción de las concentraciones de FFL vs. tiempo postratamiento a dosis múltiple por vía IP (30mg/kg dosis ataque + 20 mg/kg cada 24 horas, Group 2) y OR a esquema 1 (40mg/kg dosis ataque + 20 mg/kg a las 48 horas, Group 3) y esquema 2 (80mg/kg dosis ataque + 40 mg/kg cada 24 horas, Group 4) en esturiones rusos mantenidos a 15°C (B) o 25°C (A) de temperatura de cultivo. La línea roja indica la CIM *cutoff* a 15°C (0,5 µg.mL⁻¹) y a 25-35°C (2,0 µg.mL⁻¹). Los puntos rojos indicarían los tiempos límites (24 y 62 h) a dosis única para mantener concentraciones superiores a la CIM *cutoff* a 15°C por la vía IP y OR a distintas temperaturas.

Discusión

A partir de la técnica de extracción desarrollada en el marco de esta tesis, fue posible detectar y cuantificar FFL desde plasma de esturiones rusos mediante HPLC-UV, abarcando rangos de concentraciones que van de los 50 a los 1000 ng.mL⁻¹. Si bien se han llevado a cabo varios estudios de farmacocinética del FFL en distintas especies de peces (Kverme *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2006; Samuelsen *et al.*, 2003), hasta el momento existe un único reporte en Acipenseriformes referido al esturión siberiano (*Acipenser baerii*) (Wang *et al.*, 2012).

Este es el primer estudio en el que se determinan los parámetros farmacocinéticos del florfenicol en esturiones rusos para las vías intravenosa, intraperitoneal y oral. A su vez es la primera ocasión en la que dichos parámetros son establecidos a diferentes temperaturas en una misma población de esturiones de modo de evaluar el efecto de la misma.

Si bien el cultivo de esturiones en el mundo se lleva a cabo en zonas de clima estable y adecuado para las especies que se producen, en nuestro país estos animales se enfrentan a variaciones estacionales en la temperatura del agua que afectan tanto a su salud como a los procesos fisiológicos que llevan a cabo (Castellano *et al.*, 2017). Esto se ve reflejado tanto en las diferencias en la tasa de crecimiento que se aprecian en distintas épocas del año (Kolman y Kapusta, 2018) como en el aumento de la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas conforme aumenta la temperatura del agua (Perretta *et al.*, 2009).

Las alteraciones fisiológicas derivadas del factor temperatura también se ven reflejadas en la farmacocinética de este antimicrobiano y han sido descritas previamente para especies tales como el *goldfish* (Yang *et al.*, 2018), la tilapia (Rairat *et al.*, 2019) y el lenguado (Chang *et al.*, 2019), donde se ven afectados fundamentalmente los procesos de eliminación. En el esturión ruso en particular, es notorio el aumento en la biodisponibilidad del fármaco que se observa a 15°C en comparación con lo ocurrido cuando el tratamiento se realiza a 25°C, independientemente de la vía de administración empleada. Este hallazgo, no reportado hasta el momento, puede tener consecuencias en el manejo terapéutico, ya que a una misma dosis se estarían obteniendo concentraciones diferenciales en plasma según la temperatura ambiente.

Por otra parte, es de destacar las diferencias en biodisponibilidad que se presentan según la vía de administración e independientemente de la temperatura, siendo los valores de F para la vía IP, en general, el doble de los alcanzados para la vía OR.

Los resultados de la simulación del modelo farmacométrico nos permiten visualizar que, a 15°C la monodosis IP alcanza niveles superiores a las del CIM *cutoff* únicamente en las primeras 24 horas postratamiento, a diferencia de la vía OR que presenta un retraso en superar dicho nivel, aunque su acción terapéutica se extiende hasta las 62 horas. En ninguna de las alternativas de tratamiento propuestas, los

niveles de CIM *cutoff* serían alcanzados a temperaturas de 25° y 35°C a la posología estudiada.

Del análisis de las simulaciones que se presentan queda claramente demostrado que la temperatura es un factor determinante a la hora de establecer una terapéutica racional para el tratamiento de una infección por *Aeromonas* móviles en esturiones rusos, con importantes diferencias entre las vías de administración empleadas (IP vs OR). Teniendo en cuenta esto, sugerir una única posología global para el tratamiento de aeromoniasis en esturiones traería importantes cambios terapéuticos en los perfiles de concentración dependiendo la vía de administración y la temperatura ambiental.

El efecto combinado de la temperatura sobre los microorganismos y los animales ectotermos esta muy poco estudiado en la farmacología de organismos acuáticos, debido en parte a que la acuicultura se ha llevado a cabo tradicionalmente en países de clima estable (ya sean fríos o tropicales) donde la amplitud térmica dentro de un ciclo productivo es mínima.

Debido a la carencia de investigaciones específicas en la materia, en los países templados la acuicultura ha tenido que adoptar las pautas posológicas y terapéuticas desarrolladas para pisciculturas de clima estable, con lo que, teniendo en cuenta nuestros hallazgos, las fallas terapéuticas y el posible desarrollo de resistencia a los antimicrobianos serían probables, debido a la subdosificación derivada de las distintas situaciones farmacométricas. En este sentido cabe destacar que la

En lo que respecta al cultivo de esturiones en Uruguay, es posible prever que los esquemas posológicos tradicionalmente empleados deban ser ajustados en función de las simulaciones llevadas a cabo en este estudio y considerando los datos farmacodinámicos de CIM *cutoff* reportados en el capítulo III. Las sugerencias representan esquemas de discusión que plantean modificaciones en el enfoque terapéutico los cuales deberán ser validados en ensayos clínicos adecuadamente diseñados y con sus correspondientes estudios de seguridad e inocuidad que respalden su implementación. No obstante, permiten visualizar un problema terapéutico real en la cría de esturiones en nuestras situaciones ambientales.

10. CONSIDERACIONES FINALES

- El 45% de los aislamientos de *Aeromonas* spp. que se obtienen de esturiones cultivados en Uruguay son multirresistentes a los antimicrobianos
- El gen de resistencia a los anfenicoles, *floR*, se encuentra en el 9,1% de los aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de esturiones cultivados en Uruguay. La acción de la bomba de eflujo que codifica provoca un aumento de hasta seis veces en su concentración inhibitoria mínima.
- La temperatura de cultivo influye directamente sobre la concentración inhibitoria mínima y el diámetro de halo de inhibición de florfenicol en *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii* sensibles al antimicrobiano.
- Los puntos de corte epidemiológicos de florfenicol para *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii* a distintas temperaturas de cultivo son los siguientes:
 - . 0,5 µg.mL⁻¹ a 15°C
 - . 2,0 µg.mL⁻¹ a 25°C y 35°C
- El tiempo de exposición tiene un efecto potenciador de la actividad del florfenicol sobre *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii*, independientemente de la temperatura de cultivo.
- El florfenicol tiene un comportamiento mixto (concentración-dependiente y tiempo-dependiente en *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii*.
- Es posible extraer florfenicol desde plasma de esturión ruso y detectarlo y cuantificarlo mediante HPLC-UV abarcando un rango de concentraciones que va de los 50 a los 1000 ng.mL⁻¹.
- A temperatura de 15°C la biodisponibilidad de florfenicol en esturión ruso es notoriamente superior que a 25°C, ya sea por vía intraperitoneal (2,17 veces superior) u oral (13,8 veces superior).
- A una temperatura ambiente de 15°C, las vías intraperitoneal y oral constituyen una alternativa terapéutica eficaz para el tratamiento con FFL de las infecciones por *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii* sensibles al fármaco. A temperaturas mayores no es posible ajustar un modelo terapéutico a partir de los parámetros farmacométricos obtenidos en este estudio.
- La posología terapéutica del florfenicol debería considerar un ajuste en los tiempos de dosificación reiterada y ajuste de dosis teniendo en cuenta las variables de temperatura y vías de administración en las condiciones de cultivo de Uruguay.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelsalam, M., Asheg, A., & Eissa, A. 2013. *Streptococcus dysgalactiae*: An emerging pathogen of fishes and mammals. International Journal of Veterinary Science and Medicine. 1:1-6.

Abulhamd, A. (2010). Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of motile aquatic aeromonads, International Journal of Chemical Engineering and Applications. 1(1):90-96.

Ahmad, I.; Huang, L.; Hao, H.; Sanders, P.; Yuan, Z., (2016). Application of PK/PD Modeling in Veterinary Field: Dose Optimization and Drug Resistance Prediction. Biomed Res. Int. 2016.

Aoki, T. (1999). Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections. Edited by: Woo, P. y Bruno, D. CABI Publishing, New York, USA. pp:874.

Austin, B. y Austin, D. (2007). Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish. Springerlink and Praxis Publishing eds., Chinchester, UK. pp:552.

Baron, S.; Granier, S.; Larvor, E.; Jouy, E.; Cineux, M.; Wilhelm, A.; Gassilloud, B.; Le Bouquin, S.; Kempf, I. y Chauvin, C. 2017. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater-an attempt to set generic epidemiological cutt-off values. frontiers in Microbiology. 8:503.

Bolton, L., Kelley, L., Lee, M., Fedorka-Cray, P. y Maurer, J. 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. J. Clin. Microbiol. 37(5):1348-1351.

Bowser, P.; Kosoff, R.; Chen, Y.; Wooster, G.; Getchell, R.; Craig, J.; Lim, P.; Wetzlich, S.; Craigmill, A. y Tell, L. (2009). Florfenicol Residues in Nile Tilapia after 10-d Oral Dosing in Feed: Effect of Fish Size. Journal of Aquatic Animal Health 21:14–17.

Bronzi, P.; Chebanov, M.; Michaels, J.; Wei, Q.; Rosenthal, H. y Gessner, J. 2019. Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017. Journal of Applied Ichthyology. 35:257–266.

Cabello, F., Godfrey, H., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. Environmental Microbiology. 15(7):1917–1942.

Carnevia, D.; Perretta, A.; Letamendia, M.; Delgado, G. (2009). Manual de prevención de enfermedades en organismos acuáticos de cultivo. Montevideo, Oficina de Publicaciones de la Facultad de Veterinaria. 1:62.

Carnevia, D.; Letamendia, M.; Perretta, A. (2009) “Bacteriosis cutánea” en peces ornamentales asociada a mortalidad en criaderos de peces ornamentales de Montevideo. 1. Aspectos semiológicos y microbiológicos. Bol. IIP (27): 38-41.

Carnevia, D.; Rosso, A.; Benquet, S.; Mattos, A. y Mattos, M. (2009) Epizootia por *Ambiphrya* sp. (Protozoa: Ciliophora: Sesiloidae) afectando lisas (*Mugil platanus*) en condiciones de cultivo. Descripción de caso. Bol. IIP (27): 53-56.

Carnevia, D.; Letamendia, M.; Perretta, A. (2009) Podredumbre bacteriana de las aletas por *Aeromonas hydrophila/caviae*, en brótola *Urophycis brasiliensis* (Pisces: Gadiformes: Phycidae) . Primer diagnóstico en Uruguay. Bol. IIP (27): 43-47.

Carnevia, D.; Letamendia, M.; Perretta, A.; Delgado, E. (2010). Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticada en peces ornamentales de Uruguay. Veterinaria (Montevideo). 46(177-180):27-32.

Carnevia, D.; Letamendia, M.; Perretta, A. (2013). Pathogenic Gram-negative bacteria isolated from ornamental fish in Uruguay: characterization and antibiotic resistance. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 33(6):181-188.

Carnevia, D., Rosso, A., Letamendia, M., Carnales, D., Perreta, A. (2013). Segundo relevamiento de pisciculturas ornamentales en Uruguay. Actas del Primer Congreso Internacional de Veterinaria. Montevideo, 21 a 23 de noviembre. p48.

Chaves, L.; D. Carnevia (2003) Resistencia a diversos antibióticos de cepas de *Aeromonas hydrophila* (Bacteria, Aeromonadaceae) aisladas de peces ornamentales de Uruguay. IV Jornadas Técnicas Facultad de Veterinaria, Boletín IIP nº 24 : 13.

Chaves, L.; Carnevia D.; Friss de Kereki, C. (2003) Identificación de bacterias que afectan peces ornamentales tropicales en Uruguay. Primer avance. IV Jornadas Técnicas Facultad de Veterinaria, Boletín IIP nº 24, p. 32.

CHEA. (2006). Manejo de Animales de Experimentación Tradicionales y No Tradicionales. Publicaciones de la Oficina del Libro FEFMUR. pp:101.

Cipriano, R. (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. US Fish and Wildlife publications. Revision of Fish Disease Leaflet 68. pp: 25.
CLSI. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. 32(2):1-88.

CLSI. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Second Informational Supplement. CLSI document VET03/VET04-S2. Clinical and Laboratory Standard Institute Eds, Pennsylvania – USA. pp38.

CLSI. 2015a. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. CLSI guideline M45. Clinical and Laboratory Standards Institute Eds, Pennsylvania – USA. pp97.

CLSI. 2015b. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute Eds, Pennsylvania – USA. pp236.

da Silva, G.; Rossi, C.; Santana, M.; Langford, P.; Bossé, J. y Bazzolli, D. 2017. p518, a small *floR* plasmid from a South American isolate of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Veterinary microbiology. 204:129-132.

De Haas, V., Bonnier, M., Gicquel, M., Eto, F. & Shuster, D. 2002. Florfenicol: a time- or concentration-dependent antibiotic? New advances in calf disease management. XXII World Buiatrics Congress. IV:17–25

Di Salvo, A.; della Rocca, G.; Terzetti, E. y Malvisi, J. (2013). Florfenicol depletion in edible tissue of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and sea bream, *Sparus aurata* L. Journal of Fish Diseases. 36:685–693.

DINARA. (2018). Boletín Estadístico Pesquero. Publicaciones de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Montevideo. 52pp.

Domingues, S., Harms, K., Fricke, W., Johnsen, P., da Silva, G., & Nielsen, K. 2012. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. PLoS Pathogens. 8:e1002837.

Duman, M.; Saticioglu, I. y Altun, S. 2020. The determination of antimicrobial susceptibility by MIC and epidemiological cut-off values and the detection of resistance genes in *Aeromonas* species isolated from cultured fish. Letters in Applied Microbiology. 71(5):531-541.

FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.

FDA. (2008).

Fernández-Alarcón, C.; Miranda, C.; Singer, R.; López, Y.; Rojas, R.; Bello, H. y González-Rocha, G. 2010. Detection of the *floR* gene in a diversity of florfenicol resistant Gram-negative bacilli from freshwater salmon farms in Chile. Zoonoses and public health. 57(3):181-188.

- Foerster, S.; Unemo, M.; Hathaway, L.; Low, N. y Altaus, C. 2016. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. BMC Microbiology. 16:216.
- Gaikowski, M.; Mushtaq, M.; Cassidy, P.; Meinertz, J.; Schleis, S.; Sweeny, D y Endris, R. (2010). Depletion of florfenicol amine, marker residue of florfenicol, from the edible fillet of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. niloticus* and *O. niloticus* x *O. aureus*) following florfenicol administration in feed. Aquaculture. 301:1-6.
- Godoy, D.; Mian, G.; Zanolo, R.; Yuhara, T.; Faria, F. y Figueireido, H. 2008. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomicin in Brazilian strains of motile aeromonads. Aquaculture. 285:255-259.
- Gordon, L.; Cloeckert, A.; Doublet, B.; Schwarz, S.; Bouju-Albert, A.; Ganière, J.; Le Bris, H.; Flèche-Matéos, A. y Giraud, E. 2008. Complete sequence of the *floR*-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. J. Antim. Chem. 62:65-71.
- Horsberg, T.; Martinsen, B. y Varma, K. 1993. The disposition of ¹⁴C-florfenicol (*Salmo salar*) in Atlantic salmon. Aquaculture. 122:97-106.
- Ikebene, T.; Okuno, R.; Sasaki, M.; Kanda, Y.; Otsuka, H.; Kawahara, R.; Ohya, H.; Suzuki, M.; Uchida, K.; Nihonmatsu, H. and Ohnishi, M. 2007. Molecular characterization and antibiotic resistance of SDSE isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome. Journal of Infection and Chemotherapy. 24(2):117-122
- Janda, M.; Abbott, S. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clinical Microbiology Reviews. 23(1):35-73.
- Koleman, R. y Kapusta, A. (2018). Chapter 30, Food Characteristics and Feeding Management on Sturgeon with a Special Focus on the Siberian Sturgeon. En: The Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Bandt, 1869) Volume 2, Farming. Ed.: Williot, P.; Nonotte, G. y Chebanov, M. Springerlink International Publishing.
- Kossoff, R. E.; Chen, C. Y.; Wooster, G. A.; Getchell, R. G.; Bowser, P. R.; Clifford, A.; Tell, L. A. (2009). Florfenicol residues in three species of fish after 10-day oral dosing in feed. *Journal of aquatic animal health*, 21(1), 8-13.
- Kronvall, G.; Kahlmeter, G.; Myhre, E. y Galas, M. 2003. A new method for normalized interpretation of antimicrobial resistance from disk test results for comparative purposes. Clinical microbiology and infection. 9(2):120-132.
- Krumperman, P. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Applied Environmental Microbiology, 46(1):165–170.

Kverme, K.; Haugland, G.; Hannisdal, R.; Kallekleiv, M.; Colquhoun, D.; Lunestad, B. y Samuelsen, O. (2019). Pharmacokinetics of florfenicol in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) after a single oral administration. *Aquaculture*. 512. 734279.

Letamendía, M.; Carnevia, D.; Calone, E. (2008) Identificación de patógenos presentes en episodios de mortalidad natural, afectando bagre porteño (*Parapimelodus valenciennis* Kroyer, 1874) en el Río Negro, Uruguay. IX Jornadas Zoología Uruguay, Montevideo. p127.

Letamendia, M.; Carnevia, D.; Perretta, A.; Delgado, E. (2009) Detección del género *Aeromonas* (Bacteria: Aeromonadaceae) en organismos acuáticos de interés comercial en Uruguay. *Bol. IIP* (27) 42-45.

Letamendia, M.; Perretta, A.; Carnevia, D. (2009) Análisis de casos de “Podredumbre Bacteriana de las Aletas” (fin rot) en peces ornamentales de Uruguay. *Bol. IIP* (27): 57-60.

Lewbart, G. A.; Papich, M.; Whitt-smith, D. (2005). Pharmacokinetics of florfenicol in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after single dose intramuscular administration 142–144.

Lin, M.; Fan, H.; Chen, Z.; Yao, Z. (2012). Pharmacokinetics of florfenicol in Japanese eel (*Anguilla japonica*) after a single oral dose 813–815.

Liu, L., Tsai, J., Hsueh, P., Tseng, S., Hung, W., Chen, H., and Teng, L. 2007. Identification of *tet*(S) gene area in tetracycline-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi:10.1093/jac/dkm500

Martinsen, B.; Oppegaard, H.; Wichstrom, R. y Myhr, E. 1992. Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36(8):1738-1743.

Martisen, B., Horsberg, T.E., Varma, K.J. (1993). Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 110C. *Aquaculture* 112:1-11.

Meng, Y., Xiao, H., & Zeng, L. 2011. Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen from Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Journal of Applied Ichthyology*. 27:799–803.

Michel, C., y Blanc, G. 2001. Minimal inhibitory concentration methodology in aquaculture: the temperature effect. *Aquaculture*. 196:311-318.

Michel, C.; Kerouault, B.; Martin, C. 2003. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fishpathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 95:1008–1015.

Michel, C.; Matte-Tailliez, O.; Kerouault, B. y Bernardet, J. 2005. Resistance pattern and assessment of phenicol agents' minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *Journal of applied microbiology*. 99(2):323-332.

Miranda, C. y Rojas, R. 2007. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture*. 266(1-4): 39-46.

Mota, M.; Gadea, M.; González, S.; González, G.; Pardo, L.; Rivas, M.; Algorta, G.; Schelotto, F. y Varela, G. 2010. Bacterial pathogens asociated with bloody diarrhea in Uruguayan children. *Revista Argentina de Microbiología*. 42:114-117.

Mouton, J.W., Dudley, M.N., Cars, O., Derendorf, H., Drusano, G.L. (2005). Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti- infective drugs: an update 55, 601– 607.

Mugetti, D., Pastorino, P., Menconi, V., Pedron, C., & Prearo, M. 2020. The old and the new on viral diseases in sturgeon. *Pathogens*. 9:146.

Nielsen, M.; Hoi, L.; Schmidt, A.; Qian, D.; Shimada, T.; Shen, J. y Larsen, J. (2001). Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? *Diseases of Aquatic Organisms*. 46:23-29.

Noga, E. (1996). *Fish Diseases, diagnosis and treatment*. Iowa, Ed. Mosby-Year Book, Inc. USA. p.367.

Osman, K., Al-Maary, K., Mubarak, A., Dawoud, T., Moussa, I., Ibrahim, M., Hessain, A., Orabi, A., & Fawzy, N. 2017. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC Veterinary Research*. 13:357.

Park, B.; Lim, J.; Kim, M. y Yun, H. 2006. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (*Silurus asotus*). *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 29(1): 37-40.

Perretta, A.; Letamendia, M.; Carnevia, D. Y Conijeski, D. 2009. Primera experiencia de infección experimental de esturión siberiano (*Acipenser baerii*) con *Streptococcus dysgalactiae*. *Bol. IIP* (27): 30- 34.

Perretta, A.; Letamendia, M. y Carnevia, D. 2009. Infección experimental de peces ornamentales con *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*. Primer ensayo. Bol. IIP (27): 50-52.

Perretta, A.; Antúnez, K. y Zunino, P. 2018. Phenotypic, molecular and pathological characterization of motile aeromonads isolated from diseased fishes cultured in Uruguay. Journal of Fish Diseases. 41:1559-1569.

Perretta, A.; Antúnez, K. y Zunino, P. 2019. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias aeromonadales móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay. Veterinaria (Montevideo). 55:4-8.

Pinault, L.P., Millot, L.K., Sanders, P.J. (1997). Absolute oral bioavailability and residues of florfenicol in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). J. Vet Pharmacol Therap 20:297-298.

Plumb, J. y Hanson, L. (2011). Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Third Edition. Wiley-Blackwell eds. New Delhi, India. pp:492.

Ranjbar, R., Salighehzadeh, R., & Sharifiyazdi, H. 2019. Antimicrobial resistance and incidence of integrons in *Aeromonas* species isolated from diseased freshwater animals and water samples in Iran. Antibiotics. 8(4):198.

Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredía, S., de Verdál, H., & Gozlan, R. 2020. Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. Nature Communications. 11(1):1-8.

Salogni, C., Cervellione, F., Guarnera, S., Mioso, P., Zanoni, M., Giovannini, S., & Alborali, G. 2010. Infezioni da cocchi Gram positivi in *Acipenser baerii* allevati nella Pianura Padana. Ittiopatologia. 7:25-32.

Samuelsen, O.; Bergh, Ø. y Ervik, A. 2003. Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. Diseases of Aquatic Organisms. 56(2): 127-133.

Santi, M., Pastorino, P., Foglini, C., Righetti, M., Pedron, C., & Prearo, M. 2018. A survey of bacterial infections in sturgeon farming in Italy. Journal of Applied Ichthyology. 00:1-8.

Santos, L., & Ramos, F. 2018. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. International Journal of Antimicrobial Agents. 52:135-143.

Sidhu, P., Rassouli, A., Illambas, J., Potter, T., Pelligand, L., Rycroft, A., & Lees, P. 2014. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration and modelling of florfenicol in calves. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. 37(3):231-242.

Silva, N., Nogueira, J., Gouveia, J., Costa, M., & Gouveia, G. 2018. Gene *floR* e a resistência ao florfenicol em isolados de *Aeromonas* spp. autóctones de organismos aquáticos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 38(3):357-366.

Shoemaker, C., Xu, D., & Soto, E. 2017. *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae*. Fish viruses and bacteria: Pathobiology and protection. 298-313.

Smith, P. 2006. Breakpoints for disc diffusion susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases: a review of current practice. Aquaculture. 261(4):1113-1121.

Smith, P.; Ruane, N.; Douglas, I.; Carroll, C.; Kronvall, G. y Fleming, G. 2007. Impact of inter-lab variation on the estimation of epidemiological cut-off values for disc diffusion susceptibility test data for *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture. 272(1-4): 168-179.

Smith, P. y Kronvall, G. 2014. How many strains are required to set an epidemiological cut-off value for MIC values determined for bacteria isolated from aquatic animals? Aquaculture International. 23(2):465-470.

Stecher, G., Tamura, K., & Kumar, S. 2020. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. Molecular Biology and Evolution. 37(4):1237-1239.

Schwarz, S.; Kehrenberg, C.; Doublet, B. y Cloeckaert, A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS microbiology reviews. 28(5):519-542.

Trust, T.; Bull, L.; Currie, B. y Buckley, J. (1974). Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 36:1174-1179.

Ture, M., Ozcelep, T., Akbulut, B., & Kutlu, I. 2018. Disease of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) caused by *Aeromonas* sp. Genetics of Aquatic Organisms. 2:43-47.

Uruguay. Plan Nacional de Desarrollo de la Acuicultura. (2008). Estrategia general para el desarrollo de la acuicultura sostenible en la República Oriental del Uruguay. Montevideo, DINARA – FAO. 40 p.

Verner-Jeffreys, D.; Welch, T.; Schwarz, T.; Pond, M.; Woodward, M.; Haig, S. y Baker-Austin, C. 2009. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. PloS one:4(12):e8388.

Wang, R., Wang, D., Li, S. W., and Lu, T. Y. (2012). Pharmacokinetics and tissue distribution of florfenicol and florfenicol amine in *Acipenser baerii*. Journal of Shanghai Ocean University. 21(4):568-574.

- Wrzesinski, C., Crouch, L., Gaunt, P., Holifield, D., Bertrand, N., Endris, R., (2006). Florfenicol residue depletion in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Aquaculture* 253, 309–316.
- Xiao, Y., Wang, B., Xia, Y., Hu, L., Hu, K., & Yang, X. 2015. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic *Aeromonas sobria* from sturgeon. *Journal of Southern Agriculture*. 46(10):1909-1914.
- Yang, W. & Li, A. 2009. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture*. 294:14-17.
- Yáñez, M., Catalán, V., Apraiz, D., Figueras, M., & Martínez-Murcia, A. 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:875–883
- Zimmerman, D.M,m Armstrong, D.L., Curro, T.G., Dankoff, S.M., Vires, K.W., Cook, K.K., Jaros N.D., and Papich, M.G. (2006). Pharmacokinetics of florfenicol after a single intramuscular dose in whitespotted bambbo sharks (*Chiloscyllium plagiosum*). *J Zoo Wildl Med* 37 (2): 165:73.

ANEXO 1

Artículo 1: sustento al capítulo I de esta tesis



Resistencia a los antimicrobianos en bacterias aeromonadales móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay

Antimicrobial resistance in motile aeromonads isolated from fishes cultured in Uruguay

Alejandro Perretta¹ <https://orcid.org/0000-0003-2375-1408>
Karina Antúnez² <https://orcid.org/0000-0002-3664-9835>
Pablo Zunino² <https://orcid.org/0000-0003-2318-3906>

¹Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria – UdelaR
Tomás Basáñez 1160, Montevideo, C.P.: 11300.

²Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable” - MEC

Veterinaria (Montevideo) Volumen 55
Nº 211 - 1 (2019) 4-8

Recibido: 18/09/2018
Aceptado: 13/11/2018

Resumen

Nuestro país es referente a nivel mundial en algunos sectores de la acuicultura tales como la producción de caviar a partir de la cría de esturiones. Como en todas las producciones animales intensivas, en piscicultura se desarrollan epizootias debido a patógenos bacterianos en cuyo caso el empleo de antimicrobianos puede constituir una estrategia de control. La Septicemia por *Aeromonas* móviles (SAM) es la enfermedad infecciosa más prevalente en la piscicultura nacional. Las dificultades para el acceso en el país a formulaciones específicas para acuicultura y la carencia de información farmacológica para las especies y condiciones de cultivo nacionales, provocan en muchos casos un uso indebido de los fármacos con el consecuente riesgo de desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los perfiles de resistencia a los antimicrobianos desarrollados por un número representativo de aeromonadales aislados de peces cultivados en nuestro país. Para ello se empleó el método de difusión en placa según protocolo estandarizado por el *Clinical and Laboratory Standard Institute*. Los antimicrobianos evaluados fueron: amoxicilina ácido clavulánico, ampicilina, ampicilina dicloxacilina, enrofloxacin, eritromicina, nitrofurantoina, oxitetraciclina, penicilina, tiamfenicol y sulfametoxazole-trimetropim. Se halló un elevado porcentaje (82.3%) de aislamientos multiresistentes a los antimicrobianos. Todos los aislamientos analizados fueron susceptibles a la acción de los antimicrobianos enrofloxacin y nitrofurantoina.

Palabras clave: *Aeromonas*, resistencia, peces, Uruguay

Summary

Uruguay is a world reference in some aquaculture sectors such as caviar production in sturgeons farms. Bacterial outbreaks are usual in fish farming as well as in all intensive animal production and the use of antimicrobials appears as a strategy for their control. Motile aeromonads septicemia is the most prevalent infectious disease in Uruguayan aquaculture. The difficulties for access to specific formulations for aquaculture in the country and the lack of pharmacological information for the species and national culture conditions, cause in many cases, improper use of the drugs with the consequent risk of developing resistance to antimicrobials. The aim of this work was to characterize the antimicrobial resistance profiles developed by a representative number of aeromonads isolated from fishes cultured in Uruguay. It was used the agar diffusion method according to the protocol standardized by the Clinical and Laboratory Standard Institute. The antimicrobials evaluated were: amoxicillin with clavulanic acid, ampicillin, ampicillin with dicloxacillin, enrofloxacin, erythromycin, nitrofurantoin, oxytetracycline, penicillin, thiamphenicol and sulfamethoxazole-trimetropim. We found a high percentage (82.3%) of antimicrobial multiresistant isolates. All the isolates analyzed were susceptible to the action of the antimicrobials enrofloxacin and nitrofurantoin.

Key words: *Aeromonas*, resistance, fishes, Uruguay

Introducción

La acuicultura es la actividad de producción animal que más se ha expandido en las últimas décadas a nivel mundial, superando en ritmo de crecimiento anual al resto de las producciones animales y supliendo casi el 50% de los productos acuáticos que se consumen actualmente (FAO, 2018). En este contexto Uruguay se destaca como el mayor productor de caviar en Sudamérica y uno de los diez principales productores a nivel mundial (Bronzi y Rosenthal, 2014), con una producción anual que supera las 600 toneladas de carne de esturión y las siete toneladas de caviar (DINARA, 2014). A su vez, el cultivo de peces ornamentales se destaca como una rama de la actividad de importancia a nuestra escala país, con una producción anual de 250.000 animales en promedio (Carnevia y col., 2013).

Al igual que en otras producciones animales, en los establecimientos de piscicultura intensiva ocurren epizootias por diversos patógenos, dentro de los que se destacan por su prevalencia e importancia las bacterias Gram negativas (Austin y Austin, 2007). La septicemia por *Aeromonas* móviles (SAM) es la enfermedad infecciosa más importante en la piscicultura nacional, afectando tanto peces ornamentales como para consumo humano, siendo *Aeromonas hydrophila* y *A. veronii* las especies más prevalentes en nuestra acuicultura (Perretta y col., 2018).

Estos microorganismos, ubicuos en toda la biosfera microbiana, han adquirido relevancia para la salud en las últimas décadas, debido por un lado al aumento y la gravedad de los casos clínicos observados en pacientes humanos y por otro lado a las importantes pérdidas económicas provocadas en la acuicultura (Janda y Abbott, 2010; Rasmussen-Ivey y col., 2016).

El elevado número de mortandades que puede provocar la enfermedad sin tratamiento y la carencia de herramientas de prevención, hacen que los piscicultores nacionales, tanto de peces ornamentales como para consumo, optan por la terapia con antimicrobianos para controlar epizootias. Las dificultades para el acceso en el país a formulaciones específicas para acuicultura y

la carencia a su vez de información farmacológica para las especies y condiciones de cultivo nacionales, provocan en muchos casos un uso indebido de los fármacos con el consecuente riesgo de desarrollo de resistencia a los antimicrobianos.

A pesar de la importancia que poseen los aeromonadales tanto para la salud humana como animal, para Janda y Abbott (2010) la susceptibilidad *in vitro* de *Aeromonas* spp. a los antimicrobianos es un área clave del conocimiento de los aeromonadales que ha recibido poca atención en las últimas décadas.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los perfiles de resistencia a los antimicrobianos desarrollados por un número representativo de aeromonadales aislados de peces cultivados en nuestro país.

Materiales y Métodos

Origen de los aislamientos

Se emplearon 33 aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de distintas especies de peces de agua dulce con signos clínicos de SAM (6% *A. allosaccharophila*, 6% *A. bestiarum*, 3% *A. caviae*, 15% *A. punctata*, 36% *A. hydrophila* y 33% *A. veronii*). Los animales afectados provinieron de acuarios comerciales (6.2%), bioterios (21.9%) y criaderos de peces ornamentales y para consumo (71.9%), todos ellos ubicados dentro del territorio nacional.

Mediante entrevista a los encargados de la sanidad de cada establecimiento se determinó el tipo y la frecuencia de uso de antimicrobianos. Se evaluó la susceptibilidad de cada aislamiento hacia diez antimicrobianos entre los que se incluyen aquellos empleados en la acuicultura nacional, a saber: amoxicilina ácido clavulánico (AMC 2:1, 20µg), ampicilina (AP 10µg), ampicilina dicloxacilina (AMD 10:1, 10µg), enrofloxacin (ENO 30µg), eritromicina (ER 15µg), nitrofurantoína (NF 300µg), oxitetraciclina (OT 30µg), penicilina (P 10U), tiamfenicol (TFM 65µg) y sulfametoxazole-trimetoprim (SXT 19:1, 25µg).

Para la determinación de sensibilidad se empleó el método de difusión simple en agar (Bauer y col., 1966) según el protocolo

Cuadro 1. Estándares de sensibilidad empleados para la determinación de resistencia en los aislamientos de *Aeromonas* spp. móviles provenientes de peces cultivados en Uruguay mediante el método de difusión en placa (Kirby-Bauer).

Antimicrobiano	Diámetro del halo en milímetros			Referencia
	S	R	I	
Amoxicilina (20µg) + Ácido clavulánico (10µg)	≥ 18	≤ 13	14 a 17	BD; CLSI, 2006
Ampicilina (10µg)	≥ 17	≤ 13	14 a 16	BD
Ciprofloxacina (5µg)	≥ 21	≤ 15	16 a 20	BD; CLSI, 2006
Cloramfenicol (30µg)	≥ 18	≤ 12	13 a 17	CLSI, 2006
Eritromicina (15µg)	≥ 23	≤ 13	14 a 22	BD
Levofloxacina (5µg)	≥ 17	≤ 13	14 a 16	BD; CLSI, 2006
Nitrofurantoína (300µg)	≥ 17	≤ 14	15 a 16	BD
Penicilina (10U)	≥ 15	≤ 14	sin dato	BD
Sulfametoxazole (25µg) + Trimetoprim (1,3µg)	≥ 16	≤ 10	11 a 15	BD; CLSI, 2006
Tetraciclina (30 µg)	≥ 19	≤ 14	15 a 18	BD; CLSI, 2006

I: sensibilidad intermedia, R: resistente, S: sensible

BD: Becton Dickinson ®

que figura en el manual M42-P del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2005). Se empleó la cepa tipo de *A. hydrophila* ATCC 7966® como control de calidad del procedimiento.

La discriminación entre bacterias sensibles, resistentes e intermedias se basó en los estándares especificados por CLSI para *Aeromonas hydrophila* (CLSI, 2006). En los casos en los que dicho estándar no posee información para el antimicrobiano empleado, se utilizó la información existente para drogas de la misma familia o el estándar de sensibilidad aportado por el fabricante de los Sensi-Discs® (Bekton Dickinson, BD) (ver Cuadro 1).

Se consideraron aislamientos susceptibles a la acción de un antimicrobiano determinado a aquellos cuyos halos de inhibición correspondieron tanto a la categoría “resistente”, como “intermedia”. Este criterio se basa en que los estándares de resistencia existentes en la actualidad no han sido evaluados en patógenos de organismos acuáticos y a su vez no se han desarrollado modelos farmacométricos en peces para dichas drogas (del Río-Rodríguez y Turnbull, 2002; Smith y col., 1994).

Se determinaron las diferencias de susceptibilidad entre especies mediante el empleo del test de Chi² con un nivel de confianza del 95% (software Statgraphics versión 16.1.18).

Se calculó a su vez el “Índice de Multiresistencia a Antimicrobianos” (MAR), como el cociente entre el número de antimicrobianos a los que un aislamiento fue susceptible sobre el número de antimicrobianos evaluados para ese aislamiento. Valores de MAR mayores o iguales a 0,2 son indicativos de aislamientos con alto riesgo de proceder de ambientes donde se hace uso habitual de antibimicrobianos, los valores inferiores o iguales a 0,2 indican aislamientos procedentes de ambientes donde el uso de antimicrobianos es mínimo o nulo (Krumperman, 1983). Para aumentar la confiabilidad de los resultados se excluyeron los antimicrobianos β-lactámicos de este análisis debido a que para algunos autores este grupo bacteriano es naturalmente resistente a la acción de estos fármacos (Aoki, 1999; Martin-Carnahan y Joseph, 2005)

Resultados

En el cuadro 2 se presentan los perfiles de sensibilidad desarrollados por los distintos aislamientos ante los diferentes antimicrobianos evaluados. Todos los aislamientos evaluados son resistentes a las penicilinas, ya sea naturales o sintéticas. La adición de un inhibidor de las β-lactamasas (ácido clavulánico), permite desarrollar sensibilidad al 11,8% de los aislamientos analizados. Se destaca a su vez, el escaso número de aislamientos sensibles a los macrólidos (11,8% de aislamientos sensibles a la Eritromicina).

Los aislamientos procedentes de un mismo brote epizootico poseen perfiles de sensibilidad similares entre sí, salvo en una ocasión en que dos aislamientos epizootológicamente relacionados no comparten el mismo perfil de sensibilidad

Cuadro 2. Resultados del antibiograma realizado sobre *Aeromonas* spp. móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay, método de difusión en placa según documento M45-P de CLSI (los valores corresponden al diámetro del halo de inhibición en milímetros).

Aislamiento	AMC	AMD	AP	ENO	ER	NF	OT	P	TFM	SXT
A1	20	-	-	37	20	25	32	-	36	36
A2	21	-	-	34	24	25	33	-	34	32
B1	15	-	-	37	20	23	32	-	33	33
B2	18	-	-	38	19	26	33	-	35	34
C1	12	-	-	30	19	20	24	-	33	26
H1	15	-	-	36	9	24	23	-	32	23
H2	15	-	-	32	15	24	35	-	36	36
H3	16	-	-	37	15	24	34	-	36	35
H4	11	-	-	31	18	24	30	-	26	32
H5	17	-	-	37	20	23	32	-	33	35
H6 ^a	14	-	-	35	16	23	33	-	33	35
H7 ^a	12	-	-	39	17	25	35	-	41	32
H8	14	-	-	33	15	23	9	-	-	-
H9	13	-	-	32	21	21	-	-	-	-
H10	13	-	-	33	23	21	29	-	31	30
H11	15	-	-	21	15	22	30	-	31	29
H12	15	-	-	34	17	22	33	-	32	33
H13	10	-	-	32	18	21	27	-	29	29
P1	13	-	-	31	13	20	26	-	33	20
P2 ^b	13	-	-	32	15	20	20	-	32	20
P3 ^b	12	-	-	32	18	21	28	-	32	25
P4 ^c	13	-	-	29	16	19	23	-	29	25
P5 ^c	15	-	-	32	16	21	23	-	32	24
V1	15	-	-	43	22	25	33	-	35	35
V2	14	-	-	29	15	21	10	-	32	25
V3 ^d	13	-	-	36	21	22	13	-	-	25
V4 ^d	16	-	-	39	24	22	35	-	32	38
V5	16	-	-	37	21	22	9	-	32	24
V6	15	-	-	21	24	19	13	-	-	32
V7	14	-	-	25	18	24	-	-	36	26
V8	13	-	-	31	12	21	26	-	32	19
V9	20	-	-	26	16	23	27	-	33	22
V10 ^e	14	-	-	36	15	21	23	-	32	23
V11 ^e	16	-	-	34	18	21	24	-	33	25

AMC: amoxicilina ácido clavulánico (2:1, 20μg), AMD: ampicilina dicloxacilina (10:1, 10μg), AP: ampicilina (10μg), ENO: enrofloxacin (30μg), ER: eritromicina (15μg), NF: nitrofurantoina (300μg), OT: oxitetraciclina (30μg), P: penicilina (10U), TFM: tiamfenicol (65μg), SXT: sulfametoxazole trimetoprim (19:1, 25μg).

Se destacaron en negrita aquellos halos correspondientes a sensibilidad intermedia o resistencia según estándar de CLSI y/o especificaciones del fabricante de los sensidiscos empleados.

(-) corresponde a aquellos casos donde no se detectó inhibición del crecimiento bacteriano.

^{a, b, c, d, e}: letras iguales indican aislamientos procedentes de un mismo brote epizootológico.

(V3-V4).

En la Figura 1 se muestra la proporción de aislamientos que adoptan cada uno de los valores de Índice MAR calculados. Cabe destacar que 82,3% de los aislamientos nacionales de *Aeromonas* spp. son multirresistentes a los antimicrobianos.

Discusión

Este es el primer estudio que analiza la resistencia a los antimicrobianos desarrollada por un número representativo de microorganismos aeromonadales aislados de peces procedentes de la acuicultura nacional. A partir de los resultados obtenidos es posible advertir el elevado número de *Aeromonas* spp. resistentes que se aíslan de los peces que se cultivan en nuestro país, ya sea ornamentales o para consumo humano.

Existe consenso en afirmar que la resistencia a los antimicrobianos en este grupo bacteriano se ha visto incrementada en los últimos años, por un lado debido al desarrollo de cepas multirresistentes procedentes de las aguas residuales urbanas y hospita-

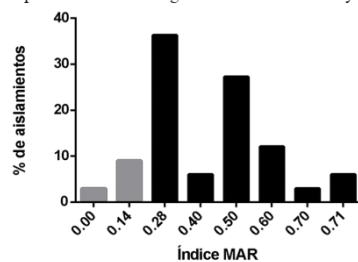


Figura 1. Gráfico en el que se representan los diferentes valores del Índice de Multirresistencia a los antimicrobianos (MAR) observado en aislamientos de *Aeromonas* spp. móviles obtenidos de peces cultivados en Uruguay. Las barras de color gris corresponden a aislamientos no multirresistentes (Índice MAR < 0.2) y las de color negro corresponden a aislamientos multirresistentes

liarias y por otro lado debido al uso indiscriminado de antimicrobianos que ha hecho históricamente la acuicultura (Schmidt y col., 2000; Kaskhedikar y Chhabra, 2010; Saavedra, 2012).

Aeromonas spp. aisladas de sistemas de cultivo de peces son particularmente resistentes a los antimicrobianos y frecuentemente contienen plásmidos e integrones con múltiples genes de resistencia, lo que genera dificultades en el tratamiento de las enfermedades provocadas por este grupo bacteriano (Baquero y col., 2008; Odeyemi y col., 2012).

Teniendo en cuenta la clasificación de susceptibilidad a los antimicrobianos establecida por Janda y Abbott (2010) para *Aeromonas* spp., los aislamientos nacionales deben considerarse en general resistentes a los macrólidos y penicilinas naturales y de espectro ampliado (<12% de aislamientos susceptibles); con susceptibilidad variable hacia los anfenícolos y tetraciclinas (79 a 88%) y susceptibles a los antifolatos, quinolonas y nitrofuranos (94 a 100%); hallazgos coincidentes con los realizados por dichos autores a partir de la revisión de una extensa bibliografía.

A pesar de esto es preciso destacar que en *Aeromonas* spp. pro-

cedentes de la acuicultura es común observar diferencias en la resistencia a los distintos fármacos debido a la expresión de distintos mecanismos de resistencia en aislamientos que se hayan expuestos a presión de selección inducida por el uso de diferentes antimicrobianos (Yi y col., 2014). Del mismo modo es común encontrar aislamientos de *Aeromonas* spp. multirresistentes debido principalmente a la adquisición por transferencia horizontal de elementos móviles del genoma que poseen varios genes de resistencia (Rhodes y col., 2000; Ndi y Barton, 2011; Saavedra, 2012).

Si bien existen pocas investigaciones que comparen la susceptibilidad entre especies, algunos autores destacan que *A. hydrophila* es más resistente a los antimicrobianos que *A. caviae* y *A. sobria*, especialmente a las penicilinas y cefalosporinas (Motyl y col., 1985; Chang y Bolton, 1987). En nuestro caso, no se encontraron diferencias entre especies en lo que respecta a la susceptibilidad desarrollada para el conjunto de los antibióticos analizados ($\chi^2=104,627$; g.l.: 306; $p=1,0$).

Los hallazgos realizados en el marco de esta investigación revelan el elevado número de aislamientos de *Aeromonas* spp. multirresistentes que ocurren en la acuicultura nacional, hecho que reviste gran importancia, no solo por las dificultades en el tratamiento de las aeromoniasis que puedan ocurrir en las pisciculturas, sino además por la capacidad de actuar de reservorios de genes de resistencia que poseen estos microorganismos y la facilidad de dispersión de los mismos hacia otros ecosistemas a través del medio acuático (Janda y Abbott, 2010; Igbinosa y col., 2013; Patil y col., 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior, resulta fundamental el establecimiento de correctos planes terapéuticos en los sistemas de acuicultura de nuestro país, basados en un adecuado diagnóstico y antibiograma de los microorganismos actuantes y en la investigación de aspectos farmacométricos aplicados a las especies icticas de interés para el país.

Conclusiones

Existe un elevado porcentaje (82,3%) de aislamientos de *Aeromonas* spp. procedentes de peces cultivados en nuestro país que son multirresistentes a los antimicrobianos.

Todos los aislamientos analizados fueron susceptibles a la acción de los antimicrobianos enrofloxacina y nitrofurantoina. Bib

Bibliografía

1. Aoki T. (1999). Motile Aeromonads (*A. hydrophila*). En: Woo, P. y Bruno, D. Fish Diseases and Disorders. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Editado por: CABI Publishing, New York. pp:427-453.
2. Austin B y Austin D. (2007). Bacterial fish pathogens: dis-

- eases in farmed and wild fish. Springerlink and Praxis Publishing eds., Chichester, UK. pp:552.
3. Baquero F, Martínez J y Cantón R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotech.* 19:260-265.
 4. Bauer A, Kirby W y Sherris J. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45:493-496.
 5. Bronzi P y Rosenthal H. (2014). Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview. *Journal Appl Ichthyol.* 30(6):1536-1546.
 6. Carnevia D, Letamendia M y Perretta A. (2013). Pathogenic Gram-negative bacteria isolated from ornamental fish in Uruguay: characterization and antibiotic resistance. *B Eur Assoc Fish Pat.* 33(6):181-186.
 7. Chang B y Bolton S. (1987). Plasmids and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. *Antimicrob Agents Ch.* 31(8):1281-1282.
 8. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2005). Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Proposed Guideline. CLSI document M42-P. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
 9. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2006). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated and Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. CLSI document M45-P. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
 10. del Río-Rodríguez R y Turnbull J. (2002). Aerobic microflora of imported ornamental fish from Singapore and South America. Part 2: Antimicrobial Resistant Profiles of motile Aeromonads. *Fish Veterinary Journal.* 6:1-21.
 11. DINARA (Dirección Nacional de Recursos Acuáticos). (2014). Boletín Estadístico Pesquero zafra 2014. http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/boletin_estadistico_pesquero_2014.pdf (último acceso 13/09/2018)
 12. FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 13. Igbinosa I, Chigor H, Igbinosa V, Obi E y Okoh A. (2013). Antibigram, adhesive characteristics, and incidence of class 1 integron in *Aeromonas* species isolated from two South African rivers. *BioMed Res Int.* ID 127570.
 14. Janda M. y Abbott S. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin Microbiol Rev.* 23(1):35-73.
 15. Kaskhedikar M y Chhabra D. (2010). Multidrug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Veterinary World.* 3(2):76-77.
 16. Krumpalman P. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microb.* 46(1):165-170.
 17. Martin-Carnahan A y Joseph S. (2005). Order XII. Aeromonadales ord. nov. En: Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J. & Garrity, G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ª edición, vol. 2, parte B. New York: Springer. pp. 556-580
 18. Motyl M, McKinley G y Janda M. (1985). In Vitro susceptibilities of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Ch.* 28(1):151-153.
 19. Ndi O y Barton M. (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J Fish Dis.* 34:589-599.
 20. Odeyemi O, Asmat A y Usup G. (2012). Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Aeromonas hydrophila* isolated from estuary. *J Microbiol Biotech Food Sci.* 1(6):1339-1357.
 21. Patil H, Benet-Perelberg A, Naor A, Smirnov M, Ofek T, Nasser A, Minz D, y Cytryn E. (2016). Evidence of increased antibiotic resistance in phylogenetically-diverse *Aeromonas* isolates from semi-intensive fish ponds treated with antibiotics. *Front Microbiol.* 7:1875.
 22. Perretta A, Antúnez K y Zunino P. (2018). Phenotypic, molecular and pathological characterization of motile aeromonads isolated from diseased fishes cultured in Uruguay. *J Fish Dis.* 40(10):1559-1569.
 23. Rasmussen-Ivey C, Hossain M, Odom S, Terhune J, Hemstreet W, Shoemaker C, Zhang D, Xu D, Griffin M, Liu Y, Figueras M, Santos S, Newton C y Liles M. (2016). Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm water fishes. *Front Microbiol.* 7:1615.
 24. Rhodes G, Huys G, Swing J, McGann P, Hiney M, Smith P y Pickup R. (2000). Distribution of Oxytetracycline Resistance Plasmids between Aeromonads in Hospital and Aquaculture Environments: Implication of Tn1721 in Dissemination of the Tetracycline Resistance Determinant Tet A. *Appl Environ Microbiol.* 66(9):3883-3890.
 25. Saavedra M. (2012). Antibiotic Resistance of the Genus *Aeromonas* spp. *Aquac Res Develop.* 3(2):1000e101.
 26. Schmidt A, Bruun M, Dalsgaard I, Pedersen K y Larsen J. (2000). Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Appl Environ Microbiol.* 66(11):4908-4915.
 27. Smith P, Hiney M y Samuelson O. (1994). Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu Rev Fish Dis.* 4:273-313. Yi S, Kim D, You M, Kim B, Kim W y Shin G. (2014). Antibiotic and heavy metal resistance in motile *Aeromonas* strains isolated from fish. *Afr J Microbiol Res.* 8(17):1793-1797.