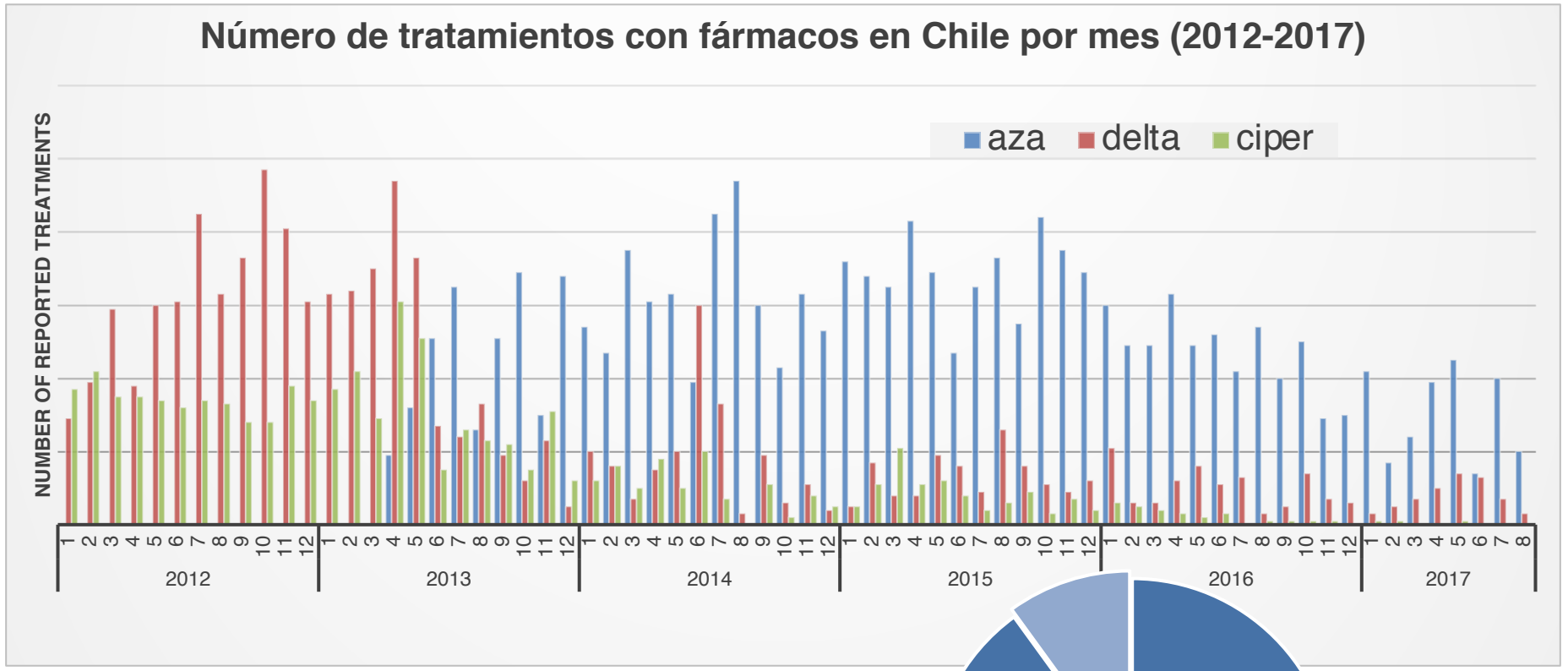
Un nuevo enfoque para el monitoreo de la sensibilidad a los medicamentos para *Caligus*, a través de nuevos marcadores genéticos: caracterización y validación de herramientas genómicas emergentes

Dr. Gustavo Núñez-Acuña, MSc. Constanza Sáez-Vera, Dr. Cristian Gallardo-Escárate

Laboratorio Nacional de Referencia para la Caligidosis

Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR)

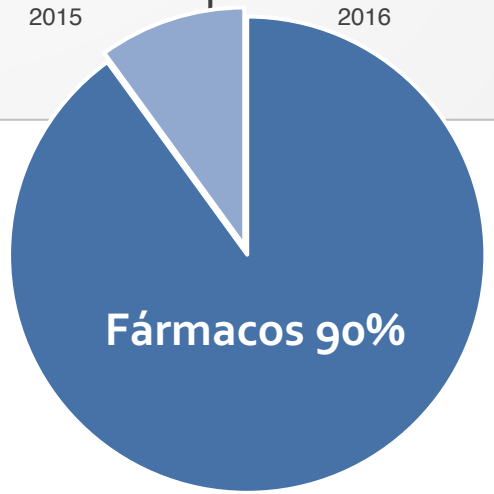
Uso de fármacos antiparasitarios en salmonicultura chilena



$

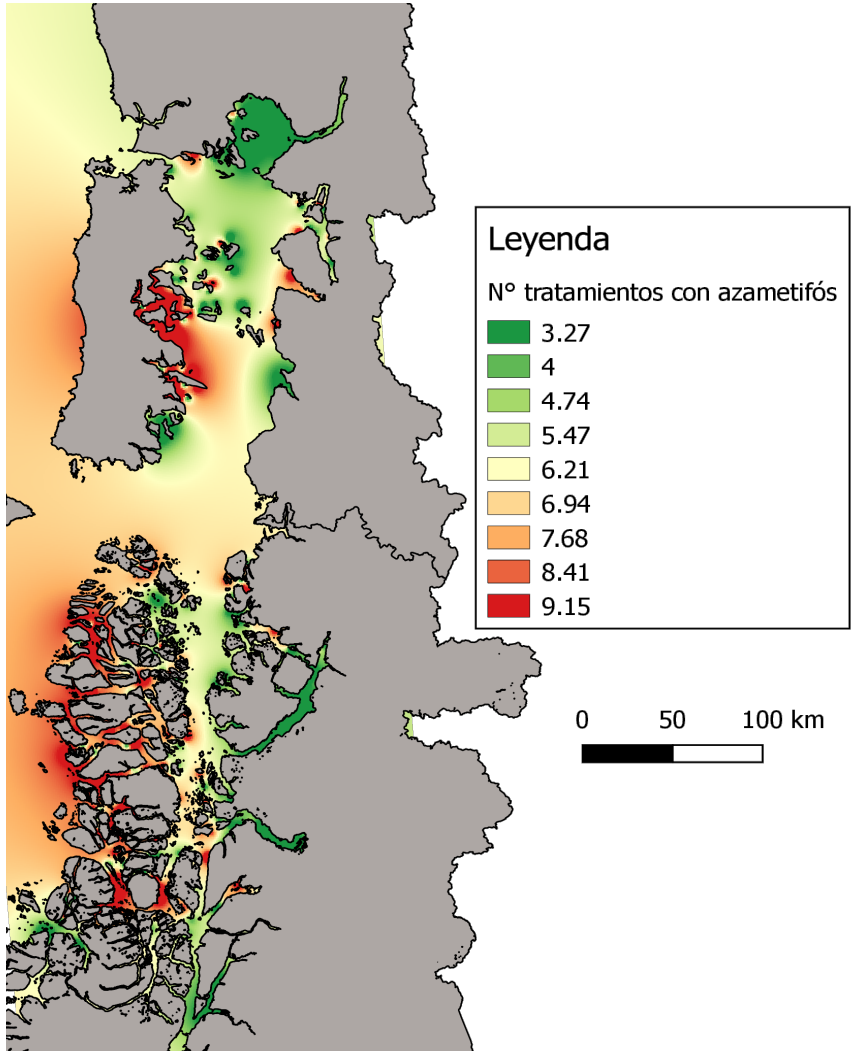
Costo de la industria debido a *Caligus*:

~ MM US$ 400 / año



Reducción de la eficacia de fármacos antiparasitarios en Chile

Número de tratamientos por año



SHORT COMMUNICATION

Aquaculture Research WILEY

First report of the reduction in treatment efficacy of the organophosphate azamethiphos against the sea lice *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000)

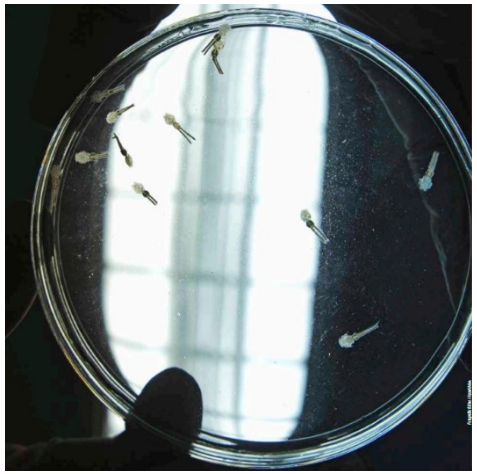
Gabriel Arriagada[1,2] | Jorge Figueroa[3] | Sandra L. Marín[4,5] | Ana María Arriagada[2] | Marcela Lara[6] | Cristian Gallardo-Escárate[2]

TABLE 1 Mixed-effects one-inflated beta regression model for the efficacy of treatments performed with azamethiphos from 2015 to 2017 (n = 9517)

		95% credibility interval	
Variable	Estimation	Lower	Upper
Intercept	1.867	0.431	3.554
Fish mean weight (kg)	−0.032	−0.052	−0.011
Year (2015 as reference)			
2016	−0.108	−0.172	−0.036
2017	−0.059	−0.112	−0.007
Season (winter as reference)			
Spring	0.017	−0.054	0.076
Summer	0.092	0.022	0.160
Autumn	0.107	0.043	0.174
w	0.409	0.399	0.420
δ_0	3.247	3.152	3.343
δ_1	−2.057e-05	−4.491e-05	−6.957e-06
σ^2	4.220	0.006	11.617

REFERENCE LABORATORY FOR CALIGUS

Bioensayo estándar



- Basado en protocolos SEARCH (2006-2018)
- Estimación de índice EC_{50}
- Uso de 7-8 concentraciones de drogas
- Se requieren > 200 parásitos adultos
- Efecto estimado por observación directa
- Lectura después de 24 h

Aproximaciones alternativas

- Bioensayos F1
  - Limitaciones en implementación
- Ensayo de toxicidad tiempo-respuesta
  - Estimación de ET_{50}

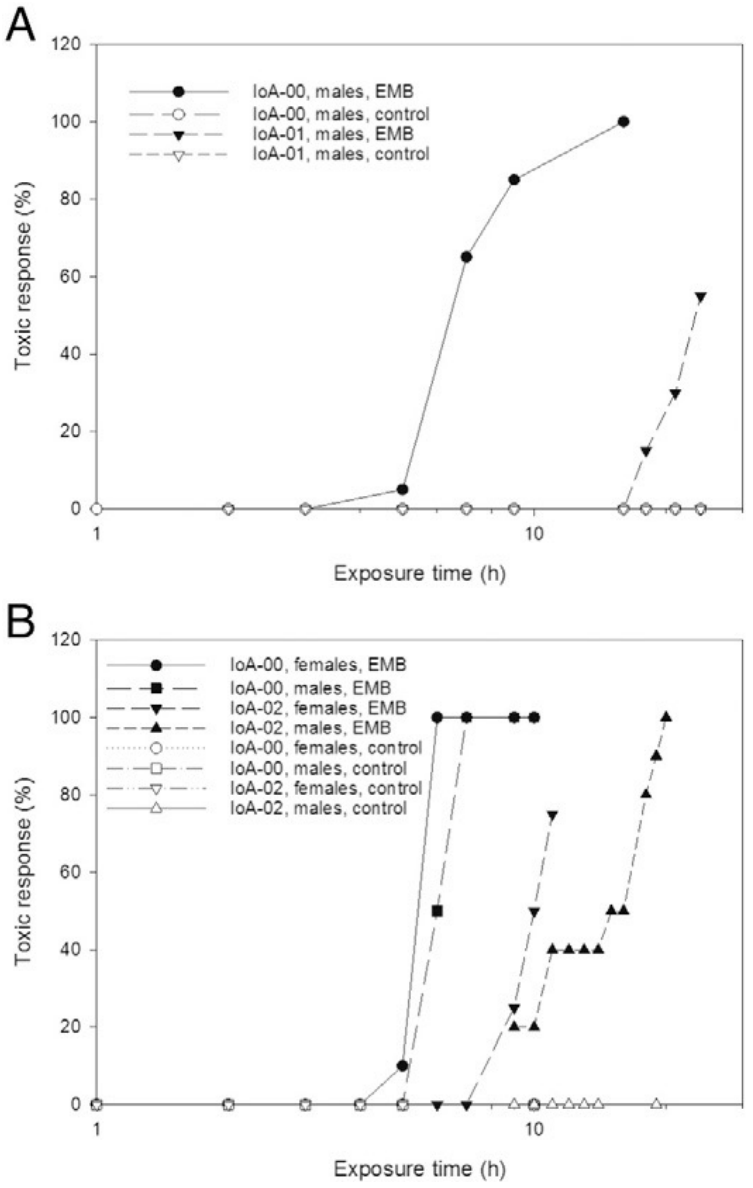
Ensayo toxicidad tiempo-respuesta

El primer ensayo en piojo de mar fue realizado para evaluar la sensibilidad a benzoato de emamectina en *L. salmonis*

(Carmona-Antoñanzas et al. 2016)

Se basa en la **estimación del efecto por intervalos de tiempo** de exposición al fármaco

Requiere significativamente **menor cantidad de parásitos adultos**, respecto del tradicional (60 ectoparásitos)



Ensayo toxicidad tiempo-respuesta

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

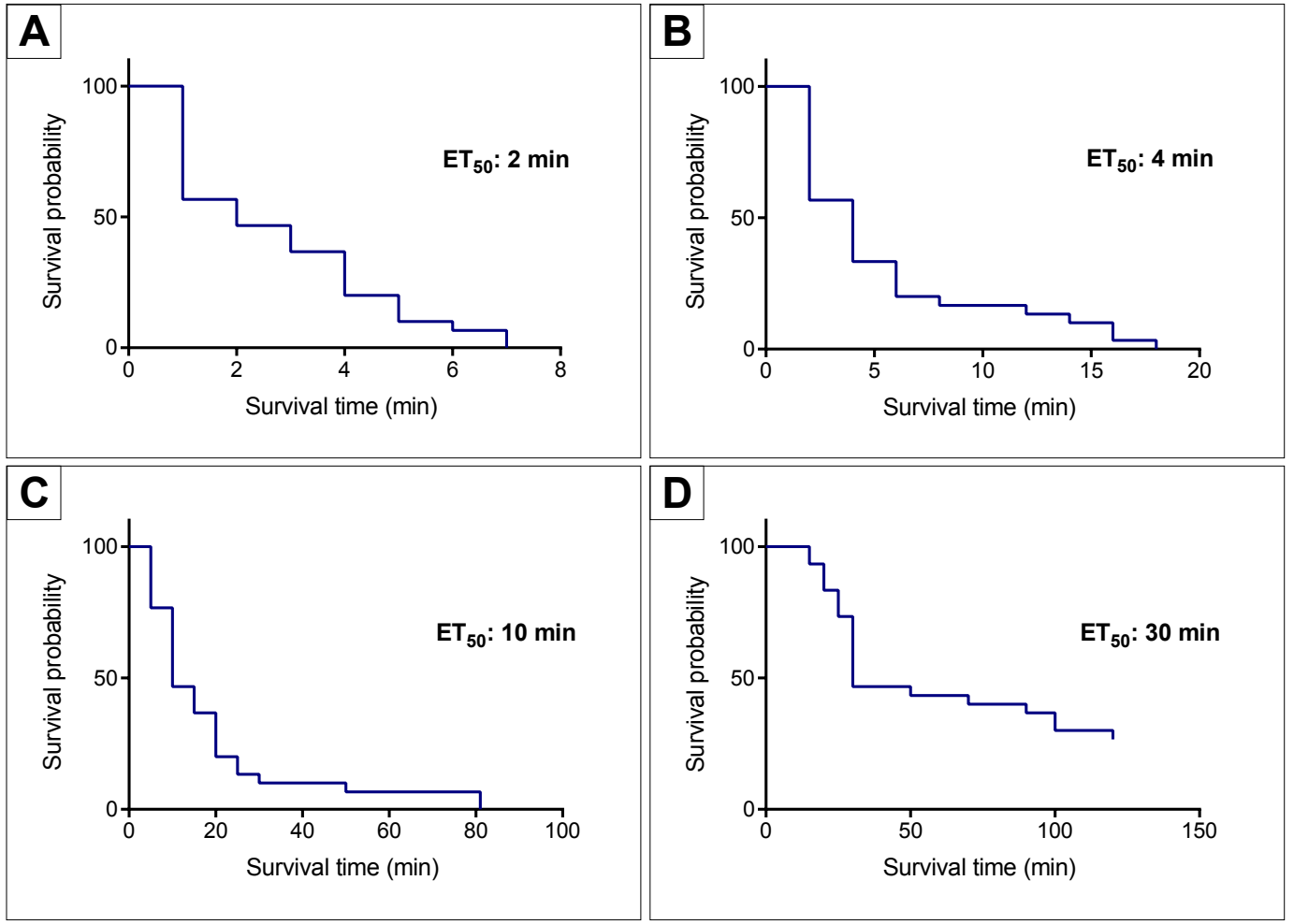
Sensitivity assessment to azamethiphos by time-to-response bioassay and biomarkers in the sea louse *Caligus rogercresseyi*

Constanza Sáez-Vera [a,b], Gustavo Núñez-Acuña [a,b], Cristian Gallardo-Escárate [a,b,*]

[a] Interdisciplinary Center for Aquaculture Research, University of Concepción, O'Higgins 1695, Concepción, Chile
[b] Laboratory of Biotechnology and Aquatic Genomics, Center of Biotechnology, Barrio Universitario s/n, University of Concepción, Concepción, Chile

Estimación ET_{50}

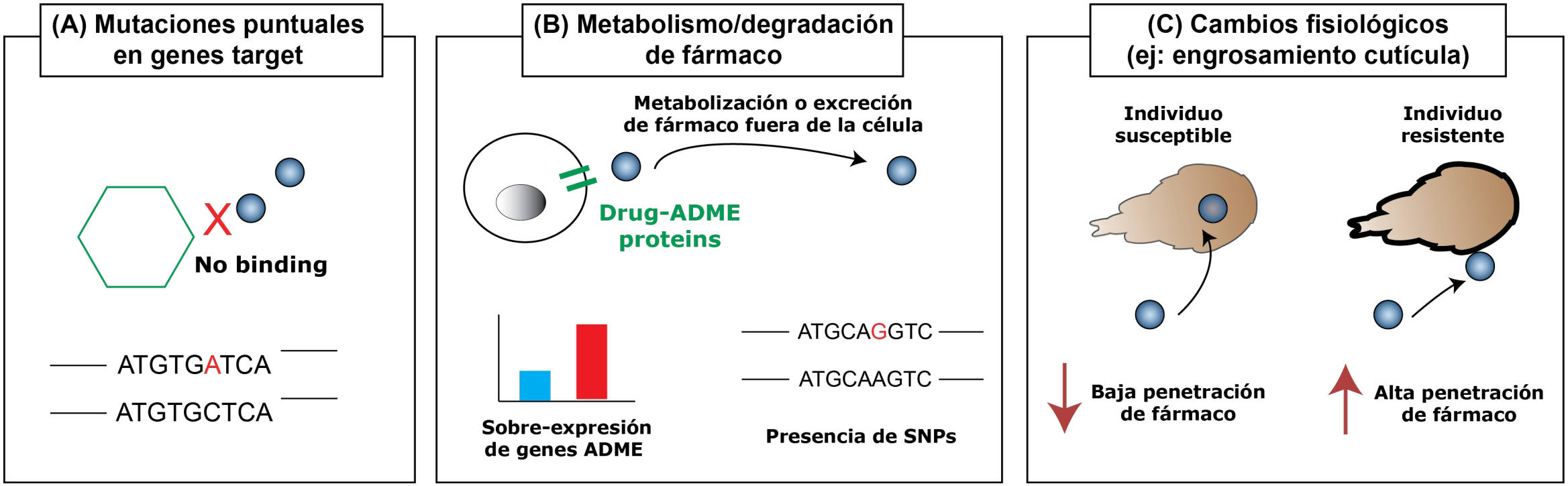
Modified from Carmona-Antoñanzas et al., (2016) protocol



Monitoreo de la sensibilidad farmacológica vs causas de la pérdida de la sensibilidad

Resistencia farmacológica: habilidad de cierta población o cepa para tolerar dosis letales de un compuesto tóxico en la mayoría de individuos de esa población en una especie particular (WHO, 1957).

¿Cómo?



Mutuaciones puntuales en genes target

Agusti-Ridaura *et al. Parasites & Vectors* (2018) 11:570
https://doi.org/10.1186/s13071-018-3151-7

Parasites & Vectors

RESEARCH Open Access

Caligus rogercresseyi acetylcholinesterase types and variants: a potential marker for organophosphate resistance

Celia Agusti-Ridaura[1*], Michael Dondrup[2], Tor E. Horsberg[1], Jong S. Leong[3], Ben F. Koop[3], Sandra Bravo[4], Julio Mendoza[5] and Kiranpreet Kaur[1]

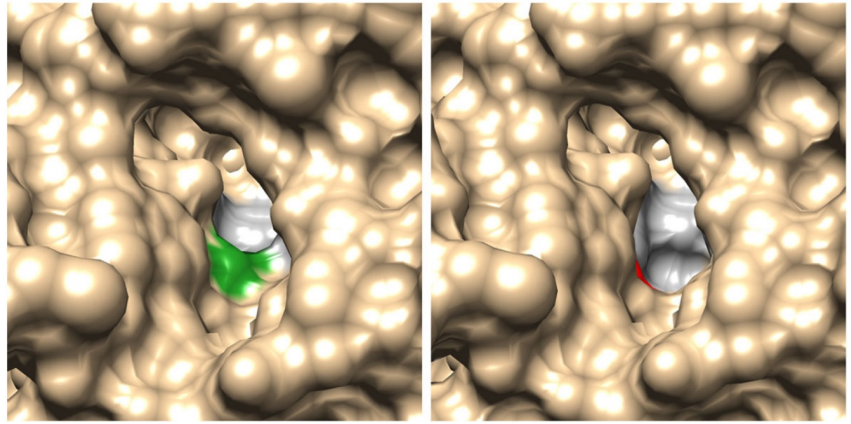
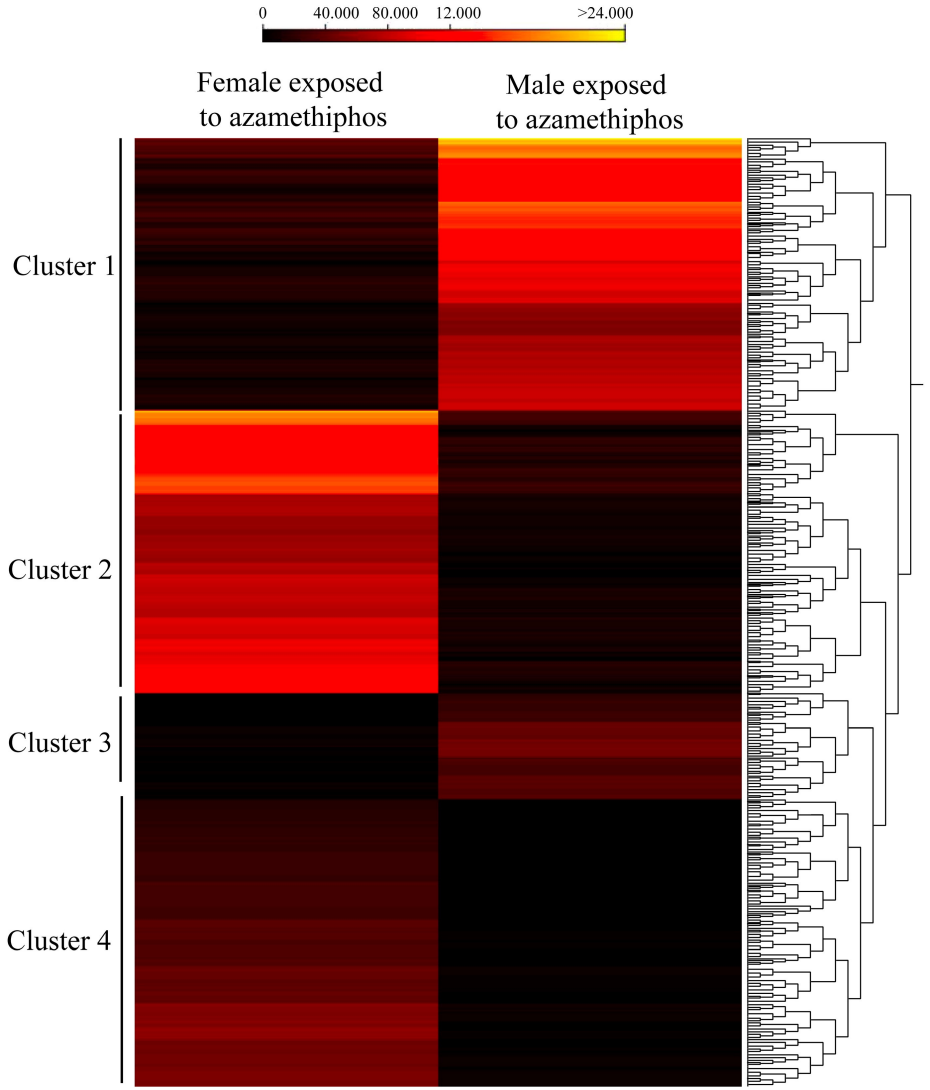


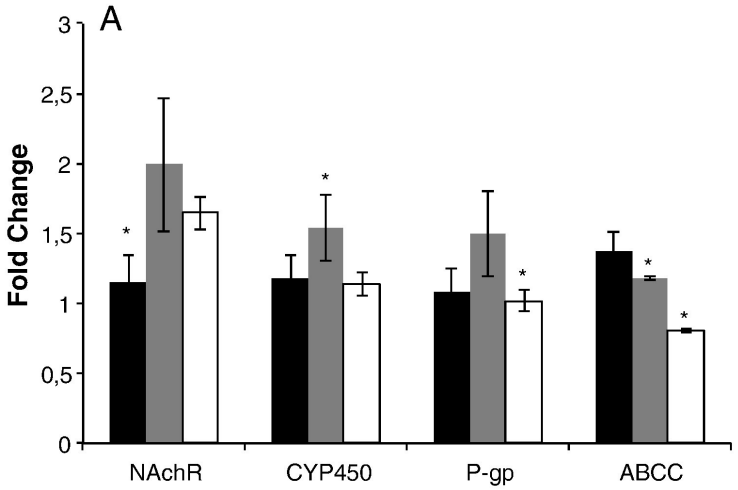
Table 2 Presence/absence of the F/V318 variant in *Caligus rogercresseyi* AChE1a selected for azamethiphos using bioassays (10 lice)

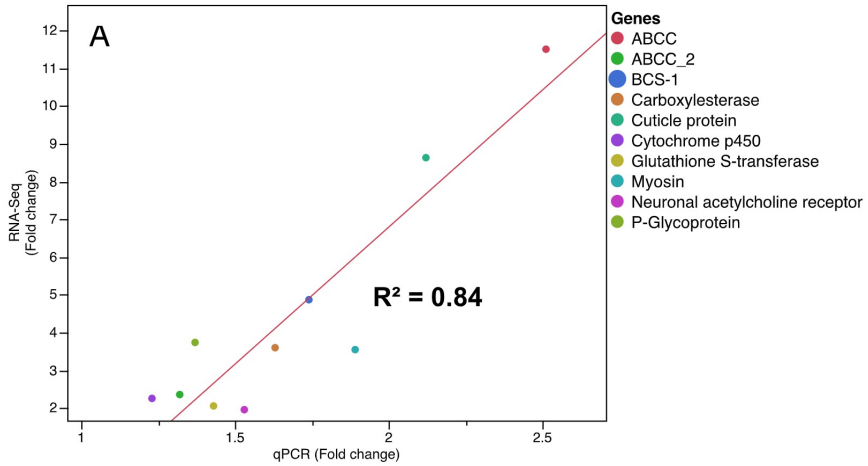
Aza dose (ppb)	Bioassay output	Louse sex	Farm	AChE1a variant
0.2	Immobilized	Male	1	Homozygous F/F
0.4	Immobilized	Male	1	Homozygous F/F
0.4	Immobilized	Female	1	Homozygous F/F
0.4	**Immobilized**	**Female**	**1**	**Heterozygous F/V**
0.4	Immobilized	Female	1	Homozygous F/F
1.2	Unaffected	Female	2	Homozygous F/F
1.2	Unaffected	Female	2	Homozygous F/F
1.2	Unaffected	Female	2	Homozygous F/F
2.0	**Unaffected**	**Female (young[a])**	**2**	**Heterozygous F/V**
2.0	**Unaffected**	**Male (young[a])**	**2**	**Heterozygous F/V**

(Agusti-Ridaura et al., 2018)

Genes relacionados con el metabolismo/excreción del Caligus







(Valenzuela-Muñoz et al., 2014)

Información genómica disponible para piojo de mar

illumina®

Caligus rogercresseyi:

- 1597 proteínas
- 33625 mRNAs
- 1 genoma ensamblado (cromosomas)

Lepheoptheirus salmonis:

- 38132 proteínas
- 184922 mRNAs
- 1 genoma ensamblado (scaffolds)

Caracterización del genoma de *Caligus rogercreseeyi*: nueva herramienta para estudios moleculares en el piojo de mar

Genoma de *Caligus rogercresseyi*

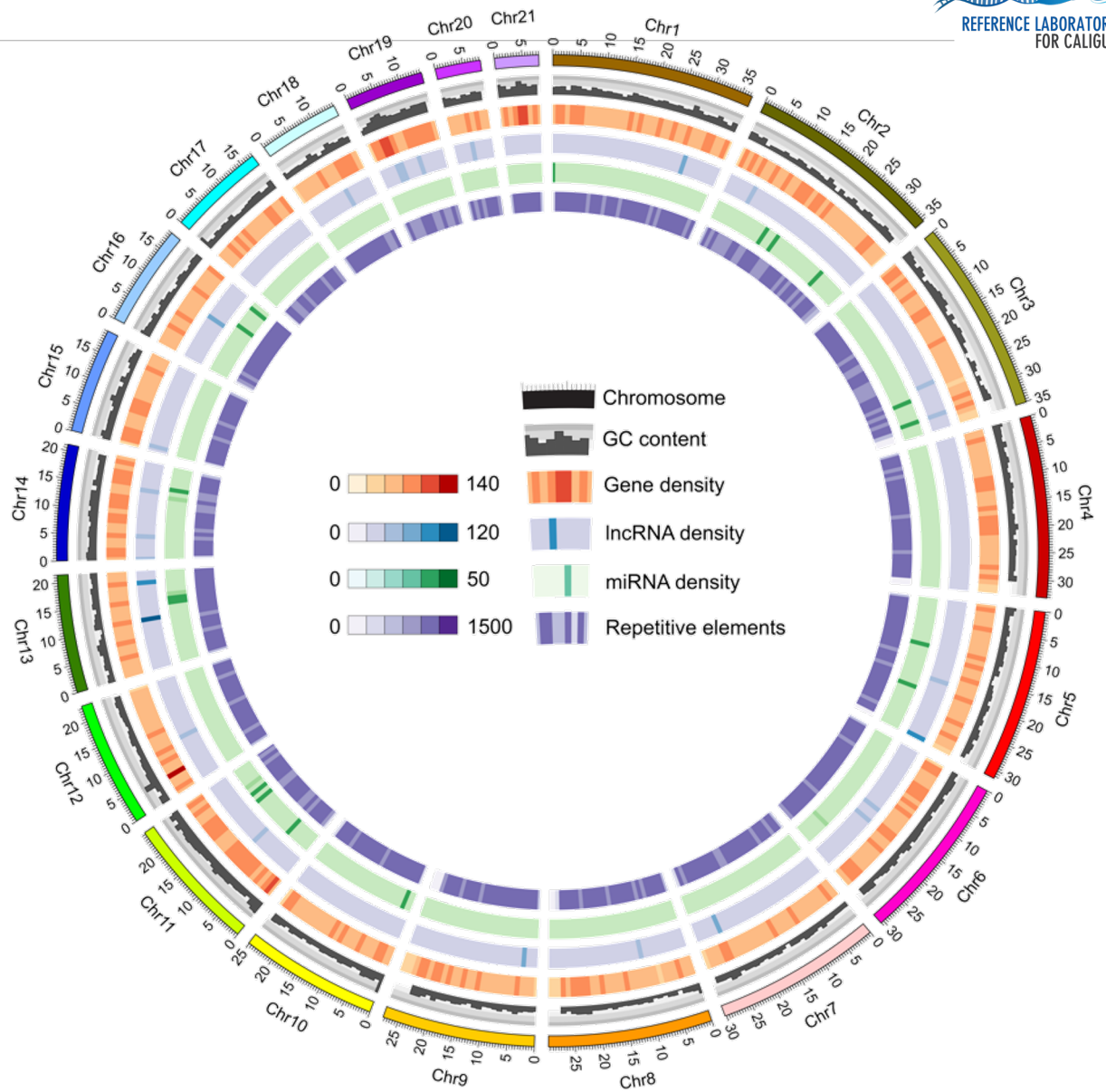
REFERENCE LABORATORY FOR CALIGUS

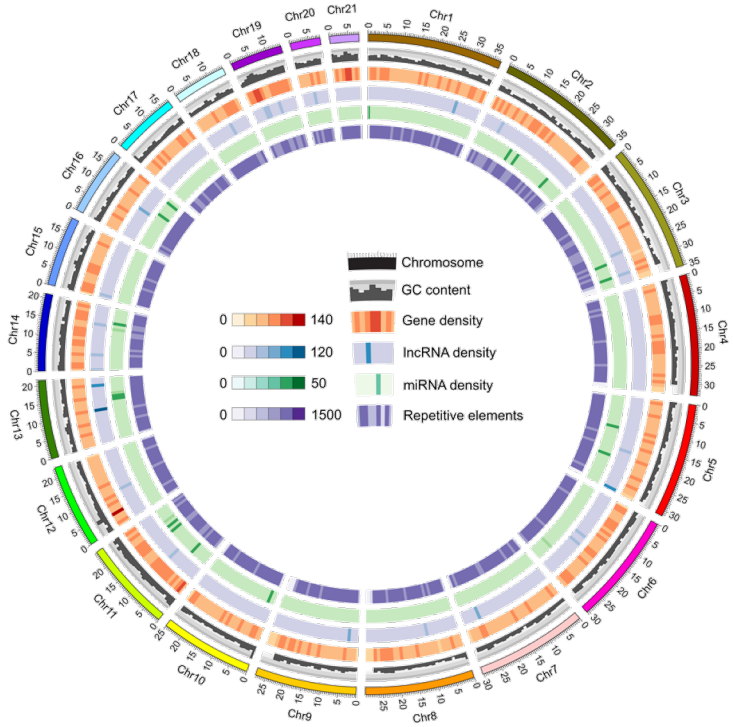
PHASE GENOMICS

PROXIMO™ HI-C GENOME SCAFFOLDING

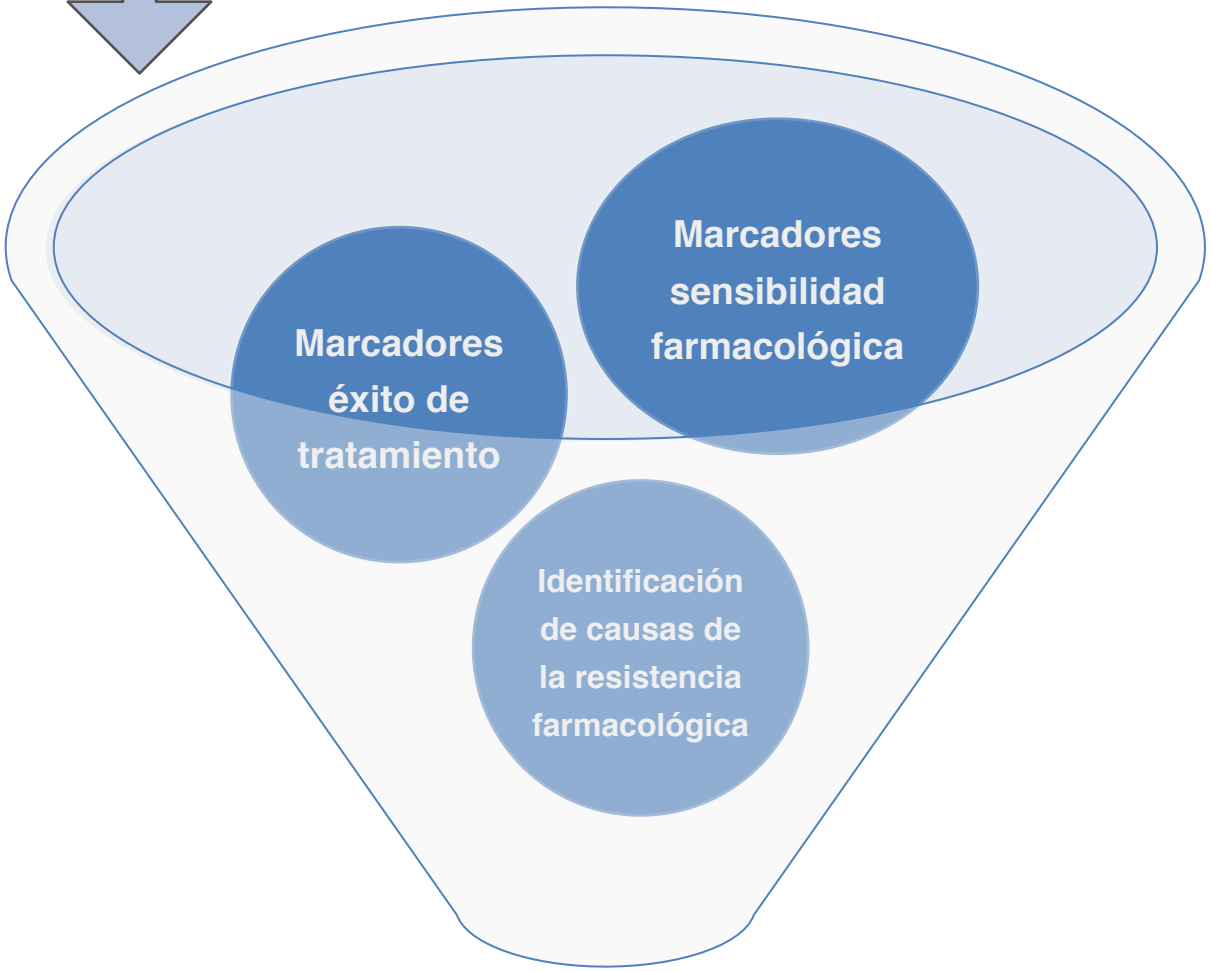
Caligus rogercresseyi genome

- ✓ 505 Mbases
- ✓ 23,686 coding genes
- ✓ 12,553 ncRNAs





Genoma de *Caligus rogercresseyi*



Aplicaciones directas al control de la Caligidosis

Marcadores sensibilidad farmacológica

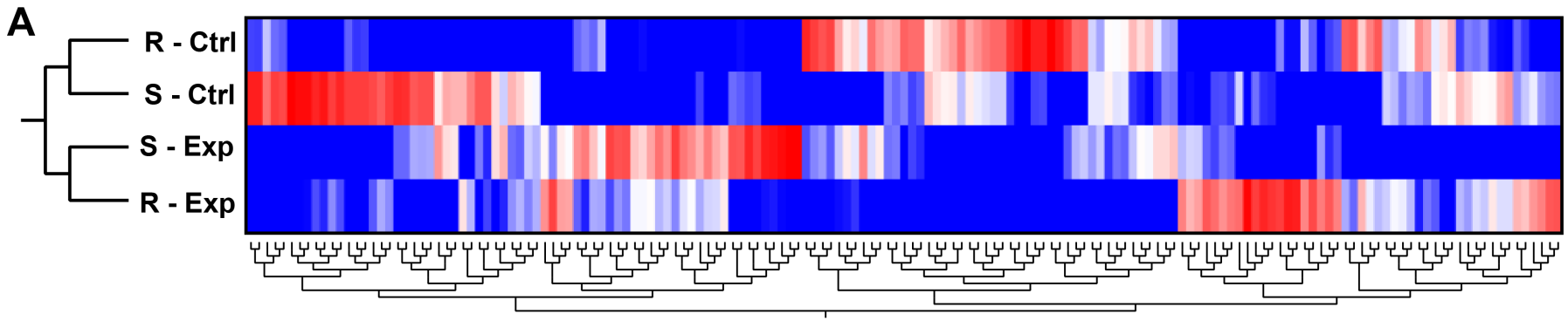
Strain	Delousing drug	Treatment efficacy	Bioassay result (EC50)	95% CI
↓ A	Azamethiphos	< 60%	13,72	6.392 - 32.6
B	Azamethiphos	> 92%	0,4778	0.0765 - 1.275
↓ C	Deltamethrin	< 50 %	3,042	1.826 - 5.285
D	Deltamethrin	> 80%	1,424	0.634 - 3.746
↓ E	Cypermethrin	< 40%	9,709	3.155 - 57.84
F	Cypermethrin	> 80%	2,178	0.972 - 5.259

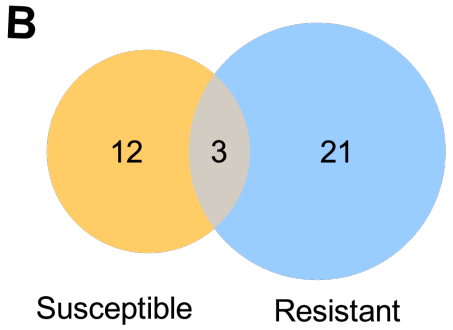
Absorción

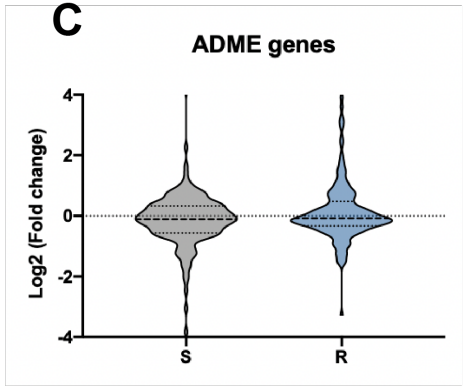
Distribución

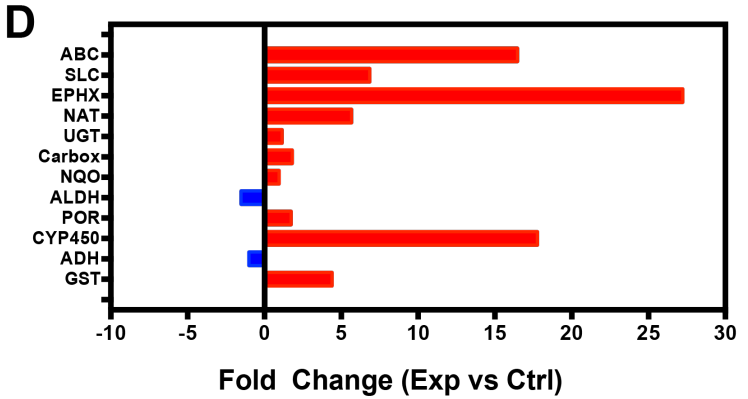
Metabolismo

Excreción





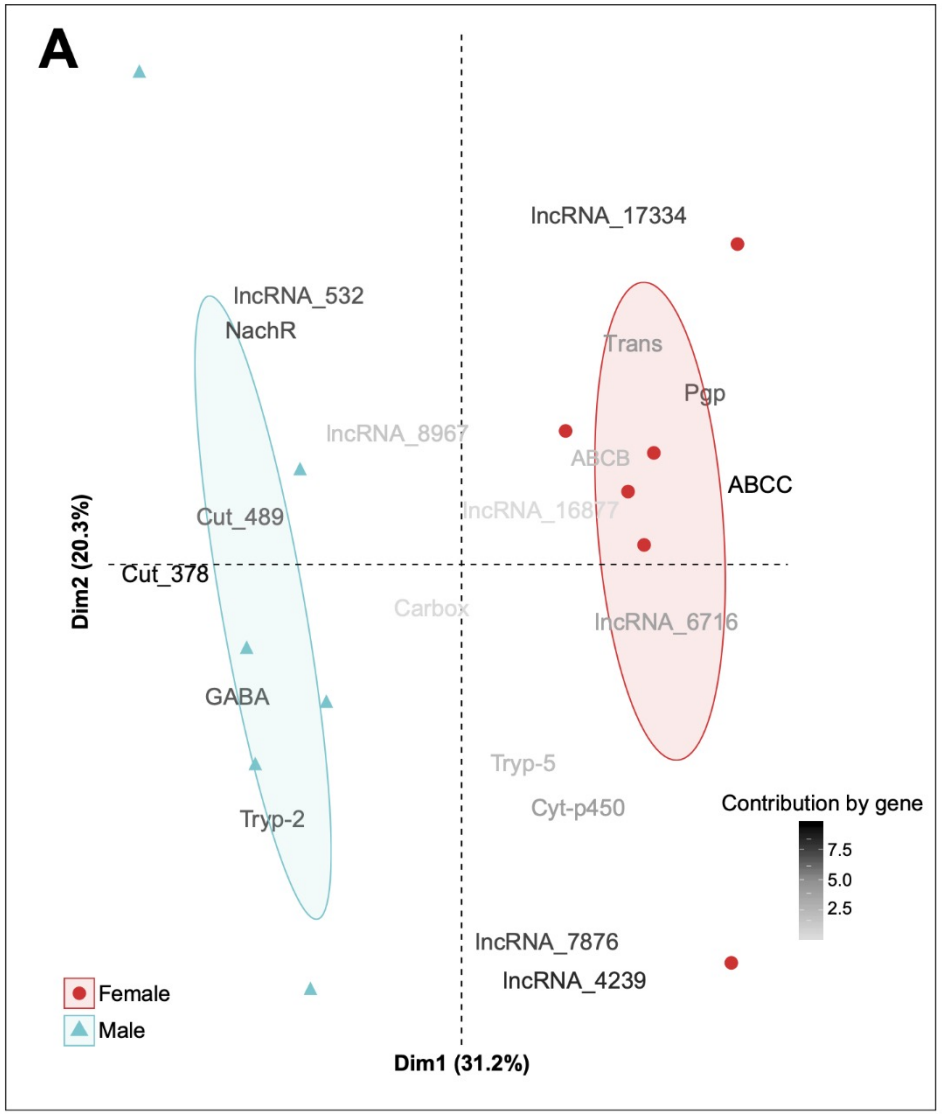




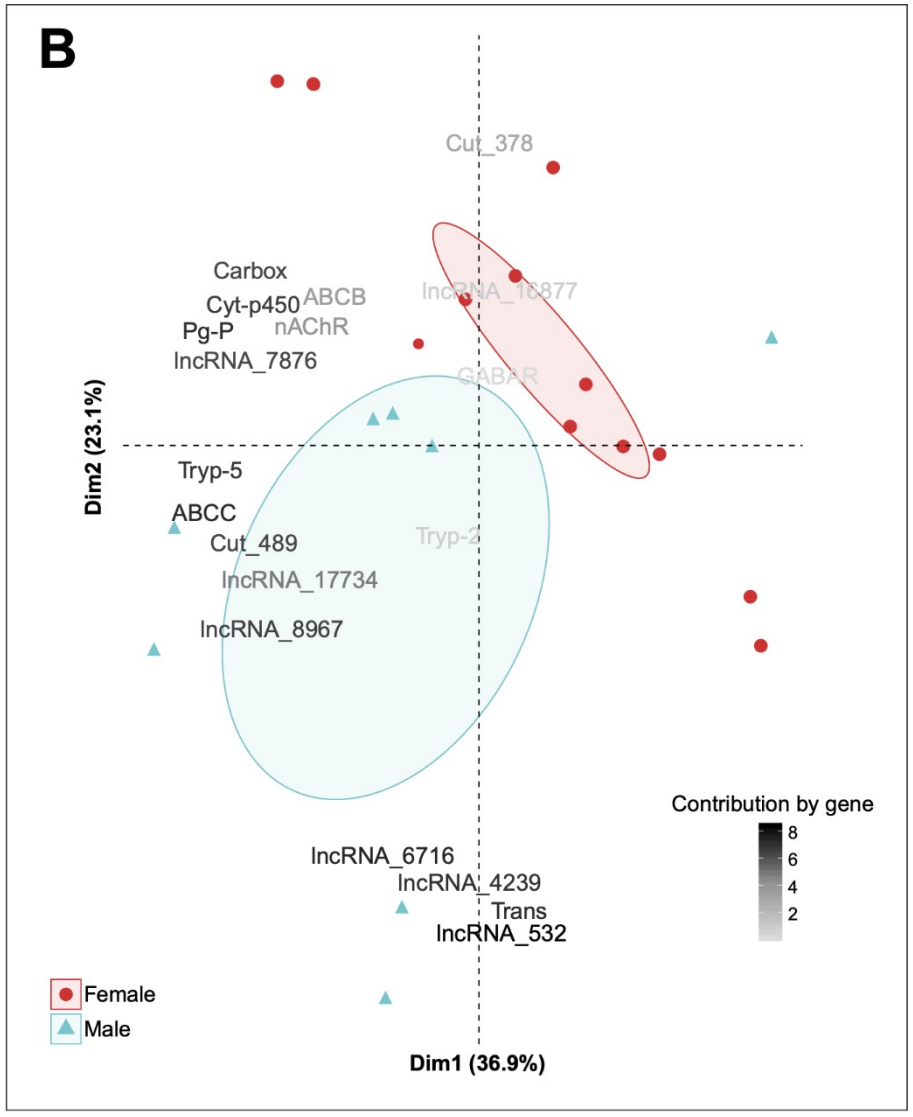
Marcadores sensibilidad farmacológica

REFERENCE LABORATORY FOR CALIGUS

Alta eficacia

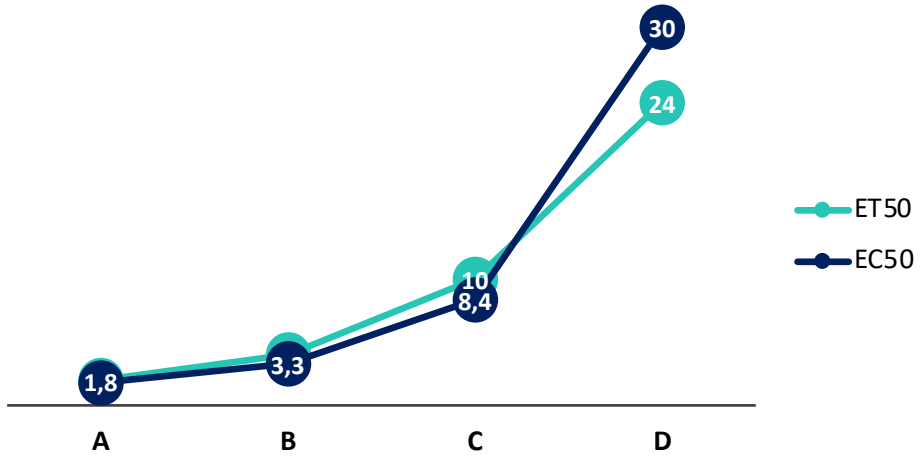


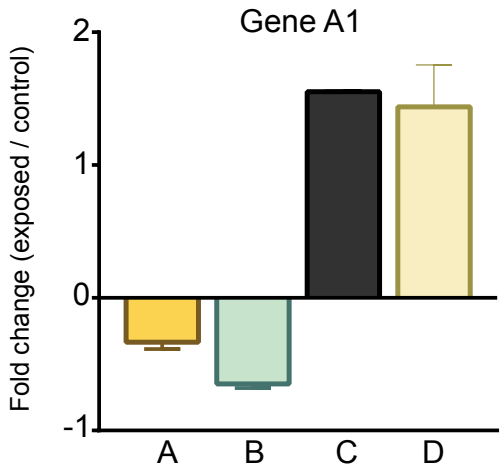
Mediana eficacia

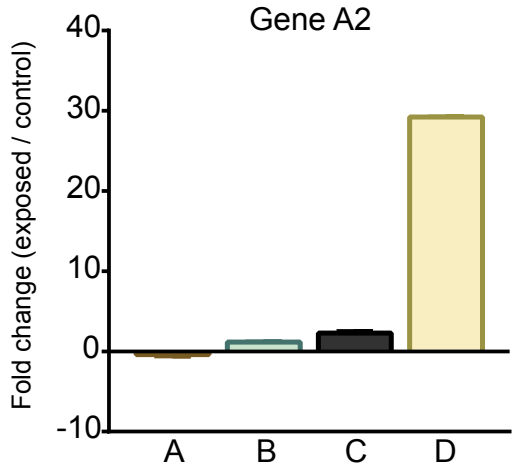


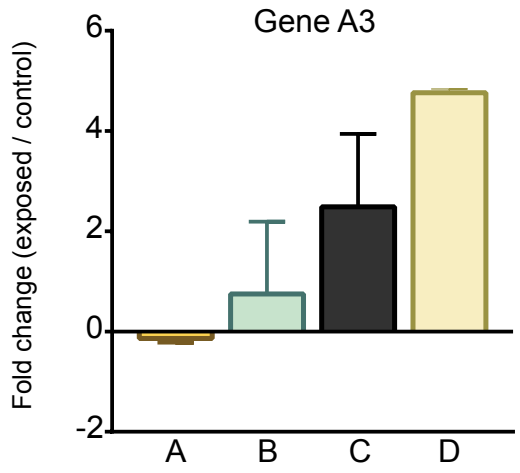
Marcadores sensibilidad farmacológica

(Fotografía: Revista AQUA)





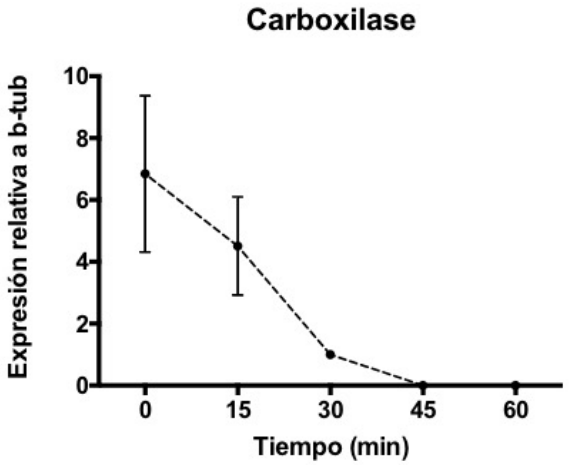


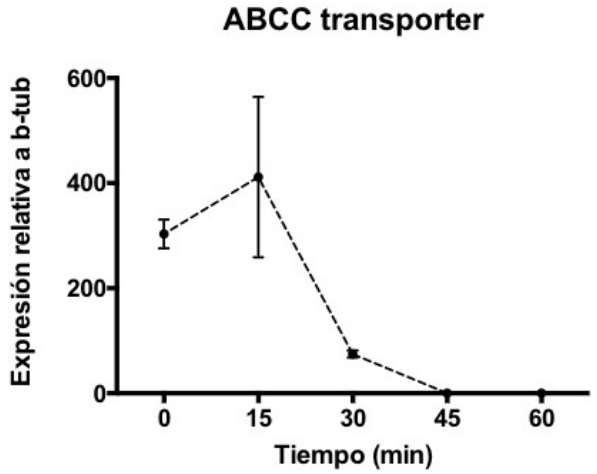


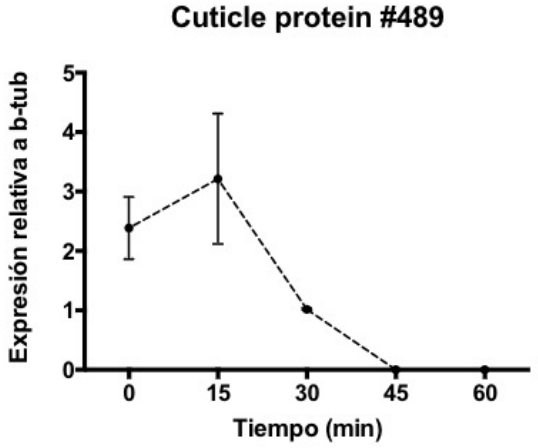
Marcadores sensibilidad farmacológica

REFERENCE LABORATORY FOR CALIGUS

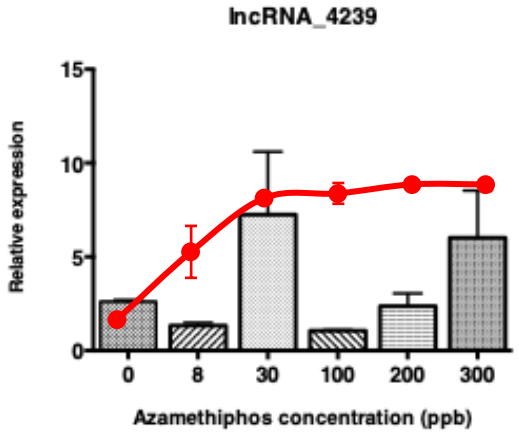
TIEMPO

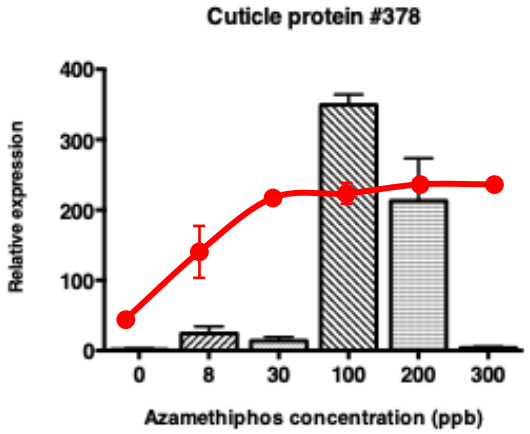


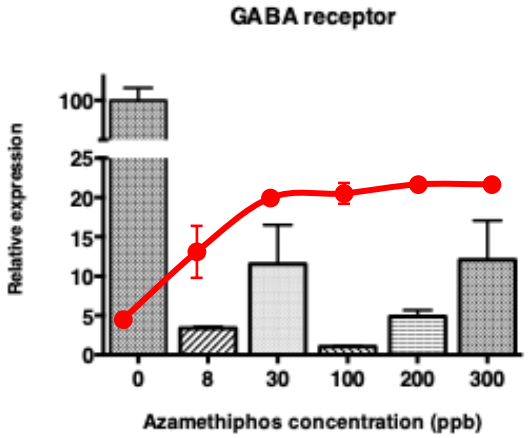




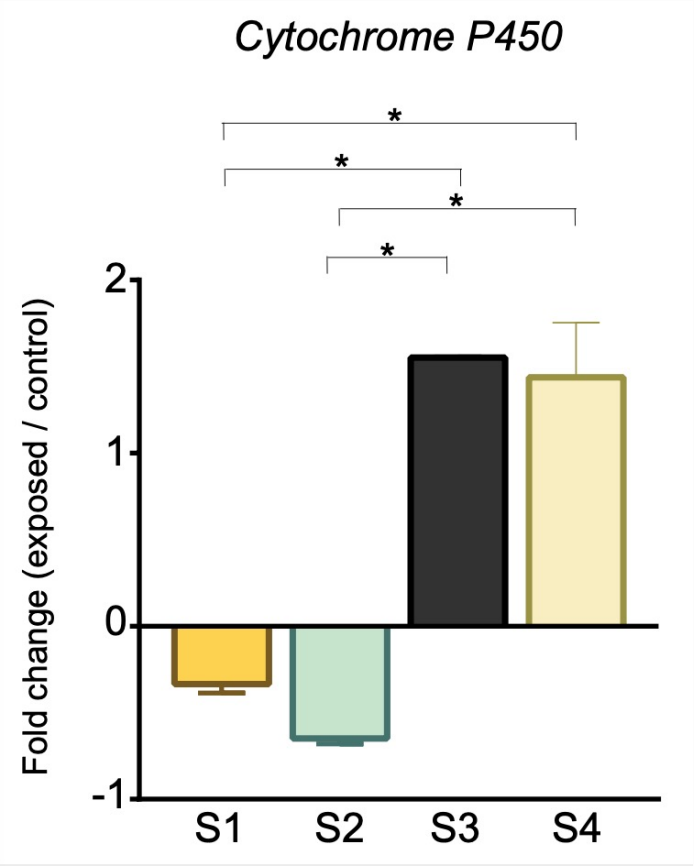
DOSIS

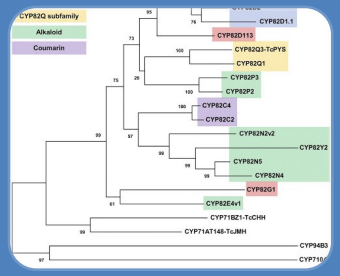




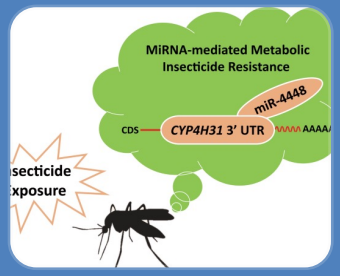


Genes utilizados como indicadores de sensibilidad farmacológica

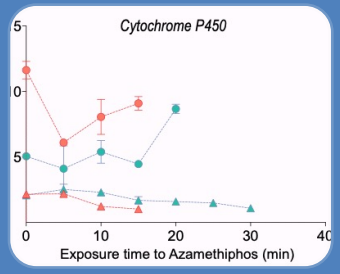




Extensa familia de proteínas involucradas en procesos de oxidación (Fase I) en detoxificación celular

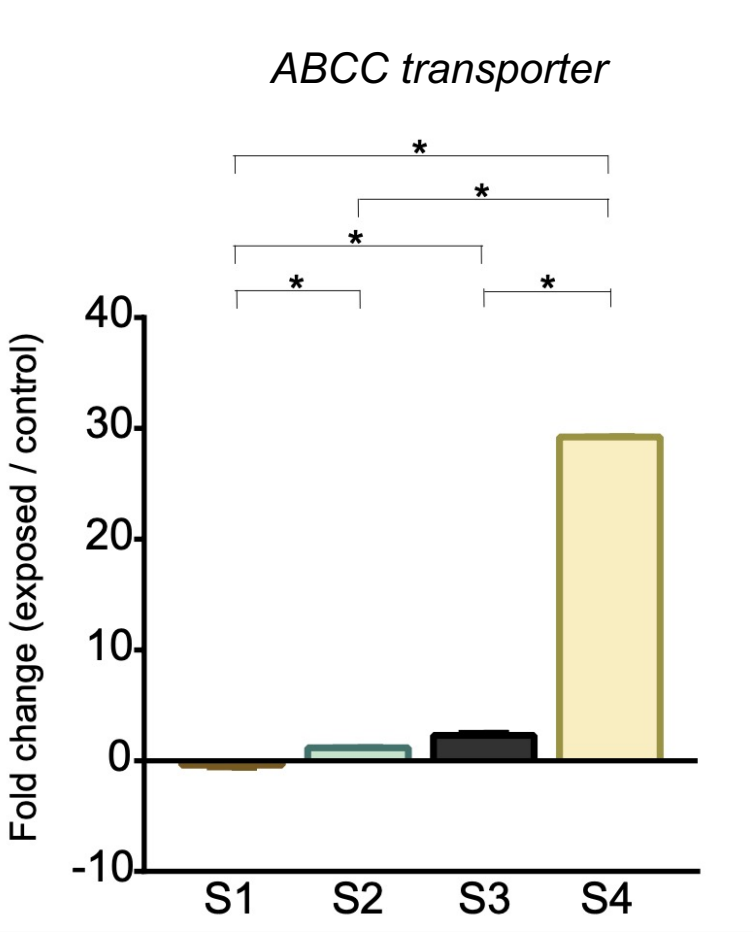


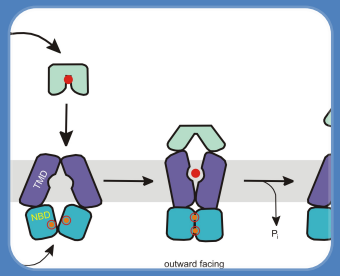
Genes asociados a resistencia farmacológica en numerosos estudios en artrópodos



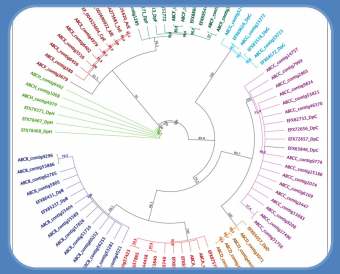
Incrementa sus niveles de expresión en poblaciones más resistentes

Genes utilizados como indicadores de sensibilidad farmacológica

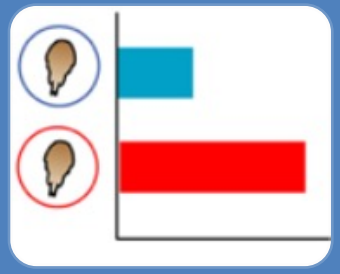




Parte de familia de proteínas transportadora de drogas en sistema nervioso

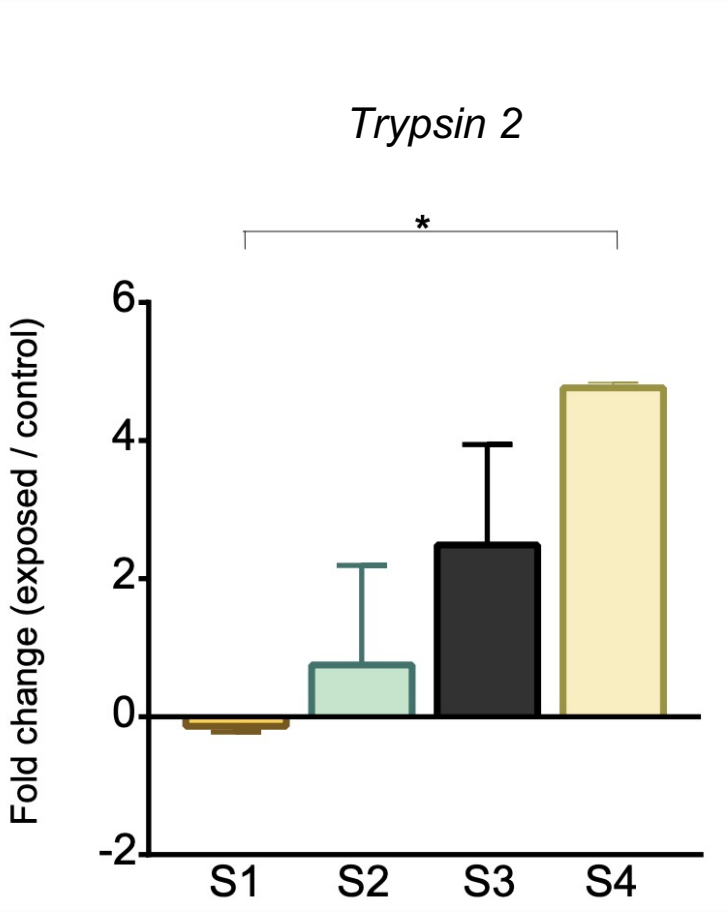


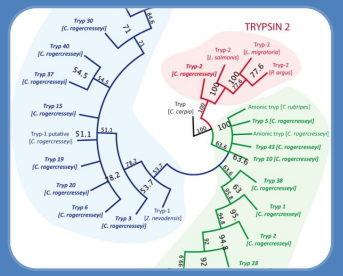
En *Caligus rogercresseyi* se ha descrito más de 50 representantes de este tipo de transportadores



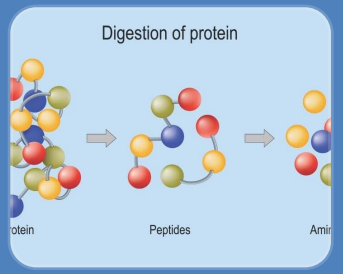
Presenta altos niveles de expresión en parásitos expuestos a fármacos como azametifós y deltametrina

Genes utilizados como indicadores de sensibilidad farmacológica

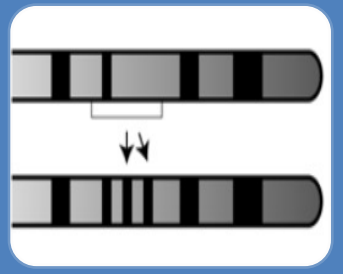




Función molecular: degradación de proteínas y otros compuestos a nivel celular.



En otras especies se describe como proteínas responsable de conferir resistencia a deltametrina.



Presenta duplicaciones en el genoma de *Caligus rogercersseyi* en poblaciones con eficacia contrastante de azametifos.

Propuesta metodológica para norma técnica (LABD NT5, SERNAPESCA)

(1) pre-tratamiento

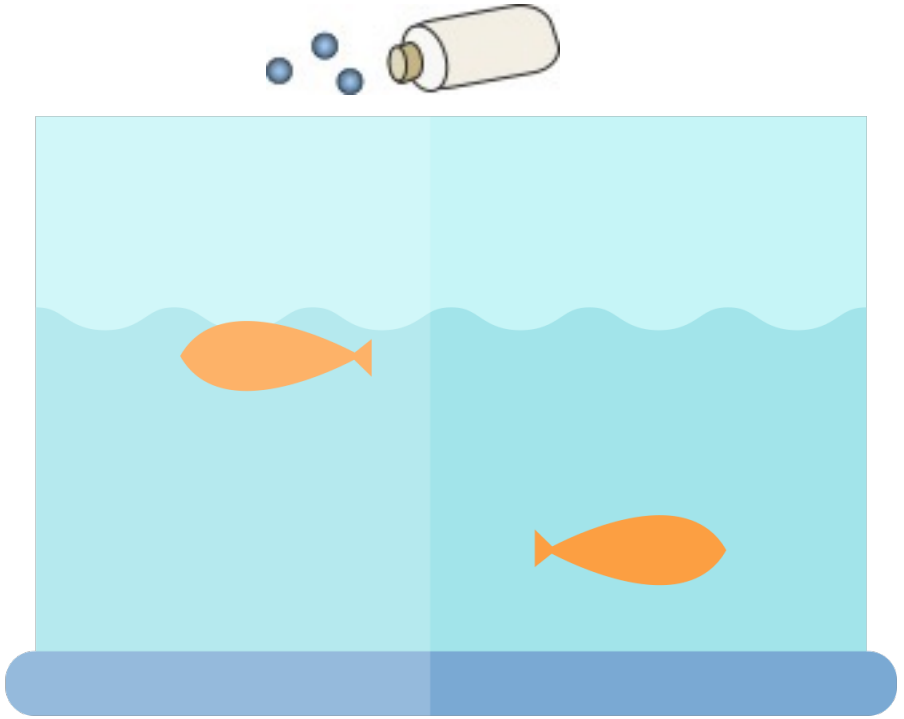
(2) post-tratamiento

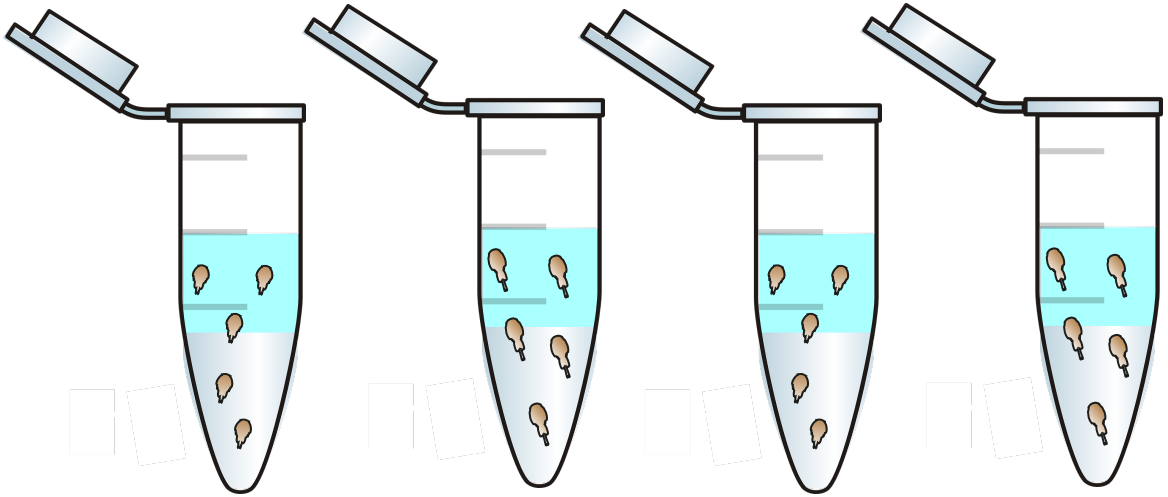
Toma de muestras

24 – 48 h
diferencia

Fijar muestras

Baño por inmersión





Control (RNA Later)

Expuesto (RNA Later)

Extracciones RNA

Obtención de datos

Datos C_T

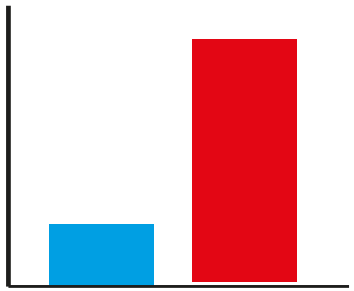
Cuantificación por método ddC_T comparativo

Control endógeno: *b-tubulina*

Muestra calibradora: X muestra con menor dC_T

Fold change: Expuesto vs Control

Análisis estadísticos



Expresión génica

Fold change y factor ponderado

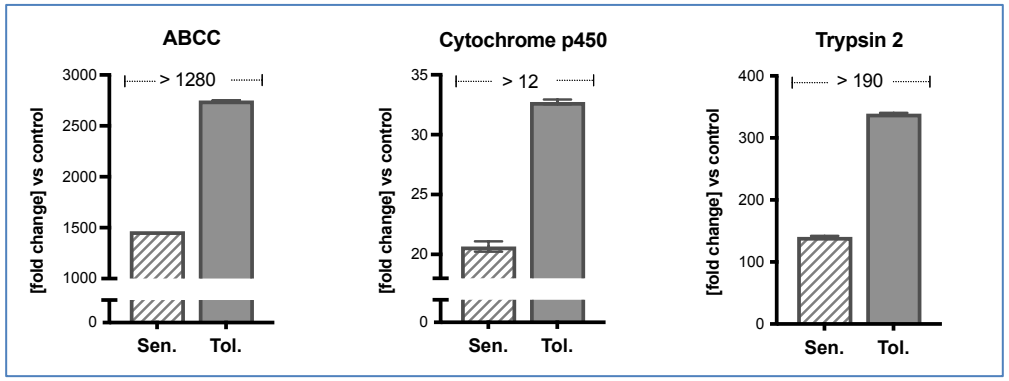
AZA > 2.35

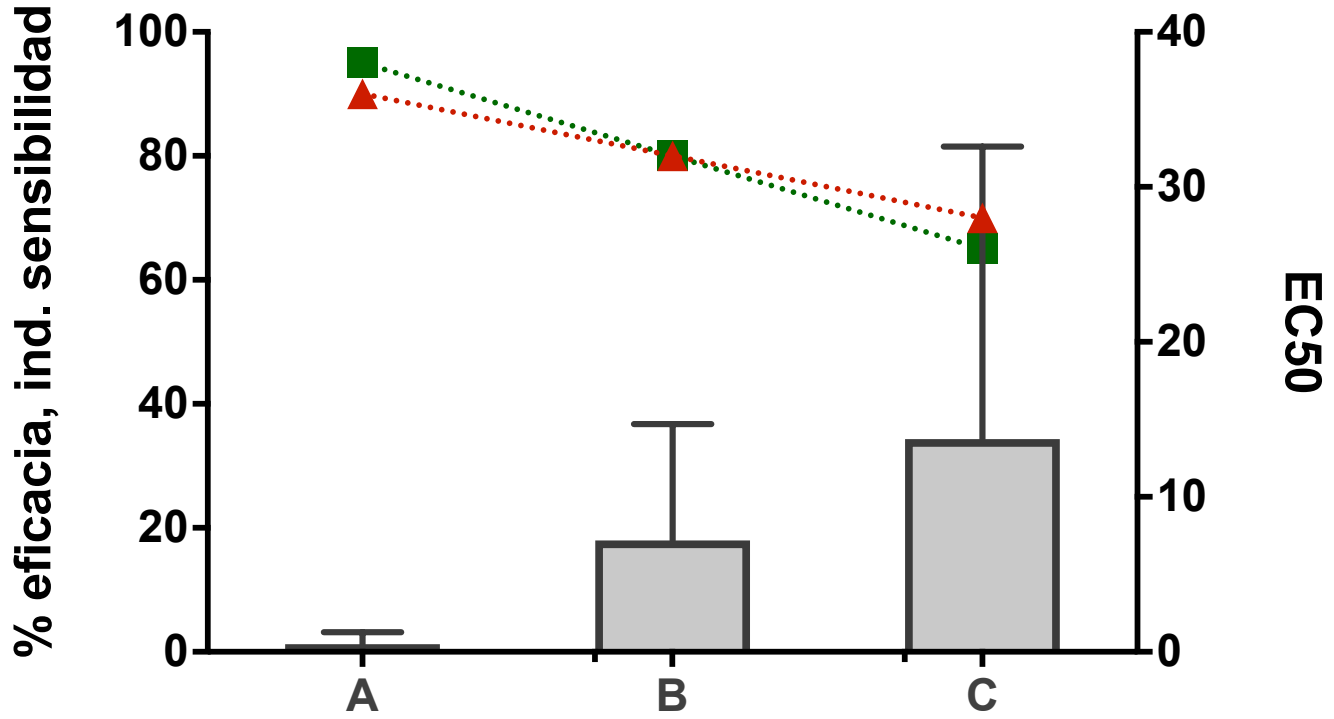
DELTA > 6.3

CYPER > 4.55

Indice sensibilidad	X %

Obtención de datos





Ind. sensibilidad (%) Eficacia (%, IPT) EC50

LABD/NT5/SEPTIEMBRE 2021

Programa Sanitario General para la Vigilancia de la Sensibilidad a Antiparasitarios en la Salmonicultura

NORMA TÉCNICA

Nº5

PROTOCOLO ANÁLISIS MOLECULARES PARA EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD FARMACOLÓGICA EN *Caligus rogercresseyi*

Departamento De Salud Animal
Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
Chile

- El genoma de *C. rogercresseyi* constituye una herramienta que permite abrir nuevas posibilidades para el entendimiento de la resistencia farmacológica y el monitoreo de la sensibilidad de parásitos.

- El éxito del monitoreo de la sensibilidad farmacológica depende de la obtención de gran cantidad de datos a partir de la colaboración con centros de cultivo.

- La utilización de marcadores genéticos constituyen una herramienta válida para evaluación de sensibilidad farmacológica en *C. rogercersseyi*.

- Investigaciones en progreso permitirán determinar nuevos marcadores en el genoma de *C. rogercresseyi* que permitan fácilmente establecer asociaciones con sensibilidad farmacológica.

REFERENCE LABORATORY FOR CALIGUS

PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA

FIE-2015-V014

Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo

FONDAP 15110027: “Interdisciplinary Center for Aquaculture Research”

FONDECYT 11200813: “Uncovering the role of duplicated gene-clusters on the pharmacological resistance of *Caligus rogercresseyi* through whole-genome resequencing”