

# Novas ferramentas para superar patógenos inteligentes

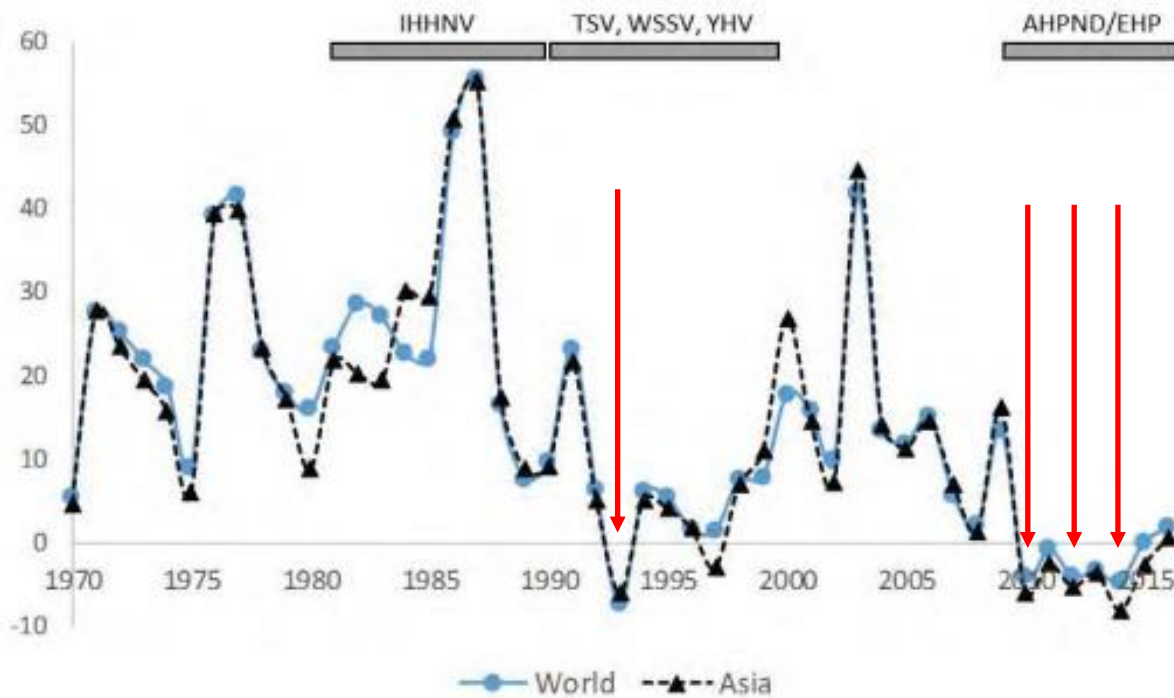
Benedict Standen, PhD

Chefe Aqua Marketing Global, dsm-firmenich

FENACAM 2023 17.11.2023

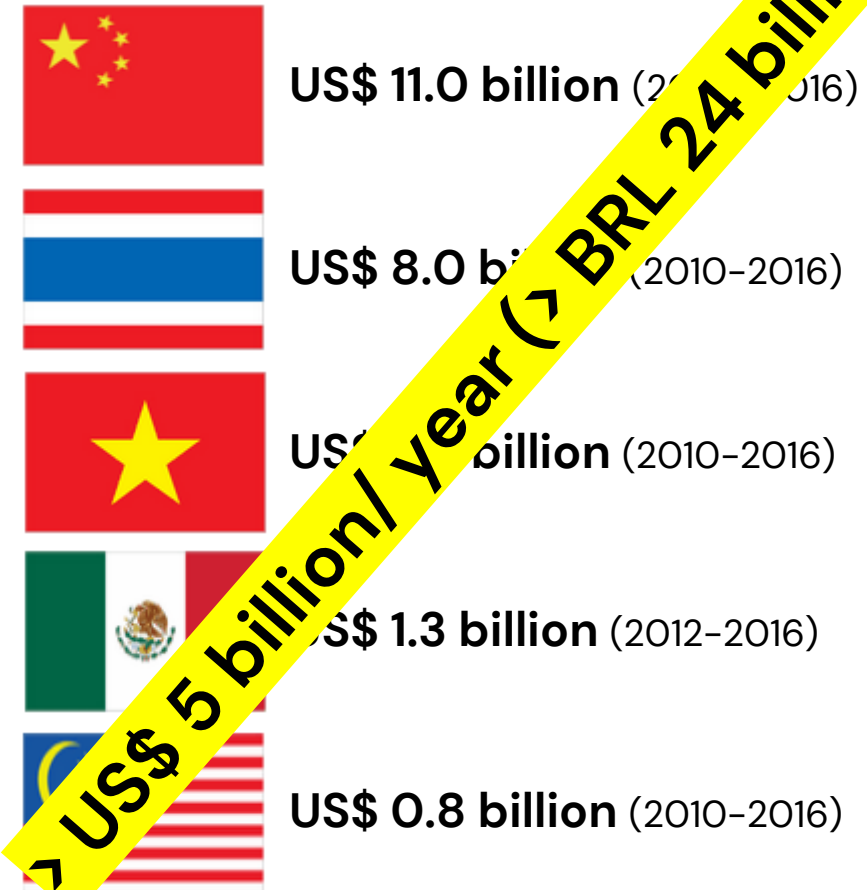


# Doença do camarão é cara



Variação homóloga (%) na produção de camarão. A doença pode causar grandes diminuições na produção, até mesmo crescimento negativo (setas vermelhas)

## Perdas econômicas devido à doença do camarão

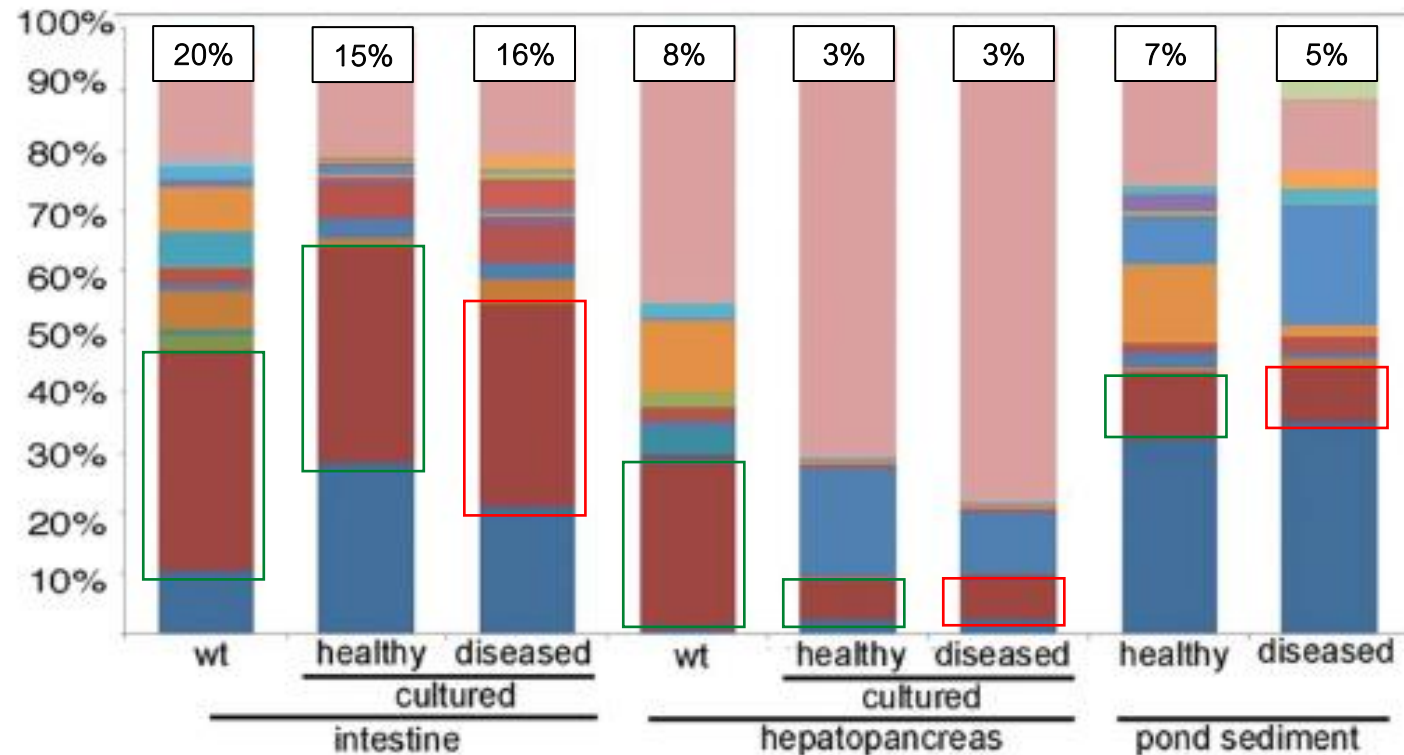
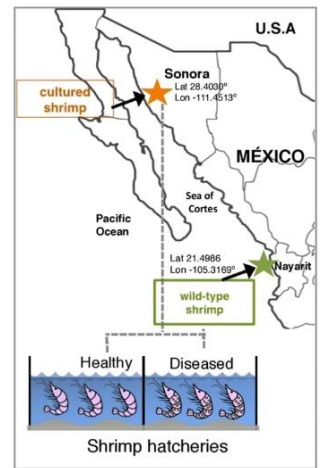
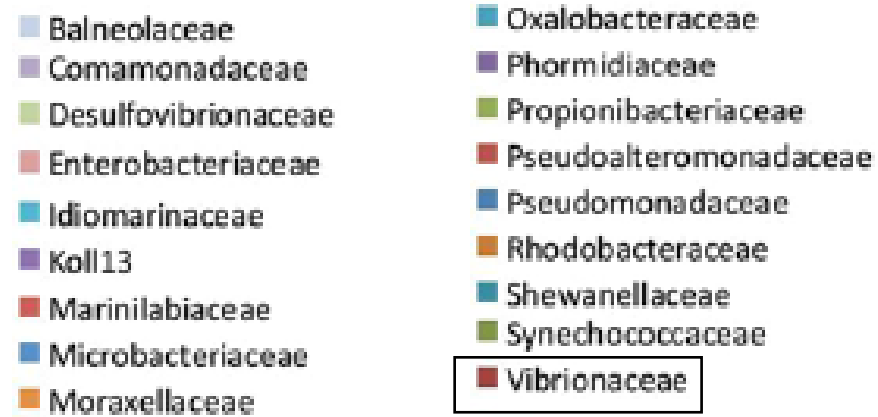


Shinn et al 2018

O que são patógenos inteligentes?

*Eles estão 'em todos os lugares'*

- *Fazem parte das bactérias comensais do camarão*
- *São as bactérias intestinais mais comuns, mesmo em camarões saudáveis*
- *A doença não vem necessariamente do aumento da abundância de Vibrio*



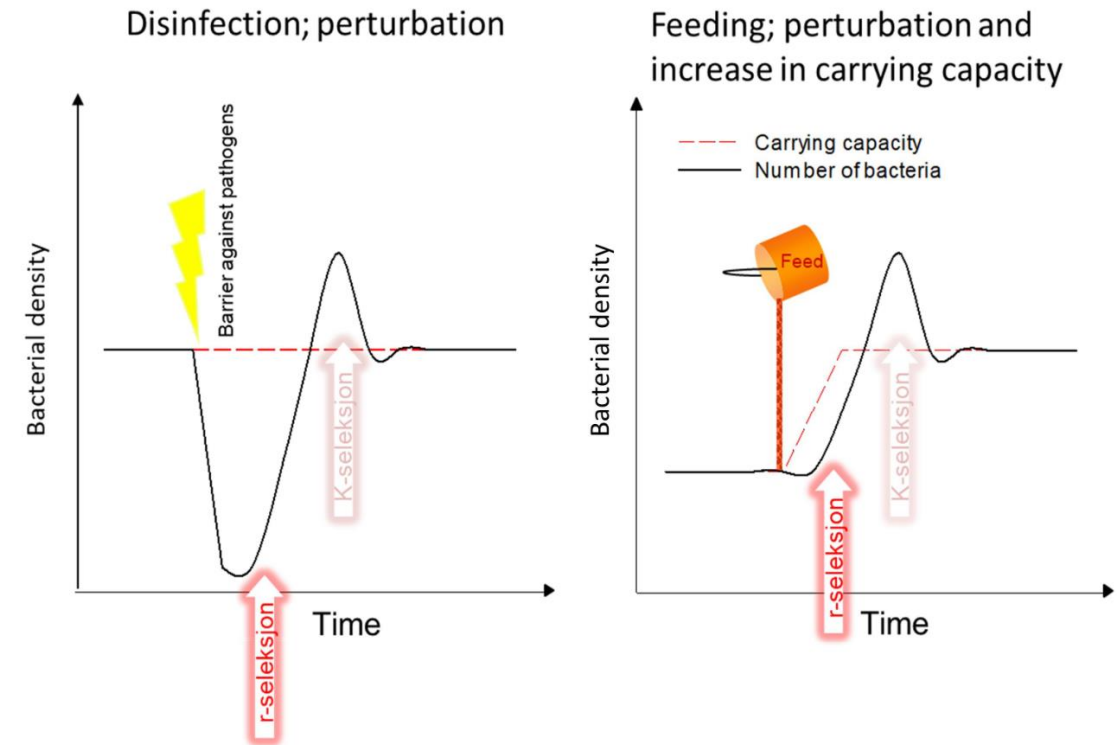
Cornejo-Granados et al. 2017



O que são patógenos inteligentes?

## O 'Usain Bolt' das bactérias

- **r-strategists** apresentam altas taxas de crescimento, especialmente em ambientes não competitivos
  - Dominam em condições instáveis
  - Junto com muitos patógenos, *Vibrio* é um r-estrategista
- **K-strategists** crescer mais devagar, mas capaz de manter as populações perto da capacidade de carga
  - Dominam em condições estáveis
  - Probióticos são geralmente K-estrategistas
- A aquicultura geralmente impulsiona a seleção de r.



Species	Temperature (°C)	Generation time (mins)	Reference
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	37	11-13	Ulitzur 1974
<i>Vibrio alginolyticus</i>	37	20-25	Ulitzur 1974
<i>Vibrio natriegens</i>	37	< 10	Eagon 1961
<i>Bacillus</i>	37	53+	DSM
<i>Pediococcus</i>	37	40	DSM
<i>Lactobacillus</i>	37	50	DSM
<i>Enterococcus</i>	37	58	DSM

# Detection and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* Isolates in Aquaculture Environments: Implications for Public Health

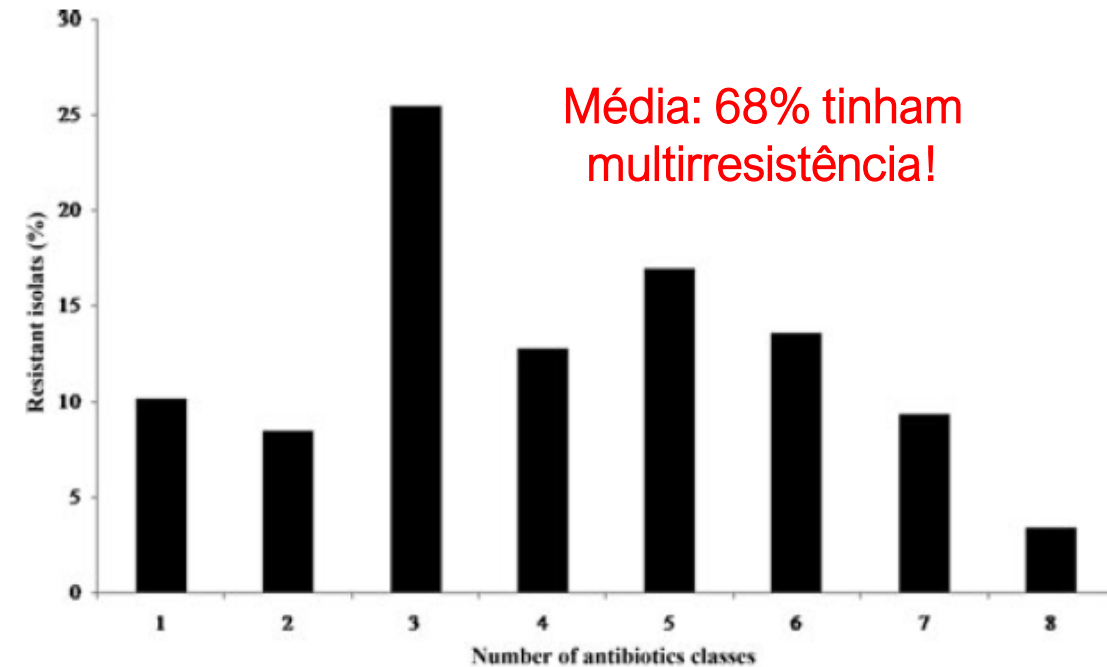
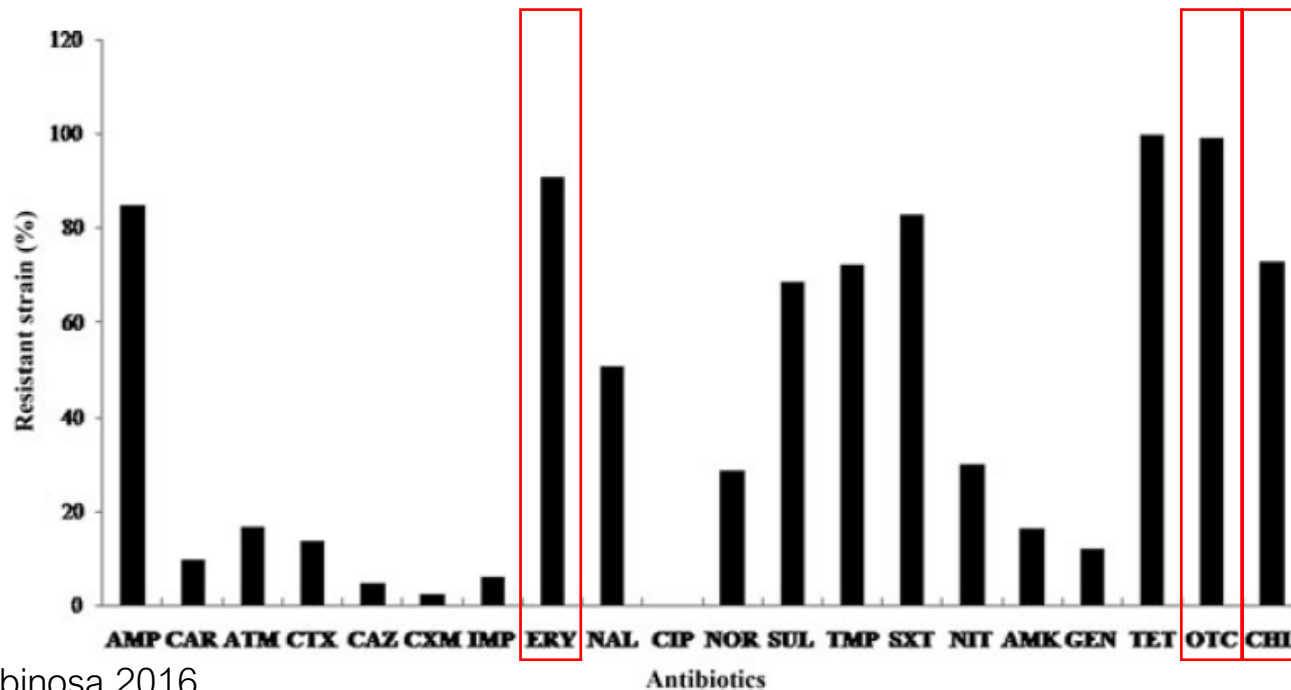
Etinosa O. Igbinsosa ✉

O que são patógenos inteligentes?

## Resistente a antibióticos

- 56 amostras de viveiros de aquicultura colhidas
  - *Vibrio* encontrado em todas as amostras, entre  $10^3 - 10^6$  UFC/ 100 ml
  - A resistência antimicrobiana foi caracterizada contra 20 produtos antimicrobianos

33% *V. fluvialis*  
21% *V. parahaemolyticus*  
18% *V. vulnificus*



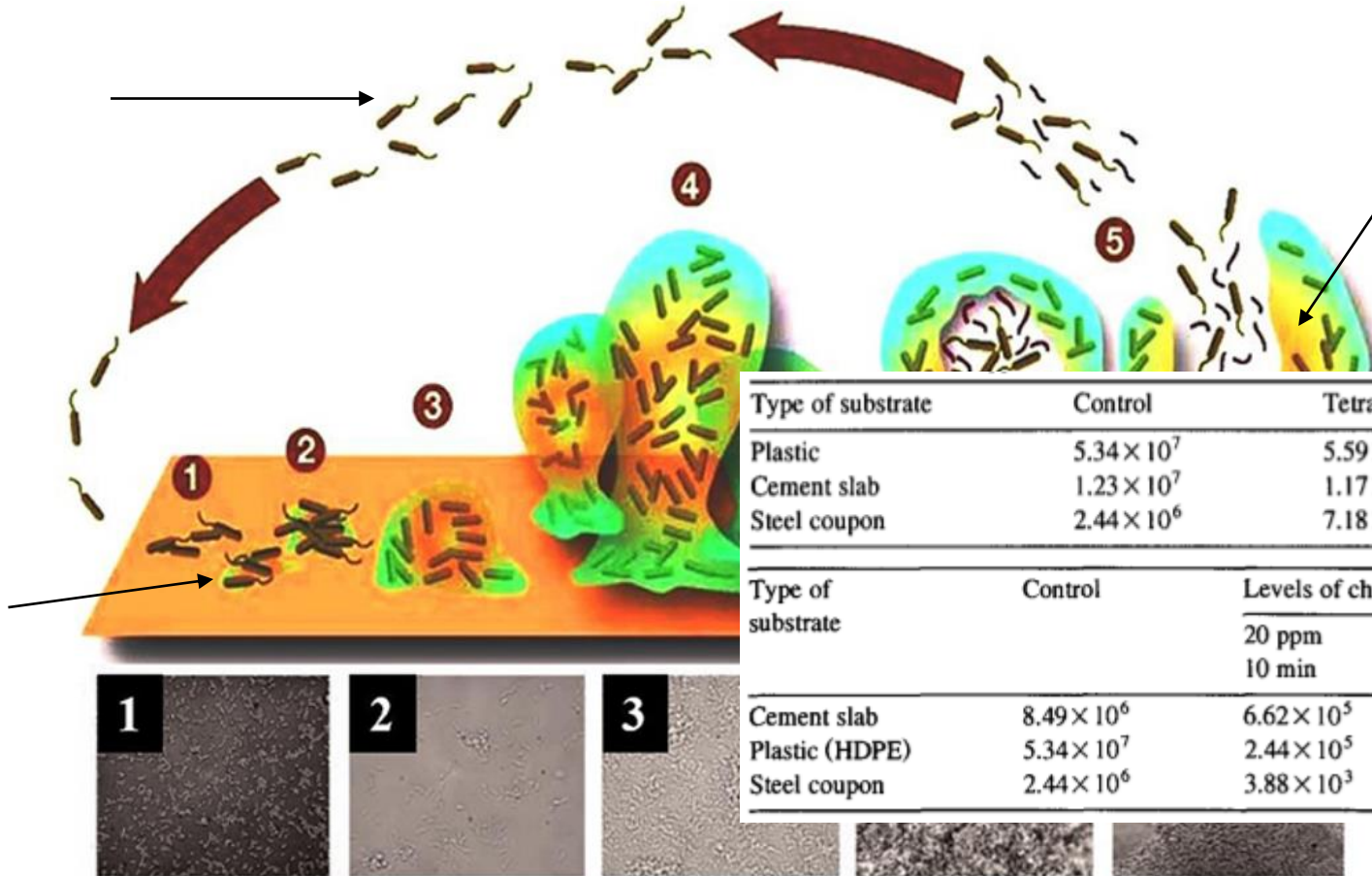
Igbinsosa 2016



O que são patógenos inteligentes?

## 'Esconde-esconde' em biofilmes

Vida livre, flagelada e altamente virulenta



Matriz extracelular aprisiona nutrientes, fornece suporte estrutural e proteção

Formação de biofilme coordenada através de quorum ser

Type of substrate	Control	Tetracycline	Chloramphenicol		
Plastic	$5.34 \times 10^7$	$5.59 \times 10^7$	$3.08 \times 10^6$		
Cement slab	$1.23 \times 10^7$	$1.17 \times 10^7$	$1.14 \times 10^7$		
Steel coupon	$2.44 \times 10^6$	$7.18 \times 10^6$	$1.08 \times 10^7$		

Type of substrate	Control	Levels of chlorine and exposure time		
		20 ppm 10 min	100 ppm 10 min	200 ppm 10 min
Cement slab	$8.49 \times 10^6$	$6.62 \times 10^5$	$5.67 \times 10^4$	$4.36 \times 10^3$
Plastic (HDPE)	$5.34 \times 10^7$	$2.44 \times 10^5$	$3.40 \times 10^3$	-
Steel coupon	$2.44 \times 10^6$	$3.88 \times 10^3$	-	-



Karunasagar et al 1996

Verderosa et al 2019

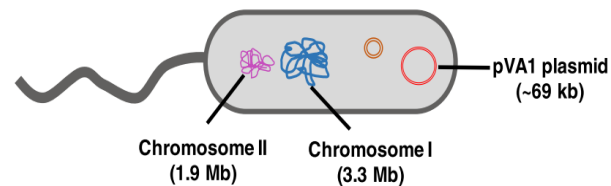


O que são patógenos inteligentes?

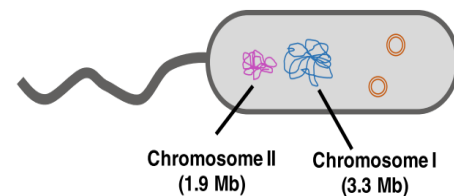
## Tem 'armas' – exotoxinas

- Toxinas (Pir)AB relacionadas a insetos *Photobacterium* produzidas por *Vibrio*
- Até 100% de mortalidade para camarão em 20–30 DOC
- Genes de toxinas codificados em um plasmídeo

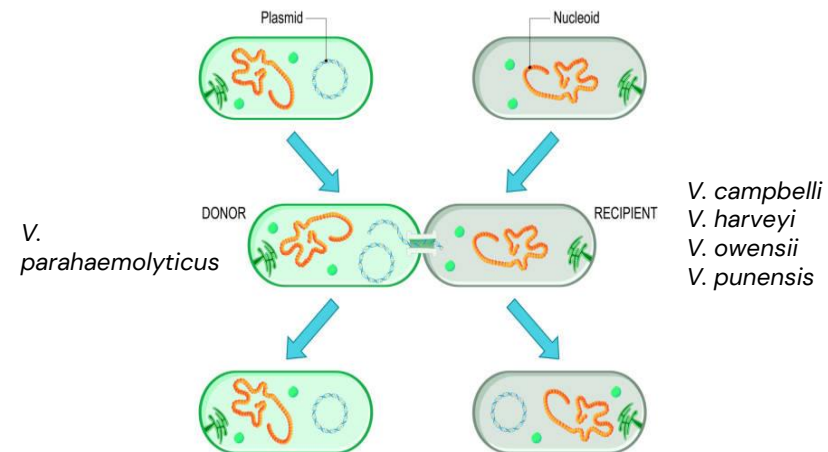
AHPND-causing *V. parahaemolyticus*



Non-AHPND causing *V. parahaemolyticus*



Horizontal gene transfer



*V. campbelli*  
*V. harveyi*  
*V. owensii*  
*V. punensis*

# Como combater patógenos "inteligentes"?

**Inibição Directa**



**Rompimento de Membrana**



**Quórum Quenching**



**Degradação de toxinas**



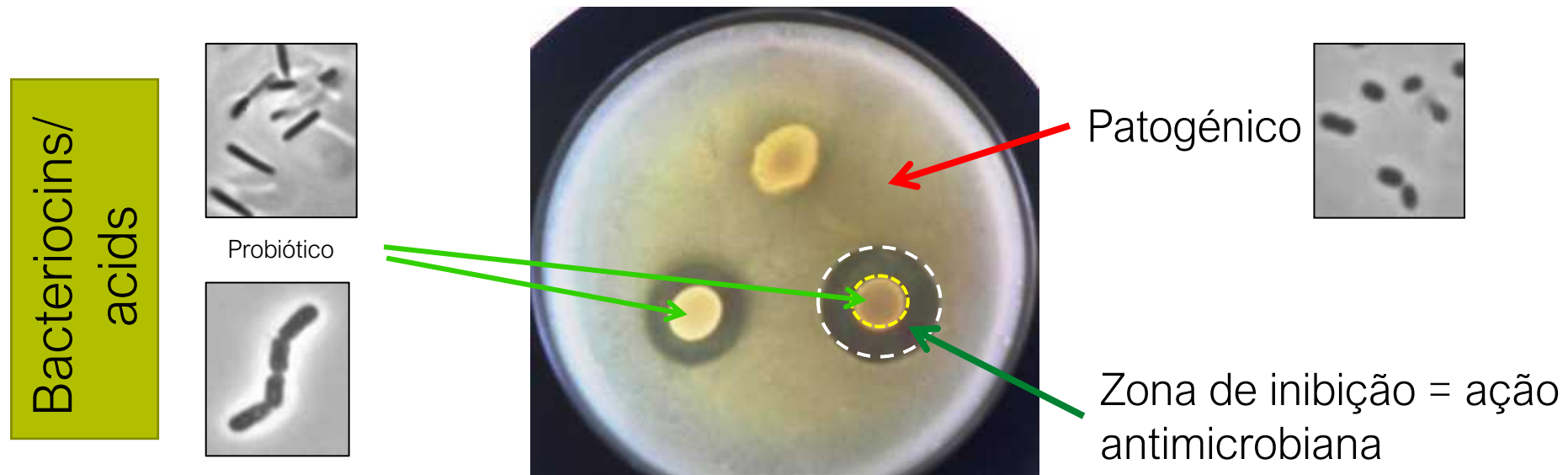


# Inibição direta do patógeno

Matar patógenos diretamente, ou impedir sua proliferação

## Ação antimicrobiana de amplo espectro

- Os probióticos podem produzir substâncias que:
  - Matam patógenos diretamente ou
  - Reduzem o crescimento e a virulência do patógeno (quorum quenching)

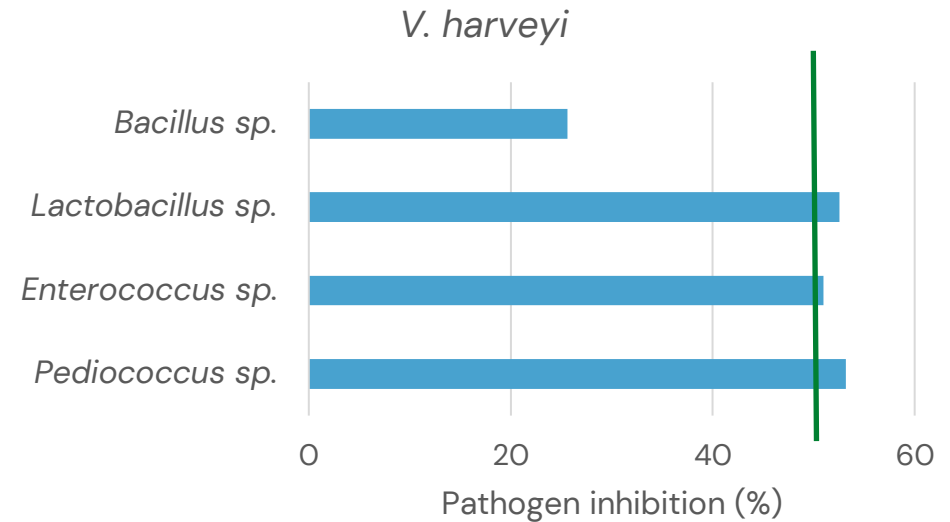
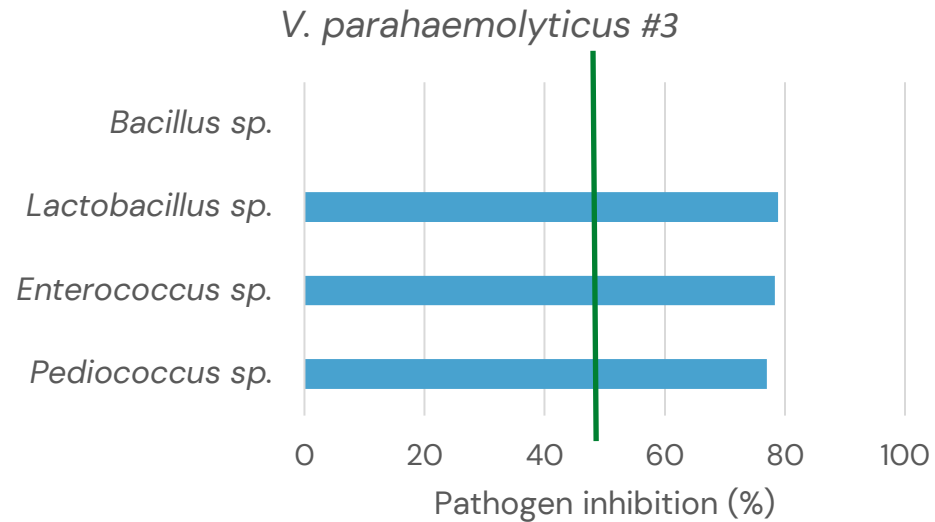
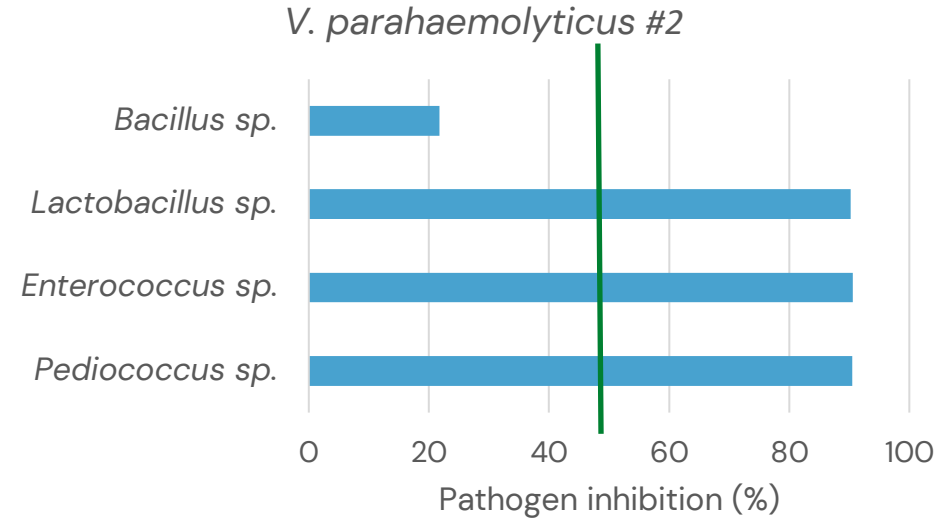
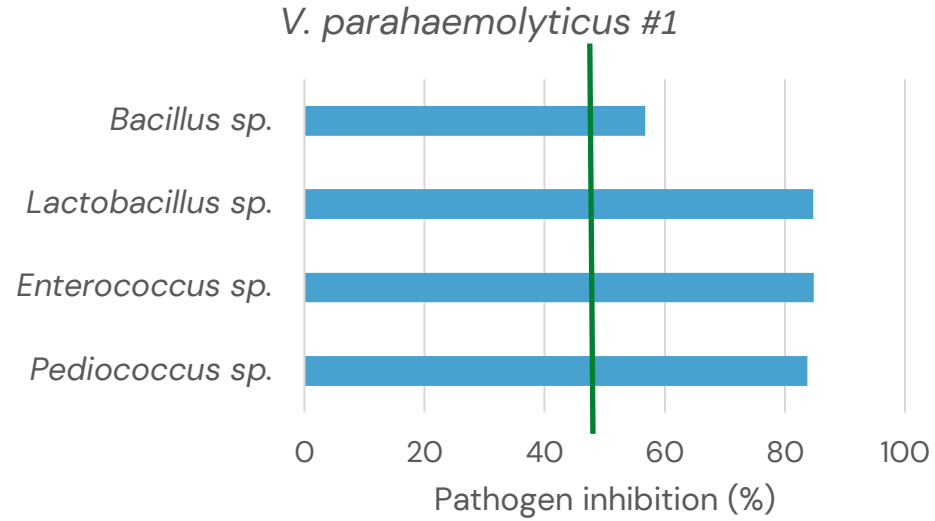


## AquaStar® demonstra ampla inibição de patógenos

Pathogen	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
<i>A. hydrophila</i>	+++	+++	+++	++
<i>A. salmonicida</i>	++++	++++	++++	+
<i>E. tarda</i>	++++	+++	++++	++
<i>F. indologenes</i>	++++	++++	++++	+++
<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	+
<i>S. agalactiae</i>	+++	+++	+++	++
<i>S. iniae</i>	+++	+++	+++	++++
<i>V. alginolyticus</i>	+++	++	+++	+++
<i>V. diazotrophicus</i>	+++	++	+++	+
<i>V. harveyi</i>	+++	+++	+++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	++++	++++	++++	++
<i>Y. ruckeri</i>	++++	+++	++++	++++

\* Symbols indicate percentage inhibition where 0% (-), 1-25% (+), 26-50% (++) , 51-75% (+++) and 76-100% (++++)

# Inibição direta do *Vibrio* spp.



Source: dsm-firmenich



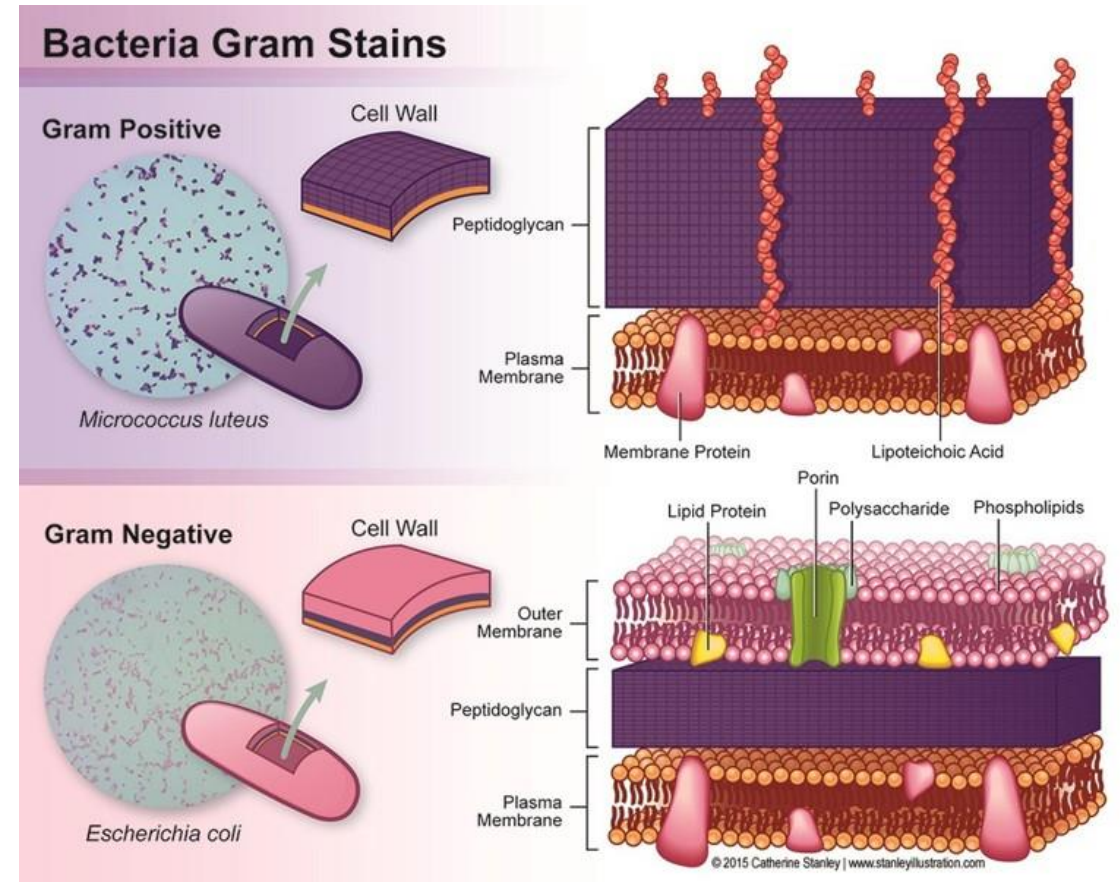
# Danos à membrana

Rompendo membranas patogênicas, matá-las ou torná-las incapacitadas



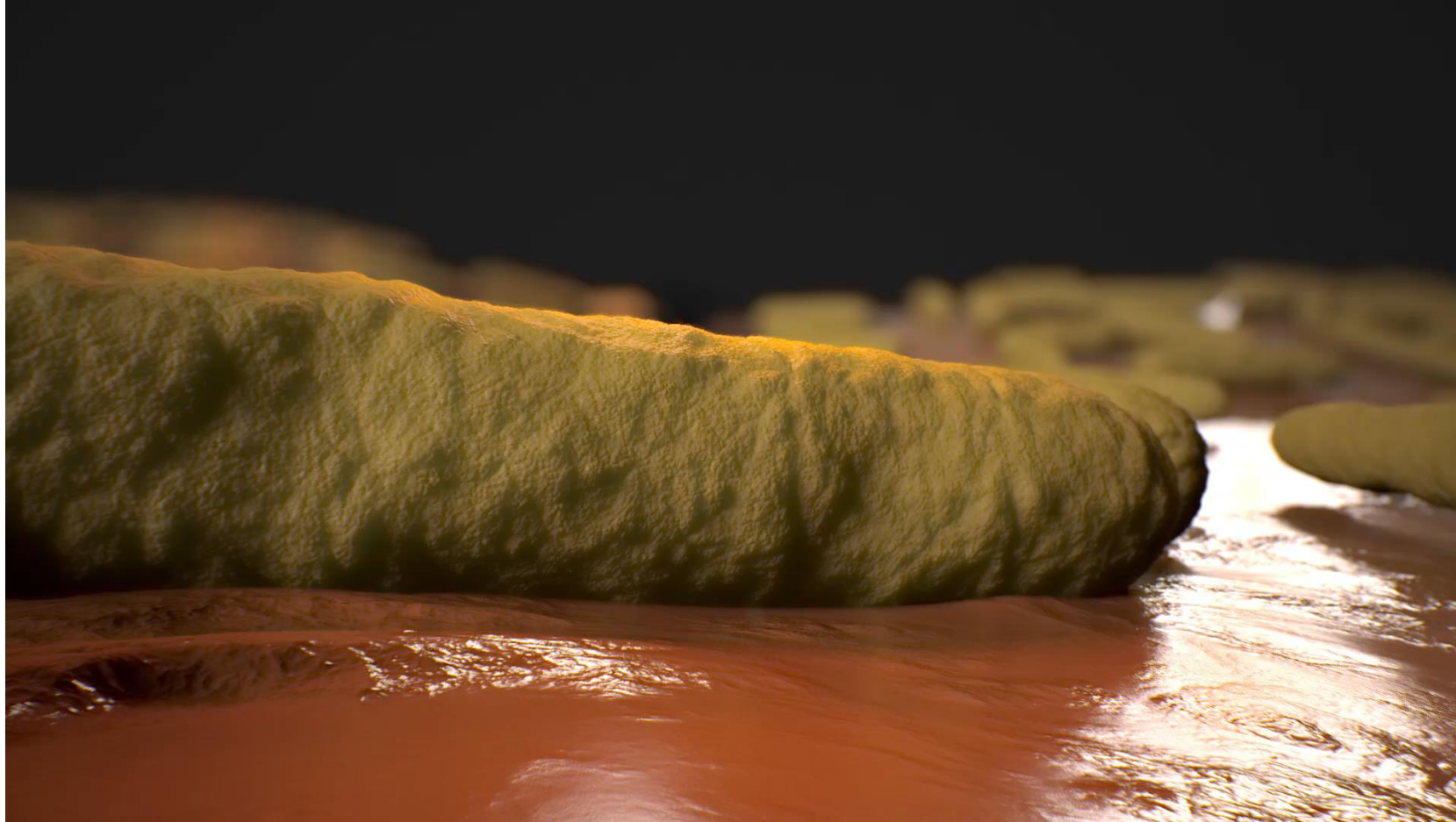
## Patógenos bacterianos

- As bactérias gram-negativas (por exemplo, *Vibrio* spp.) têm uma membrana externa composta por lipopolissacarídeo (LPS)
- Juntamente com bombas de efluxo multidrogas, o LPS contribui para a resistência e protege a célula
- É necessária uma abordagem diferente para mitigar diferentes tipos
- Para patógenos Gram-negativos, primeiro é necessário atingir a membrana externa



SOURCE: Ayon 2020

# Eficácia melhorada com Biotronic® – Permeabilizing Complex™

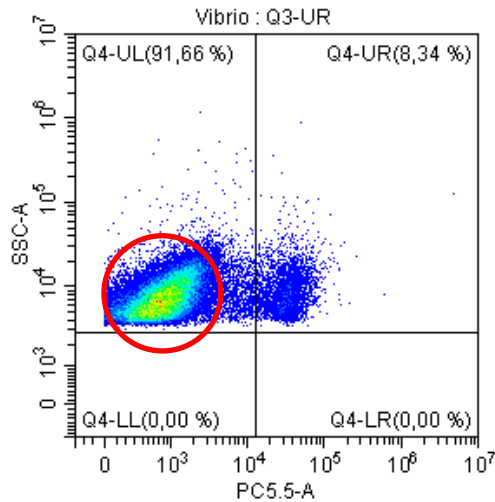


# Biotronic® rompe membranas patogênicas

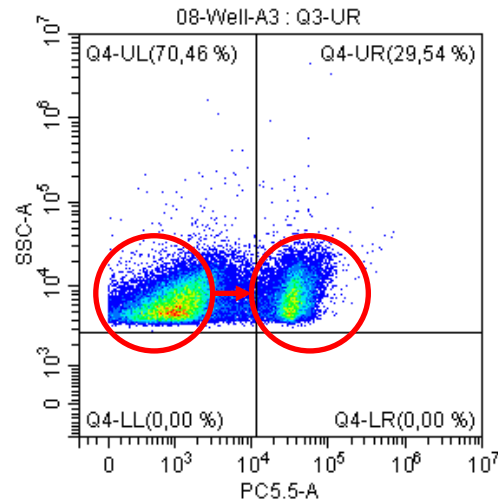
## Um estudo de caso de *Vibrio parahaemolyticus*...



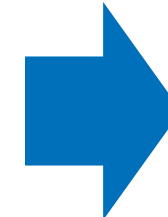
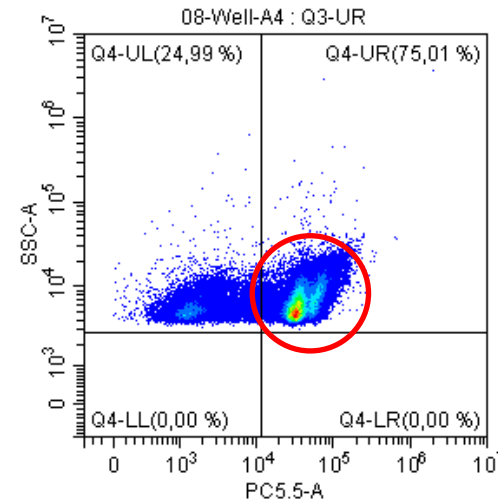
Controle



Biotronic® baixo

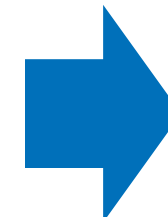


Biotronic® alta



O aumento do sinal corresponde ao aumento do dano à membrana

- Maior influxo de outros antimicrobianos
- Redução da virulência

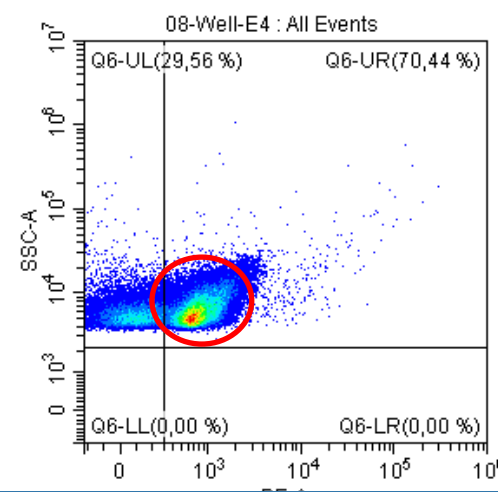
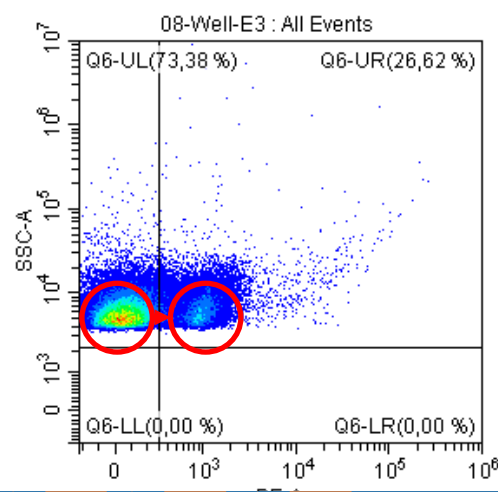
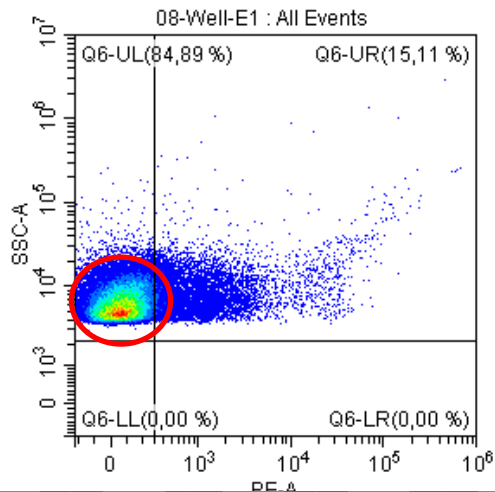


O aumento do sinal corresponde à diminuição da atividade da bomba de efluxo

- Menor resistência aos antimicrobianos (RAM)
- Elogia a estratégia antimicrobiana

Integridade da membrana

Atividade da bomba de efluxo



# Quorum quenching

Quebrando a comunicação entre patógenos, reduzindo sua virulência e 'trabalho em equipe'





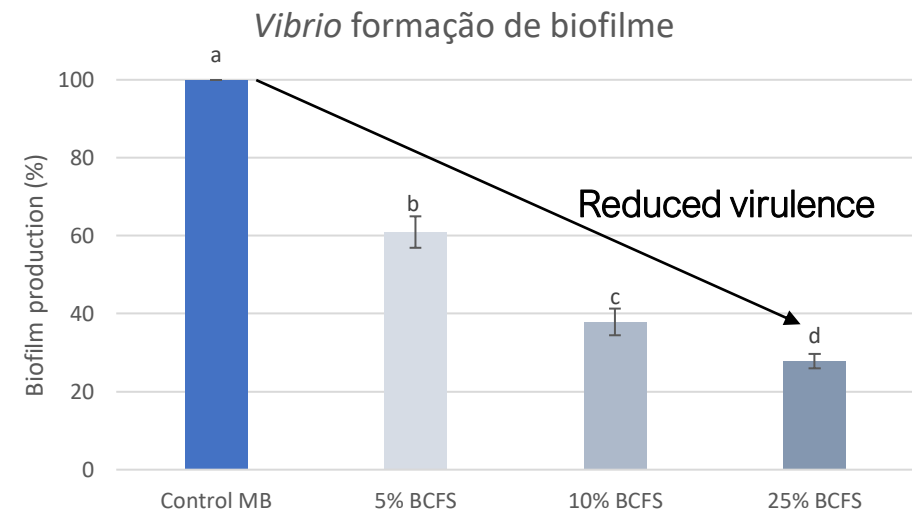
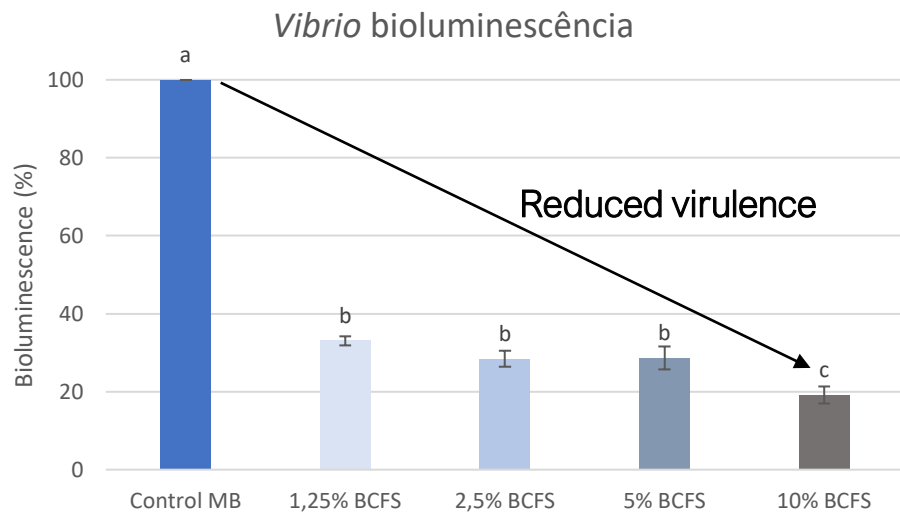
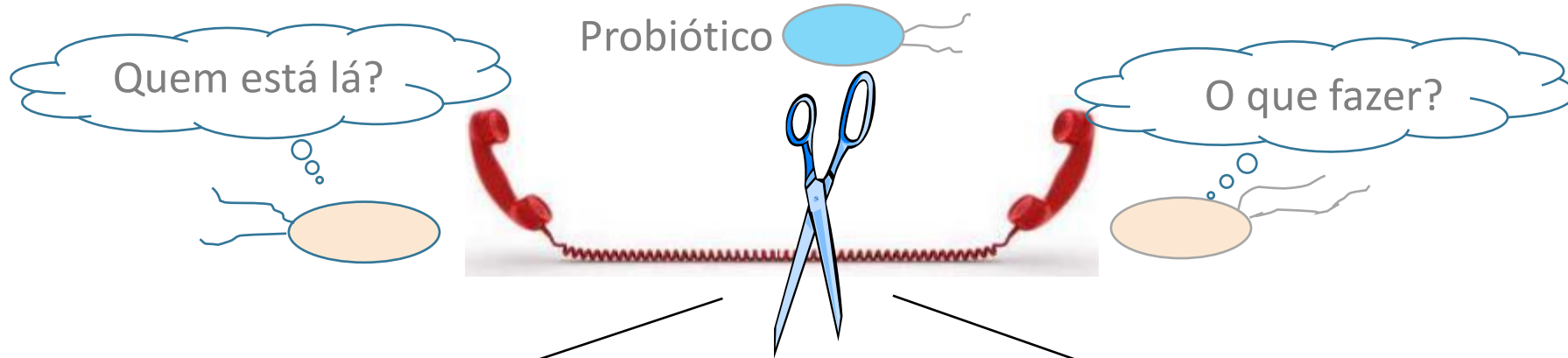


## Quenchers de quórum natural

- O oposto do quorum sensing é o quorum quenching (QQ)
- QQ pode ser usado para reduzir a virulência de patógenos gerenciar biofilmes
- QQ natural são produzidos por
  - Alga
  - Fitogênicos (cinamaldeído, Biotronic®)
  - Probióticos (AquaStar®)



# Quorum quenching por AquaStar®

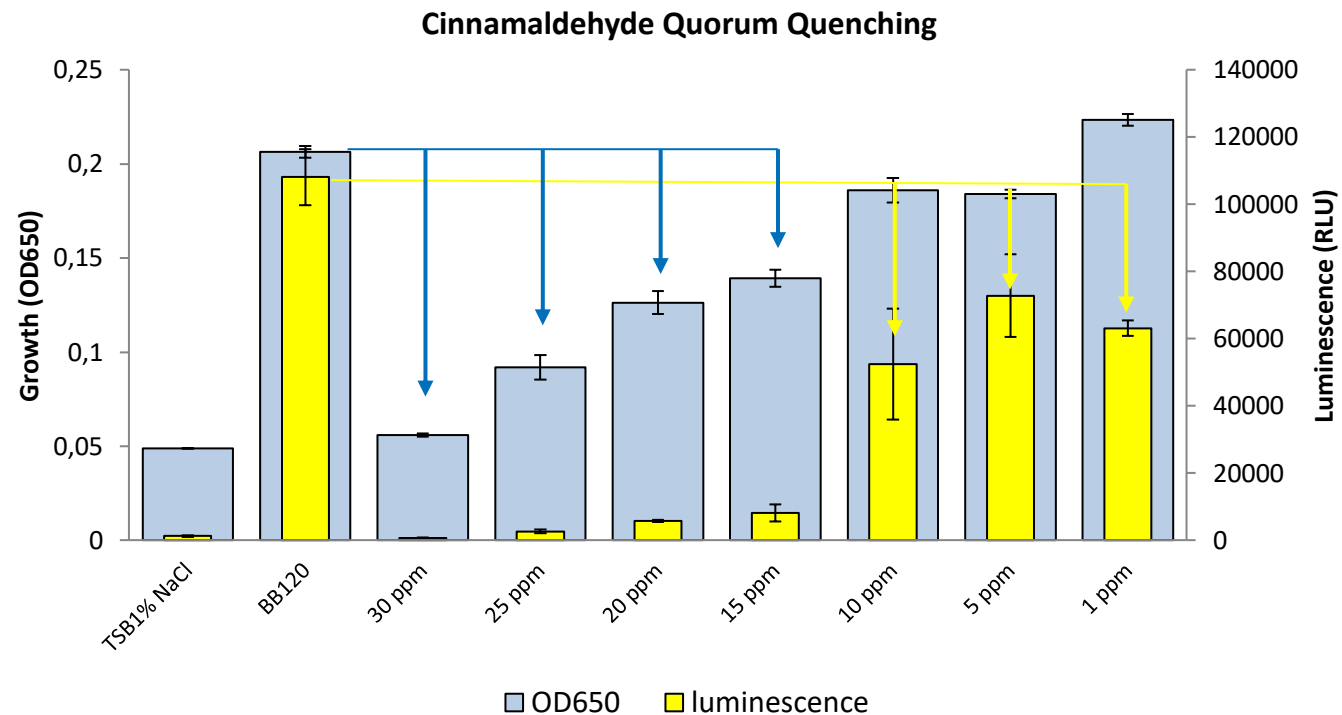


\*BCFS = *Bacillus* cell free supernatant

SOURCE: ARC Ghent University

## Quorum quenching by Biotronic®

- Em doses baixas cinamaldeído (em Biotronic® reduz a bioluminescência/virulência (setas amarelas)
- Em doses mais elevadas, o cinamaldeído reduz o crescimento do patógeno (setas azuis)

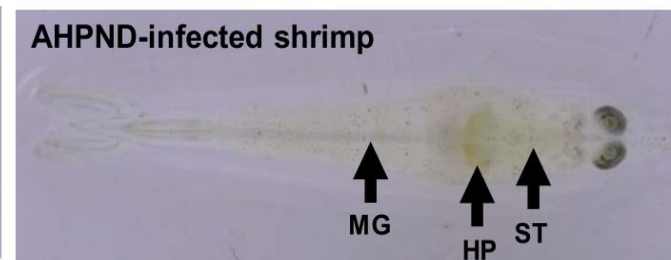
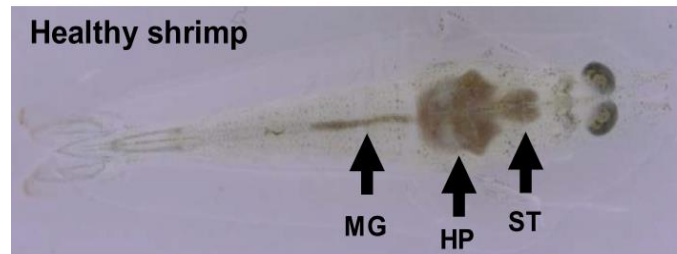
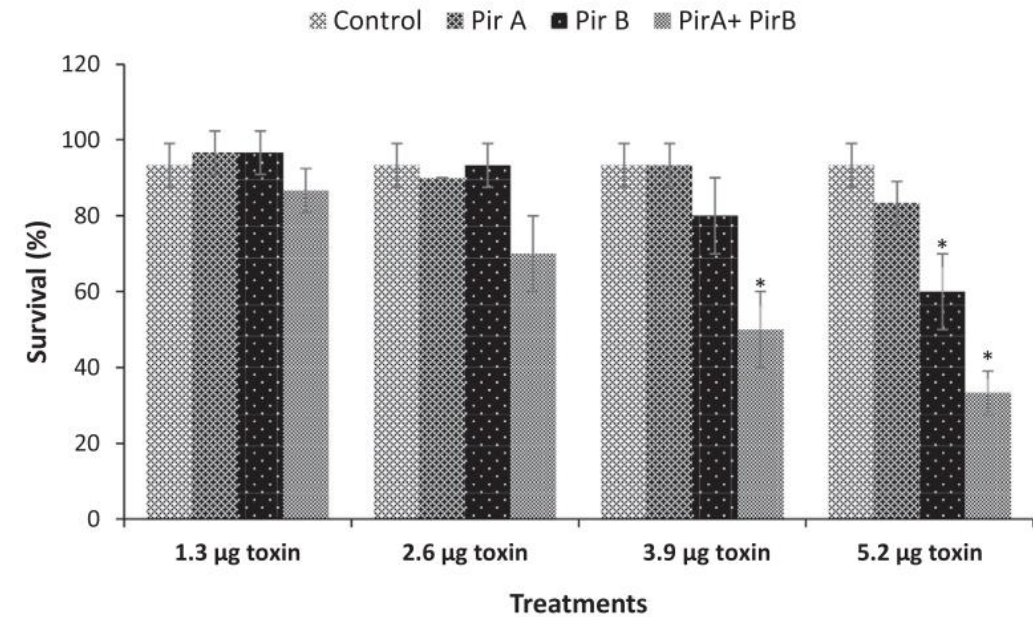
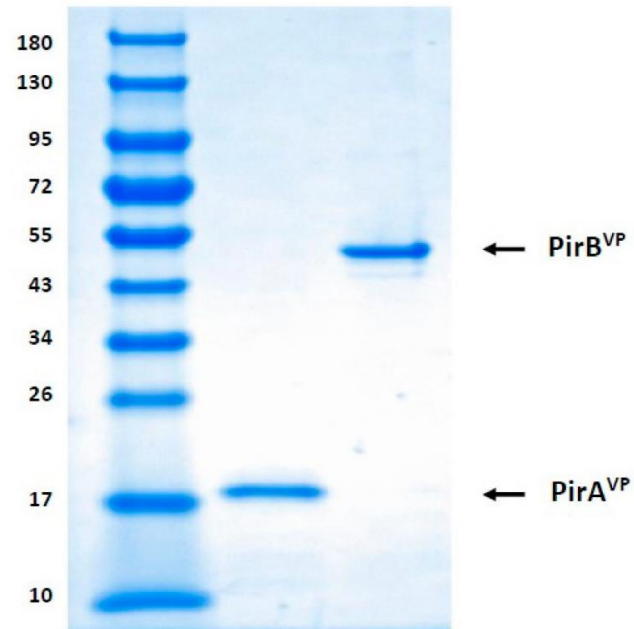


# Desintoxicação

Neutralizando exotoxinas, prevenindo seus maiores danos



## Toxicidade do PirAB em camarões: PirA < PirB < PirAB



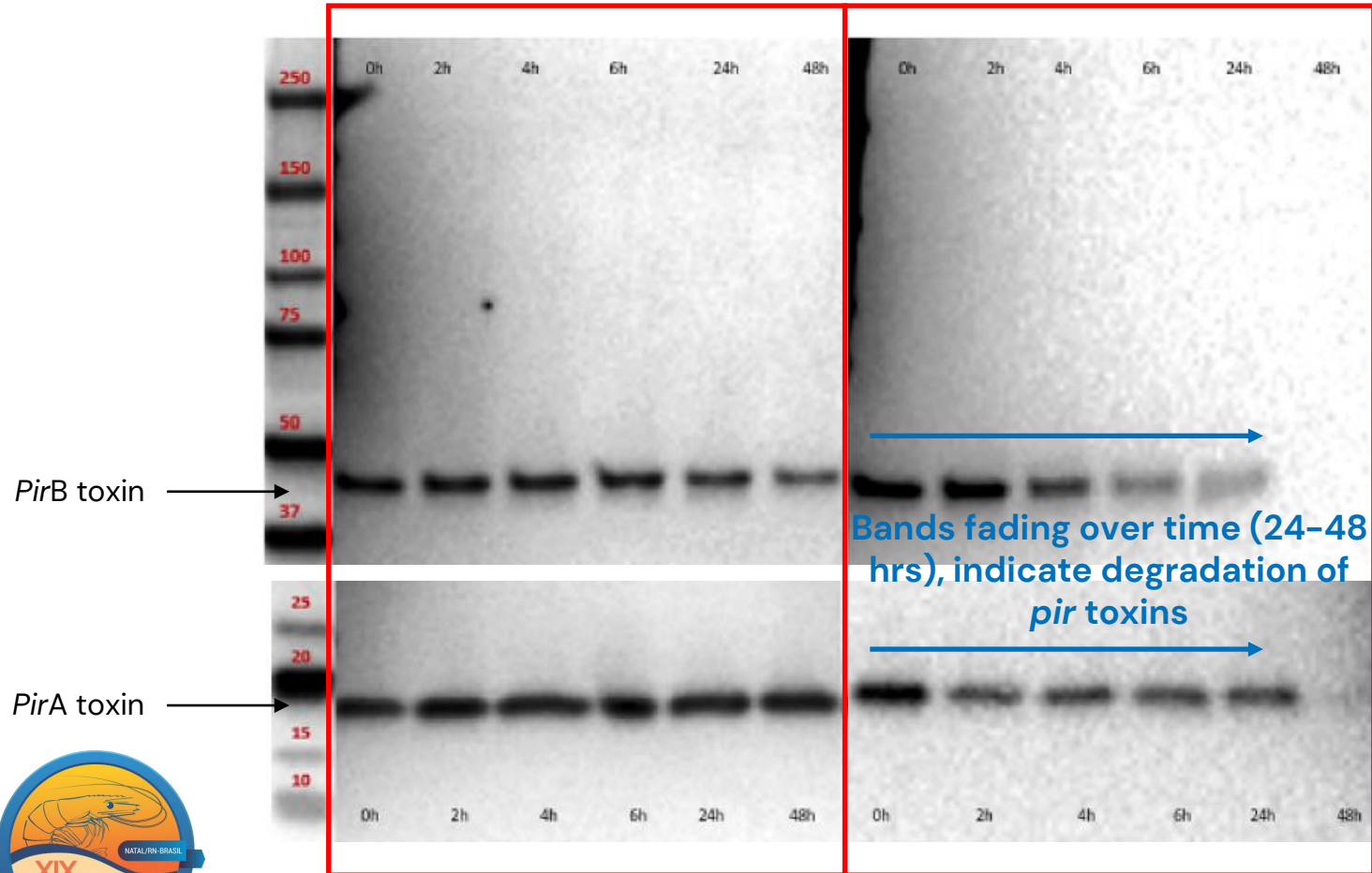
O camarão AHPND pode ser diagnosticado por PCR, histologia, produção de toxinas (ELISA/Western Blot)



# Bacillus no AquaStar® degrada toxinas PirAB

Controle negativo (toxina pir)

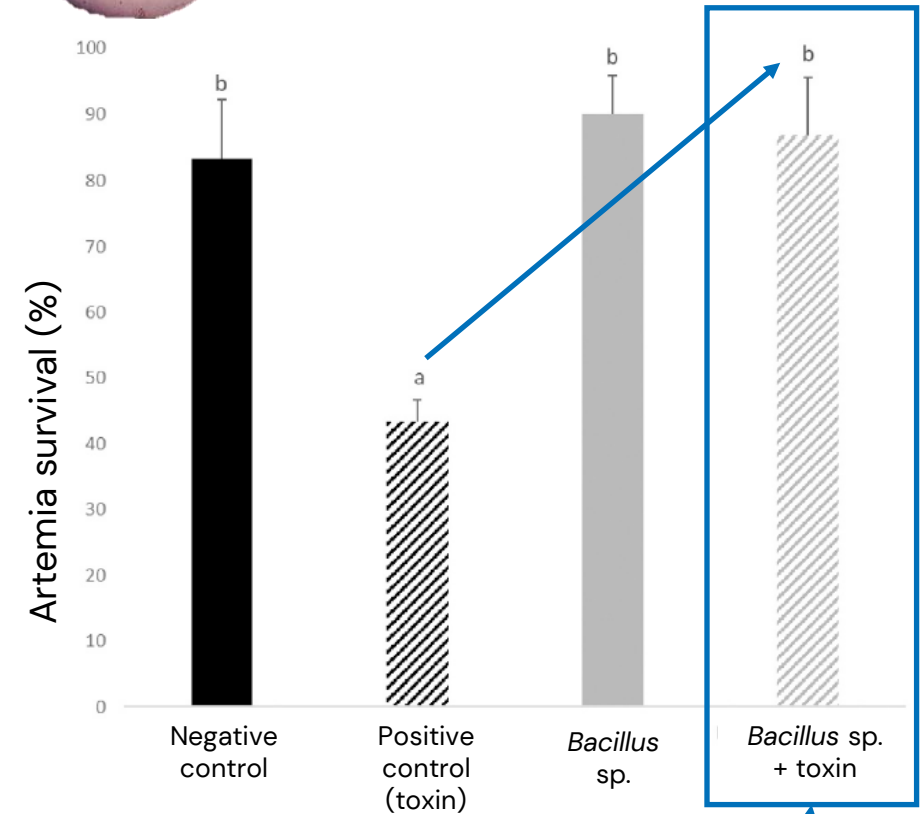
Controle positivo (toxina pir + Bacillus)



Nguyen et al. 2021



**Nota: nem todos os Bacillus spp**



Leva a uma maior sobrevivência da artemia quando desafiado com toxina pir



# *Ensaaios in vivo*

Eficácia comprovada do laboratório até a fazenda

## AquaStar® GH vs AHPND

**Objetivo: demonstrar o benefício do AquaStar® GH\* na prevenção da doença contra EMS/AHPND positivo para *V. parahaemolyticus*, com diferentes doses**

- **Animais: 600 camarões FPS distribuídos em 30 tanques (20 por tanque, peso inicial 1,4g)**
- **Tratamentos ( $n = 6$ ):**
  - Controle (ração basal com 9% de proteína marinha; Código = CON)
  - Controle + 0,2 g/kg AquaStar® GH (Código = 0,2)
  - Controle + 0,3 g/kg AquaStar® GH (Código = 0,3)
  - Controle + 0,7 g/kg AquaStar® GH (Código = 0,7)
  - Controle + 1,7 g/kg AquaStar® GH (Código = 1,7)
- **Duração: 8 weeks**
- **Desafio da doença: *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND +ve), imersão, 1 hr at  $1.25 \times 10^6$  CFU/ ml**

\*equivalent dosage, based on AquaStar® Growout

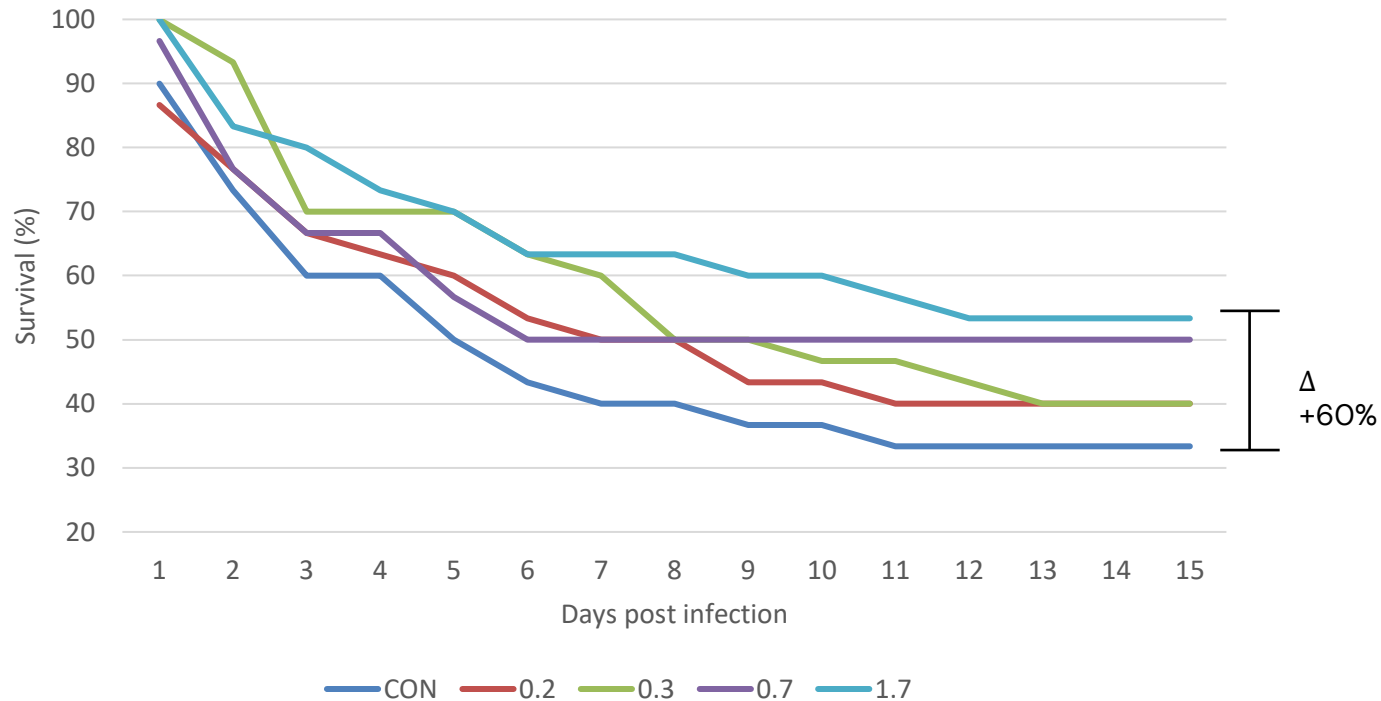




## AquaStar® GH vs AHPND

### Sobrevivência até 60% maior, em relação ao controle

- Efeito dependente da dose observado com AquaStar® contra AHPND – até 60% de proteção
- Dosagem recomendada 1 – 2 g/kg



## Biotronic® PX Top3 vs AHPND

**Objetivo: demonstrar o benefício do Biotronic® PX Top3 na prevenção de doenças de EMS/AHPND quando alimentado com diferentes doses e comparado a um AGP**

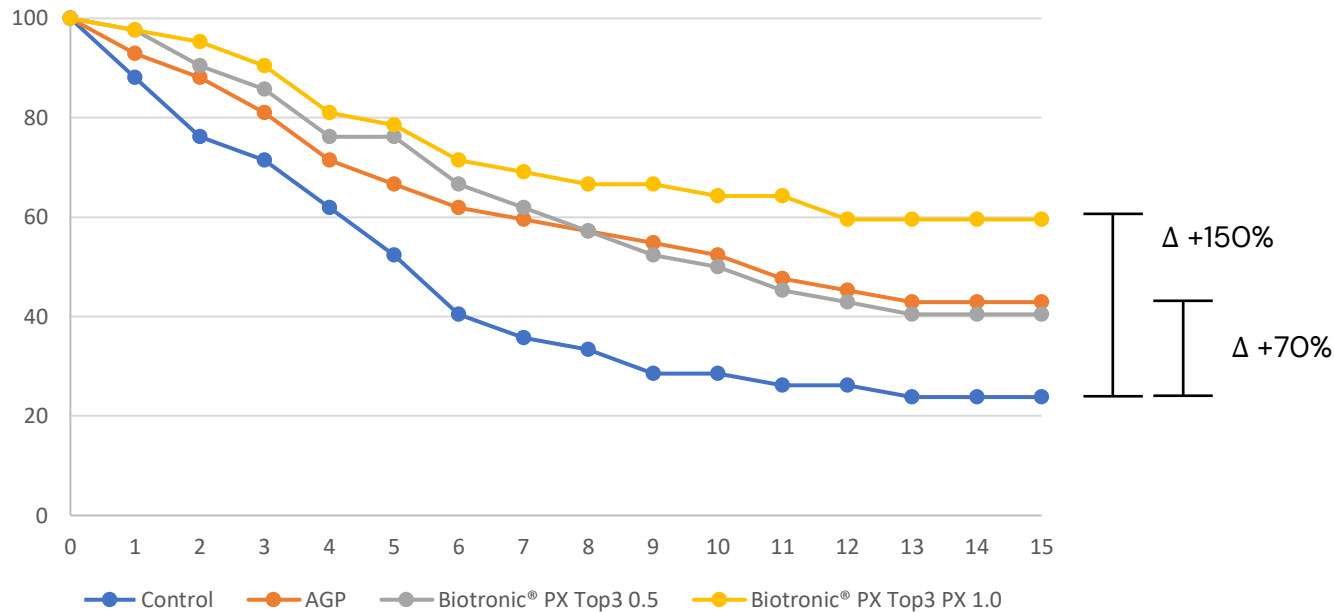
- **Animais: 480 camarões FPS distribuídos em 24 tanques (20 por tanque, peso inicial 2,4g)**
- **Tratamentos ( $n = 6$ ):**
  - Controle
  - Controle + 0.15 kg/ t Cefotaxime
  - Controle + 0.5 kg/ t Biotronic® PX Top3
  - Controle + 1.0 kg/ t Biotronic® PX Top3
- **Duração: 66 days**
- **Desafio da doença: *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND +ve), imersão, 1 hr at  $1.2 \times 10^6$  CFU/ ml**





# Biotronic® PX Top3 vs AHPND

*Sobrevida 70-150% maior, em relação ao controle*



- Resposta dose dependente do Biotronic® PX Top3
- Aumento de quase 3 vezes na sobrevida, com maior dosagem
- Biotronic® PX Top3 melhora o desempenho do camarão
- Biotronic® PX Top3 é uma alternativa sustentável ao AGP

Performance data	Survival (%)	Final weight (g)	Biomass (g)	SGR	FCR
Control	66.7 ± 4.7	9.39 ± 0.87	125 ± 9 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.82 ± 0.15 <sup>a</sup>
AGP	84.2 ± 5.3	9.06 ± 0.91	152 ± 6 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.13 <sup>ab</sup>
Biotronic® PX Top3 0.5	85.8 ± 1.9	9.13 ± 0.38	157 ± 9 <sup>b</sup>	2.09 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.55 ± 0.07 <sup>b</sup>
Biotronic® PX Top3 1.0	85.8 ± 4.5	9.28 ± 0.61	159 ± 5 <sup>b</sup>	2.12 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.08 <sup>b</sup>

## Resumo

- O maior "custo" para a Aquicultura é a quebra de safra
- Vibrio é o arc-inimigo do camarão
  - Onipresente na natureza
  - R Estrategistas para crescimento rápido
  - Resistente aos antimicrobianos tradicionais
  - Formador de biofilme e produtor de exotoxinas
- Prevenir é melhor do que remediar, e as soluções devem se concentrar em:
  - Inibição direta
  - Danos à membrana para interferir com a função celular normal e reduzir o risco de Resistencia Antimicrobiana
  - Componentes de Quorum quenching para reduzir a virulência
  - Degradação de toxinas para tirar 'armas' de patógenos
- Uma abordagem holística é necessária para este grande desafio!





# O que futebol e probióticos têm em comum?

## Lessons from soccer – applied to microbiology

By Benedict Standen

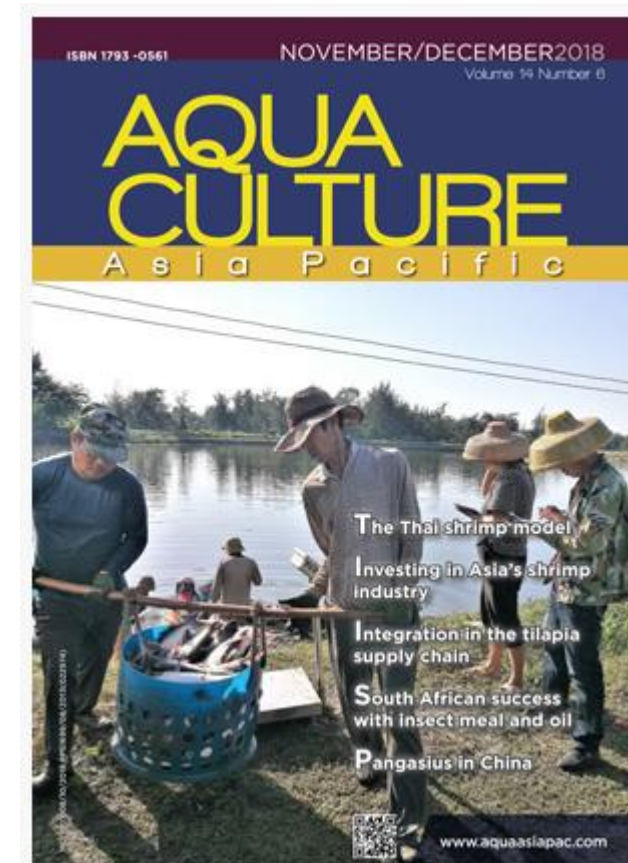
Taking the cue from using best strikers in soccer, multi-genus rather than one single genus could be more effective in probiotic formulations.

As football fever spreads across the world, nearly half the world's population watched the World Cup in 2018. The competition equalled a record, with the joint highest number of penalty shootouts, with a total of four (also in 1990, 2006 and 2014). Penalties can be a very anxious time, especially when your native country is involved. Many factors can influence the outcome of a penalty shootout. Most importantly though, you need to use your best strikers to score, and your best goalkeeper to save. It is extremely unlikely that a world-class goal scorer, can also be a world-class goalkeeper. This is obvious, since each player has strengths and weaknesses and possesses a different set of skills, which allows them to successfully accomplish a task.

The same is true for beneficial bacteria, or probiotics. Different species have different characteristics, which affect their efficacy, and ultimately their probiotic functionality. With this in mind, why are the majority of commercial probiotic formulations focussed on a single genus, the *Bacillus* sp.?

There are a few reasons for this. Firstly, most common *Bacillus* spp. are generally not too difficult to grow at moderate cost. Secondly, they can form bacterial spores, which allow for a longer shelf life and have greater (but not limitless) heat stability. Thirdly, they have an extensive safety record with only a couple of species known to be pathogenic, or toxic to animals (*Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*). This safety record makes it relatively easy to register *Bacillus* spp. products, since they appear on many positive lists: for example, GRAS - Generally Recognized as Safe in USA; QPS - Qualified Presumption of Safety in EU. However, these benefits are more useful for the probiotic producers, as opposed to the animals.

Although there is scientific evidence to support the use of *Bacillus* based probiotics in aquaculture, it is unlikely that a single genus of bacteria can do everything. The intestine is an extremely complex ecosystem, and therefore specific microbial drivers are needed, in the right concentration, for specific tasks within the gut. Consequently, the probiotic should be chosen based on the benefits one wants to achieve i.e. growth performance, immunity, disease resistance, survival etc.



# O que futebol e probióticos têm em comum?

## Lessons from soccer – applied to microbiology

By Benedict Standen

Taking the cue from using best st multi-genus rather than one sing be more effective in probiotic fo

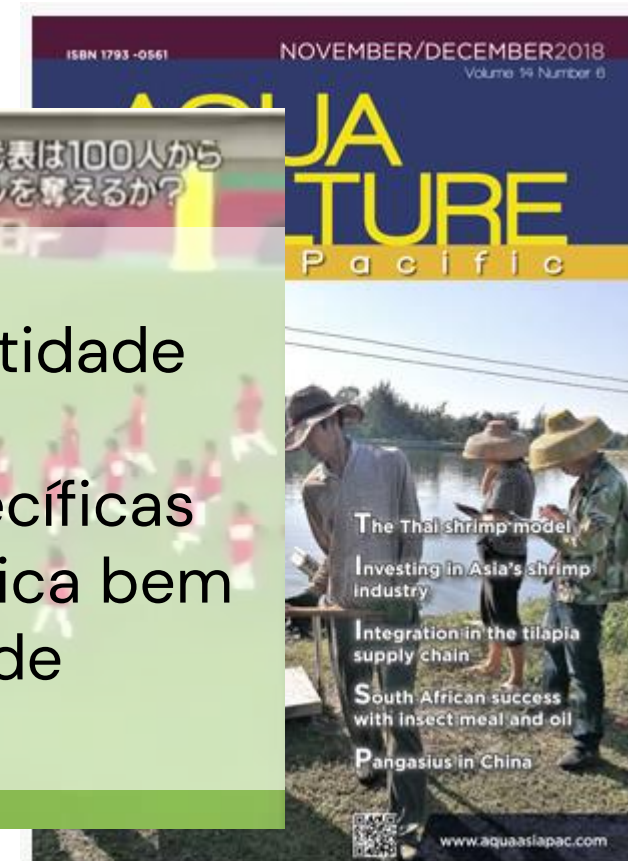
As football fever spreads across the world, n population watched the World Cup in 20 equalled a record, with the joint highest shootouts, with a total of four (also in 199 Penalties can be a very anxious time, especia country is involved. Many factors can influe a penalty shootout. Most importantly thoug your best strikers to score, and your best g is extremely unlikely that a world-class goa a world-class goalkeeper. This is obvious, si strengths and weaknesses and possesses a which allows them to successfully accomplis

The same is true for beneficial bacteria, or species have different characteristics, which and ultimately their probiotic functionality. V are the majority of commercial probiotic fo on a single genus, the *Bacillus* sp.?

### Mensagens-chave:

1. Qualidade é melhor que quantidade
2. Habilidades específicas são necessárias para tarefas específicas
3. Com uma formulação probiótica bem equilibrada, você também pode pontuar!

[https://www.youtube.com/watch?v=xg\\_VDaGnTNk](https://www.youtube.com/watch?v=xg_VDaGnTNk)



We bring progress to life™

[benedict.standen@dsm-firmenich.com](mailto:benedict.standen@dsm-firmenich.com)  
+43 664 827 9075

[thiago.soligo@dsm-firmenich.com](mailto:thiago.soligo@dsm-firmenich.com)  
+506 8503 4592



dsm-firmenich 