INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

INFORME FINAL

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

FIP N°2008-65 / Octubre-2011

INFORME FINAL

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

FIP N° 2008-65 / Octubre-2011

REQUIRENTE

FONDO DE INVESTIGACIÓN PESQUERA
Presidente Consejo de Investigación Pesquera
Pablo Galilea Carrillo

EJECUTOR

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, IFOP

Jefe División Investigación en Acuicultura
Leonardo Guzmán Méndez

Director Ejecutivo
Jorge Antonio Toro Da'Ponte

JEFE DE PROYECTO

Sergio Contreras Lynch

AUTORES

Sergio Contreras Lynch
Claudio Miranda Pérez (UCN)

COLABORADORES

Juan Carlos Quintanilla Correa
Tadaishi Yatabe Rodríguez
Mylena Menanteau Mansilla
Luis Norambuena Subiabre
Carolina Asencio Almonacid
Margarita González Gómez
Rodrigo Rojas Araya (UCN)

RESUMEN EJECUTIVO

En el presente informe, que constituye el denominado, preinforme final de la iniciativa, se entrega el desarrollo de las actividades ejecutadas y sus respectivos resultados. Se han actualizado y complementado aquellas actividades y resultados ya enunciados en los informes de avance previo, e incorporado las nuevas actividades desarrolladas desde el doceavo mes de ejecución del proyecto, a la fecha. De igual manera, se entregan los resultados vinculados a las mismas.

El principal objetivo de la presente iniciativa era lograr optimizar la utilización de los antimicrobianos en la salmonicultura, mediante la evaluación de resultados del monitoreo de la resistencia en bacterias patógenas para el salmón. Fue así como a través de los análisis de perfiles y niveles de susceptibilidad antimicrobiana efectuados a los agentes patógenos *Piscirickettsia salmonis, Flavobacterium psychrophilum, Vibrio ordalii, Aeromonas salmonicida, Streptococcus phocae y Yersinia ruckeri*, se buscó lograr una caracterización y posterior análisis de la evolución del fenómeno de resistencia bacteriana en la industria salmonicultora nacional, siendo ello la base para generar una mejor comprensión de la dinámica y modulación de los tratamientos efectuados, frente a la aparición de enfermedades de origen bacteriano.

Las sustancias antimicrobianas evaluadas corresponden a las autorizadas para su uso en acuicultura, siendo el florfenicol y la oxitetraciclina, las de mayor utilización en la industria salmonicultora nacional. También fueron evaluadas flumequina, ácido oxolínico, amoxicilina y eritromicina.

Cabe mencionar que para lograr alcanzar los objetivos trazados en el presente proyecto, fue necesario una continua coordinación con las entidades participantes en el proyecto, generándose un sistema de apoyo a la labor de obtención de

muestras, posterior aislamiento de los agentes, y finalmente, la evaluación de susceptibilidad de los agentes patógenos aislados, considerando además, la gran cobertura geográfica que consideró la iniciativa.

Tanto para la implementación de las técnicas de evaluación de susceptibilidad antimicrobiana, como en la optimización de los procedimientos de aislamiento de los agentes patógenos de interés, se contó con el importante apoyo de especialistas extranjeros, especialmente, de expertos de Dinamarca, Irlanda y Reino Unido.

Durante el proyecto se efectuaron, a diciembre de 2010, siete campañas de muestreo georeferenciado, considerando centros de cultivo de especies salmonídeas, pertenecientes a las empresas salmonicultoras que participan en el proyecto, y ordenadas en las respectivas Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS), establecidas por la autoridad.

Luego de ejecutada cada campaña de muestreo, se efectuaron los aislamientos e identificación inicial de las bacterias patógenas obtenidas desde los muestreos previos, así como la determinación de su nivel y perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos definidos en el proyecto.

La recolección de las muestras fue realizada tanto por parte del equipo de trabajo de IFOP, como por parte de personal de las mismas empresas productoras participantes, para ambas regiones; mientras que el aislamiento e identificación inicial de las bacterias patógenas fue efectuada por el Laboratorio ADL Diagnostic Chile Ltda. Adicionalmente, este mismo laboratorio se hizo cargo de los análisis de susceptibilidad antimicrobiana, para efectos exclusivos del patógeno *Piscirickettsia salmonis*, siendo el resto de los microorganismos, evaluados respecto de sus

niveles y perfiles de resistencia a antimicrobianos, por parte de la Universidad Católica del Norte.

Los resultados de los muestreos, aislamientos, perfiles y niveles de resistencia a antimicrobianos, y análisis de residuos en músculo que se informan en el presente documento, son entregados por región, y considerando el ordenamiento por Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS o “barrio”) desde la que se colectaron.

En las campañas de muestreo ejecutadas en el transcurso del proyecto, se efectuaron 228 muestreos en centros de cultivo, los que están incluidos en 24 de las 35 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras (ACS), de acuerdo a la nueva estructura establecida por la autoridad para las regiones de Los Lagos y Aysén.

Como consecuencia de estos muestreos, fue posible finalmente obtener un total de 272 aislados de los agentes bacterianos patógenos bajo estudio, los que fueron evaluados en lo que respecta a su perfil y nivel de resistencia. La mayor parte de estos aislados corresponden a *Flavobacterium psychrophilum* y *Piscirickettsia salmonis*, siendo ello concordante con la realidad epidemiológica de la industria respecto de las especies que mayores problemas generan en el sector salmonicultor.

En relación a los resultados obtenidos, es posible indicar de manera general, que una alta proporción de los aislados evaluados de *Flavobacterium psychrophilum* presentaron sensibilidad al florfenicol y a oxitetraciclina. Por el contrario el 33,9 y 13,5% presentó resistencia a los antimicrobianos ácidos oxolínico y flumequina, respectivamente.

Para el caso de los análisis de los aislados bacterianos de la especie *Piscirickettsia salmonis,* se puede indicar que una alta proporción presentó sensibilidad a florfenicol, y en menor grado, sensibilidad a oxitetraciclina. Para este agente patógeno, el mayor nivel de resistencia se presentó para acido oxolínico y flumequina con un 17,7 y 5%, respectivamente.

Por otro lado, también se efectuaron análisis en otras matrices de interés, de forma de complementar los estudios destinados a comprender y conocer los flujos que están implícitos en el fenómeno de la resistencia bacteriana en agentes patógenos de especies hidrobiológicas. De esta manera, fue posible hacer muestreos de sedimentos, para determinar residuos farmacológicos, determinar materia orgánica total, y además, aislar poblaciones bacterianas, para evaluar su susceptibilidad a los mismos agentes farmacológicos analizados para las bacterias patógenas de peces.

Asimismo, se efectuaron análisis de residuos de fármacos en músculo, para un total de 205 muestras de músculo y piel, provenientes de 13 de las 35 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras (ACS), y muestreos en agua dulce. A partir de estas 13 ACS, sólo en 11 de ellas se detectó y cuantificó la presencia de al menos uno de los antimicrobianos de interés del proyecto, siendo oxitetraciclina, florfenicol y flumequina, los únicos antimicrobianos detectados y cuantificados.

Considerando todos los antecedentes previamente descritos, posteriormente se efectuó una zonificación agrupando ACS dentro de cada una de las dos regiones estudiadas, la que consideró los resultados obtenidos de la evaluación de susceptibilidad a una serie de agentes farmacológicos de uso en acuicultura, sumado a un análisis de riesgo de la aparición del fenómeno de resistencia. Sobre esta misma base, se efectuó, para cada zona, una categorización, generándose indicadores de control, que llevan a la creación de un sistema que permite

monitorear de forma continua las variables que son factores críticos de éxito y las variables que exigen control.

La base de esta zonificación y caracterización se efectuó a partir de un modelo de análisis de riesgo, donde se estimó el número de brotes causados por cepas resistentes a antimicrobianos, de *P. salmonis* y *F. psychrophilum,* para centros de cultivo de mar y agua dulce (piscicultura y lago), respectivamente.

Los diferentes sectores de agua dulce y mar, se agruparon en zonas de riesgo alto y bajo. Luego, y a partir de los perfiles de resistencia de cada aislado, se diseño un score de resistencia para cada zona en estudio, generándose tres categorías: alta, intermedia y baja.

Cabe recalcar que la categorización de sectores presentada corresponde a una visualización presente de los resultados y análisis del proyecto, y debe entenderse que las clasificaciones de las zonas corresponden a un proceso dinámico que variará en función de los nuevos muestreos y evaluaciones de susceptibilidad a antimicrobianos.

El sistema de monitoreo fue desarrollado a partir de los casi cuatro años de experiencia en el ámbito de los muestreos, análisis e interpretación de los resultados de evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos en el sector acuicultor.

En la última etapa de la presente iniciativa, se presentó a la autoridad pertinente, la propuesta de programa de vigilancia oficial de la resistencia bacteriana, de forma de ajustar los requerimientos técnicos, a las prioridades que se establezcan en conjunto.

Finalmente, se elaboró un documento de carácter técnico destinado a difundir las correctas prácticas de uso de los antimicrobianos en el sector acuicultor, pero que además contiene material de respaldo científico, relativo a conocer de mejor forma, los conceptos y procesos asociados a la resistencia bacteriana, de manera de generar un apoyo concreto al manejo de dicho fenómeno, por parte de los profesionales encargados del manejo sanitario en los centros de cultivo.

Debe recalcarse que tanto el programa propuesto de monitoreo oficial de la resistencia bacteriana, así como la guía diseñada para difundir el uso responsable de antimicrobianos y el manejo de la resistencia en la industria salmonicultora, requieren del respaldo de las autoridades pertinentes, de forma de lograr su validación y aplicación sectorial.

ÍNDICE GENERAL

Página

RESUMEN EJECUTIVO ..... **i**

INDICE GENERAL ..... **vii**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **viii**

ÍNDICE DE TABLAS ..... **xvii**

ÍNDICE DE ANEXOS ..... **xxii**

1. INTRODUCCIÓN **1**

2. OBJETIVO GENERAL **4**

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS **4**

4. ANTECEDENTES **5**

5. METODOLOGÍA DE TRABAJO **14**

6. RESULTADOS **43**

7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS **116**

8. CONCLUSIONES **134**

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **143**

FIGURAS

TABLAS

ANEXOS:

Anexo 1. Detalle personal participante por actividad. Proyecto FIP N° 2008-65

Anexo 2. Presentación inicial del proyecto efectuada al Fondo de Investigación Pesquera.

Anexo 3. Registro gráfico de algunos de los antibiogramas efectuados para determinar perfiles de resistencia.

Anexo 4. Guía Buenas Prácticas uso Antimicrobianos.

Anexo 5. Propuesta monitoreo oficial de la resistencia bacteriana.

Anexo 6. Memoria de cálculo costeo de propuesta de programa de monitoreo oficial.

Anexo 7. Programa y presentaciones del taller final.

Anexo 8. Manuscrito en inglés.

Anexo 9. Base Datos FIP N° 2008-65.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 (a, b). Número y áreas de Agrupación de Concesiones Salmoneras en las regiones de Los Lagos y Aysén.

Figura 2. Distribución porcentual del total de cepas evaluadas para obtención de los perfiles de resistencia según patógeno de interés, obtenidas desde centros de cultivo de agua dulce y agua de mar en la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 3. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 4. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 5. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 6. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 7. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 8. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 9. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 10. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 11. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 12. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 13. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos y de Aysén.

Figura 14. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos y de Aysén.

Figura 15. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos y de Aysén.

Figura 16. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos y de Aysén.

Figura 17. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos y de Aysén.

Figura 18. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos.

Figura 19. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Eritromicina en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos.

Figura 20. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos.

Figura 21. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos.

Figura 22. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos.

Figura 23. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de los Lagos.

Figura 24. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Aeromonas salmonicida* en los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 25. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Aeromonas salmonicida* en los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 26. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Aeromonas salmonicida* en los años y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 27. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Aeromonas salmonicida* en los años y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 28. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Aeromonas salmonicida* en los años y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Aysén.

Figura 29. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de los Lagos.

Figura 30. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de los Lagos.

Figura 31. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de los Lagos.

Figura 32. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de los Lagos.

Figura 33. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de los Lagos.

Figura 34. Número de cepas de *Flavobacterium psychrophilum* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico florfenicol.

Figura 35. Número de cepas de *Flavobacterium psychrophilum* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Oxitetraciclina.

Figura 36. Número de cepas de *Flavobacterium psychrophilum* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el para el antibiótico Acido Oxolínico.

Figura 37. Número de cepas de Flavobacterium psychrophilum con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Flumequina**.**

Figura 38. Número de cepas de *Piscirickettsia salmonis* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Florfenicol.

Figura 39. Número de cepas de *Piscirickettsia salmonis* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Oxitetraciclina.

Figura 40. Número de cepas de *Piscirickettsia salmonis* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Acido Oxolínico.

Figura 41. Número de cepas de *Piscirickettsia salmonis* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Flumequina.

Figura 42. Número de cepas de *Vibrio ordalii* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2006 y 2009 para el antibiótico Florfenicol.

Figura 43. Número de cepas de *Vibrio ordalii* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2006 y 2009 para el antibiótico Oxitetraciclina.

Figura 44. Número de cepas de *Vibrio ordalii* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2006 y 2009 para el antibiótico Acido Oxolínico.

Figura 45. Número de cepas de *Vibrio ordalii* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2006 y 2009 para el antibiótico Flumequina.

Figura 46. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* con su respectivo resultado de CMI el año 2008 para el antibiótico Florfenicol.

Figura 47. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* con su respectivo resultado de CMI el año 2008 para el antibiótico Oxitetraciclina.

Figura 48. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* con su respectivo resultado de CMI el año 2008 para el antibiótico Acido Oxolínico.

Figura 49. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* con su respectivo resultado de CMI el año 2008 para el antibiótico Flumequina.

Figura 50. Distribución de la cantidad de muestras con presencia de residuos para cada Agrupación de Concesión Salmonera (ACS), según el antimicrobiano de interés. ACS: Agrupación de Concesiones Salmoneras; OTC: Oxitetraciclina; FF; Florfenicol; FLU; Flumequina; AML: Amoxicilina; ER: Eritromicina

Figura 51. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 1.

Figura 52. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 2.

Figura 53. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 9a.

Figura 54. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 9b.

Figura 55. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 10a.

Figura 56. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina y Florfenicol en la Agrupación de Concesión Salmonera 12a.

Figura 57. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 17a.

Figura 58. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina y Flumequina en la Agrupación de Concesión Salmonera 17b.

Figura 59. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 19a.

Figura 60. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 19b.

Figura 61. Distribución de los resultados de cuantificación de Florfenicol en la Agrupación de Concesión Salmonera 23a.

Figura 62. Distribución de los resultados de cuantificación de Florfenicol en centros de cultivo de agua dulce.

Figura 63. Recuento cultivable de bacterias heterótrofas totales (RTBC) y resistentes a Florfenicol (FFCr), Oxitetraciclina (OTr) y Flumequina (UBr) presente en sedimentos de centros de cultivo de salmones en Chile.

Figura 64. Diagrama de flujo de la conceptualización del análisis de riesgo de la resistencia bacteriana

Figura 65. Gráfico de tornado (correlación de Spearman) para el N° de brotes de Piscirickettsiosis (SRS) causado por cepas resistentes a OA en la ACS 2

Figura 66. Gráfico de tornado (correlación de Spearman) para la probabilidad de fracaso terapéutico frente a un brote de Piscirickettsiosis tratado con OA en la ACS 2

Figura 67. Gráfico de tornado (correlación de Spearman) para las pérdidas (Ton de producto) debido al fracaso terapéutico frente a P. salmonis con OA en la ACS 2

Figura 68. Vista general de la cartografía base contenida en el Sistema de Información Geográfica (S.I.G).

Figura 69. Ejemplo de información de los perfiles de resistencia bacteriana desplegada en el S.I.G. implementado.

Figura 70. Ejemplo de visualización espacio-temporal de perfiles de resistencia bacteriana.

Figura 71. Imagen de radar e imagen geoprocesada en DEM.

Figura 72. Simbología de la cartografía vectorial base.

Figura 73. Simbología asociada a la información cartográfica de carácter acuícola.

Figura 74. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2006.

Figura 75. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2007.

Figura 76. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2008.

Figura 77. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2009.

Figura 78. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2010.

Figura 79. Diagrama de Flujo del Programa Oficial de Vigilancia de Resistencia Bacteriana.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Centros de cultivo muestreados por región y por Agrupación de Concesiones Salmoneras (ACS), durante las campañas de muestreo, a Noviembre de 2010.

Tabla 2. Cantidad total de muestras ingresadas por Agrupación de Concesiones Salmoneras (ACS), durante las campañas de muestreo, a Noviembre de 2010.

Tabla 3. Resultados de susceptibilidad a los antimicrobianos a partir anti-biogramas de muestras obtenidas desde centros de cultivo de agua de mar y centros estuarinos en ACS en la Región de Los lagos y Aysén y desde centros de agua dulce de la Región de Los Lagos.

Tabla 4. Resultados de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos florfenicol, oxitetraciclina, acido oxolínico y flumequina a partir de los análisis realizados a la totalidad de las cepas evaluadas.

Tabla 5. Distribución de CMI de 89 cepas de *Flavobacterium psychrophilum.*

Tabla 6. Distribución de CMI de 78 cepas de *Piscirickettsia salmonis.*

Tabla 7. Distribución de CMI de 12 cepas de *Vibrio ordalii.*

Tabla 8. Distribución de CMI de 7 cepas de *Yersinia ruckeri.*

Tabla 9. Metodología analítica utilizada según el compuesto problema, y su respectiva referencia técnica.

Tabla 10. Cantidad total de muestras ingresadas por Agrupación de Concesión Salmonera y centros de agua dulce.

Tabla 11. Clasificación cualitativa de los resultados de residuos en muestras de músculo y piel, por antimicrobiano analizado, según la Agrupación de Concesión Salmonera y centros de agua dulce.

Tabla 12. Cantidad y porcentaje de muestras con presencia de residuos para cada una de las 11 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras y centros de agua dulce, por antimicrobiano de interés.

Tabla 13. Cantidad de residuos de antimicrobianos detectados en muestras de músculo y piel en la totalidad de muestras analizadas para cada Agrupación de Concesiones Salmoneras.

Tabla 14. Resultados de residuos de cuatro fármacos bajo estudio en muestras de sedimento marino, provenientes de dos sectores de la Región de Aysén.

Tabla 15. Porcentaje (%) de materia inorgánica y materia orgánica en muestras de sedimento, para 2 centros de cultivo en sectores Seno Magdalena (A) y Puerto Cisnes (B), Región de Aysén.

Tabla 16. Gramos (g) de materia inorgánica y materia orgánica en muestras de sedimento, para 2 centros de cultivo en sectores Seno Magdalena (A) y Puerto Cisnes (B), Región de Aysén.

Tabla 17. Descripción de los expertos participantes en el estudio

Tabla 18. Valores esperados del número de estanques/jaulas en una piscicultura, centro de lago y centro de engorda, aportados por los expertos participantes del estudio

Tabla 19. Valores esperados del número de peces por estanque en una piscicultura, aportados por los expertos participantes del estudio

Tabla 20. Valores esperados del número de peces por jaula en un centro de lago, aportados por los expertos participantes del estudio

Tabla 21. Valores esperados del número de peces por jaula en un centro de engorda, aportados por los expertos participantes del estudio

Tabla 22. Valores esperados de los parámetros relativos a un brote de piscirickettsiosis (SRS)

Tabla 23. Valores esperados del peso promedio de los peces al presentar un brote de piscirickettsiosis (SRS)

Tabla 24. Valores esperados de los parámetros relativos a un brote de flavobacteriosis

Tabla 25. Distribución estimada del número anual de brotes de Piscirickettsiosis, para las ACS estudiadas

Tabla 26. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *P. salmonis* resistentes a flumequina para las ACS estudiadas

Tabla 27. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *P. salmonis* resistentes a ácido oxolínico para las ACS estudiadas

Tabla 28. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *P. salmonis* resistentes a amoxicilina para las ACS estudiadas

Tabla 29. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *P. salmonis* con flumequina para las ACS estudiadas

Tabla 30. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *P. salmonis* con ácido oxolínico para las ACS estudiadas

Tabla 31. Distribución estimada de la cantidad (Ton) de producto perdido debido a la resistencia a flumequina en las ACS estudiadas durante un año

Tabla 32. Distribución estimada de la cantidad (Ton) de producto perdido debido a la resistencia a ácido oxolínico en las ACS estudiadas durante un año

Tabla 33. Distribución estimada del número anual de brotes de Flavobacteriosis, para los distintos sectores estudiados

Tabla 34. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a flumequina, para los distintos sectores estudiados

Tabla 35. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a oxitetraciclina, para los distintos sectores estudiados

Tabla 36. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a ácido oxolínico, para los distintos sectores estudiados

Tabla 37. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a florfenicol, para los distintos sectores estudiados

Tabla 38. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a amoxicilina, para los distintos sectores estudiados

Tabla 39. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con flumequina para las ACS estudiadas.

Tabla 40. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con oxitetraciclina para las ACS estudiadas.

Tabla 41. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con ácido oxolínico para las ACS estudiadas.

Tabla 42. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con florfenicol para las ACS estudiadas.

Tabla 43. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con amoxicilina para las ACS estudiadas.

Tabla 44. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a flumequina, para los distintos sectores estudiados.

Tabla 45. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a oxitetraciclina, para los distintos sectores estudiados.

Tabla 46. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a ácido oxolínico, para los distintos sectores estudiados.

Tabla 47. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a florfenicol, para los distintos sectores estudiados.

Tabla 48. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a amoxicilina, para los distintos sectores estudiados.

Tabla 49. Resultados de susceptibilidad a los antimicrobianos a partir antibiogramas de muestras obtenidas desde centros de cultivo de agua de mar en ACS localizadas en la Región de Los Lagos y desde centros de agua dulce de la Región de Los Lagos, durante la puesta en marcha del plan piloto.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Detalle personal participante por actividad. Proyecto FIP N° 2008-65

Anexo 2. Presentación inicial del proyecto efectuada al Fondo de Investigación Pesquera.

Anexo 3. Registro gráfico de algunos de los antibiogramas efectuados para determinar perfiles de resistencia.

Anexo 4. Guía Buenas Prácticas uso Antimicrobianos.

Anexo 5. Propuesta monitoreo oficial de la resistencia bacteriana.

Anexo 6. Memoria de cálculo costeo de propuesta de programa de monitoreo oficial.

Anexo 7. Programa y presentaciones del taller final.

Anexo 8. Manuscrito en inglés.

Anexo 9: Base Datos FIP N° 2008-65.

1. INTRODUCCIÓN

La salmonicultura en Chile es una actividad de nivel industrial, que no posee más de 30 años de historia, y que tuvo hasta el año 2007, una significativa expansión, generando importantes ingresos para las regiones donde se desarrolló, y posicionándose como uno de los sectores productivos más importantes del país. Esta expansión intensiva trajo como consecuencia colateral, un aumento de enfermedades de etiología bacteriana en las especies cultivadas, por lo que se intensificó el uso de agentes antimicrobianos como medida de tratamiento primaria y de fácil acceso. Sin embargo, su uso intensivo, implicó algunas consecuencias, entre los que se encuentran la persistencia de residuos en el producto final (filetes), y la aparición del fenómeno de resistencia bacteriana de los agentes patógenos de peces a los antimicrobianos.

En Chile, la importación de antibióticos usados en acuicultura como oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina y β-lactámicos aumentó entre 1990 y 1997 desde aproximadamente 150 ton a 550 ton anuales. Se estima que la industria salmonera chilena utiliza aproximadamente 75 veces más antibióticos que la industria noruega para producir una tonelada de salmón (Grave *et al*., 1999), generando así un alto costo operacional y ambiental por uso de alimento medicado que altera la flora bacteriana en los sedimentos marinos y columna de agua, y el efecto de presión de selección en la resistencia bacteriana de patógenos de salmones y humanos (Alderman & Hastings, 1998; Angulo, 2000; Furushita *et al*., 2003).

Está demostrado que el uso de antimicrobianos en acuicultura selecciona bacterias resistentes en el ambiente, y existen evidencias epidemiológicas y moleculares que señalan que los genes que median esta resistencia pueden ser

transmitidos de bacterias acuáticas a bacterias capaces de producir infecciones en humanos y animales (Capone *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2002; Furushita *et al.*, 2003).

En la actualidad, y frente a la necesidad de buscar herramientas que permitan evaluar y controlar la realidad sanitaria de la industria, para establecer las condiciones del entorno que permitan una actividad salmonicultora sustentable, se financió la ejecución del presente proyecto denominado "Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura", a través del Fondo de Investigación Pesquera, que incluyó la presente iniciativa, en su programa de investigación del año 2008.

En el presente proyecto, se ha trabajado sobre la base de la lógica de las Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS) definidas por la Autoridad, lo cual permitió por un lado, una mejor articulación logística de la toma de muestra desde los centros de cultivo, como por otro lado, realizar análisis agrupados por sectores geográficos, situación que permitió establecer la categorización de riesgo, y sentar las bases de un eficiente futuro Programa de Monitoreo del fenómeno de la resistencia bacteriana en el sector salmonicultor.

Dicho programa de monitoreo, junto con el desarrollo de un sistema de alertas tempranas que permite evaluar con criterio científico los cambios en los niveles de resistencia por sector, sustenta además, una oportuna toma de decisiones de parte de la autoridad.

El desarrollar esta iniciativa con el apoyo de la industria, significó un efecto sinérgico con los esfuerzos que se efectúan actualmente en por el Estado, tendiente a controlar las enfermedades de salmónidos, y la consecuente disminución paulatina en el tiempo, del uso de quimioterapéuticos en la industria

del salmón, lográndose de esta forma, el objetivo final de crear una actividad ambientalmente sustentable.

El presente informe pre-final contiene las metodologías de ejecución y los resultados comprometidos, según lo propuesto en los términos técnicos de referencia. En este sentido, se desarrollaron la totalidad de las actividades incluidas dentro de los objetivos específicos, cuyos resultados se presentan a continuación.

2. OBJETIVO GENERAL

Optimizar la utilización de los antimicrobianos en la salmonicultura, mediante la evaluación de resultados del monitoreo de la resistencia en bacterias patógenas para el salmón.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Determinar la distribución y cuantificación de residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina, así como la distribución y cuantificación de bacterias patógenas de salmones resistente a estas sustancias en zonas de cultivo.

3.2 Confeccionar un manual para médicos veterinarios (y administradores de centros de cultivo) de procedimientos estandarizados que tienda a reducir (o de las pautas para) el uso de antibióticos en la producción de salmones.

3.3 Establecer las bases para instaurar en forma permanente un programa de monitoreo sistemático y oficial de la resistencia bacteriana patógena de salmones que propenda a la disminución del uso de antibióticos.

3.4 Validar el sistema de monitoreo propuesto.

4. ANTECEDENTES

La industria salmonicultora nacional, tuvo un vertiginoso crecimiento hasta el año 2007, en cuanto a los niveles productivos y al desarrollo tecnológico asociado, lo que transformó a nuestro país en uno de los principales países exportadores a nivel mundial.

Esta expansión tuvo como consecuencias, un aumento de los niveles productivos por área, intensificándose los cultivos en términos de densidades, y generando las condiciones para un aumento de las enfermedades infecto-contagiosas en los peces, con el consecuente aumento del uso de sustancias antimicrobianas.

En este sentido, cabe mencionar el reporte entregado por el Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, con fecha 14 de julio 2009, en el marco de la Ley 20.285 sobre el Acceso a la Información Publica, donde se indica que, de acuerdo a datos estimados, en el año 2007 el uso de antimicrobianos en la industria del salmón alcanzó los 358.635 kg., cifra que registró un descenso en el año 2008 con un total reportado de 325.616 kg.

En Chile y en especial en la Región de Los Lagos, se encuentra la mayoría de los centros de cultivos de salmón, y por su condición hidrográfica, se crea el entorno ideal para la selección de resistencia bacteriana, debido al uso de agentes antimicrobianos como las fluoroquinolonas (flumequina) y oxitetraciclina, que permanecen por tiempos prolongados en el ambiente.

Aunque la administración de agentes antibacterianos es un medio efectivo para el control de las infecciones bacterianas en peces en cultivo (Gratzek, 1983), existe una creciente preocupación acerca de sus consecuencias sobre la salud pública (Bernoth, 1991), sobre el medio ambiente (Hansen *et al*., 1992; Kupka-Hansen *et al*., 1992) y

sobre los animales tratados (Van der Heijden *et al*., 1992). Diversos autores han enfatizado la necesidad de analizar los efectos negativos del uso de antimicrobianos en los cultivos de peces (Austin, 1985b; Lunestad, 1992; Midtvedt & Lingaas, 1992; Smith *et al*., 1994a), ya que es sabido que el uso de agentes antibacterianos se relaciona directamente con la emergencia de cepas bacterianas resistentes a estos compuestos, generándose un riesgo para la salud pública (Midtvedt & Lingaas, 1992; Monnet, 1999). Es así que problemas de infecciones recurrentes (Alvarado *et al*., 1990) y de resistencia a los antibacterianos serían consecuencias del uso intensivo de antibacterianos en los centros de cultivos de salmones en Chile.

Los problemas de salud pública que ocasiona el desarrollo de resistencia no están restringidos a los microorganismos patógenos de cultivos *per se*, sino a toda la *taxa* microbiana expuesta a los compuestos utilizados, incluyendo especies productoras de infecciones en humanos y otras asociadas con actividades marinas (Saito *et al*., 1977; Chang & Pien, 1986), así como a parte importante de la fauna autóctona presente en las vecindades del sistema de cultivo (Samuelsen *et al*., 1992a; Capone *et al*., 1996; Coyne *et al*., 1997).

En varios países la legislación sobre la disponibilidad y uso de drogas en acuicultura es inadecuada, debido a que ha sido originalmente formulada con una orientación hacia los problemas de medicina veterinaria convencional (Alderman & Michel, 1992; Schlotfeldt, 1992). Además, se debe considerar que diversos factores ambientales, como temperatura, pH, concentración de iones y salinidad, tienen influencia sobre la farmacocinética de la mayoría de las drogas utilizadas en peces (Rasmussen, 1988; Lunestad & Goksøyr, 1990; Martinsen *et al*., 1991; Björklund *et al*., 1992; Ishida, 1992; Van der Heijden *et al*., 1994; Barnes *et al*., 1995; Martinsen & Horsberg, 1995; Pursell *et al*., 1995; Vaughan & Smith, 1996; Haug & Hals, 2000).

La exposición repetida de poblaciones bacterianas a los antimicrobianos favorece la selección de las cepas con mayor resistencia (Lewin, 1992). De esta manera, continuas exposiciones van eliminando la mayoría de las bacterias susceptibles, sobreviviendo una población reducida de bacterias resistentes, que incrementan rápidamente, en ausencia de competencia con los microorganismos susceptibles (Midtvedt & Lingaas, 1992; Young, 1993). Por lo tanto, el uso masivo de agentes antimicrobianos en sistemas de cultivos acuícolas puede ser un factor determinante en el reemplazo de microorganismos susceptibles por otros resistentes (Aoki, 1992; Lewin, 1992).

Por otra parte, el uso profiláctico de antibióticos es una práctica habitual en algunos de estos centros de cultivos, sin que se considere habitualmente el alto riesgo que implica esta actividad (Brown, 1989). Los antibióticos usados en salmones sanos es un factor que favorece a las bacterias, ya que, al aumentar su exposición a la droga, permiten una mayor posibilidad de selección de mutantes resistentes espontáneas (Midtvedt & Lingaas, 1992), favoreciéndose su supervivencia frente a la presión selectiva de los antimicrobianos (Midtvedt & Lingaas, 1992).

La forma más habitual de administración de antibióticos en peces corresponde a su incorporación en el alimento. Debido a la disminución del apetito que experimentan los peces con enfermedades bacterianas y a la baja palatabilidad del alimento suplementado con drogas (Hustvedt *et al*., 1991), aproximadamente el 20-30% del antibacteriano administrado es ingerido por los peces, mientras que el 70-80% restante se distribuye en el medio ambiente (Lunestad, 1992; Samuelsen, 1992). Además, algunos agentes antibacterianos, entre ellos oxitetraciclina, presentan una absorción baja a nivel del tracto gastrointestinal de los peces, con lo cual una alta proporción no metabolizada del antibiótico es liberada al ambiente por medio de la orina y las fecas de los peces (Björklund &

Bylund, 1990; Cravedi *et al*., 1987; Jacobsen, 1989; Rogstad *et al*., 1991), con el consecuente impacto ambiental sobre la microflora del medio ambiente, ya sea en el agua o en el sedimento (Hansen *et al*., 1992).

Estudios recientes han demostrado que antibacterianos como oxitetraciclina, flumequina y ácido oxolínico (y que han sido ampliamente utilizados en la industria nacional) persisten por meses en el sedimento de los sistemas de cultivo después de su administración (Jacobsen & Berglind, 1988; Björklund *et al*., 1990; Hansen *et al*., 1992; Nygaard *et al*., 1992; Samuelsen, 1992; Samuelsen *et al*., 1994; Hektoen *et al*., 1995; Smith, 1996). De igual modo, algunos investigadores (Jacobsen & Berglind, 1988; Samuelsen, 1989), han informado una vida media de 10 semanas y 32-64 días, respectivamente, para la oxitetraciclina en sedimentos de centros de cultivo. Algunas bacterias ictiopatógenas sobreviven en el sedimento por un tiempo prolongado (Enger *et al*., 1989; Hoff., 1989) y la persistencia de agentes antibacterianos en el sedimento aumenta la posibilidad de que estas bacterias desarrollen resistencia a ellos (Schlotfeldt *et al*., 1985; Björklund *et al*., 1991, Miranda *et al.*, 2005).

Por lo general, la mayoría de los estudios tendientes a dilucidar la problemática del uso de antibióticos en cultivos de salmones, se restringe a la determinación de la frecuencia de microorganismos resistentes al antibacteriano utilizado en el sistema, y de la concentración residual del antibacteriano en los peces y el sedimento ubicado bajo el cultivo (Björklund *et al*., 1991; Coyne *et al*., 1994; Hektoen *et al*., 1995). Existen muy pocos estudios acerca de los elementos genéticos involucrados en la resistencia que presentan las bacterias de estos cultivos y ellos son, en su mayoría, referidos a bacterias ictiopatógenas aisladas de patologías en cultivos (Toranzo *et al*., 1984; DeGrandis & Stevenson, 1985; DePaola *et al*., 1988; Sϕrum *et al*., 1990; Starliper *et al*., 1993; Saitanu *et al*., 1994). En Chile, existen sólo dos estudios que describen los elementos genéticos

presentes en bacterias provenientes de cultivos de salmones, y que evidencian una gran heterogenicidad de genes *tet*, que codifican para resistencia a tetraciclinas (Miranda *et al*., 2003), y genes *floR*, que codifican para resistencia a florfenicol (Miranda y Rojas, 2007a). Por lo anterior, es evidente la necesidad de estudiar la resistencia de bacterias patógenas de peces para evaluar su rol en la eficiencia de las terapias antimicrobianas implementadas en los centros de cultivo de salmones en Chile. Adicionalmente cabe mencionar que el traslado de peces desde ambientes de agua dulce (ríos y lagos) hacia ambientes marinos, facilitándose la migración de bacterias resistentes a los antibióticos y diseminación de patógenos a nichos ecológicos geográficamente lejanos (Goldberg *et al*., 2001), siendo esta una actividad rutinaria en la industria nacional.

En los cultivos de salmones se ha demostrado que el uso de oxitetraciclina conduce a un aumento en la frecuencia de la microflora resistente de los sedimentos ubicados bajo las jaulas de peces (Torsvik *et al*., 1988; Hansen *et al*., 1993a; Kerry *et al*., 1994), así como al aumento de cepas ictiopatógenas resistentes a oxitetraciclina y otros antibióticos (Nygaard *et al*., 1992; Toranzo *et al*., 1992, Bruun *et al*., 2000). Puede sugerirse, entonces, que el incremento de resistencia a oxitetraciclina durante el período de medicación puede limitar la efectividad del tratamiento, por conducir a la aparición de bacterias patógenas de peces resistentes a este antibiótico (DePaola, 1995). Así por ejemplo, se ha demostrado la transferencia de resistencia mediada por plasmidios a cepas de *Y. ruckeri* (DeGrandis & Stevenson, 1985; Klein & Boehm, 1994).

Por lo general, la resistencia a oxitetraciclina, florfenicol y amoxicilina es codificada extracromosomalmente en plasmidios, los que pueden ser transferidos horizontalmente a otras bacterias de la misma o diferente especie (Lewin, 1992). La mayoría de los determinantes de resistencia a estos antibióticos se localizan en plasmidios y transposones (Chopra & Roberts, 2001; Miranda *et al.,* 2003), lo que

evidencia la alta posibilidad de su diseminación en el sistema de cultivo en particular y el medio natural en general (Roberts, 1994). Además, algunos estudios han demostrado la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina en bacterias ictiopatógenas (Sϕrum *et al*., 1992; Zhao & Aoki, 1992; Andersen & Sandaa, 1994).

Es necesario considerar que el reservorio de la mayoría de las bacterias patógenas para salmones aún no ha sido definido claramente, aunque existen estudios que describen una elevada prevalencia de bacterias pigmentadas en agua dulce (Allen *et al*., 1983) y marina (Austin, 1982), sugiriendo la presencia de *Flavobacterium* en estos sistemas (Austin & Austin, 1987). Se han identificado plasmidios en bacterias ictiopatógenas como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwarsiella tarda* y *Yersinia ruckeri,* que codifican resistencia hasta a 5 agentes antibacterianos (Aoki *et al*., 1983; Toranzo *et al*., 1983; DeGrandis & Stevenson, 1985; Hedges *et al*., 1985; Bast *et al*., 1988; Sϕrum *et al*., 1988; Griffiths & Lynch, 1989; Sϕrum *et al*., 1990; Inglis *et al*., 1993; Sandaa & Enger, 1994; Giles *et al*., 1995).

Diversos países y organizaciones relacionadas con la salud animal y humana, han estado trabajando en los mecanismos de prevención y control de la resistencia bacteriana. Así, la FAO, en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE), han formado desde 2003 un grupo de trabajo relacionado con el manejo, riesgo e implementación de programas de monitoreo de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria. Este grupo ha hecho énfasis especial en la evaluación del riesgo, buenas prácticas veterinarias y planes de monitoreo (FAO/WHO/OIE, 2003; FAO/WHO/OIE, 2004). Además, el Comité Internacional Veterinario para la Armonización (VICH), entidad que reúne a expertos de la Unión Europea, Estados

Unidos y Japón con el fin de uniformar criterios científicos en relación a la resistencia bacteriana, ha estado trabajando en los parámetros que se deben medir para autorizar la medicación con antibióticos y sus consecuencias en la generación de resistencia bacteriana (VICH, 2003).

En países como Noruega, Reino Unido y Estados Unidos de Norteamérica, el uso de antibacterianos en acuicultura esta fuertemente restringido, regulado y controlado. Los reglamentos no sólo aprueban los tipos de antibióticos que pueden emplearse, sino también suelen especificar las especies a las que se destinan, el diagnóstico, la dosis, la duración y el período de carencia que debe observarse antes del sacrificio cuando se utiliza un antibiótico como agente terapéutico. El cumplimiento de estas condiciones y reglamentos asegura que los residuos en los productos se mantengan por debajo de los Límites Máximos Residuales (LMR) y el riesgo de que las bacterias patógenas desarrollen resistencia sea insignificante o, al menos, aceptable.

La Unión Europea a través del Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) dependiente de la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products desarrolló en el año 2000 un Plan Estratégico relacionado con la resistencia bacteriana en medicina veterinaria. Dentro de este plan, se incluye la entrega de información de países miembros sobre el estado de resistencia, planes de monitoreo, uso prudente de antimicrobianos, entre otros (EMEA, 2003). A su vez, Estados Unidos creó en 1999 un Grupo de Acción para combatir la Resistencia Antimicrobiana integrado por agencias federales como la Food and Drug Administration, Center for Diseases Control, National Health Institute, Agency for Health Care Research and Quality, Health Care Financing Administration, Health Resources and Services Administration, Department of Agriculture, Department of Defense, Department of Veterinarian Affairs y la Environmental Protection Agency. Este grupo ha creado un Plan de Acción incremental para

combatir la amenaza creciente de resistencia bacteriana y contempla un programa de vigilancia nacional, entrega de datos confiables sobre la susceptibilidad de microorganismos a diferentes drogas, plan de monitoreo del uso de drogas, adopción de políticas para el uso apropiado de drogas, mejoramiento del diagnóstico de enfermedades, plan de disminución de transmisión de infecciones, investigación y desarrollo (personal e infraestructura), entre otros (CDC, 2001).

Sin embargo, en Chile la situación es algo diferente, no existiendo una entidad preocupada y focalizada en la problemática de la resistencia bacteriana, aun cuando existen estudios científicos que señalan que esta problemática existe en la acuicultura de la Región de Los Lagos (Miranda y Zemelman, 2002a; Miranda y Zemelman, 2002b; Miranda *et al.*, 2003; Miranda y Rojas, 2007a).

Para determinar el estado y progreso de la resistencia bacteriana es necesario utilizar tecnologías modernas, rápidas y confiables. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se utilizan para definir el agente antimicrobiano debería seleccionarse para el tratamiento de una enfermedad bacteriana patógena especifica, como también para conocer el estado de resistencia de dicha bacteria (Alderman y Smith, 2001; Miller *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005). Tradicionalmente se han utilizado metodologías como las pruebas de difusión en placa, que si bien entregan datos relativamente rápidos (24-48 h) no cuantifican la magnitud de la resistencia y se realizan a temperaturas apropiadas para organismos terrestres y no acuáticos. Por esta razón es que instituciones internacionales, específicamente el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI/NCCLS), institución encargada de recomendar internacionalmente las metodologías de laboratorio, en el año 2005 puso a disposición documentos estándares para la determinación de resistencia bacteriana especificas en peces, como por ejemplo temperaturas, medios de cultivo semisólidos, medios de cultivos suplementados, entre otros (NCCLS, 2005; CLSI, 2005). Estas metodologías aún no se implementan en

muchos países, entre ellos Chile. Además, existen otras alternativas para cuantificar la resistencia bacteriana, como por ejemplo la identificación de genes de resistencia a través de PCR/RT-PCR, pruebas inmunológicas, entre otros (Schmidt *et al*., 2001; Furushita *et al*., 2003). Estas técnicas son de especial utilidad en presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos, o bien a bacterias que no pueden ser aisladas y cultivadas por métodos tradicionales.

En virtud de los antecedentes entregados y en consideración de contar con información objetiva sobre los aspectos sanitarios y ambientales relacionados con la acuicultura, el Instituto de Fomento Pesquero ejecutó el presente proyecto, que permitió generar las bases científicas y técnicas necesarias para desarrollar las disposiciones aplicables a la acuicultura para prevenir y/o controlar el fenómeno de la resistencia bacteriana en cepas ictiopatógenas presentes en los centros de cultivo, información requerida para normar y regular el uso adecuado de sustancias antimicrobianas en la actividad salmonicultora.

5. METODOLOGÍA DE TRABAJO

5.1 Objetivo específico 3.1. *Determinar la distribución y cuantificación de los residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina, así como la distribución y cuantificación de bacterias patógenas de salmones resistentes a estas sustancias en zonas de cultivo.*

5.1.1 Contacto y reunión con expertos

Como parte de las actividades del proyecto, se ha mantenido un estrecho contacto, tanto a nivel nacional como internacional, con expertos en materia de aislamiento y diagnóstico de los agentes bacterianos de interés, como a nivel de técnicas de evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos, de forma de intentar alcanzar los estándares internacionales, para ambos procesos.

A nivel nacional, la participación directa del Dr. Claudio Miranda, de la Universidad Católica del Norte, reconocido experto en materia de evaluación de resistencia bacteriana asociada a organismos acuáticos, ha permitido efectuar una serie de perfeccionamientos a los procedimientos de aislamiento y evaluación de resistencia, los que han sido incorporados, tanto por parte de los laboratorios subcontratados, como por el propio equipo de trabajo del proyecto.

A su vez, se ha recibido apoyo científico y actualizaciones constantes por parte de expertos internacionalmente reconocidos como lideres en materia de evaluación de resistencia bacteriana, destacando el grupo del Dr. Peter Smith, de la Universidad Nacional de Irlanda, Galway; y los Dres. Brunn y Dalsgaard de la Universidad de Copenhague en Dinamarca.

Se efectuaron a lo largo del proyecto, reuniones periódicas con INTESAL de SalmonChile, con la Universidad Católica del Norte y los Laboratorios ADL Diagnostic Chile Ltda. y Biovac S.A. para la coordinación técnica y logística de muestreos, aislamientos y evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos.

Adicionalmente, de forma de mantener informadas del progreso de los estudios a las empresas salmonicultoras participantes, se efectuaron reuniones con cada una de las mismas, durante todo el año 2010, además de los talleres ampliados efectuados.

5.1.2 Campañas y sitios de muestreos

El proyecto contempló finalmente el desarrollo de siete campañas de muestreo georreferenciado, con una duración de tres meses cada una, y cuya finalización se produjo en noviembre de 2010.
Este aumento de las campañas inicialmente establecidas, permitió fortalecer los resultados de muestreos e interpretación de resultados, verificándose de mejor forma, la evolución del fenómeno de resistencia en las áreas estudiadas.

Dentro de los sitios de muestreo, se abordaron en total 24 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras (ACS), más lo correspondiente a agua dulce, incluyendo tanto pisciculturas como centros de cultivo de lagos.

En términos generales, inicialmente se definieron dos tipos de muestreo que incluyeron muestreos dirigidos o en brote y muestreos pasivos. De esta manera, los muestreos dirigidos, se realizaron cuando la empresa salmonicultora informaba de la presencia de un brote confirmado, es decir, considerándose aquellos centros de cultivo que presentaban porcentajes de mortalidad más altos que lo considerado

como normal en la época, asociados a factores de tipo sanitario o a signologías y análisis previos efectuados por los propios equipos de salud de las empresas. Para estos casos de brote, se contemplaba realizar dos muestreos, el primero debía hacerse antes del tratamiento y el segundo, posterior al término del tratamiento. En la mayoría de los casos, el muestreo post tratamiento se efectuó sin mayores problemas, siendo el muestreo previo inicio de tratamiento, el que fue muy complejo de abordar, por efecto de las urgencias propias de las empresas productoras.

No obstante lo anterior, en estos casos, los centros fueron muestreados dos veces durante el transcurso del cuadro infeccioso, es decir, al inicio y después de haber iniciado una terapia con antibióticos.

En cuanto a los tipos de muestreos, finalmente se privilegiaron los denominados, muestreos dirigidos, con el fin de asegurar la pesquisa de patógenos de los centros muestreados mediante los análisis del laboratorio. El momento de realización de estos muestreos obedeció al seguimiento de un programa preestablecido organizado por Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS), y previa coordinación con las empresas participantes.

Estos muestreos fueron realizados en centros de cultivos de salmones en agua dulce (lagos y pisciculturas), estuario y de mar, en las regiones de Los Lagos y Aysén, tomando en consideración las áreas de ACS establecidas por la Autoridad Sanitaria (SERNAPESCA). La elección de ACS se efectuó, en principio, en base a la ubicación de los centros de las empresas salmoneras participantes del proyecto. Posteriormente y a mediados del año 2010, se dio prioridad a aquellas áreas en las cuales había un mejor historial de aislamientos de patógenos de interés, de forma de respaldar de mejor manera, los análisis y conclusiones posteriores que se efectuaran.

5.1.3 Recolección de muestras

a) Muestras de peces

La coordinación de los muestreos y la logística para llegar a los centros de destino se realizó en conjunto con el apoyo de personal de las empresas participantes del proyecto. Para la recolección de las muestras, el procedimiento a seguir consistió en tomar 15 ejemplares de peces, preferentemente desde la mortalidad fresca, o moribundos, sin embargo y sólo en casos puntuales, fue necesario recurrir a peces vivos. Las muestras fueron colectadas desde una o varias unidades de cultivo (jaula o estanque) dependiendo de la sospecha que se tuviese de ocurrencia de brotes de enfermedad, basándose en los niveles de mortalidad, comportamiento de los peces, lesiones, etc.

Las muestras tomadas de cada centro fueron debidamente rotuladas y transportadas en cajas termoaisladas con hielo en escamas entre 0 y 8º C o gelpack, hasta el laboratorio de diagnóstico ADL, donde se procedió a realizar el aislamiento de los patógenos bacterianos de interés: *Flavobacterium psychrophilum, Yersinia ruckeri, Vibrio ordalii, Aeromonas salmonicida, Streptococcus phocae* y *Piscirickettsia salmonis.*

De las muestras mencionadas anteriormente, por su parte, una sección de la musculatura de los mismos peces, se tomó para la determinación y cuantificación de residuos de antibióticos en músculo.

En cada muestreo se tomó una muestra representativa de 15 peces para el análisis bacteriológico y, 5 peces adicionales para la determinación de residuos de antibióticos en músculo.

Cabe mencionar que para aquellos casos en que la distancia entre los centros de cultivo y el laboratorio no permitía el envío de la muestra dentro de las 12 horas correspondientes para realizar los análisis, fue necesario realizar la toma de muestra y sembrar en placas de cultivo. En estos casos puntuales, la toma de muestra de los patógenos señalados, también siguió las directrices entregadas por la Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE) para esos efectos. El muestreo bacteriológico en peces se realizó de manera uniforme para todos los patógenos seleccionados y consistió en la búsqueda de lesiones a través de un examen visual externo del cuerpo, incluyendo branquias, cola y aletas, o bien, de órganos o tejidos blanco para cada patógeno en particular. La toma de muestra de las lesiones localizadas en estos sitios se realizó utilizando asas estériles, las que eran colocadas sobre medios de cultivo a través de la técnica de siembra en placa. Una vez realizado el examen y toma de muestra externos se procedió a realizar una necropsia donde se exponen los órganos internos del pez, especialmente el aparato gastrointestinal. Se observaron las lesiones y se tomaron muestras de los órganos con procesos patológicos visibles utilizando asas estériles y sembrando en medios de cultivos específicos preparados para cada patógeno. Adicionalmente, en el caso de no encontrar ninguna lesión visible, se tomó una muestra de riñón con un asa estéril, y se siembra en medios de cultivo adecuados para cada patógeno.

Todas las muestras recolectadas desde los centros de cultivo, fueron identificadas con un código asignado por IFOP, que corresponde al centro muestreado y la empresa a la cual pertenece dicho centro, incluyendo, además, la especie, el estadio de cultivo, el tipo de agua, tipo de muestreo y zona geográfica correspondiente.

b) Muestras de sedimento

Se tomaron muestras de tres sitios localizados en los extremos y centro de los módulos de cultivo (balsas jaula). También se recolectó 1 muestra de un sitio control ubicado al menos a 100 m de distancia de las balsas jaulas, ubicadas desde la corriente predominante. (4 muestras en total por centro). Las muestras de sedimento se recolectaron utilizando una draga Van Veen de 0.1 m^2, transfiriéndose a un frasco estéril Schott tapa rosca de 250 ml.

Para cada una de las muestras obtenidas, se tomaron desde la draga porciones del sedimento con una cuchara plástica previamente esterilizada con alcohol de 70°.

Luego, se transfirieron a cada frasco tapa rosca, 2 porciones desde los primeros 3 cm. de la capa superior del sedimento obtenido con la draga, hasta completar 3/4 de la capacidad del envase con sedimento.

Finalmente, se cerraron los frascos, se sellaron con parafilm, se identificaron y se dispusieron en refrigeración a 4ºC, hasta su envío a Puerto Montt.

5.1.4 Procesamiento y análisis de las muestras

Las muestras obtenidas desde peces, luego de colectadas desde los centros de cultivo de salmones, fueron enviadas al laboratorio de diagnostico ADL Diagnostic Chile Ltda., que realizó el aislamiento e identificación inicial de los patógenos bacterianos comprometidos, y adicionalmente, evaluó las características de susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos (perfiles y niveles de resistencia), para el caso específico del patógeno *Piscirickettsia salmonis*. Para el resto de los agentes patógenos bajo estudio, las muestras fueron enviadas al laboratorio de

Patobiología Acuática de la Universidad Católica del Norte, con sede en Coquimbo, donde se realizaban los antibiogramas y CMI respectivos.

a) Aislamiento de agentes bacterianos patógenos desde peces en centros de cultivo.

Para efectos de lograr el aislamiento de agentes bacterianos, el procedimiento se efectuó mediante metodologías bacteriológicas y de diagnostico estandarizadas y aprobadas por organismos chilenos e internacionales (OIE, INN, ISP, ICMSF, Sernapesca, entre otros). A partir de un tejido u órgano de peces con sospecha de la presencia de un agente bacteriano patógeno, de acuerdo con lo observado durante el análisis anatomopatológico, se extrajo una muestra usando una tórula o asa estéril, la que era inoculada mediante la técnica de *swabbing* en placas de agar específico para el crecimiento de la especie patógena a recuperar. Paralela y eventualmente, se recolectaron muestras para la realización de frotis Gram directo y frotis para técnica de IFAT, en conjunto con muestra de tejido para reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

Posteriormente, las placas de agar eran observadas para evidenciar desarrollo de colonias, número de UFC, morfología, tamaño, bordes, pigmento, hemólisis, acompañado de tinción Gram, reacción de oxidasa, catalasa, movilidad, y sensibilidad al agente vibrioestático O-129. Una vez establecido el diagnóstico de especie, las cepas eran criopreservadas de acuerdo a Gherna (1994).

Luego de la identificación y aislamiento inicial, las cepas patógenas fueron trasladadas al Laboratorio de Patobiología Acuática de la Universidad Católica del Norte, con el fin de determinar los perfiles y niveles de resistencia a los antibióticos para todos los agentes bacterianos comprometidos en la propuesta, con excepción de *P. salmonis*, que como ya se indicó, se efectuó en el Laboratorio ADL.

b) Determinación de niveles y perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas.

Para efectos de la determinación de la susceptibilidad de las cepas bacterianas patógenas aisladas, a los antibacterianos oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina, flumequina y, de manera adicional ácido oxolínico, se realizó el método de difusión en agar (NCCLS, 2002; CLSI, 2006a), siguiendo las recomendaciones establecidas por Alderman y Smith (2001). Se utilizaron placas con agar Müeller-Hinton (M-H, Difco), para *Y. ruckeri*, *A. salmonicida* atípica y *S. phocae*, o sus modificaciones descritas por Dalsgaard (2001) para algunas especies patógenas específicas como *F. psychrophilum* (M-H diluído) y *Vibrio ordalii* (M-H suplementado con 1,5 % NaCl).

Para el caso particular de los perfiles de resistencia de las cepas pertenecientes a la especie *Piscirickettsia salmonis*, éstos fueron determinados por el Laboratorio ADL Diagnostic Chile Ltda., en consideración a su experiencia desarrollada en el trabajo con este patógeno intracelular.

Para los antibiogramas se utilizaron sensidiscos con los siguientes agentes antibacterianos: amoxicilina (AML, 25 µg), florfenicol (FFC, 30 µg), oxitetraciclina (OT, 30 µg), eritromicina (E, 15 µg), ácido oxolínico (OA, 2 µg) y flumequina (UB, 30 µg). Las placas se incubaron a 22°C por 24-72 h, con excepción de las cepas de *Flavobacterium psychrophilum*, las que se incubaron a 17°C. De acuerdo a las recomendaciones del NCCLS, (2002), se incluyó la cepa la de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, como control de calidad. Todos los discos, excepto florfenicol (Schering-Plough) fueron suministrados por Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hampshire, England).

En cuanto a la determinación del nivel de resistencia a antibióticos, se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) de los antibacterianos florfenicol (Schering-Plough^{MR}), oxitetraciclina (Sigma^{MR}), flumequina (Sigma^{MR}) y ácido oxolínico (Sigma^{MR}), incorporado posteriormente al proyecto, para las cepas patógenas Gram negativas, y las CMIs de amoxicilina (Sigma^{MR}) y eritromicina (Sigma^{MR}) de las cepas patógenas Gram positivas, por un método de dilución en agar, según las indicaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) CLSI (2006a), y Alderman y Smith (2001). De esta manera, se preparó un patrón de diluciones seriadas de cada antibacteriano para su adición en el medio de agar específico para cada especie patógena, para la obtención de concentraciones duplicadas finales de 0,125 a 256 µg mL^{-1}. En los casos de las especies patógenas de *Flavobacterium psychrophilum* los medios Mueller-Hinton se modificaron de acuerdo a Hawke y Thune (1992). Se inocularon placas en triplicado utilizando un replicador de Steers (Steers *et al.*, 1959), inoculando aproximadamente 10^4 unidades formadoras de colonias por inóculo, e incubadas por 48 h a 22°C. Las placas de *F. psychrophilum* se incubaron por 4 días a 15°C de acuerdo a lo sugerido por Schmidt *et al*. (2000). La CMI es definida como la menor concentración del antibacteriano que produce una ausencia de crecimiento en al menos 2 de las 3 placas correspondientes a una misma concentración del antibiótico. La cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, se utilizó como control para la verificación de los rangos de CMI en las placas con agar Mueller-Hinton.

c) Determinación de residuos de antimicrobianos en músculo de peces.

Para efectos de la determinación de residuos de antibióticos, parte de las muestras (5) recolectadas desde cada centro de cultivo muestreado, fueron enviadas al laboratorio BIOVAC, que efectuó la determinación de residuos de las sustancias antimicrobianas de interés en músculo de pescado.

La determinación de residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina se efectuó en el Área Química del Laboratorio.

La metodología utilizada correspondió a Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) basado en diferentes métodos para la extracción de analitos en matriz de peces.

En primer término se efectuó la preparación de la muestra. Posteriormente, se procedió con el proceso de extracción y determinación del analito. Para ello, una vez concentrado el analito a medir, y libre de gran parte del aporte de sustancias químicas que entrega la matriz, se efectuó una separación final del resto de las sustancias químicas de naturaleza similar. Esta separación más fina, se realizó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En las técnicas cromatográficas instrumentales se utilizaron detectores con el propósito de observar como las sustancias se van separando en el tiempo, y a la vez, llevar a cabo la cuantificación e identificación final.

En el caso específico de los analitos comprometidos en el proyecto, la técnica a utilizar es HPLC para la separación fina, con sus respectivas variaciones.

d) Determinación de residuos de antimicrobianos en sedimentos.

A través de la metodología de toma de muestras descrita para el punto 5.1.3 b), en diciembre de 2010 se obtuvieron 2 grupos de 4 muestras cada uno, provenientes de dos centros de cultivo de salmónidos, de los sectores Seno Magdalena y Puerto Cisnes, región de Aysén. Los análisis se efectuaron sobre submuestras de alrededor de 45 g de la capa superior de la muestra dispuesta en tubos tipo Falcon de 50 ml. Las muestras fueron congeladas hasta su posterior análisis.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, y con una jeringa de 5 ml se eliminó el sobrenadante de agua. El proceso de análisis de los diferentes analitos se realizó de manera general como se indica a continuación:

- Disgregación de la matriz.
- Disolución de sustancias
- Separación del analito desde la matriz
- Determinación de la concentración del analito en la fase apropiada.

Luego, se procedió a la extracción y determinación del analito, mediante una separación más fina, de carácter instrumental y que se realizó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En las técnicas cromatográficas instrumentales se utilizaron detectores con el propósito de observar como las sustancias se van separando en el tiempo, y a la vez, llevar a cabo la cuantificación e identificación final.

La extracción de los analitos (antibióticos bajo estudio) se realizó de acuerdo a los procedimientos previamente desarrollados y validados por IFOP. El proceso de extracción de la muestra fue el siguiente:

- Se tomó una muestra de aproximadamente 3 gramos de sedimento húmedo.
- Se agregaron 30 ml de solución de ácido oxálico 0.1 M en metanol.
- Se agitó vigorosamente en forma manual por 10 segundos y en vórtex por 30 segundos.
- Se sonicó durante 30 minutos.
- Se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos.
- El sobrenadante se evaporó en rotavapor a 50ºC, a sequedad.

- Se resuspendió el residuo en 3 ml de solución de agua HPLC/Acetonitrilo HPLC (75:25) y se traspasó a un tubo de 50 ml tipo falcon debidamente rotulado.
- Se centrifugó por 10 minutos a 4000 RPM.
- Con una jeringa de 5 ml, se tomó el sobrenadante y se filtró con filtro 0,22 µm, 13 mm. de diámetro, de PVDF sobre viales para HPLC, debidamente rotulado con tapa y septa.

Dependiendo del analito en particular, las condiciones cromatográficas y de detección varían levemente:

Acido Oxolínico-Flumequina:

Se utilizó un equipo HPLC Shimadzu, que consta de una bomba cuaternaria, un horno de columna, un autosampler y un detector de fluorescencia. Se utilizó una columna fenilo de 250 mm x 4.6 mm de 0,5 um para la separación, la fase móvil fue en base a agua, acetonitrilo y metanol con 0,1 % TFA (ácido trifluoroacético).

La detección de fluorescencia se efectuó con las siguientes condiciones:
- Longitud de onda de excitación: 325 nm.
- Longitud de onda de emisión: 365 nm.

Oxitetraciclina:

Se utilizó el mismo equipo HPLC mencionado anteriormente, pero con un detector de arreglo de diodos. Se utilizó una columna fenilo de 250 mm x 4,6 mm de 0,5 um para la separación, la fase móvil fue en base a agua, acetonitrilo y metanol con 0,1 % TFA (ácido trifluoroacético).

La longitud de onda de monitoreo fue 355 nm.

Florfenicol:

Se utilizó el mismo equipo HPLC y detector utilizado para oxitetraciclina. Se utilizó una columna fenilo de 250 mm x 4,6 mm de 0,5 um para la separación, la fase móvil fue en base a agua, acetonitrilo y metanol con 0,1 % TFA (ácido trifluoroacético).

La longitud de onda de monitoreo fue 220 nm.

Cabe mencionar, que para todos estos estudios, se realizaron ensayos de estas muestras al menos en dos días diferentes. En la realización de éstos se incluyeron dos muestras de fortificados para cada analito en cuestión, comprobando que la realización de los ensayos estuvo correctamente realizado y los resultados obtenidos son válidos.

e) Determinación de materia orgánica en sedimentos.

El contenido de materia orgánica (e inorgánica), tanto relativo como absoluto, de las mismas muestras de sedimento previamente descritas, se realizó de acuerdo a Logue *et al*. (2004), por medio de la cuantificación de humedad por secado en estufa a 95º C (AOAC, 2000, Official Method 934.01 - 4.1.03), y por la cuantificación de cenizas en horno mufla a 500º C (AOAC, 2000, Official Method 942.05 - 4.1.10).

Este parámetro es particularmente importante de determinar debido a que existen varios antecedentes que indican que niveles altos de materia orgánica están muy

correlacionados con una alta incidencia de resistencia a antimicrobianos en la microbiota asociada a sedimentos afectados por actividades de cultivo de peces (La Rosa *et al.*, 2001; Vezzulli *et al.*, 2002).

f) Recuento y determinación de perfiles de resistencia bacterianos en sedimentos

Una porción de las muestras de sedimento ya mencionadas, se envió a la Universidad Católica del Norte, para realizar el recuento de bacterias cultivables totales y resistentes a los antimicrobianos indicados. Una vez en el laboratorio, se extrajeron porciones de 10 g de cada muestra de sedimento recolectada, las que fueron pesadas asépticamente (peso húmedo), resuspendidas en 90 mL de solución salina (0,85%) estéril y homogenizadas a baja velocidad por 1 min utilizando un agitador Hamilton Beach (Modelo 808–220) para desprender las bacterias de las partículas del sedimento (Miranda y Rojas, 2007b).

Se realizaron recuentos cultivables de bacterias totales y resistentes a oxitetraciclina (SigmaMR), florfenicol (Schering-PloughMR), eritromicina (SigmaMR), amoxicilina (SigmaMR) y flumequina (SigmaMR), inoculando en triplicado alícuotas (0,1 mL) del homogenizado de las muestras de sedimento y sus diluciones respectivas por diseminación en superficie (APHA, 1992). Se utilizan placas con agar cuenta gérmenes (PCA, Difco) para la siembra de muestras de agua dulce, y PCA suplementado con NaCl (2%) y agar Marino (Difco) para las muestras de mar, suplementados con oxitetraciclina (30 µg/mL), florfenicol (30 µg/mL), eritromicina (15 µg/mL), amoxicilina (25 µg/mL) o flumequina (10 µg/mL). Los niveles de bacterias heterótrofas totales se determinaron utilizando placas con medio de cultivo sin antimicrobiano. Después de incubar por 5 días a 20°C se enumeraron las colonias desarrolladas (Miranda *et al*., 2005).

Se aislaron cepas bacterianas resistentes provenientes del sedimento, y se determinaron sus perfiles de resistencia a antibacterianos, utilizando las metodologías descritas previamente.

5.1.5. Zonificación de las áreas de cultivo

Con la información disponible de los análisis de perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos, de los patógenos de peces de la industria salmonicultora nacional, obtenidos a través de siete campañas de muestreo, y con la implementación de un análisis de riesgo, incluido un análisis de sensibilidad, se ha planteado una zonificación que permita optimizar el programa de vigilancia de la resistencia bacteriana propuesto.

De esta manera, tomando como base las directrices de la Organización Mundial de Sanidad Animal relacionadas con la elaboración de análisis de riesgo de la emergencia de resistencia bacteriana producto del uso de antimicrobianos en animales (OIE, 2010) se desarrolló un modelo de análisis de riesgo específico para el fenómeno de la resistencia bacteriana, con el objetivo de establecer en forma transparente, objetiva y científicamente fundada, el riesgo asociado con el desarrollo de resistencia producto del uso de antimicrobianos en salmónidos (OIE, 2010). Este trabajo se enfoca particularmente al evento de la infección con microorganismos patógenos que hayan adquirido resistencia producto del uso de antimicrobiano(s) en salmónidos, resultando en la pérdida de efectividad de la terapia antimicrobiana usada para tratar la infección.

Se consideró la información recopilada y analizada en el marco del estudio, relativa a los perfiles de resistencia de las cepas aisladas y la opinión de expertos en área de salud de salmónidos, a fin de definir ciertos eventos para los cuales la

información no se encontraba disponible o bien era de calidad discutible. Además, se incluyó en el análisis, información aportada por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca), relativa a los tratamientos antimicrobianos administrados durante el periodo de 2007-2009.

En un principio, se diseñó el modelo de análisis de riesgo a implementar. Esta etapa consistió en la conceptualización del modelo en cuanto al objetivo, escenarios y eventos que participan de los procesos involucrados. En esta etapa se contó con la participación de expertos en el área de la microbiología y de la farmacología, quienes validaron el modelo propuesto.

La información utilizada para el desarrollo del modelo de análisis de riesgo y la zonificación posterior, incluyó:

- Identificación y ubicación espacial de las áreas de muestreo
- Perfiles de resistencia de las cepas aisladas
- Registros de uso de fármacos durante el periodo de estudio, especificando el principio activo utilizado, diagnóstico frente al cual se realizó tratamiento, fecha de inicio y término, y la Agrupación de Concesiones Salmoneras (ACS) donde se realizó el mismo.
- Registro del número de centros de cultivo operativos en las regiones de Los Lagos y Aysén, indicando la especie cultivada, ACS, comuna, nombre del cuerpo de agua de su emplazamiento y tipo de centro (centro de lago, piscicultura o centro de mar).

Según la metodología de OIE (2010), la estructura del Análisis de Riesgo incluye las siguientes etapas:

• Identificación del peligro.
• Evaluación de riesgo.
• Gestión de riesgo.
• Comunicación de riesgo.

Identificación del peligro

La identificación de peligros consistió en la clasificación de posibles eventos y efectos de la presencia de bacterias resistentes en función del análisis espacial y temporal de la información proveniente de las distintas fuentes consideradas en el presente estudio.

Evaluación del riesgo

Es la etapa del análisis en que se estimó el riesgo asociado a un peligro, es decir, la probabilidad de ocurrencia del peligro y las consecuencias ligadas al mismo. La evaluación de riesgo a su vez se compone de cuatro etapas:

• Evaluación de la difusión

Describe la secuencia de sucesos necesarios para que el uso de un antimicrobiano específico en salmónidos, lleve a la liberación de microorganismos resistentes o determinantes de resistencia en un ambiente determinado, y estimación de la probabilidad de ocurrencia de dicho proceso.

• Evaluación de la exposición:

Describe las rutas biológicas necesarias para la exposición de los salmónidos a los microorganismos resistentes o determinantes de resistencia originados ("difundidos") a partir de un uso determinado de antimicrobianos en salmónidos, estimando la probabilidad de ocurrencia de las exposiciones.

• Evaluación de las consecuencias

Describe la relación entre las exposiciones, especificadas en la etapa anterior, a microorganismos resistentes y las consecuencias de estas exposiciones. Las consecuencias consideradas en el presente estudio hacen referencia a la cantidad de producto perdido en los centros de cultivo en mar (toneladas de salmónido perdidas) y a la cantidad de individuos juveniles perdidos en los centros cultivo en lago y pisciculturas.

• Estimación del riesgo

Integra los resultados de la evaluación de la difusión, evaluación de la exposición y evaluación de las consecuencias para producir estimadores generales de los riesgos asociados con los peligros. En consecuencia, la estimación del riesgo toma en consideración la totalidad de la ruta del riesgo, desde la identificación de los peligros hasta las consecuencias no deseadas.

Ejecución del Modelo Análisis de Riesgo

En función de la zonificación preliminar generada por el análisis de antecedentes, se ejecutaron los modelos de riesgo para cada zona. El resultado de esta etapa se utilizó para clasificar las zonas según la función de riesgo estimado.

Aplicación de encuestas

Durante esta fase del modelo de riesgo, se elaboraron y aplicaron encuestas a los expertos identificados en las áreas de salud de peces, microbiología y farmacología a fin de:

- Validar y priorizar (asignar importancia relativa) los eventos elementales del flujo de proceso de ocurrencia de la resistencia bacteriana.

- Estimar los parámetros relativos a la magnitud de impactos producidos por la resistencia bacteriana, los cuales no se encuentran documentados en la literatura.

Análisis de la información

La ejecución del modelo y sus resultados han sido debidamente documentados y sustentados por publicaciones científicas y los resultados del análisis de información en el marco del estudio, todos los cuales también han incluido la participación de expertos. De igual manera se consideraron las directrices existentes elaboradas por la OIE.

Las información fue compilada y manejada utilizando Microsoft Excel®, mientras que para el análisis de riesgo se utilizó el software @Risk®.

Análisis de Sensibilidad

En base al método de correlación de Spearman, se determinaron los principales eventos del diagrama de flujos de procesos, estimando cuales variables o parámetros tienen una mayor correlación con los riesgos derivados de la resistencia bacteriana.

Concluido este análisis de riesgo y considerando los resultados obtenidos de los muestreos realizados en la primera etapa de este objetivo, se procedió a zonificar las áreas de cultivo evaluadas en base a los resultados obtenidos.

5.2 Objetivo Específico 3.2.: *Confeccionar un manual para médicos veterinarios (y administradores de centros de cultivo) de procedimientos estandarizados que tienda a reducir (o las pautas para) el uso de antibióticos en la producción de salmones*

5.2.1. Categorización de las zonas según residuos de antibióticos y prevalencia estacional de bacterias resistentes

Para la categorización de las zonas se han considerado los resultados de los perfiles de resistencia bacteriana generados, los que se están complementando con los resultados del análisis de riesgo de la resistencia bacteriana detallado metodológicamente previamente.

Para categorizar las zonas se creó un score de resistencia para cada aislado, basado en su perfil de resistencia, en el que se asignó puntaje según la presentación o no de resistencia, susceptibilidad intermedia o susceptibilidad de las bacterias estudiadas frente a los 4 antimicrobianos evaluados para Gram positivas, y los 2 antimicrobianos para Gram negativas, a los que se realizaron las evaluaciones. En este sistema, por cada antibiótico al que el aislado fue resistente se le asigno un puntaje de 1, y por cada antibiótico al que presentó susceptibilidad intermedia se le dio un puntaje de 0,5 puntos. Los antibióticos a los que la bacteria fue susceptible no sumaron puntaje. De esta manera, a modo de ejemplo, un aislado que en su perfil de resistencia fue resistente a 3 antibióticos, presentó susceptibilidad intermedia a 1, y fue susceptible los otros 2 antimicrobianos obtendría un score de resistencia de 3,5 puntos. En consecuencia, el score puede adoptar valores de entre 6 (aislado resistente a todos los antibióticos evaluados) y 0 (aislado susceptible a todos los antibióticos evaluados).

Una vez estimado este score para cada aislado, se procedió a estimar el score para cada ACS o sector de agua dulce, en base al valor promedio de los scores de los aislados presentes en dicha zona. Posteriormente, se realizó la categorización de las zonas en base a los valores así obtenidos.

Los aislados considerados para realizar esta categorización fueron aquellos de *F. psychrophilum* en los sectores de agua dulce y *P. salmonis* en las ACS, aislados entre los años 2009-2010. Se consideró sólo a estos dos patógenos debido a que representan a la mayoría de los aislados obtenidos en terreno, y por ende, pueden entregar una mejor representación del fenómeno, además de ser los principales patógenos bacterianos que afectan al sector salmonicultor nacional.

5.2.2. Diseño de un plan de restauración de acuerdo a la categorización de las zonas

Se ha diseñado un plan de restauración, sobre la base de los resultados y análisis de susceptibilidad a antimicrobianos efectuados a lo largo del desarrollo del proyecto, y que consideran las regiones de Los Lagos y Aysén, subdivididas en Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS).

Esta actividad consideró la revisión bibliográfica científica de documentos existentes a nivel nacional e internacional respecto de medidas que propendan a evitar la emergencia del fenómeno de la resistencia bacteriana, o a generar medidas de control para evitar la propagación de la misma, modulando la aplicación de antimicrobianos en cultivos intensivos, y se adaptó a la realidad geográfica y productiva del sector salmonicultor nacional.

Entre la información revisada se consideró:

- Regulaciones y estudios del FDA-CVM (Food and Drug Administration) de EUA
- Recomendaciones y guías de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)
- Información de Organización para la Agricultura y los Alimentos (FAO) de Naciones Unidas
- Regulaciones, recomendaciones y guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS)
- Regulaciones y estudios de la Unión Europea
- Revisión de los programas de monitoreo y vigilancia de la resistencia bacteriana, tales como DANMAP (Dinamarca)
- Regulaciones, recomendaciones y guías de la European Agencia Europea para la Evaluación de productos Medicinales. EMEA.

De la revisión efectuada, los documentos que de mejor forma fundamentan un plan de restauración y manejo de la resistencia de agentes bacterianos patógenos de peces, a los antimicrobianos bajo estudio, son los siguientes:

- Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. OMS. 2001.
- Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. OMS. 2000.
- A risk management strategic plan for controlling antimicrobial resistance through the authorisation of veterinary medicines. EMEA. 2000.

- Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Report of a Joint FAO/OIE/WHO. Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. 2006.

Más allá de las recomendaciones y guías que se consideran aplicables a la realidad nacional, luego de revisados estos documentos, y que se detallan en la sección de resultados, el establecimiento de un Monitoreo Oficial de la Resistencia Bacteriana, y los acuerdos para validar dicho programa, serán el componente principal de cualquier plan de restauración a presentar, y que debe estar consensuado y contar con el apoyo de las autoridades sectoriales pertinentes.

5.2.3. Confección de un Manual de Buenas Prácticas de Uso Racional de Antimicrobianos en la salmonicultura

Sobre la base de los resultados y análisis previos, se elaboró una Guía Técnica que permite sustentar buenas prácticas y un uso racional de antimicrobianos, así como el consecuente manejo de la resistencia bacteriana, entregando los lineamientos para una buena utilización (pertinencia y uso) de los agentes antimicrobianos en la salmonicultura, y con el objetivo de disminuir la presión de selección de resistencia en bacteria patógenas de peces.

Este documento entrega una serie de recomendaciones e información técnica de respaldo para el manejo de la resistencia bacteriana caracterizada y categorizada previamente, e intenta por un lado, tanto instruir respecto del uso responsable de los fármacos en la industria, de forma de evitar el surgimiento de resistencia bacteriana, como a su vez, guiar respecto del manejo del fenómeno, una vez que éste ya se ha presentado.

Se pretende que este documento sea difundido ampliamente en la industria, y a su vez, cuente con la validación de la autoridad para que se encuentre acorde a las prioridades que el Estado tiene en estas materias.

Para ello, el documento se presentó a representantes del Servicio Nacional de Pesca, y se efectuó una reunión especial para su discusión, en el mes de mayo de 2010.

La Guía incluye, además, conceptos teóricos que permiten comprender el fenómeno de resistencia a antibacterianos de bacterias acuáticas y su diseminación en el ambiente acuático. Además, considera información de al menos los siguientes conceptos: dosis recomendada, intervalos de uso, duración del tratamiento y sus mecanismos de acción.

La estructura y contenidos considerados en el documento se presentan en la sección de resultados respectiva.

5.3. Objetivo Específico 3.3.: *Establecer las bases para instaurar en forma permanente un programa de monitoreo sistemático y oficial de la resistencia bacteriana patógena de salmones que propenda a la disminución del uso de antibióticos.*

5.3.1. Elaboración de Propuesta para un Monitoreo Oficial de la Resistencia Bacteriana

Con la información recolectada de los objetivos 3.1 y 3.2, la experiencia de la propia ejecución de muestreos, aislamientos y análisis de susceptibilidad antimicrobiana, y en conjunto con la revisión de guías y recomendaciones en la

materia, y modelos de otros países o entidades y expertos nacionales e internacionales, se ha elaborado una propuesta base para instaurar un sistema de monitoreo/vigilancia de la resistencia bacteriana patógena de peces salmonídeos. Dentro de este sistema de monitoreo se han considerado las zonas representativas de cada nivel antes categorizado en cuanto al nivel de contaminación y resistencia bacteriana.

Es importante señalar que los resultados obtenidos en las metodologías de muestreo, determinación de residuos, identificación de patógenos y metodologías de evaluación de la resistencia bacteriana especifica en peces, fueron la base técnica y metodológica para la presente propuesta de sistema de monitoreo/vigilancia.

Este sistema propuesto considera:

- Un sistema de muestreo sobre la base de la experiencia del proyecto
- Un sistema de análisis de muestras
- Una propuesta de análisis de resultados y de apoyo a la autoridad
- Base de datos georreferenciada por zona definida: Esta explicita la información del estado de la resistencia para cada patógeno por diferentes niveles de referencia (ej: Agrupación de Concesión de Salmonera, o por región geopolítica, o por tipo de agua, etc.), siendo este una base de datos dinámica que puede responder a las necesidades del consultor.
- Sistema de información geográfica (S.I.G.): Se confeccionó e implementó un S.I.G. con información cartográfica base e información de carácter acuícola, la cual fue levantada y procesada con diversos softwares, siendo ArcGIS ArcEditor 9.3 ®, la plataforma de desarrollo de este S.I.G., y que permite una

interrelación ya sea de carácter tabular ó espacial entre la cartografía y los datos obtenidos de resistencia de los patógenos por cada zona.

Entre sus capacidades se cuenta la posibilidad de su publicación y consulta vía Web, mediante la plataforma ArcGis Server Advance 9.3 ®.

5.4. Objetivo Específico 3.4.: *Validar el sistema de monitoreo propuesto*

5.4.1. Ejecución piloto de la propuesta de Monitoreo

Se efectuaron monitoreos piloto utilizando como base la propuesta de Sistema de Monitoreo/Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura, que consideró para su elaboración, los resultados recopilados desde el 2007, y que fundamente la propuesta descrita en el punto anterior. Esta puesta en marcha, permitió efectuar los últimos ajustes al plan de monitoreo propuesto, a fin de obtener el Sistema de Monitoreo Oficial.

De esta forma, todas estas consideraciones, dieron forma al sistema definitivo que será la base del programa de vigilancia oficial propuesto.

5.4.2. Costeo de la propuesta de Monitoreo entregada

Adicionalmente y como parte de la propuesta entregada, se identificaron los requerimientos de recursos humanos, equipos e infraestructura, junto al tipo de inversiones y costos operacionales necesarios para la implementación del Programa propuesto.

Para esto, se aplicó la técnica de costeo basado en las actividades o ABC ("Activity Based Costing"), cuya metodología se resume a continuación:

Elaboración de Diagrama de flujo

Se elaboró un diagrama de flujo relacionado con la implementación del proceso de seguimiento (o vigilancia), control y fiscalización por parte de la autoridad y se identificaron las actividades relacionadas.

Recopilación y registro de información

Se recopiló información desde el personal involucrado en el proceso con el objetivo de conocer y corroborar las actividades identificadas previamente y de los costos que estás involucra.

Implementación del costeo ABC.

Con la información obtenida en los puntos anteriores se implementó el sistema de costeo. Este considera dos fases que incluyeron los siguientes pasos:

Fase 1

- Asignación de costos indirectos a los centros de actividad
- Identificación de las actividades por centro
- Determinación de los generadores de costo de las actividades
- Reclasificación de las actividades
- Cálculo del costo unitario del generador de costos

Fase 2

- Asignación de los costos de las actividades a los productos
- Asignación de los costos directos a los productos

En la primera fase se asignaron los costos a las actividades pertenecientes a los diferentes centros; de esta forma las actividades se convirtieron en el núcleo del modelo.

En la segunda fase se asignaron a los productos los costos de las actividades, y además se asignaron a esos mismos productos los costos directos.

5.4.3. Presentación de la propuesta de Monitoreo a la Autoridad

Como se ha indicado previamente, se efectuó una reunión con la autoridad en el mes de mayo del presente año, de forma de dar a conocer el sistema monitoreo oficial de la resistencia bacteriana en la salmonicultura, propuesto a través del presente proyecto. Esta reunión se efectuó en dependencias del Servicio Nacional de Pesca, en la ciudad de Valparaíso. A través de presentaciones de resultados obtenidos, y dando a conocer los conceptos que sustentan la propuesta elaborada, se pudieron discutir varios temas que fortalecieron lo establecido originalmente.

5.5. Otras Actividades

5.5.1. Revisión de normativas y bibliografía científica

La actualización respecto de normativas nacionales e internacionales relacionadas con el fenómeno de la resistencia bacteriana, se efectuó a lo largo de toda la iniciativa. Lo mismo ocurrió con la actualización científica, la que entregó nuevos antecedentes durante la ejecución del proyecto, principalmente a nivel internacional. Se entregan detalles de este trabajo en sección resultados.

5.5.2. Taller de presentación de metodologías

Al inicio de la ejecución del proyecto, y tal como estaba comprometido, se realizó el taller de presentación de metodologías en dependencias del Fondo de Investigación Pesquera (FIP), en la ciudad de Valparaíso. En la oportunidad, se presentó el proyecto y se entregó la metodología de trabajo propuesta, así como observaciones y propuestas a la misma, de forma de aclarar y fortalecer el desarrollo de la iniciativa. Asistieron a esta reunión representantes del FIP, de la Subsecretaría de Pesca y parte del equipo de trabajo del proyecto. Mayores detalles de la actividad se presentan en la sección de resultados.

5.5.3. Taller de entrega resultados

De acuerdo a lo comprometido, se llevó a cabo el taller para presentar los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente iniciativa. Se consideró la participación de representantes del sector salmonicultor, y en particular, de los encargados de temas sanitarios, en las empresas que participaron apoyando la iniciativa. El detalle de la actividad se presenta en la sección resultados.

5.5.4. Elaboración de manuscrito en ingles

Tal como estaba comprometido, se elaboró un documento tipo resumen ejecutivo en inglés, que entrega las principales metodologías y resultados asociados al desarrollo de la iniciativa. Este documento, puede ser el sustento de la difusión científica a nivel internacional del proyecto.

6. RESULTADOS

6.1 Objetivo específico 3.1. *Determinar la distribución y cuantificación de los residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina, así como la distribución y cuantificación de bacterias patógenas de salmones resistentes a estas sustancias en zonas de cultivo.*

6.1.1. Contacto y reunión con expertos

a) Expertos nacionales

A lo largo del desarrollo del proyecto se desarrolló un constante trabajo conjunto con el Dr. Claudio Miranda, de la Universidad Católica del Norte, tanto en el ámbito del aislamiento de agentes bacterianos de interés, como en el de la interpretación de resultados de determinación de susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

El Dr. Miranda posee una reconocida especialización en materia de evaluación de resistencia antimicrobiana asociada a organismos acuáticos y de microbiología aplicada en general.

Su apoyo fue fundamental, tanto para el equipo de trabajo de IFOP, como para los grupos participantes de los laboratorios subcontratados, en el entendido que muchas de las materias técnicas vinculadas al fenómeno de la resistencia bacteriana en el país, se han incorporado relativamente hace poco tiempo, en las labores rutinarias de los laboratorios que prestan servicios a la industria salmonicultora.

Asimismo, con el apoyo y experiencia en materia de diagnóstico de patógenos de peces, y de análisis de residuos químicos de los equipos de profesionales y técnicos pertenecientes a los mismos laboratorios participantes del proyecto, se lograron las sinergias necesarias para el logro de los resultados del proyecto.

b) Expertos internacionales

A través de la red de contactos internacionales generada, vinculados a la problemática de resistencia bacteriana en el mundo, logró disponer de apoyo concreto de parte de grupos de expertos profesionales.

Es así como en materia de técnicas de evaluación se recibió el constante apoyo del Dr. Peter Smith de la Universidad Nacional de Irlanda, en Galway. Por otro lado, se recibió el apoyo de parte del grupo de la Universidad de Copenhague, Dinamarca, liderado por la Dra. Inger Dalsgaard, quienes enviaron material científico, principalmente relacionado con técnicas de evaluación de resistencia en el género de las Flavobacterias asociadas a organismos acuáticos, y en particular de especies de peces salmónidos.

c) Reuniones informativas y de coordinación con empresas

A lo largo del proyecto, se efectuaron tanto reuniones ampliadas, con representantes de las empresas del sector salmonicultor, como reuniones personalizadas con cada empresa, de forma de entregar los avances del proyecto, y los resultados asociados a los centros de cultivo propios, de esa entidad.

La primera de ella se efectuó en julio de 2009, de manera de formalizar el apoyo con la iniciativa, y entregarles los antecedentes generales del estudio y la metodología de trabajo. De esta manera, se consiguió finalmente la participación en el proyecto de

13 empresas, con las que se ha trabajado en la coordinación y, posterior ejecución, de los muestreos que se realizan en sus respectivos centros de cultivo.

Las empresas que participaron del proyecto son las siguientes: Marine Farm (GMT S.A.), Salmones Multiexport S.A., Ventisqueros S.A., Trusal S.A., Pesquera Pacific Star S.A., AquaChile S.A., Compañía Pesquera Camanchaca S.A., Pesquera El Golfo S.A., Salmones Antártica S.A., Salmones Friosur S.A., Invertec Seafood S.A. y Salmones Itata S.A.

Posteriormente, y con el fin de afinar algunos asuntos metodológicos, tanto de la toma como del transporte de muestras desde los centros de cultivo, y principalmente para hacerles conocer el estado de avance del proyecto, se efectuaron reuniones bilaterales con cada una de las entidades participantes, durante los meses de enero y febrero de 2010.

d) Otros

Adicionalmente, se efectuaron reuniones con el Instituto Tecnológico del Salmón, INTESAL, de la asociación de productores, SalmonChile, con el objetivo inicial de obtener información de la distribución geográfica de los centros de cultivo de salmones y la entrega de información sanitaria relacionada con la Industria, a través de los Informes de Avance del Programa Zonal de INTESAL.

Adicionalmente, en reuniones posteriores, se solicitó y entregó por parte de dicha entidad, actualizaciones constantes de las siembras y cosechas de las diferentes empresas, organizadas geográficamente por Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura, información que resultó de suma importancia para la continuidad de los muestreos y del proyecto en su totalidad.

6.1.2. Campañas y sitios de muestreos

Durante el desarrollo del proyecto, finalmente se efectuaron siete campañas de muestreo georreferenciado en centros de cultivos de salmones presentes en las regiones de Los Lagos y Aysén y cuya última campaña finalizó en noviembre de 2010.

A la fecha de entrega del presente informe, se efectuaron 228 muestreos en centros de cultivo, localizados en ambas regiones, y correspondiente a 24 de las 35 Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS) existentes, tal como se detalla en la figura 1. En las áreas restantes (11) no fue posible realizar muestreos ya sea porque o no se encontraban activas (descanso sanitario), o no había centros de cultivo de las empresas participantes en ese sector, o bien porque las normativas de bioseguridad de éstas u otras empresas terceras, restringieron el ingreso de personal externo para realizar ese tipo de labores.

De los 228 muestreos, 74 de los centros pertenecen a las ACS de la Región de Los Lagos. Las ACS muestreados en esta región fueron 12. En la misma región y correspondiente a los centros de Agua Dulce, los centros muestreados fueron 13, de los cuales 6 corresponden a centros emplazados en el lago (centros de lago) y 7 a centros emplazados en tierra (pisciculturas). Para la región de Aysén, los muestreos se realizaron en 35 centros de cultivo los cuales están repartidos en 12 ACS.

El detalle de la información referente al número de centros de cultivo muestreados, por región y por ACS, se entrega en la tabla 1. Por su parte, en la tabla 2, se indican las muestras totales enviadas al laboratorio.

Cabe destacar, que hasta la primera campaña del total de 78 muestreos realizados, 50 correspondieron a muestreos activos o dirigidos, es decir, fueron realizados en

centros que presentaban brote de enfermedad; mientras que los 28 restantes corresponden a muestreos de tipo pasivos, es decir, fueron realizados en centros de cultivo que no mostraban sintomatología clínica característica asociada a la presencia de agentes patógenos. Posteriormente, esta denominación de centro activo se le asignó a los centros que entraban a tratamiento y en los cuales se realizó muestreo antes y después del tratamiento. Para este caso, 23 centros muestreados estuvieron bajo esta condición de muestreo.

En manera general, las campañas de muestreo, a cargo del equipo de trabajo de IFOP se realizaron sin inconvenientes. El equipo de trabajo que realizó los muestreos en la Región de Los Lagos, estuvo constituido por un profesional, a cargo de las actividades, y dos técnicos asistentes. Para el caso de la Región de Aysén, el equipo de trabajo estuvo constituido por un profesional a cargo de las actividades y un técnico asistente. Cabe mencionar que en algunos casos, las propias empresas participantes se hicieron responsables, por medio de sus equipos de profesionales, tanto de la toma de muestra en el centro de cultivo, como del transporte de la misma a los laboratorios subcontratados.

6.1.3. Recolección de muestras

a) Muestras de peces para aislamiento y evaluación de resistencia

Durante los muestreos realizados, se colectaron muestras de peces de las especies *Salmo salar* (Salmón del Atlántico), *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoiris) y *Oncorhynchus kisutch* (Salmón coho). A partir de estas muestras se ha realizado el aislamiento de cepas bacterianas patógenas, en las que se ha determinando el perfil y nivel de resistencia.

Del total de muestreos (228) un 20,16% corresponde a la especie *Salmo salar* (Salmón del Atlántico), un 59,65% de *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoiris) y un 20.18% de *Oncorhynchus kisutch* (Salmón coho).

Todas las campañas de muestreos programadas incluyeron la toma de muestras de peces para el aislamiento de bacterias patógenas; mientras que las muestras de peces para determinación en músculo de residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina, ácido oxolínico y flumequina, se han colectado a partir de la segunda campaña de muestreo y hasta marzo de 2010.

b) Muestras de peces para análisis de residuos de antimicrobianos en músculo

Para el cumplimiento de este punto, es importante mencionar que durante todo el período informado, se han efectuado la totalidad de campañas de muestreo georreferenciado en centros de cultivo de salmones presentes en las diferentes Agrupaciones de Concesiones Salmoneras localizadas en las regiones de Los Lagos y Aysén. Las muestras de peces destinadas a la cuantificación en músculo de residuos de antimicrobianos, fueron obtenidas a partir de las campañas de muestreo mencionadas con anterioridad.

Las muestras enviadas para el análisis de residuos de antimicrobianos, se obtuvieron a partir de los mismos pescados que fueron colectados para el aislamiento bacteriológico, asegurando que estas se ajustaran a lo establecido por el Servicio Nacional de Pesca. De manera más específica y para obtener la muestra respectiva, se efectuó un corte transversal al eje del pescado, por detrás de la aleta dorsal y delante de la aleta anal, incluyendo la cola del pescado. Cada muestra tuvo un peso mínimo de 400 grs. y en la eventualidad de que esta tuviera un peso inferior, el corte transversal se adelantó hacia la cabeza del pescado, lo

suficiente como para obtener los 400 grs. mínimos, siendo el tope, el pescado entero, eviscerado y sin cabeza. Si este último, pesó menos de 400 grs., se tomaron los pescados necesarios para completar el peso mínimo, constituyendo así una única muestra. Ahora bien, en relación con el N muestreal, por cada muestreo efectuado se ingresaron al menos 5 muestras para análisis de residuos.

Para la determinación de residuos antimicrobianos, se ingresaron un total de 205 muestras de músculo y piel, distribuidas de acuerdo a lo detallado en la tabla 10.

Finalmente fueron muestreadas 13 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras (ACS), de las que en 11, fue posible generar una con cuantificación de residuos,

c) Muestreos de sedimento para análisis de residuos antimicrobianos, aislamiento bacteriano y evaluación de resistencia

A través de la metodología de toma de muestras descrita en el capítulo 5, en diciembre de 2010 se obtuvieron 2 grupos de 4 muestras cada uno, provenientes de dos centros de cultivo de salmónidos, de los sectores de Seno Magdalena y Puerto Cisnes, región de Aysén.

Los análisis de residuos de antimicrobianos se efectuaron sobre submuestras de alrededor de 45 g de la capa superior de la muestra dispuesta en tubos tipo Falcon de 50 ml. Las muestras fueron congeladas hasta su posterior análisis.

El resto de la muestra fue remitida a la Universidad Católica del Norte, de forma refrigerada, quienes efectuaron los análisis de recuento y aislamiento bacteriano y evaluación de resistencia, así como de materia orgánica e inorgánica totales.

6.1.4. Procesamiento y análisis de las muestras

a) Resultados de aislamientos de agentes patógenos de interés.

Como se mencionó anteriormente, las muestras colectadas desde los centros de cultivo de salmones, fueron enviadas al laboratorio de diagnóstico ADL Diagnostic Chile Ltda., entidad subcontratada que realiza el diagnóstico y aislamiento de los patógenos bacterianos comprometidos, así como los análisis de evaluación de resistencia bacteriana para el caso particular del patógeno *Piscirickettsia salmonis*. Para el caso de la evaluación de susceptibilidad de los otros agentes patógenos estudiados, las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Patobiología Acuática de la Universidad Católica del Norte.

El trabajo realizado por el laboratorio, consideró el aislamiento de los siguientes patógenos, dado la importancia económica y su prevalencia en la industria salmonicultora nacional: *Flavobacterium psychrophilum, Piscirickettsia salmonis, Vibrio ordalii, Streptococcus phocae, Aeromonas salmonicida y Yersinia ruckeri.*

Respecto del aislamiento de agentes patógenos por especie de pez, es posible indicar que los patógenos bacterianos mayormente aislados en las tres especies (trucha arco iris, salmón del atlántico y salmón coho) son *P. salmonis, F. psychrophilum,* y en segundo término, y menor proporción respecto de los dos primeros, *V. ordalii y S. phocae*. Lo anterior coincide con la realidad, tanto diagnóstica como productiva, informada laboratorios y empresas productoras, respectivamente. *P. salmonis, F. psychrophilum* son considerados los principales problemas sanitarios sobre la base de los diagnósticos realizados por las empresas salmoneras que colaboran con el desarrollo de este proyecto, y a los antecedentes aportados por INTESAL de SalmonChile.

Del total de aislamientos de agentes patógenos evaluados para determinación del perfil de resistencia, el 60,1% se presentaron en trucha arcoiris, el 32,5% en salmón del atlántico y el 7,4% en salmón coho.

A partir de la totalidad de las muestras colectadas durante las campañas de muestreo como de aislamientos generados de servicios rutinarios en laboratorios, se ha logrado el aislamiento y la obtención del perfil de resistencia de un total de 272 aislados de los patógenos bajo estudio.

Del total de aislados, una alta proporción de éstas correspondieron a *Piscirickettsia salmonis y Flavobacterium psychrophilum,* los que en su conjunto alcanzaron cerca del 85,6% del total. Esto evidencia que *P. salmonis* y *F. psychrophilum* siguen correspondiendo a los patógenos más prevalentes en los peces de cultivo, generando las mayores pérdidas en la producción, hecho que justifica a su vez, el mayor número de aislados adquiridos por el proyecto, para estos agentes, a partir de los servicios rutinarios de laboratorios.

Para una mejor presentación de los resultados y una comprensión de la evolución de la resistencia bacteriana en patógenos de interés frente a los diversos antibióticos analizados, la información fue disgregada en cuerpos de agua de mar (Región de los Lagos y Aysén) y cuerpos de agua dulce (Región de Los Lagos), éste último a su vez se subdividió en agua dulce - Chiloé, agua dulce - Lago Llanquihue, agua dulce - Lago Rupanco y agua dulce – continente (excluye al Lago Llanquihue y Rupanco). La totalidad de las cepas de patógenos de interés aisladas desde cuerpos de agua dulce, provinieron en su totalidad de centros localizados solo en la Región de Los Lagos, no siendo posible la obtención y aislamiento de patógenos en la Región de Aysén.

La selección de aislados para la determinación de los perfiles de resistencia bacteriana, fue realizada en base al órgano desde el cual se aislaron y su crecimiento en placa. De esta forma, debido a que el principal órgano blanco para el aislamiento de los patógenos en estudio es el riñón, en primera instancia, se consideró las cepas bacterianas aisladas desde este órgano. En caso que existiera un pobre crecimiento en placa de la cepa a partir de éste órgano se privilegió aquellas aisladas desde otros órganos (cerebro, hígado, bazo, branquias, lesión y piel) que presentaron una mejor conducta de crecimiento.

b) Resultados de perfiles de resistencia antimicrobiana

En relación a los resultados de la determinación de resistencia antimicrobiana de las cepas de patógenos de interés aisladas durante el transcurso del proyecto en la Región de Los Lagos y Aysén, de las 272 cepas aisladas, la totalidad se evaluaron en lo que respecta a su perfil de resistencia. De éstas, 155 (57%) corresponden a *Flavobacterium psychrophilum,* 79 (29%) a *Piscirickettsia salmonis*, 12 (4,4%) a *Vibrio ordalii,* 13 (4,8%) a *Streptococcus phocae,* 7 (2,6%) a *Yersinia ruckeri* y 6 (2,2%) a *Aeromonas salmonicida* (figura 2).

En relación al comportamiento de la resistencia bacteriana en el tiempo, cabe destacar que al ser *F. psychrophilum y P. salmonis,* los patógenos que presentaron mayor incidencia en las diferentes etapas de cultivo del salmón, fue en estos agentes donde fue posible evaluar de mejor forma el comportamiento de la resistencia bacteriana a través del tiempo.

En lo que respecta a *F. psychrophilum*, se obtuvieron aislados del patógeno tanto desde centros de cultivo de agua dulce localizados en la Región de Los Lagos (no siendo posible su aislamiento en la Región de Aysén) como desde centros de mar

ubicados en 7 agrupaciones de concesiones salmoneras (ACS 1, 2, 10a, 10b, 16, 25 y 28b) distribuidas en las regiones de Los Lagos y Aysén, entre los años 2008 al 2010. De la totalidad de las cepas (n= 155) obtenidas y analizadas en dicho período de tiempo, el 96,1% presenta sensibilidad a florfenicol, el 94,8% presenta sensibilidad a amoxicilina, el 85,9% presenta sensibilidad a oxitetraciclina, el 83,9% presenta sensibilidad a flumequina y el 66,03% es sensible a ácido oxolínico.

Un 33,9% de las cepas presentó resistencia a ácido oxolínico, un 13,5% presentó resistencia a la flumequina, un 7,0% presentó resistencia a oxitetraciclina y un 3,9% presentó resistencia a florfenicol. Para éste último antibiótico (florfenicol), es relevante hacer mención de la presencia de 6 cepas resistentes aisladas el año 2010 desde centros de cultivo de agua dulce de la Región de Los Lagos situados en la Isla de Chiloé (2), el Lago Llanquihue (2) y en la localidad de Puerto Montt y alrededores (2); considerando que en la actualidad, es uno de los antibióticos más utilizados en la acuicultura.

Para el caso de amoxicilina, oxitetraciclina, acido oxolínico y flumequina, el total de cepas aisladas que presentaron resistencia a éstos antibióticos se obtuvieron preferentemente desde centros de agua dulce (Continente, Lago Llanquihue y Chiloé) de la Región de Los Lagos entre los años 2008 al 2010, presentándose un aumento significativo en la resistencia para el ácido oxolínico, flumequina y en menor grado para oxitetraciclina el año 2010, con valores de de 19, 6 y 5 cepas aisladas, respectivamente. Adicionalmente, para el caso del acido oxolínico y flumequina, se aislaron cepas resistentes provenientes desde centros de agua de mar, específicamente de las ACS 1, 10a, 10b, 25, 28b y en las ACS 10b, 25 y 28b; respectivamente, donde se presentaron valores máximos de 4 cepas resistentes (ACS 1) a acido oxolínico con 1 cepa aislada el año 2009 y 3 cepas aisladas el año 2010, y 2 cepas resistentes (ACS 25) a flumequina, ambas aisladas el año 2009.

Uno de los resultados importantes a considerar, es que en la mayoría de los cuerpos de agua dulce y ACS señaladas con anterioridad, el 96,1% de los aislados de *F. psychrophilum* analizados fueron sensibles a florfenicol, siendo éste fármaco el principal tratamiento de elección frente a un cuadro clínico de Flavobacteriosis, seguido de la oxitetraciclina con un 85,9% de cepas del patógeno con sensibilidad a éste fármaco.

En el caso del patógeno de interés *F. psychrophilum*, destaca además por su presentación de forma transversal en múltiples agrupaciones de concesiones salmoneras (ACS) estuarinas y cuerpos de agua dulce, a diferencia de lo que ocurre con *P. salmonis, Vibrio ordalii* y *Streptococcus phocae* que se han restringido a cuerpos de agua de mar. En el caso de *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas salmonicida* estos se han presentado principalmente en cuerpos de agua dulce o estuarinos, en algunas ACS asociados a períodos de tiempo restringidos, lo que ha dificultado la obtención de muestras que permitan evaluar la evolución de la resistencia bacteriana a los antibióticos mencionados con anterioridad

En lo que respecta a *P. salmonis*, se obtuvieron aislados del patógeno desde centros de cultivo de agua de mar situados en 14 agrupaciones de concesiones salmoneras (ACS 1, 2, 3a, 3b, 9b, 10a, 12a, 16, 17a, 17b, 18c, 19a, 28b y 30a), distribuidas en las regiones de Los Lagos y Aysén, entre los años 2008 al 2010. De la totalidad de cepas analizadas (n= 79), el 98,7% presenta sensibilidad a florfenicol, el 92,4% de las cepas presentan sensibilidad a Amoxicilina, el 91,1% presenta sensibilidad a flumequina, el 82,2% presenta sensibilidad a acido oxolínico y el 75,9% presenta sensibilidad a Oxitetraciclina, Para el resto de los antibióticos, las cepas sensibles se presentaron en la mayoría de las 14 ACS durante los años 2008 al 2010.

Un 17,7% de las cepas presentaron resistencia a acido oxolínico y el 5% presentaron resistencia a flumequina, y en lo que respecta al acido oxolínico, se observa un aumento en la resistencia en 5 ACS en el período 2009 - 2010. Es importante señalar la presencia de cepas con sensibilidad intermedia para los antibióticos Oxitetraciclina (n= 19; 24,1%) las que se distribuyen durante el período 2008 - 2010 en la mayoría de las agrupaciones de concesiones salmoneras, y para el antibiótico florfenicol (n= 1; 1,3%) el año 2009 en la ACS 9b.

Uno de los resultados más relevantes, es que en la mayoría de las ACS señaladas con anterioridad, el 98,7% de los aislados de *P. salmonis* analizados fueron sensibles a florfenicol, siendo éste fármaco el principal tratamiento de elección frente a un cuadro clínico de Piscirickettsiosis, seguido del ácido oxolínico, otro importante antibiótico utilizado para el control de *P. salmonis,* pero que en este último tiempo debido a diversas restricciones, ha tendido a ser menos utilizado.

Por otro lado, a partir de las cepas del patógeno *P. salmonis* aisladas entre los años 2008 al 2010 en las diferentes agrupaciones de concesiones salmoneras analizadas, se ha observado una leve recuperación de la sensibilidad del patógeno a las quinolonas (ácido oxolínico y flumequina), sobre todo hacia al período 2009-2010.

En el caso de *V. ordalii*, se obtuvieron aislados del patógeno en 4 agrupaciones de concesiones salmoneras (2, 16, 21a y 32) distribuidas en las regiones de Los Lagos y Aysén para los años 2006, 2008 y 2009, sin ser posible su aislamiento en otras ACS. Respecto a los resultados de susceptibilidad antibiótica, de la totalidad de los aislados del patógeno obtenidos y analizados (n= 12), el 100% presentó sensibilidad al ácido oxolínico, seguido de la flumequina y oxitetraciclina que presentaron un 91,7% de cepas sensibles, el florfenicol que presentó un 83,3% de

cepas sensibles, y finalmente la amoxicilina que presentó un 75% de cepas sensibles. En lo que respecta a flumequina y oxitetraciclina, un 8,3% de las cepas presentaron sensibilidad intermedia para cada antibiótico, observándose en ambos casos la aparición de la cepa en el ACS 32 el año 2008.

En lo que respecta a la resistencia, solo en la amoxicilina y el florfenicol se observa la presencia de cepas del patógeno, resistentes a dichos antibióticos, con un 25 y 8,3% del total de cepas de *V. ordalii* analizadas, respectivamente; registrándose para ambos casos en la ACS 32 en el año 2008.

Para *S. phocae* se presentaron aislados para el período comprendido entre los años 2007 y 2009, ubicándose éstos en 2 agrupaciones de concesiones salmoneras (ACS 1 y 2), no siendo posible su aislamiento en otras agrupaciones de concesiones salmoneras. Respecto a los resultados de susceptibilidad antibiótica, de la totalidad de cepas del patógeno obtenidas y analizadas (n= 13), el 100% de ellas presentaron tanto sensibilidad los antibióticos amoxicilina y eritromicina, como resistencia a acido oxolínico y flumequina en las agrupaciones de concesiones salmoneras señaladas anteriormente en el período 2007-2009. Para el caso del florfenicol, se presentó solo 1 cepa con sensibilidad intermedia el año 2008 en el ACS 1. La situación más compleja se presenta en el antibiótico oxitetraciclina, utilizado actualmente en acuicultura, donde del total de cepas del patógeno obtenidas, 7 cepas presentan sensibilidad intermedia en las ACS 1 y 2 en el período comprendido entre el año 2007 y 2009. Por su parte, en el año 2009 y específicamente en el ACS 1 se presenta 1 cepa del patógeno que presenta resistencia a oxitetraciclina lo que sugiere un proceso de adaptabilidad del patógeno al desarrollo de resistencia.

Para el patógeno *A. salmonicida*, se obtuvieron aislados del patógeno tanto de centros de cultivo de agua dulce localizados en la Región de Los Lagos (no siendo

posible su aislamiento en la Región de Aysén) como de centros de mar ubicados en 3 agrupaciones de concesiones salmoneras (ACS 2, 17a, y 32) distribuidas en las regiones de Los Lagos y Aysén, el año 2007 y 2009; no obstante, pese a haber aislado cepas del patógeno del ACS 2, no fue posible obtener el perfil de resistencia de la cepa señalada, ya que no existió desarrollo (ND) ni crecimiento de ésta en la placa de cultivo. En relación a los resultados de susceptibilidad antibiótica para el patógeno *A. salmonicida*, de la totalidad de las cepas obtenidas y analizadas (n= 6 + 1 ND), un 83,3% de las cepas presentó sensibilidad al florfenicol, seguido de la amoxicilina con un 66,6% de cepas sensibles. Para el acido oxolínico, el 66% (n= 4) de las cepas presentaron resistencia a éste antibiótico, seguido de oxitetraciclina, flumequina y amoxicilina donde el 33% (n= 2) de las cepas presentaron resistencia a cada uno de éstos antibióticos. Para el caso de amoxicilina, es importante señalar que la totalidad de cepas resistentes se obtuvieron de cepas aisladas desde centros de agua dulce (continente). Finalmente, se presentó solo 1 cepa resistente a florfenicol el año 2007 obtenida del ACS 32.

Finalmente, para *Y. ruckeri*, se obtuvieron aislados del patógeno tanto de centros de cultivo de agua dulce (no siendo posible su aislamiento en la Región de Aysén) como de centros de mar ubicados en 2 agrupaciones de concesiones salmoneras (ACS 2, 12c) distribuidas en las regiones de Los Lagos, únicamente para el año 2008, por lo que para éste patógeno se dificultará obtener la evolución de la resistencia bacteriana en el tiempo. En relación a los resultados de susceptibilidad antibiótica, de la totalidad de las cepas del patógeno obtenidas y analizadas (n= 7), el 100% de las cepas presentaron sensibilidad a los antibióticos amoxicilina, florfenicol, oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina.

En el anexo figuras**,** se presentan las figuras 3 a la 33 en que se muestran los gráficos con la evolución de la resistencia bacteriana para cada antibiótico y patógeno de peces de interés tanto por agrupación de concesiones salmoneras

(ACS) como por cuerpos de agua dulce para los años que se especifican, disgregándose estos últimos en agua dulce (continente), agua dulce (Lago Llanquihue), agua dulce (Lago Rupanco) y agua dulce (Chiloé).

En el anexo tablas (tabla 3), se presenta el detalle de la totalidad de los resultados obtenidos de los perfiles de resistencia y grado de susceptibilidad a los antimicrobianos Amoxicilina, Eritromicina, Florfenicol, Oxitetraciclina, Ácido Oxolínico y Flumequina a partir de los análisis realizados en los aislados bacterianos obtenidos desde muestreos realizados a centros de cultivo en mar y estuario, como desde centros de agua dulce, localizados en la Región de Los Lagos y Aysén.

c) Resultados niveles de resistencia a antibióticos

Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los antibióticos florfenicol, oxitetraciclina y flumequina para los patógenos Gram (-) *F. psychrophilum*, *P. salmonis*, *V. ordalii*, *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*, y para los antibióticos amoxicilina y eritromicina para el patógeno Gram (+) *S. phocae*. De las 272 cepas de patógenos de interés a las cuales se les determinó el perfil de resistencia, se ha determinado la concentración mínima inhibitoria en 186 cepas para los antibióticos mencionados anteriormente, considerando que existen adicionalmente 20 CMI donde no se presentó desarrollo de los patógenos *S phocae* (13) y *A. salmonicida* (7).

En el anexo figuras, figuras 34 a la 49, se presenta el detalle de la totalidad de los resultados obtenidos de CMI de los antimicrobianos florfenicol, oxitetraciclina, acido oxolínico y flumequina a partir de los análisis realizados de las cepas bacterianas obtenidas de los muestreos realizados como de las cepas obtenidas desde los laboratorios de servicio.

Respecto de los resultados por patógeno, se determinaron los valores de CMI de 89 cepas de *Flavobacterium psychrophilum*, pudiéndose observar un amplio rango de valores de CMI a florfenicol, distribuidos bimodalmente (figura 34), en que la mayoría de las cepas presentaron valores de 0,25-0,5 µg/mL, mientras que otro grupo no menor, evidenció niveles de CMI a florfenicol superiores a 2 µg/mL, siendo estas cepas mayoritariamente aisladas durante el año 2010. La determinación de los valores de CMI de oxitetraciclina de las cepas de *F. psychrophilum*, evidenciaron una alta dispersión, en que la mayoría de las cepas en estudio presentó niveles de susceptibilidad ≥ 4 µg/mL (figura 35). Asimismo, los valores de CMI de las quinolonas, ácido oxolínico y flumequina presentaron una amplia dispersión, detectándose que un número importante de cepas con valores de CMI mayores a 8 µg/mL y 4 µg/mL, respectivamente (figuras 36 y 37, tabla 5).

Se analizaron 78 cepas de *Piscirickettsia salmonis* aisladas en el período 2008-2010, y se determinaron sus valores de CMI de florfenicol, observándose una distribución unimodal, en que la mayoría de las cepas analizadas presentó valores de CMI de 0,25-2 µg/mL (figura 38). Por otra parte los valores de CMI de oxitetraciclina evidenciaron una gran dispersión, observándose algunas cepas con valores bastante altos, mientras que la mayoría exhibió niveles de susceptibilidad a este antibacteriano de 0,25-1 µg/mL (figura 39). En contraposición a lo anterior, los valores de CMI de las quinolonas ácido oxolínico y flumequina evidenciaron un comportamiento de susceptibilidad a estos antibacterianos dependiente del tiempo ya que se observa un significativa mayor susceptibilidad a ambas quinolonas de las cepas aisladas en el año 2009, en relación a aquellas aisladas en el año 2010, las que presentaron mayoritariamente una menor susceptibilidad a estos 2 antibacterianos, puesto que la mayoría de las cepas recuperadas en el 2009 presentaron valores de CMI de ácido oxolínico de 0,125-0,25 µg/mL, mientras que la mayoría de las cepas aisladas durante el 2010 exhibieron niveles de susceptibilidad a este antibacteriano de 2-4 µg/mL (figura 40). Asimismo, la

mayoría de las cepas aisladas durante el 2009 presentaron valores de CMI de flumequina de 0,25-0,5 µg/mL, mientras que la mayoría de las cepas aisladas durante el año 2010 presentaron valores de CMI de 1-2 µg/mL (figura 41). La distribución de CMI para cada uno de los antimicrobianos mencionados anteriormente, se presenta en la tabla 6.

Se estudiaron 12 cepas de *Vibrio ordalii*, y se pudo observar una distribución bimodal de los niveles de CMI de florfenicol y oxitetraciclina, en que 3 cepas evidenciaron valores de CMI mucho mayores a las demás, como se puede observar en las figuras 42 y 43. Por lo general, la mayoría de las cepas analizadas presentaron niveles altos de susceptibilidad a estos antibacterianos (≤ 0,5 µg/mL). Por otra parte, las cepas de *V. ordalii* presentaron niveles altos de susceptibilidad a quinolonas, tanto a ácido oxolínico como a flumequina (figuras 44 y 45), con rangos de 0,0312-0,5 µg/mL y 0,0312-2 µg/mL de CMI para ácido oxolínico y flumequina, respectivamente (tabla 7), observándose solo una cepa con niveles menores de susceptibilidad a estos agentes, en particular a flumequina.

Se analizaron las 7 cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas durante el proyecto y se observaron, como muestra la figura 46, que la totalidad de las cepas resultaron susceptibles a florfenicol, con valores que variaron entre 1 y 8 µg/mL, evidenciando valores moderados. De manera similar las cepas analizadas evidenciaron valores CMI de oxitetraciclina de 1 y 2 µg/mL, los que aunque están dentro del rango de susceptibilidad, son bastante importantes (figura 47). En contraposición, la totalidad de las cepas de *Y. ruckeri* evidenciaron una gran susceptibilidad a la acción de quinolonas (figuras 48 y 49), con rangos de 0,0312-0,125 µg/mL y 0,0625-0,5 µg/mL de CMI para ácido oxolínico y flumequina, respectivamente (tabla 8).

d) Resultados análisis de residuos de antimicrobianos en músculo de pescado

La totalidad de las muestras de músculo y piel obtenidas a partir de los peces muestreados desde centros de cultivo, fueron enviadas al Laboratorio de diagnóstico Biovac S.A., entidad subcontratada y responsable de realizar la cuantificación de los antimicrobianos comprometidos en el presente proyecto. El análisis efectuado por Biovac, consideró la cuantificación de cinco antimicrobianos: oxitetraciclina, florfenicol, flumequina, amoxicilina y eritromicina.

La metodología analítica utilizada correspondió a Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), basado en diferentes métodos para la extracción de analitos en matriz de peces (músculo y piel) (tabla 9).

Determinación de la distribución de residuos de antimicrobianos

Para la determinación de residuos antimicrobianos, se ingresaron un total de 205 muestras de músculo y piel, distribuidas de acuerdo a lo detallado en la tabla 10. A partir de las 13 Agrupaciones de concesiones salmoneras (ACS) muestreadas, en 11 de ellas (1, 2, 9a, 9b, 10a, 12a, 17a, 17b, 19a, 19b y 23a) (85%) se detectó la presencia al menos uno de los antimicrobianos de interés. De las 2 ACS restantes (16 y 28b) (15%) no se detectó ninguno de los antimicrobianos (tabla 11). En relación a los muestreos realizados en centros de agua dulce, solo en el 20% de las muestras ingresadas para análisis se detectó presencia de residuos de al menos un antimicrobiano (tabla 12).

Ahora bien, a partir de las 11 ACS con cuantificación de residuos, la oxitetraciclina representó el antimicrobiano de interés con mayor cantidad de detecciones en comparación con el resto de sus pares. En la tabla 12 y figura 50, se puede

apreciar que en 10 de las 13 ACS (76,9%) se ha detectado la presencia de oxitetraciclina; en las AMS 12a y 23 a (15,4%%) se ha detectado florfenicol y sólo en el ACS 17b (7,7%) se ha detectado flumequina. La amoxicilina y eritromicina no se han detectado en ninguna de las 13 ACS antes descritas. Respecto a las muestras provenientes de centros de agua dulce, en el 20% de las muestras ingresadas se detectó presencia de florfenicol.

Finalmente, en la tabla 12 y figura 50, se puede observar el detalle de la cantidad de muestras en que hubo detección de antimicrobianos, según la Agrupación de Concesiones Salmoneras de origen.

Determinación de la cuantificación de residuos de antimicrobianos

En relación con este punto, los únicos antimicrobianos que fueron cuantificados en la totalidad de las muestras provenientes tanto de las diferentes ACS como de centros de agua dulce correspondieron a oxitetraciclina, florfenicol y flumequina. De manera más específica, a partir de las 205 muestras ingresadas, en 65 de ellas (31,7%) se cuantificó oxitetraciclina; en 15 (7,3%) florfenicol y en una (0,48%) flumequina (tabla 13).

Con respecto a los valores de cuantificación, la oxitetraciclina fue la que presentó la mayor variabilidad entre las distintas muestras ingresadas. De esta forma, a partir de la tabla 13 es factible constatar que dicho antimicrobiano presentó valores que oscilaron entre las 21,7 partes por billón (ppb) hasta las 7.482,5 ppb. Para el caso del florfenicol, este presentó valores entre las 123,5 ppb y las 2.564,7 ppb. Finalmente, el único valor cuantificado de flumequina fue de 1,2 ppb.

De manera más específica, en el anexo figuras, desde la figura 51 a la 61 detallan la distribución de la cuantificación de residuos encontrados para cada uno de los antimicrobianos de interés, tanto en las 11 ACS con presencia de analitos como en los centros de agua dulce (figura 62).

e) Resultados análisis efectuados a muestras de sedimentos

Residuos antimicrobianos en sedimentos

La totalidad de las muestras, para todos los analitos estudiados, dieron como resultado no detectado. Las muestras control (fortificados), entregaron recuperaciones que están dentro de los límites de recuperación previamente establecidos para estas técnicas, lo que demuestra la validez de estos resultados.

Cabe señalar que el límite de detección para los diferentes analitos es el descrito en la tabla N° 14.

Materia orgánica total en sedimentos

Para los análisis de materia orgánica e inorgánica totales, de muestras de sedimentos asociados a centros de cultivo de la Región de Aysén, para los sectores de Seno Magdalena y Puerto Cisnes, se verificaron como promedios cantidades relativas de materia inorgánica, un 94,37% y un 94,2% respectivamente. En consecuencia, el porcentaje de materia orgánica correspondió como promedio, a 5,63% y 5,8% para cada sector muestreado (tabla 15).

Por otro lado, las cantidades absolutas, expresadas en gramos, fueron de 0,55g de materia inorgánica y de 0,032g de materia orgánica, como promedios de las muestras para el sector de Seno Magdalena. Por su parte, para el sector de Puerto Cisnes, como promedios de las muestras de esta localidad, se obtuvo un valor de 0,66g de materia inorgánica y 0,039g de materia orgánica (tabla 16).

Recuento bacteriano y evaluación de resistencia bacteriana en sedimentos

El análisis de los sedimentos provenientes de centros de cultivo evidenció la presencia de niveles moderados de bacterias heterótrofas, no observándose grandes variaciones en las distintas muestras analizadas, siendo del orden de 105 ufc/g de sedimento los niveles detectados (figura 63). Cabe hacer notar que los niveles bacterianos de los sitios control (M4 y M8) no resultaron significativamente menores que aquellos de los sedimentos ubicados bajo las jaulas de cultivo, lo que sugiere niveles de eutrofización similares para los ambientes sujetos a impacto y aquellos seleccionados como controles, ubicados a 100 m de las balsas jaulas de cultivo.

En las distintas muestras analizadas no se observaron niveles relevantes de bacterias resistentes a florfenicol, pero los niveles de resistencia a oxitetraciclina y flumequina fueron bastante elevados, siendo solo algo menores a los valores totales de bacterias heterotróficas detectadas, lo cual constituye una incógnita desde el punto de vista de su importancia como factor de riesgo en salud animal, ya que pudieran ser parte del resistoma intrínseco detectado en ambientes naturales, que se ve favorecido por la presión de selección ejercida por residuos de antibacterianos y los altos niveles de materia orgánica que se encuentran habitualmente asociados a ambientes cercanos a centros de cultivo de peces. Sería de gran interés conocer los elementos moleculares involucrados en estos microorganismos, para así definir su real impacto en la

microbiota del sedimento y la factibilidad de su transferencia a patógenos de salmones, lo que pudiera constituirse en un riesgo para la eficiencia de las terapias antibacterianas utilizadas en estos sistemas de cultivo.

Se analizaron 4 cepas aisladas de los sedimento en estudio y se determinó su perfil de susceptibilidad a antibacterianos. Las especies aisladas correspondieron a *Pseudomonas stutzeri, Brevundimonas vesicularis* y *Pseudomonas fluorescens*, esta última con perfil de resistencia a 4 de los 5 antimicrobianos evaluados. El detalle de estos resultados puede verificarse en la tabla N° 50.

6.1.5. Zonificación de las áreas de cultivo

Ejecución del Modelo Análisis de Riesgo

En función de la zonificación preliminar generada por el análisis de antecedentes, se ejecutaron los modelos de riesgo para cada zona.

a) Diseño del modelo de análisis de riesgo:

A partir de la literatura y referencias internacionales, como las entregadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), se diseñó un modelo de análisis de riesgo cuyo punto de partida es la infección con un patógeno específico por parte de los peces a nivel del centro de cultivo y el consecuente brote de enfermedad causado por este, enfocando este análisis a los principales patógenos que afectan hoy en día a la industria, *Piscirickettsia salmonis* en los centros ubicados en agua de mar, y *Flavobacterium psychrophilum* en las pisciculturas y centros de lago. La figura 64 muestra el flujo de procesos de este modelo, el que comienza con el brote del patógeno específico, el que puede ser tratado o no con el antibiótico en evaluación, siendo la respuesta a este tratamiento el éxito o

fracaso terapéutico, dependiendo del perfil de resistencia del agente infeccioso. Las consecuencias del fracaso terapéutico fueron cuantificadas en términos de la cantidad de producto perdido (toneladas de salmónidos), para los centros de cultivo ubicados en mar, o del número de juveniles (alevines/smolts) para las pisciculturas o centros de cultivo de lago.

La conceptualización de este modelo, en cuanto a su objetivo, escenarios y eventos que participan en él, fue validada por los expertos en el área de la microbiología y farmacología consultados.

b) Recopilación de información necesaria para el desarrollo del modelo de análisis de riesgo:

Para esta etapa se consideró la información recopilada y analizada en el marco del estudio, relativa a los perfiles de resistencia de las cepas aisladas en las siete campañas de muestreo. Se incluyó también en el análisis la información aportada por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca), relativa a los tratamientos antimicrobianos administrados durante el periodo de estudio. De esta manera, la información con la que se contó para el desarrollo del estudio incluyó:

- Identificación y ubicación espacial de las áreas de muestreo
- Perfiles de resistencia de las cepas aisladas
- Registros de uso de fármacos durante el periodo de estudio, especificando el principio activo utilizado, diagnóstico frente al cual se realizó tratamiento, fecha de inicio y término, y la agrupación de concesiones salmoneras (ACS) donde se realizó el mismo.

- Registro del número de centros de cultivo operativos en las regiones de Los Lagos y de Aysén, indicando la especie cultivada, ACS, comuna, nombre del cuerpo de agua de su emplazamiento y tipo de centro (centro de lago, piscicultura o centro de mar).

c) Desarrollo del modelo de análisis de riesgo

Siguiendo la metodología de OIE (2010), la estructura del Análisis de Riesgo incluyó las siguientes etapas:

Identificación del peligro

En base a la revisión de la literatura existente relativa al análisis de riesgo de la resistencia bacteriana, se definieron los siguientes peligros:

- Presencia de microorganismos patógenos que hayan adquirido resistencia a partir del uso de antimicrobianos en salmónidos.
- Presencia de microorganismos patógenos que hayan obtenido determinantes de resistencia desde otros microorganismos, los que adquirieron resistencia a partir del uso de antimicrobianos en salmónidos.

Para efectos de este estudio, se consideró que ambos peligros se encuentran representados en los perfiles de resistencia de los patógenos aislados en las campañas de muestreo, debido a que el origen de la resistencia expresada por estos involucraría ambos mecanismos.

Evaluación del riesgo

• Evaluación de la difusión

Considerando que las rutas biológicas que llevan a la liberación de microorganismos resistentes o determinantes de resistencia no se encuentran plenamente caracterizadas en peces y que la probabilidad de ocurrencia de este proceso es desconocida, además del hecho de que se cuenta con la información de los perfiles de resistencia de las cepas aisladas desde peces afectados por bacterias patógenas desde las campañas de muestreo y la frecuencia de ocurrencia de eventos de enfermedad a partir de la información aportada por Sernapesca, se decidió no considerar la etapa de la difusión de los agentes al medio, y comenzar el análisis de riesgo directamente en la evaluación de la exposición.

• Evaluación de la exposición:

La probabilidad de exposición de un grupo de salmónidos a microorganismos resistentes se encuentra dada por la probabilidad de ocurrencia de un evento de infección con el agente específico y por la probabilidad de que este agente sea resistente. De esta forma, el número de brotes al año causado por cepas resistentes del agente específico viene dado por:

N° casos anuales X probabilidad de resistencia del agente

El número de casos anuales a nivel de agrupación de concesiones salmoneras (ACS) o sector, tanto para los casos de piscirickettsiosis como los de flavobacteriosis, se estimó a partir del registro de uso de fármacos de Sernapesca, específicamente de la información relativa al diagnóstico frente al cual se realizó el tratamiento. Para ingresar este valor dentro del modelo, se utilizó la distribución de

Poisson, que permite estimar el número de eventos que ocurren en un periodo de tiempo definido (en este caso un año).

En cuanto a la probabilidad de resistencia del agente, esta se estimó a partir de los resultados de los perfiles de resistencia obtenidos a partir de los aislados de las campañas de muestreo. Para esto se utilizó una distribución beta, la que permite estimar la probabilidad de ocurrencia de un evento (en este caso el que la cepa sea una cepa resistente).

• Evaluación de las consecuencias

Las consecuencias derivadas de la resistencia bacteriana evaluadas en este estudio fueron el de la pérdida de producto (toneladas de salmónidos) en centros ubicados en mar o bien el número de juveniles perdidos en los centros de agua dulce (piscicultura o lago). La estimación de estos valores a nivel de ACS o sector de agua dulce viene dada por el número de fracasos terapéuticos que se presentan en la unidad y la pérdida de producto o juveniles que esto determina.

El número de fracasos terapéuticos al año fue estimado a partir del número de brotes anuales causados por cepas resistentes del agente específico estimado en la etapa anterior, y la probabilidad de utilizar el principio activo específico frente al cual el agente es resistente. Lo anterior viene dado por:

N° brotes resistentes X Probabilidad uso antimicrobiano específico

Para estimar la probabilidad de uso del antimicrobiano frente al patógeno específico se utilizó la información disponible en el registro de uso de fármacos de Sernapesca, en específico la relativa a los diagnósticos y principios activos utilizados frente a ellos. De esta forma se utilizó una distribución beta para estimar esta probabilidad.

La estimación de la pérdida de producto en agua de mar y la pérdida de individuos en agua dulce debido a brotes de piscirickettsiosis y flavobacteriosis, respectivamente, se realizó a partir de la información entregada por expertos en salud de peces, lo que permitió estimar esta consecuencia a nivel de centro de cultivo en mar, piscicultura o lago.

• Estimación del riesgo

Integrando todas las etapas anteriores se estimó el número anual de fracasos terapéuticos por ACS o sector de agua dulce para cada principio activo evaluado, y la cantidad de producto o individuos juveniles perdidos.

Aplicación de encuestas

Se realizó una consulta a 8 expertos con experiencia en el área de salud de salmónidos, a fin de definir los parámetros de ciertos eventos para los cuales la información no se encuentra disponible. La descripción de la experiencia de los expertos, así como su área de trabajo específica dentro del cultivo de salmónidos, se detalla en la tabla N° 17.

La información entregada por los expertos fue la siguiente:

- Valores esperados del número de estanques/jaulas en una piscicultura, centro de lago y centro de engorda (tabla N° 18).
- Valores esperados del número de peces por estanque/jaula en una piscicultura, centro de lago y centro de mar para las especies salmón del Atlántico, Coho y trucha arcoiris (tablas N° 19, 20 y 21).

- Valores esperados de los parámetros relativos a un brote de piscirickettsiosis cuando este se controla en una primera instancia y frente al escenario de fracaso terapéutico (tabla N° 22 y 23).

- Valores esperados de los parámetros relativos a un brote de flavobacteriosis cuando este se controla en una primera instancia y frente al escenario de fracaso terapéutico (tabla N° 24).

Esta información entregada por los expertos permitió estimar las consecuencias asociadas a un evento de fracaso terapéutico, en términos toneladas de producto perdido en mar o de número de individuos juveniles perdidos en agua dulce.

Los resultados del análisis de riesgo se presentarán primero para la resistencia de *P. salmonis* y luego para la de *F. psychrophilum*.

A. Análisis de riesgo de la resistencia antimicrobiana de *Piscirickettsia salmonis*

Análisis de la exposición

a) Número anual de brotes de piscirickettsiosis a nivel agrupación de concesiones salmoneras (ACS)

La tabla N° 25 muestra la distribución del número de brotes estimado a partir de los registros de uso de fármacos de Sernapesca. De las ACS bajo estudio, aquellas que presentan el mayor número de número de eventos de brote fueron la 1 y 17b, seguidas de la 19a. Las ACS que presentaron el menor número de brotes fueron la 3a, 30a y 16.

b) N° anual de brotes de piscirickettsiosis causados por cepas resistentes de *P. salmonis*

Las tablas N° 26, 27 y 28 muestran la distribución estimada del número de brotes de piscirickettsiosis causado por cepas de *P. salmonis* resistentes flumequina, ácido oxolínico y amoxicilina, respectivamente, dados los resultados de los perfiles de resistencia obtenidos en los objetivos anteriores. Para el caso del florfenicol y oxitetraciclina, dado los resultados de perfiles de resistencia obtenidos a partir de las campañas de muestreo, no se estarían produciendo brotes causados por cepas resistentes de ese agente, no pudiendo estimarse estas distribuciones. Debido a que la eritromicina no tiene efecto sobre patógenos Gram negativos como *P. salmonis*, no se consideró el número de brotes resistentes a este principio activo.

En el caso de flumequina (tabla N° 26), aquellas ACS donde se estarían presentando brotes causados por cepas resistentes son las ACS 2, 3a y 12a. Para el ácido oxolínico (tabla N° 27) la situación de resistencia estaría más diseminada, estimándose la ocurrencia de brotes resistentes en las ACS 1, 2, 3b, 10a y 12a. Para la amoxicilina (tabla N° 28) los brotes resistentes se estarían presentando en las ACS 3a, 9b, 10a y 17a.

Análisis de las consecuencias

a) Número anual de fracasos terapéuticos frente a piscirickettsiosis a nivel agrupación de concesiones salmoneras (ACS)

Dadas las actuales condiciones de uso de fármacos en la industria, el cual está dirigido cada vez más al florfenicol como única alternativa terapéutica en los centros de cultivo en mar, los tratamientos con otros principios activos, frente a los cuales se estimó ocurrencia de brotes con cepas resistentes, son más bien

infrecuentes. Esto determinó que las consecuencias producto de los brotes con cepas resistentes a estos antibióticos, estimadas a partir de los fracasos terapéuticos fueran más bien bajas, estimándose la ocurrencia de fracasos terapéuticos sólo para flumequina y ácido oxolínico.

En el caso del primer antibiótico (tabla N° 29) se estimó la ocurrencia de fracaso terapéutico sólo en la ACS 12a, con una media de 1,2 tratamientos fallidos al año. En el caso del ácido oxolínico (tabla N° 30) se estimo la ocurrencia de tratamientos fallidos en las ACS 2, 3b y 12a, con medias estimadas de 0,3; 1,5 y 0,8 tratamientos fallidos al año.

b) Estimación de la cantidad de producto perdido debido al fracaso terapéutico

La estimación de este impacto producto de la presentación de un brote con una cepa de *P. salmonis* resistente al tratamiento antibiótico en un centro de cultivo fue realizada a partir de la información entregada por los expertos en salud de peces relativa a las características de los centros de cultivo en mar (tabla N° 18 y 21) y de los parámetros relativos a los brotes de piscirickettsiosis donde el tratamiento es efectivo y aquellos donde fracasa el tratamiento (tablas N° 22 y 23). Para realizar esta estimación, la información entregada por cada experto fue ajustada utilizando la distribución Pert, definida por los parámetros valor máximo, valor mínimo y valor más probable o moda. Las opiniones de los distintos expertos en cada variable estimada fueron combinadas utilizando una distribución discreta, la que combina las distribuciones aportadas por los expertos, ponderándolas por la experiencia de cada uno. De esta manera se estimo la cantidad de producto perdido en un brote que responde al tratamiento antimicrobiano y la cantidad perdida frente a un evento de fracaso terapéutico. La diferencia entre ambas fue considerada como la cantidad de producto perdido atribuible al fracaso

terapéutico, siendo estimada esta última con una valor medio de 154 Ton, e intervalos de confianza al 90% de entre 9 y 514 toneladas.

Estimación del riesgo

Las toneladas de salmónidos perdidas debido a los brotes con patógenos resistentes a flumequina y ácido oxolínico y el fracaso terapéutico en el uso de estos antimicrobianos se muestran en las tablas N° 31 y 32. En la primera se observa que producto de los fracasos terapéuticos frente a los tratamientos con flumequina estimados para la ACS 12a, se pierden al año un promedio de 182 toneladas de biomasa de salmónidos. En la segunda se observa que el mayor impacto de la resistencia se da en la ACS 3b, donde se pierden en promedio 223 toneladas de biomasa anuales, seguida de las ACS 12a y 2, donde se estima una pérdida anual promedio de 115 y 45 toneladas de biomasa.

B. Análisis de riesgo de la resistencia antimicrobiana de *Flavobacterium psychrophilum*

En base al origen reportado de la cepa aislada, se agruparon los resultados de este estudio en 6 sectores, procurando mantener cierta homogeneidad dentro de ellos: 1) agua dulce en la isla de Chiloé, 2) Lago Llanquihue, 3) Lago Rupanco, 4) Provincia de Osorno (sin incluir al lago Rupanco), 5) Provincia de Llanquihue (sin incluir al lago Llanquihue) y 6) Provincia de Palena. Además, se presentan los resultados de la región de Los Lagos continental, la que incluye a los últimos 5 sectores mencionados.

Análisis de la exposición

a) Número anual de brotes de flavobacteriosis a nivel de sectores de agua dulce

La tabla N° 33 muestra la distribución del N° de brotes estimado a partir de los registros de uso de fármacos de Sernapesca. Aquellos sectores que presentan el mayor número de eventos de brote fueron la provincia de Llanquihue, con una media de 151 brotes anuales, y el sector de agua dulce de Chiloé, con una media de 63 casos anuales de flavobacteriosis. La provincia de Osorno es la que presenta menos casos, con una media de alrededor de 15 casos anuales. La región de los lagos continental como un todo presenta una media de 281 casos anuales de flavobacteriosis.

b) Número anual de brotes de flavobacteriosis causados por cepas resistentes de *F. psychrophilum*

Al igual que en el caso de la piscirickettsiosis, los brotes resistentes a eritromicina no fueron analizados, en vista del espectro de acción de esta molécula, el cual no incluye a bacterias Gram negativas.

A continuación se presenta la estimación del número anual de brotes resistentes para cada uno de los antibióticos en estudio.

Flumequina

La tabla N° 34 muestra la distribución estimada del número anual de brotes de flavobacteriosis resistentes a flumequina. En ella se estima que el mayor número de brotes resistentes se da en el sector de agua dulce de Chiloé, con una media estimada de 18 brotes resistentes, seguido de las provincias de Llanquihue y

Palena, con medias estimadas de 10 y 9 brotes resistentes, respectivamente. En el lago Rupanco se estima la no presentación de brotes resistentes a este principio activo, dado la muy baja presencia de cepas de *F. psychrophilum* resistentes en los aislados obtenidos desde las campañas de muestreo. A nivel de la región de Los Lagos continental como un todo se estimó una media de 25 brotes resistente a flumequina.

Oxitetraciclina

En el caso de este principio activo (tabla N° 35), la ocurrencia del mayor número de brotes resistentes se estimó en la provincia de Llanquihue y el sector de agua dulce de Chiloé, con valores medios estimados de 15 y 14 brotes de flavobacteriosis resistentes. En el caso del Lago Rupanco y de la provincia de Palena se estimó la no presentación de brotes resistentes a este principio activo. A nivel de la región de Los Lagos continental como un todo se estimó una media de 20 brotes resistentes a oxitetraciclina.

Ácido oxolínico

Los sectores con el mayor número estimado de brotes resistentes para este principio activo fueron los de la provincia de Llanquihue (media de 40 brotes) y el sector de agua dulce de Chiloé (media de 32 brotes). Los sectores con el menor número estimado de brotes fueron la provincia de Osorno (5 brotes) y el lago Rupanco (9 brotes). A nivel de la región de Los Lagos continental como un todo se estimó una media de 82 brotes resistentes a este principio activo (tabla N° 36).

Florfenicol

Los sectores con el mayor número estimado de brotes resistentes para este principio activo (tabla N° 37) fueron el sector de agua dulce de Chiloé y la provincia de Llanquihue con una media estimada de 11 y 10 brotes resistentes a este principio activo, respectivamente. Los sectores con el menor número estimado de brotes fueron el Lago Rupanco y la provincia de Palena, donde se estimo la no presentación de brotes resistentes a florfenicol. A nivel de la región de los Lagos continental como un todo se estimó una media de 15 brotes resistentes a este principio activo.

Amoxicilina

Los sectores con el mayor número estimado de brotes resistentes para este principio activo fueron la provincia de Llanquihue y el Lago Llanquihue, con una media estimada 15 y 2 brotes resistentes respectivamente (tabla N° 38). En el resto de los sectores evaluados se estimó la no presentación de brotes resistentes. A nivel de la región de los Lagos continental como un todo se estimó una media de 17 brotes resistentes a este principio activo.

Análisis de las consecuencias

a) Número anual de fracasos terapéuticos frente a flavobacteriosis

De la misma forma como ocurre en el caso de la piscirickettsiosis, la presentación de fracasos terapéuticos producto de la resistencia bacteriana en brotes de flavobacteriosis viene dada por la presentación de brotes con cepas resistentes de este patógeno y por el antimicrobiano elegido para tratar dichos eventos de brote. Debido a que en el ambiente dulceacuícola se utiliza una mayor diversidad de

principios activos, y a que en este ambiente se estima la ocurrencia de brotes resistentes para todos los principios activos estudiados, la presentación de fracasos terapéuticos sería mayor a lo que ocurre en el ambiente marino. A continuación se presentan los estimadores del número de fracasos terapéuticos para cada principio activo a nivel de los distintos sectores de agua dulce estudiados.

Flumequina

Se estimó la presentación de fracasos terapéuticos con este principio activo en la provincia de Osorno, provincia de Llanquihue y el lago Llanquihue, con medias estimadas de 0,3 fracasos terapéuticos al año para las dos primeras y 0,2 para el último. En el resto de los sectores de agua dulce se estimó la no ocurrencia de fracasos terapéuticos. Para la región de Los Lagos continental como un todo se estimo la presentación de 0,8 fracasos terapéuticos anuales con este principio activo (tabla N° 39).

Oxitetraciclina

Para este antimicrobiano se estimó la presentación de fracasos terapéuticos en la provincia de Llanquihue y en el sector de agua dulce de Chiloé, con medias estimadas de 5,6 y 1,7 fracasos terapéuticos, respectivamente. En el resto de los sectores de agua dulce se estimó la no presentación de fracasos terapéuticos. En la región de Los Lagos continental como un todo presentó una media estimada de 5,6 fracasos terapéuticos al año (tabla N° 40).

Ácido Oxolínico

El único sector en el que se estimó la presentación de fracasos terapéuticos con este principio activo fue la provincia de Llanquihue, con una media anual estimada de 2,1 eventos (tabla N° 41).

Florfenicol

El sector en el que se estimó la mayor cantidad de eventos de este tipo fue el sector de agua dulce de Chiloé, con una media estimada de 8,4 fracasos terapéuticos anuales, seguido de la provincia de Llanquihue, el lago Llanquihue y la provincia de Osorno, con medias estimadas de 5,4; 3 y 1 fracaso terapéutico, respectivamente. Los Lagos continental presentó una media estimada de 9,5 eventos. En el lago Rupanco y en la provincia de Palena se estimó la no presentación de fracasos terapéuticos (tabla N° 42).

Amoxicilina

Sólo en el lago Llanquihue se estimó la presentación de fracasos terapéuticos con este principio activo, con una media de 0,2 tratamientos fallidos al año (tabla N° 43).

b) Estimación de la cantidad de peces juveniles perdidos debido al fracaso terapéutico

La estimación de este impacto producto de la presentación de un brote con una cepa de *F. psychrophilum* resistente al tratamiento antibiótico en una piscicultura o centro de lago fue realizada a partir de la información entregada por los expertos en salud de peces relativa a las características de las pisciculturas y centros de lago (tabla N° 18, 19 y 20) y de los parámetros relativos a los brotes de flavobacteriosis en los que el tratamiento es efectivo y aquellos donde fracasa el tratamiento (tabla N° 24). De la misma forma que para la estimación de consecuencias de la resistencia de *P. salmonis*, la información entregada por cada experto fue ajustada utilizando distribuciones de Pert, y las opiniones de los distintos expertos en cada variable estimada fueron combinadas utilizando distribuciones discretas ponderadas por la experiencia de cada experto. De esta

manera se estimó la cantidad de individuos juveniles perdidos por centro en un brote de flavobacteriosis que responde al tratamiento antimicrobiano y la cantidad perdida frente a un evento de fracaso terapéutico. La diferencia entre ambas fue considerada como la cantidad de individuos juveniles perdidos por centro atribuible al fracaso terapéutico, siendo estimada para cada sector estudiado, obteniéndose valores promedio de entre 219.209 (lago Rupanco) y 634.849 (Provincia de Osorno).

Estimación del riesgo

La cantidad de individuos juveniles perdidos debido al fracaso terapéutico fue estimada para cada principio activo, presentándose estos resultados a continuación.

Flumequina

El sector donde mayores pérdidas se presentaron debido a brotes resistentes a este principio activo fue la provincia de Osorno (media estimada de 217.728 unidades) y la de Llanquihue (media estimada de 132.944 unidades). En los sectores de agua dulce de Chiloé, lago Rupanco y provincia de Palena se estimó la no perdida de juveniles debido a resistencia a este principio activo (tabla N°44). En la región de Los Lagos continental como un todo la media estimada de juveniles que se pierden producto de la resistencia a flumequina corresponde a 389.155 unidades.

Oxitetraciclina

Las mayores pérdidas de unidades producto de la resistencia a este antibiótico se estimaron en la provincia de Llanquihue (media estimada de 2.901.813 unidades) y en el sector de agua dulce de Chiloé (media estimada de 881.070 unidades). En el resto de los sectores estudiados se estimó la no ocurrencia de mortalidad de juveniles

debido a resistencia a este principio activo (tabla N° 45). En la región de Los Lagos continental como un todo la media estimada de juveniles que se pierden producto de la resistencia a oxitetraciclina corresponde a 2.901.813 unidades.

Ácido oxolínico

El único sector donde se estimo pérdida de juveniles debido a la resistencia a este principio activo fue en la provincia de Llanquihue, con una media estimada de 1.080.660 unidades. En el resto de los sectores se estimo la no pérdida de juveniles debido a la resistencia a este principio activo (tabla N°46).

Florfenicol

Los sectores donde más pérdidas se estimaron debido a la resistencia a este principio activo fueron el sector de agua dulce de Chiloé (media estimada de 4.166.904 unidades) y la provincia de Llanquihue (media estimada de 2.886.037 unidades). En los sectores del lago Rupanco y de la provincia de Palena se estimo la no ocurrencia de mortalidad de juveniles debido a la resistencia a este principio activo. En la región de Los Lagos continental como un todo la media estimada de juveniles que se pierden producto de la resistencia a oxitetraciclina corresponde a 4.248.710 unidades (tabla N° 47).

Amoxicilina

El único sector donde se estimo la ocurrencia pérdidas debido a la resistencia a este principio activo fue el del Lago Llanquihue, con una media estimada de 38.748 unidades (tabla N° 48).

Análisis de Sensibilidad

En base al método de correlación de Spearman, se determinaron los principales eventos del diagrama de flujos de procesos, estimando cuales variables o parámetros tienen una mayor correlación con los principales riesgos derivados de la resistencia bacteriana. A continuación se describen los principales factores que determinan estos riesgos

a) Número de brotes con cepas resistentes de un patógeno a un antimicrobiano específico:

El principal factor que influye en este parámetro es la probabilidad de resistencia del patógeno específico. El segundo factor en importancia es la frecuencia de brotes que se presenta en el área con el patógeno. En términos generales se puede decir que mientras menor sea la probabilidad de resistencia del agente, mayor será la importancia de la frecuencia en la ocurrencia de los eventos de brote. A modo de ejemplo la figura N° 65 muestra los resultados del análisis de correlación entre el número de brotes de piscirickettsiosis resistentes a oxitetraciclina en la ACS 2 y estas dos variables, observándose la relación antes mencionada.

b) Cantidad de fracasos terapéuticos en el sector

La frecuencia de fracasos terapéuticos en un sector específico se encuentra determinada principalmente por la probabilidad del tratamiento con el principio activo específico y la probabilidad de que el brote de enfermedad sea causado por una cepa resistente a este principio activo. El número de brotes en el área tiene una participación menor en la cantidad de fracasos terapéuticos que se presenten en el área. A modo de ejemplo la figura N° 66 muestra los resultados del análisis de correlación entre el número de fracasos terapéuticos frente a brotes de

piscirickettsiosis tratados con oxitetraciclina en la ACS 2 y las variables antes mencionadas.

c) Cantidad de producto o individuos perdidos debido a fracasos terapéuticos

Esta variable está determinada principalmente por la probabilidad de tratamiento con el principio activo específico, la probabilidad de brote con una cepa resistente del patógeno, la mortalidad acumulada de un brote que presenta fracaso terapéutico, la proporción de jaulas afectadas por el brote y el peso de los peces al momento del brote (para el caso específico de la piscirickettsiosis). El número de brotes al año, el número de jaulas en el centro de cultivo, y el número de peces en la jaula tienen impacto menor en esta variable. Se observa que la mortalidad acumulada de un brote causado por un patógeno no resistente tiene un impacto negativo sobre las pérdidas producto de la resistencia, la que se debe simplemente a que, dada la estructura del modelo de análisis de riesgo, en la medida que aumenta esta mortalidad, la diferencia con la mortalidad producto de la resistencia se reduce. A modo de ejemplo la figura N° 67 muestra los resultados del análisis de correlación entre la cantidad de producto perdido en la ACS 2 producto de brotes de piscirickettsiosis resistentes a oxitetraciclina y las variables antes mencionadas.

Zonificación de las áreas estudiadas

Debido a que las consecuencias en términos de la cantidad de producto o individuos juveniles perdidos en una determinada área varían dependiendo de las prácticas de uso de fármacos a nivel local, la que puede cambiar dependiendo de nuevas condiciones regulatorias impuestas por la autoridad oficial o autoimpuestas por la industria, nuevas condiciones de mercado o la incorporación de nuevos fármacos, y además, debido a la existencia de áreas donde las estimaciones

arrojan ausencia de pérdida de producto/individuos a pesar de que las mismas arrojan brotes con patógenos resistentes (producto del no uso circunstancial de los principios activos a los que los patógenos no son resistentes), la zonificación en base a esta estimación no parece la más adecuada.

Por otro lado, la zonificación en base a la cantidad de brotes causados por patógenos resistentes tiene una serie de ventajas:

a) Considera la situación sanitaria de las diferentes áreas y los centros de cultivo que las componen
b) Incorpora los patrones de resistencia existentes en el área
c) Los principios activos utilizados en las distintas áreas no hacen variar esta zonificación

Por los motivos anteriormente expuestos la zonificación propuesta a continuación, está basada en la cantidad de brotes causados por patógenos resistentes a antibióticos estimadas en las área de estudio. Esta será aplicada de forma diferenciada para centros de cultivo en agua de mar y centros de cultivo en agua dulce.

Zonificación en mar

Dada la distribución de brotes resistentes en las ACS en estudio, la que va desde una media estimada de cero brotes resistentes en las ACS 16, 17b, 18c, 19a, 28b y 30a hasta 60 brotes resistentes a antibióticos en la ACS 10a, se clasificaron las ACS en tres niveles de riesgo de resistencia: zonas de riesgo bajo de resistencia, zonas de riesgo intermedio y zonas de riesgo alto.

a) Zonas de riesgo bajo: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes no superan los 17 brotes anuales. Bajo esta categoría se encuentran las ACS 2, 3a, 3b, 9b, 16, 17a, 17b, 18c, 19a, 28b y 30a.
b) Zonas de riesgo intermedio: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes es mayor a 17 y menor o igual a 36 brotes anuales. Bajo esta categoría se encuentran las ACS 1 y 12a.
c) Zonas de riesgo alto: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes es mayor a 36 brotes anuales. Bajo esta categoría solamente se encuentra la ACS 10a.

La pertenencia de las ACS estudiadas a las zonas antes mencionadas fue asignada mediante un análisis de conglomerados jerárquico de encadenamiento promedio (average linkage).

Zonificación en agua dulce

Dada la distribución de brotes resistentes en los sectores en estudio, la que va desde una media estimada de 9 brotes resistentes en el lago Rupanco hasta 91 brotes resistentes a antibióticos en la en la provincia de Llanquihue, se clasificaron los sectores en estudio dos niveles de riesgo de resistencia: zonas de bajo riesgo de resistencia y zonas de alto riesgo.

a) Zonas de riesgo bajo: son aquellos sectores donde el número anual de brotes resistentes estimado fue de hasta 27 brotes. En esta categoría se encuentran el lago Rupanco (9 brotes), la provincia de Osorno (11 brotes), el lago Llanquihue (21 brotes), y la provincia de Palena (27 brotes).
b) Zonas de riesgo alto: son aquellos sectores donde el número anual de brotes resistentes estimado supera los 27 brotes. En esta categoría se encuentran el

sector de agua dulce de Chiloé (73 brotes) y la provincia de Llanquihue (91 brotes).

Al igual que la zonificación en agua de mar, la pertenencia de los sectores estudiados a las zonas antes mencionadas fue asignada mediante un análisis de conglomerados jerárquico de encadenamiento promedio (average linkage).

La zonificación de las ACS en mar y los sectores en agua dulce en base a su riesgo de presentar brotes resistentes aquí propuesta, debiera permitir focalizar de mejor manera los recursos para los planes de vigilancia y control de la resistencia que se diseñen e implementen en el futuro, y la toma de decisiones relativas a la producción y salud de peces.

6.2 Objetivo específico 3.2. *Confeccionar un manual para médicos veterinarios (y administradores de centros de cultivo) de procedimientos estandarizados que tienda a reducir (o las pautas para) el uso de antibióticos en la producción de salmones*

6.2.1. Categorización de las zonas según residuos de antibióticos y prevalencia estacional de bacterias resistentes

Con base en los resultados obtenidos del análisis de perfiles de resistencia bacteriana agrupados por Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS), los que posteriormente fueron agrupados por zonas, según se describió previamente, se efectuó una caracterización final, asociada a la definición de categorías, las que describen a continuación:

a) Zona de resistencia baja: son aquellas ACS con un score de resistencia de entre 0 y 1.
b) Zona de resistencia media: son aquellas ACS con un score de resistencia mayor a 1 y menor o igual a 2.
c) Zona de resistencia alta: son aquellas ACS con un score de resistencia mayor a 2.

Categorización de zonas en el ambiente marino

En base a los valores de score observados se generaron tres categorías de ACS:

a) Zona de resistencia baja: son aquellas ACS con un score de resistencia de entre 0 y 1. En esta categoría se encuentran las ACS 16, 17a, 18c, 19a y 30a.
b) Zona de resistencia media: son aquellas ACS con un score de resistencia de entre 1 y 2. En esta categoría se encuentran las ACS 1, 2, 3b, 9b, 12a, 17b, y 28b.
c) Zona de resistencia alta: son aquellas ACS con un score de resistencia superior a 2. En esta categoría se encuentran las ACS 3a y 10a.

Categorización de los sectores de agua dulce

Para los sectores de agua dulce se consideraron los mismos criterios de categorización que para las ACS, obteniéndose lo siguiente:

a) Zona de resistencia baja: en esta categoría se agrupó casi la totalidad de los sectores de agua dulce (provincia de Osorno, lago Rupanco, provincia de Llanquihue, lago Llanquihue y la provincia de Palena).

b) Zona de resistencia media: sólo el sector de agua dulce de Chiloé se ubicó en esta categoría. Ninguno de los sectores de agua dulce estudiados obtuvo una categoría de resistencia alta.

Cabe mencionar, que esta caracterización, por un lado permite una visualización más transversal y macro de la problemática de resistencia, y a su vez, una mejor representación gráfica del fenómeno, al asociarlo a un sistema de información geográfico (SIG). Asimismo, la Autoridad, a partir de este sistema, puede tomar medidas acotadas y más eficaces para efectos del manejo del fenómeno.

6.2.2. Diseño de un plan de restauración de acuerdo a la categorización de las zonas

Se ha establecido una propuesta de plan de restauración/manejo para enfrentar el fenómeno de la resistencia bacteriana, sobre la base de los resultados y análisis de susceptibilidad a antimicrobianos efectuados a lo largo del desarrollo del proyecto, y que consideran las regiones de Los Lagos y Aysén, subdivididas en Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS).

Como se mencionó previamente, la categorización efectuada permite ahora definir grupos de áreas según lo siguiente:

a) Zona de resistencia baja: son aquellas ACS con un score de resistencia de entre 0 y 1.

   En esta categoría debiesen encontrarse aquellas zonas con predominancia de aislados susceptibles a todos o a la mayor parte de los antibióticos a evaluar.

b) Zona de resistencia media: son aquellas ACS con un score de resistencia mayor a 1 y menor o igual a 2. En esta categoría se debiesen encontrar aquellas zonas con presencia de cepas resistentes a uno o dos antibióticos o con susceptibilidad intermedia para más de un antimicrobiano.

c) Zona de resistencia alta: son aquellas ACS con un score de resistencia mayor a 2. En esta categoría debiesen tener predominancia zonas con aislados con resultados de resistencia a más de un antibiótico evaluado o al mismo antimicrobiano, por parte de muchos aislados estudiados.

De acuerdo a lo anterior, los planes de manejo y eventual restauración asociados a la resistencia bacteriana, tanto a nivel central (autoridades, entidades de investigación, etc.), o de nivel local (profesionales especializados, operarios, etc.), se enfocan en las zonas de resistencia media y alta.

Como se indicó previamente, esta actividad consideró la revisión bibliográfica científica de documentos existentes a nivel nacional e internacional respecto de medidas que propendan a evitar la emergencia del fenómeno de la resistencia bacteriana, o a generar medidas de remediación para evitar la propagación de la misma, modulando la aplicación de antimicrobianos en cultivos intensivos.

De la revisión efectuada, se han considerado los siguientes antecedentes, y agregado otros en base a la experiencia tanto del equipo de trabajo como de expertos consultados:

a) De nivel central y relativo al manejo de sustancias antimicrobianas:

- Hacer obligatoria la prescripción de todos los antimicrobianos que se utilizan en la industria, poniendo énfasis en las áreas con mayores niveles de resistencia de acuerdo a los resultados obtenidos del programa de vigilancia.

- Disponer de evaluaciones de seguridad y eficacia de los fármacos utilizados, de lo contrario, interrumpir o reducir paulatinamente la administración del mismo.

- Fortalecer el sistema nacional de vigilancia de administración de antimicrobianos a los animales de producción.

- La evaluación de perfiles y niveles de susceptibilidad de los fármacos a autorizar para uso en acuicultura, debiese caracterizar la resistencia potencial a los medicamentos de uso humano.

- Formular directrices dirigidas a los veterinarios a fin de reducir la administración excesiva e indebida de antimicrobianos a los animales destinados al consumo humano.

- La autorización de nuevos productos antimicrobianos veterinarios debe garantizar que las dosis recomendadas son óptimas para el tratamiento, teniendo en cuenta la farmacocinética, eficacia clínica, con el fin de minimizar el desarrollo de la resistencia.

- Los productos existentes ya autorizados también deben revisarse por parte de las autoridades regulatorias para garantizar que la dosis recomendada y la duración del uso son consistentes con el conocimiento actual de la eficacia, resistencia a los antimicrobianos, farmacocinética y farmacodinamia.

- Aplicar un programa de revisión y eventual actualización de las dosis recomendadas y duración de los tratamientos para los antimicrobianos

autorizados para uso en acuicultura, basados en la realidad de campo, incluyendo estudios de respaldo.

b) De nivel central asociada a la gestión de riesgo de emergencia de la resistencia bacteriana

El plan estratégico de gestión de riesgos para controlar la resistencia a los antimicrobianos a través de la autorización de medicamentos veterinarios se resume de la siguiente manera:

- Revisar el proceso de evaluación de riesgo de aumento de la resistencia bacteriana, para identificar las áreas donde la acción directa y rápida sea posible, y poner énfasis en aquellas zonas deficitarias de datos, y que no permiten la generación de análisis y toma de decisiones.
- Comunicar las conclusiones de esta revisión a todas las partes interesadas.
- Establecer las directrices que detallen los requisitos de los datos para el proceso de evaluación, de forma de asegurar que el riesgo de desarrollar resistencia a los antimicrobianos puede ser adecuadamente definido.
- Identificar y priorizar los esfuerzos en aquellas enfermedades infecciosas donde los productos inmunológicos (vacunas) o cambios en el manejo productivo, tengan un impacto significativo en la reducción del volumen de antimicrobianos utilizados.
- Comunicar y coordinar las actividades de manejo del fenómeno de resistencia bacteriana entre todas las partes interesadas del sector salmonicultor/acuicultor, para garantizar un enfoque coherente y eficaz del problema de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

c) Respecto de las técnicas y análisis de los resultados de susceptibilidad a antimicrobianos:

- Establecer un programa de estandarización de las técnicas de evaluación de susceptibilidad antimicrobiana para los agentes patógenos de mayor importancia en la industria, considerando tanto perfiles (antibiogramas) como niveles (CMI) de resistencia bacteriana.

- Establecer un estándar o referencia nacional respecto de la interpretación de los resultados de las técnicas de evaluación de resistencia, definiendo los puntos de quiebre clínicos y puntos de corte epidemiológicos para cada patógeno de interés en la industria salmonicultora.

d) Asociadas a las prácticas en terreno (profesionales y centros de cultivo)

- Fortalecer el sistema de verificación de la prescripción medico veterinaria frente a tratamientos antimicrobianos, y las respectivas solicitudes de antibiogramas pre o post inicio de tratamiento en los centros de cultivo.

- Establecer un análisis sistemático de los datos que emanan de las prescripciones veterinarias en terreno, de forma de incorporar esa información de forma rápida y confiable, al sistema de vigilancia de la resistencia.

Las medidas de remediación propuestas, fueron incorporadas, previo acuerdo con la autoridad, en el documento Guía de Buenas Prácticas de Uso Racional de Antimicrobianos en la Salmonicultura, elaborado.

Se recalca que más allá de las recomendaciones y guías que se consideran aplicables a la realidad nacional, el establecimiento de un Monitoreo Oficial de la Resistencia Bacteriana, y los acuerdos para validar dicho programa, son el componente principal de cualquier plan de restauración a establecer, y requiere del consenso y apoyo de las autoridades sectoriales pertinentes.

6.2.3. Confección de un Manual de Buenas Prácticas de Uso Racional de Antimicrobianos en la salmonicultura

Considerando los resultados y análisis previamente descritos, la realidad del sector salmonicultor nacional respecto del uso de sustancias antimicrobianas, y el estado de la resistencia bacteriana, así como de la revisión de guías y recomendaciones nacionales e internacionales, se ha diseñado una Guía de "Buenas Prácticas de Uso Racional de Antimicrobianos y manejo de la Resistencia Bacteriana", con el fin de entregar los lineamientos de una buena utilización (pertinencia y uso) de agentes antimicrobianos en la salmonicultura, tendiente a disminuir la presión de selección de resistencia en bacteria patógenas de peces.

Este manual precisa los procedimientos a seguir, con énfasis en las zonas categorizadas como de riesgo alto e intermedio de nivel de resistencia, e intenta por un lado, tanto instruir respecto del uso responsable de los fármacos en la industria, de forma de evitar el surgimiento de resistencia bacteriana, como a su vez, guiar respecto del manejo del fenómeno, una vez que éste ya se ha presentado.

Los contenidos y detalle del documento son los siguientes:

I. Prólogo

II. Introducción

Esta sección considera explicar la importancia y razones que llevaron a la generación del documento, los objetivos del aporte, y una revisión de la situación general de la acuicultura/salmonicultura nacional y las contingencias que ha debido enfrentar.

III. Antecedentes generales

Esta sección considera entregar algunas definiciones generales y específicas vinculadas a la problemática de la resistencia bacteriana, así como ilustrar respecto de otras realidades y experiencias internacionales del manejo del fenómeno en otros países.

Asimismo, entrega detalles de los impactos estimados, generados por el fenómeno a nivel mundial y nacional.

IV. Situación del uso de fármacos en la industria

Esta sección pretende entregar una actualización de la situación de los antimicrobianos utilizados en la acuicultura, considerando toneladas utilizadas por kg producido y la variación histórica del tipo de fármaco utilizado.

V. Revisión de los mecanismos de acción de los fármacos

Esta sección hace un repaso de las principales características, dosis autorizadas, y mecanismos de acción de los antimicrobianos de mayor uso en la industria, como Oxitetraciclina, Florfenicol, Quinolonas y otros principios activos de interés.

VI. Mecanismos de generación de resistencia bacteriana

Esta sección entrega antecedentes de los mecanismos, tanto desde el punto de vista productivo como molecular, respecto de la diseminación y surgencia de la resistencia bacteriana, asociados a los principales agentes patógenos de interés de la industria.

VII. Situación de la resistencia bacteriana en la industria

Esta sección entrega los antecedentes que se han recopilado a través de la ejecución del presente proyecto, entregando además un análisis de la situación actual del fenómeno en la industria.

VIII. Las técnicas de evaluación de la susceptibilidad bacteriana

Esta sección aborda definiciones y generalidades de las principales técnicas de evaluación de susceptibilidad antimicrobiana, su situación actual en Chile y sus proyecciones.

IX. Recomendaciones y medidas de control en el uso de antimicrobianos

Esta sección entrega antecedentes recopilados desde entidades referentes, relativas a la correcta prescripción y dosificación de antimicrobianos, las conductas recomendadas a los profesionales encargados, e indicaciones de planes de manejo para ser implementados por parte de las entidades pertinentes.

X. Bibliografía

XI. Acrónimos utilizados

XII. Glosario

XIII. Sitios de interés en la web

XIV. Agradecimientos

El documento elaborado se puede observar en su totalidad, en el Anexo 5 del presente informe.

Se pretende que este documento sea difundido ampliamente en la industria, y a su vez, cuente con la validación de la autoridad para que se encuentre acorde a las prioridades que el Estado tiene en estas materias.

Como es posible verificar, este documento incluye conceptos teóricos que permitan comprender el fenómeno de resistencia a antibacterianos de bacterias acuáticas y su diseminación en el ambiente hídrico. Además, considera en base a los niveles máximos de antibióticos permitidos y volumen anual de antibióticos de acuerdo a su vida media, al menos los siguientes conceptos: dosis recomendada, intervalos de uso, duración del tratamiento y sugerencias adecuadas de rotación de uso de grupos de antibacterianos en base a sus mecanismos de acción.

6.3 Objetivo Específico 3.3.: *Establecer las bases para instaurar en forma permanente un programa de monitoreo sistemático y oficial de la resistencia bacteria patógena de salmones que propenda a la disminución del uso de antibióticos.*

6.3.1. Elaboración de Propuesta para un Monitoreo Oficial de la Resistencia Bacteriana

En consideración de las consecuencias productivas, sanitarias, económicas e indirectamente, sociales, entre otras, que implica la pérdida de eficacia de los antimicrobianos utilizados para enfrentar las enfermedades en los sectores productivos animales, y en consecuencia, la pérdida del control sobre las patologías que afectan los planteles, se hace imprescindible contar con un

programa de vigilancia oficial del fenómeno de la resistencia bacteriana en el sector salmonicultor nacional.

De lo anteriormente mencionado y con la experiencia de la ejecución del presente proyecto, la información y resultados obtenidos, y la revisión de guías, recomendaciones y experiencias a nivel internacional, se elaboró una propuesta de sistema de monitoreo oficial de la resistencia bacteriana patógena de peces salmonídeos.

Descripción de la propuesta de Sistema de Monitoreo

Las secciones que componen el sistema de vigilancia de la resistencia bacteriana, son las siguientes:

a) Obtención de las muestras y campañas de muestreo.

Considerando que de acuerdo a la reglamentación oficial emanada de los programas de vigilancia sanitarios del Reglamento Sanitario para la Acuicultura (RESA), y en los que de manera sistemática se deben efectuar muestreos obligatorios de ejemplares de peces, y con mayor razón con las nuevas modificaciones normativas, en que se hace obligatorio el generar antibiogramas previo o inmediatamente después de iniciar un tratamiento frente a un brote de enfermedades en un centro de cultivo, se propone que del 100% del total de dichos muestreos realizados al mes, el 25% debe ser destinado para análisis del programa oficial de vigilancia de la resistencia bacteriana. Sin perjuicio de lo anterior, el tamaño muestral para el programa oficial podrá variar dependiendo de los resultados obtenidos durante su puesta en marcha, principalmente de la frecuencia de la presentación de cepas resistentes para los distintos patógenos estudiados.

Además de la dinámica de muestras que genere esa fuente, se considera pertinente hacer un seguimiento especial de muestreos, en aquellas zonas en que se haya descrito niveles altos de resistencia en el tiempo.

Los muestreos deben ser ejecutados por personal capacitado en el área de salud de la empresa salmonera.

El muestreo debe contemplar la extracción de 15 unidades de pescado de la mortalidad fresca o moribundos (se descartan los peces de baja condición, inadaptados o deformes) como total del centro y proveniente de una o varias jaulas consideradas en el momento del muestreo como jaulas sospechosas o causantes de alguna alza de mortalidad asociada a un patógeno. Estas deben llegar al laboratorio debidamente rotuladas, en contenedores o cajas con algún medio que asegure que la muestra permanecerá bajo los 8ºC.

Una vez definido un muestreo por parte de la empresa dentro de un área considerada con alta resistencia, debe dar aviso inmediato al laboratorio con el fin de preparar la recepción de la muestra.

Los muestreos generales, se deberán acordar respecto de asegurar que sean representativos de todas las zonas bajo vigilancia a lo largo de periodos de al menos tres meses.

Por su parte, los muestreos dirigidos a las zonas de mayor resistencia se efectuaran de manera coordinada en plazos de 3 meses como máximo, de forma que en ese lapso, la totalidad de dichos muestreos se haya cubierto.

b) Ejecución de los análisis de susceptibilidad antimicrobiana

Para efectos de llevar a cabo los análisis de susceptibilidad antimicrobiana, vale decir, definir los perfiles y niveles de resistencia bacteriana, a través de antibiogramas y CMI (Concentraciones Mínimas Inhibitorias), se considera prioritario que dicho trabajo lo efectúe una unidad de verificación oficial y validada por la autoridad, con independencia en todo ámbito, y que no preste servicios comerciales de ese tipo a la industria. Adicionalmente, por el tipo de trabajo y procedimientos que deben aplicarse, dicha unidad no puede tener como prioridad el lucro, para de esta forma mantener la independencia anteriormente señalada.

De manera preliminar, y de acuerdo a definiciones que deben tomarse entre las partes involucradas, se propone a la Unidad de Referencia de Resistencia Bacteriana que está estableciendo IFOP en Puerto Montt, como dicho laboratorio de verificación.

c) Entrega de resultados y análisis

La entrega de resultados y análisis respectivos se entregarán de manera trimestral a la autoridad, no obstante, dado el sistema SIG que está disponible a través del presente proyecto, es posible efectuar consultas particulares de manera inmediata, por parte de quienes se considere pertinente que tengan acceso a dicho sistema.

d) Otros

Se considera pertinente además, la creación de un Comité Consultivo especifico para estos efectos, que pueda generar lineamientos sobre la base de los análisis de mediano y largo plazo que se vayan generando, al menos con reuniones de

carácter semestral. Dicho comité debiese ser compuesto por los representantes de la autoridad y expertos en la materia a definir y consensuar.

Dado que la dinámica del fenómeno de la resistencia bacteriana no es estática, no es factible a priori establecer las zonas de mayor interés, por lo que se propone el presente modelo de monitoreo que puede ser adaptado de acuerdo a los cambios en los perfiles y niveles de categorías que vayan dándose en el tiempo dentro de las zonas de estudio.

La propuesta de Monitoreo Oficial de la Resistencia Bacteriana para la Salmonicultura, se presenta en su totalidad en el Anexo 6.

La forma en que los resultados y análisis se expresan a los usuarios del sistema implementado, se expresa a continuación:

- Base de datos georreferenciada por zona definida: Esta contiene la información del estado de la resistencia para cada patógeno por diferentes niveles de referencia (ej: Agrupación de Concesión de Salmonera, o por región geopolítica, o por tipo de agua, etc.), siendo este una base de datos dinámica que puede responder a las necesidades del consultor.
- Sistema de información geográfica (S.I.G.): La compilación de toda la información cartográfica base permite contar con un Sistema de Información Geográfica actualizado, escalable, centralizado y multipropósito (ver ejemplo de visualización de consultas en la figura 68).

La información generada, sirve para obtener bases de datos que por su estructura pueden ser trabajadas por Agrupaciones de Concesiones de Salmoneras, ACS, por fechas de muestreo, por áreas geográficas, especie de cultivo, empresa, tipo de agua, etc.

Este tipo de manejo de información y estructura es con el que cuenta la base de datos de perfiles de resistencia bacteriana, el cual esta agrupado por ACS, y cuenta con información histórica.

La construcción de esta base de datos relacional es la plataforma de análisis para el sistema de vigilancia, que cuenta con planes de muestreo, evaluación de riesgo y alerta temprana (ver ejemplo en figura 69).

La implementación de este sistema de información geográfica y el desarrollo de bases de datos en formato “File Geodatabase” de los perfiles de resistencia, complementando con la información de muestreos actuales, nos entrega una visión espacio- temporal de la evolución y desarrollo de la resistencia bacteriana (ver figura 70).

Implementación del Sistema de Información Geográfica (S.I.G.)

La primera etapa en la implementación del S.I.G. fue definir el soporte cartográfico que albergará la información generada a partir de los muestreos, aislamientos y análisis de susceptibilidad bacterianos frente a los antimicrobianos estudiados.

La cartografía base está compuesta por dos grupos de información, uno de carácter cultural-geográfico y otro de carácter acuícola.

Toda la información trabajada y montada en el S.I.G. está normalizada y estandarizada en Datum WGS 84 ("Sistema Geodésico y Geocéntrico Mundial del año 1984” - World Geodetic System – 84), en coordenadas geográficas.

Generación de Cartografía base cultural y geográfica.

La información cultural y geográfica ha sido trabajada en dos formatos; Raster para la base territorial y Vectorial para la información cultural y geográfica.

La base territorial fue generada a partir de imágenes de radar de CGIAR Consortium for Spatial Information (CGIAR-CSI), que dispone de imágenes de 3 arcos de segundo (90 m aproximados de resolución) estas imágenes fueron descargadas para la zona de estudio y geoprocesadas para obtener un Modelo de Elevación Digital (DEM). (figura 71).

La cartografía base de carácter cultural y geográfico se extrajo de cartografía del Instituto Geográfico Militar (IGM) a escala 1:250.000. Generándose 5 niveles de información; infraestructura, topónimos, hidrografía, red vial y casco urbano cada uno de estas capas de información cuenta con su respectiva jerarquización y simbología (figura 72).

Generación de Información Cartográfica de Carácter Acuícola.

Esta información fue elaborada a base de 3 áreas temáticas como apoyo para los futuros análisis e interpretación de la información generada en los monitoreos. Las cuales son:

- Concesiones de Acuicultura; esta información se generó a partir del listado de concesiones y solicitudes publicada en la página web de Subsecretaria de Pesca hasta el 03 de enero 2011.9.

- Áreas de Manejo de Recursos Bentónicos (AMERB); información extraída del FIP 2008-29 “Regularización Cartográfica de Áreas de Manejo Decretadas a Nivel Nacional”.
- Barrios; Esta información se genero a partir de la Resolución nº450 del 23 de enero 2009.

Cada una de estas áreas temáticas de información contienen sus respectivas bases de datos y han sido jerarquizadas y simbolizadas para una mejor representación (figura 73).

- Sistema de Alerta Temprana frente a la evolución de resistencia bacteriana patógena: Se generó la relación entre las bases de información de cada zona generada en el sistema de información geográfica y un sistema de alerta temprana, con el fin de advertir de eventuales cambios en la resistencia de los diferentes patógenos, e implementar medidas de control y prevención de la misma.

Toda esta información tabular de carácter espacio-temporal de los análisis, se almacena y procesa en “File Geodatabase”, que es el formato nativo de ArcGIS, el que entrega una base de datos geoespacial interoperativa y escalable.

Para el caso especifico de los Perfiles de Resistencia, se creó una base de datos relacional “Madre” que contiene toda la información histórica por barrios desde septiembre del 2006, hasta noviembre del 2010, la que en sus campos cuenta con la información del estado de la resistencia para cada patógeno analizado en este estudio.

6.4 Objetivo Específico 3.4.: *Validar el sistema de monitoreo propuesto*

6.4.1. Ejecución piloto de la propuesta de Monitoreo

Se ejecutó una marcha piloto del Sistema de Monitoreo de la resistencia bacteriana en la salmonicultura, sobre la base de los resultados recopilados desde el 2007, lo que fundamente la propuesta mencionada en el punto anterior. Esta puesta en marcha, permitió efectuar los últimos ajustes al plan de monitoreo propuesto, a fin de obtener el Sistema de Monitoreo Oficial.

Luego de efectuada la séptima campaña de muestreo, con fecha de cierre en noviembre de 2010, se implementó una última campaña extraordinaria, denominada “piloto”, efectuada desde diciembre de 2010 a marzo de 2011, la que se basaba en los procedimientos indicados en la propuesta de Monitoreo Oficial de la Resistencia bacteriana en la salmonicultura, y que buscaba corroborar o modificar procesos a todo nivel, que se evidenciaran por efecto de su ejecución real. El detalle de los resultados de la campaña de monitoreo piloto, puede verificarse en la tabla 49.

Es así como se logró efectuar la totalidad del procedimiento para 28 nuevos aislados bacterianos patógenos de interés, y el respectivo análisis de perfiles de resistencia, los que desde el punto de vista de confirmar o no lo propuesto, entregaron como conclusión, los siguientes conceptos:

- Coordinación: Es imprescindible la coordinación con las empresas productoras, ya sea para obtener los % de aislados mínimos requeridos para la implementación del programa (asociados a la obligatoriedad de efectuar antibiogramas por diagnóstico generado según norma; ver propuesta), como

para aquellos análisis extraordinarios con carácter de dirigido que se pretenden efectuar. Papel fundamental cumplirían en este sentido, también los laboratorios de servicios, quienes debiesen entregar contramuestras a la unidad de verificación que designe la autoridad. El costo asociado a esta actividad se presenta en el punto 6.4.2.

- Muestreos: El n muestreal, y el procedimiento efectuado de toma y transporte de muestras ha dado excelentes resultados, tanto en la ejecución del proyecto como también en este monitoreo piloto. Se considera entonces no generar correcciones al mismo. Ver detalle en la sección metodológica. En el costeo efectuado, se han considerado muestreos rutinarios y dirigidos, para sectores cercanos, de lejanía media o de centros de cultivo aislados, en las regiones de Los Lagos y Aysén.

- Aislamientos: El procedimiento de aislamiento bacteriano debe ser efectuado, de acuerdo a la propuesta, por los laboratorios de diagnóstico, para efectos de los monitoreos rutinarios, y por la Unidad de Verificación, para muestreos dirigidos o extraordinarios. Para el primer grupo, no corresponden modificaciones por ser materia interna, y relacionada con las capacidades de cada laboratorio. El obtener una contramuestra del aislado o no, también se reflejará en la confirmación o no del agente patógeno presuntivo por el que se ha solicitado el análisis por parte de la empresa salmonera. Para efectos del aislamiento de muestras dirigidas, la Unidad de Verificación deberá utilizar los procedimientos estándares recomendados por la autoridad, y poseer las competencias profesionales comprobadas para ello. En términos metodológicos, no se consideran cambios como resultado de la campaña piloto. Sus costos asociados se presentan en el punto 6.4.2.

- Análisis de perfiles y niveles de resistencia: Este procedimiento es el esencial en términos del impacto que pueda o no tener la propuesta elaborada. La Unidad de Verificación debe poseer procedimientos estandarizados comprobables para efectuar los análisis de perfiles y niveles de resistencia bacteriana, a través de metodologías definidas por entidades de referencia internacional. Para el caso de agentes patógenos sin referencia, es prioritario que dicho proceso de estandarización sea abordado por la propia Unidad. La campaña piloto y parte de los análisis durante el desarrollo del proyecto, han evidenciado la necesidad prioritaria de generar procesos de estandarización de estos análisis, especialmente para efectos de agentes complejos de evaluar, como lo representan las bacterias intracelulares.

- Bases de datos: La generación de bases de datos estándares, y configuradas para su vinculación a Sistemas de Información Geográfico (SIG), ha dado lo resultados esperados. Tanto la revisión del tipo de información (ver tabla 3), como su facilidad de manejo para otros análisis complementarios, se ha confirmado como las pertinentes, por lo que no habrá modificaciones al respecto.

- Asociación a Sistema de Información Geográfico (SIG): El software y configuración presentados en la propuesta, relativa al SIG, y disponible para ser la plataforma del monitoreo presente, permite una excelente visualización por capas y tipos de datos, lográndose análisis de interés por zonas geográficas, tipo de fármaco, tipo de agente, por zona de riesgo, por categoría, etc. Asimismo, el sistema permite la generación de alertas tempranas frente a cambios en las categorías, ya sea por zonas o ACS. La campaña de monitoreo confirmó la pertinencia del sistema informático implementado. Sus costos están caracterizados en el punto de costeo.

- Informes a la autoridad: Se considera la entrega de informes trimestrales físicos no obstante, ante eventos de alerta temprana, se efectuarían reportes extraordinarios por otras vías instantáneas. Asimismo, la Autoridad podrá acceder a revisar la información en línea, a través de usuarios sin restricciones. Tanto el costo de generación de informes por parte de IFOP, como la revisión de los mismos por parte de los profesionales de la entidad pertinente, se han cuantificado respecto de sus costos, y se detallan en la siguiente sección. No hubo modificaciones al sistema propuesto.

6.4.2. Costeo de la propuesta de Monitoreo entregada

Adicionalmente y como parte de la propuesta a entregada a la Autoridad Competente, se identificaron los requerimientos de recursos humanos, equipos e infraestructura, junto al tipo de inversiones y costos operacionales necesarios para la implementación del Programa propuesto a través de la técnica de costeo basado en las actividades o ABC (“Activity Based Costing”).

La técnica de costeo basado en las actividades o ABC (“Activity Based Costing) comenzó a recibir especial atención en 1986, con la publicación de estudios realizados por el Harvard Business School. Actualmente el término ABC es ampliamente usado debido a la implementación del método en empresas de todo el mundo.

En términos generales, el método considera que los productos no consumen costos sino que los productos involucran actividades exigidas para su fabricación, dicho de otra manera, los productos demandan actividades. Es por ello que se entienden las actividades como el conjunto de labores y tareas elementales cuya realización determina los productos finales de la producción.

Elaboración de Diagrama de Flujo

A partir de la información generada para la elaboración de la propuesta de Programa Oficial de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana, se define el siguiente diagrama de flujo, en el cual se destacan las actividades de la cual participan los distintos centros de actividad (Figura 79).

Recopilación y registro de información

Para esta actividad se entrevistaron a actores involucrados con el objetivo de obtener información respecto de las actividades involucradas y de los costos asociados a cada una de ellas. La memoria de cálculo respectiva, presentada en el Anexo 7, da cuenta de esta información.

Implementación Costeo ABC

Para la ejecución de la fase 1, específicamente en lo relacionado a la definición de las actividades, se ha considerado que el Programa Oficial de Vigilancia se abastece de los siguientes productos:

- Evaluación de resistencia de *P. salmonis* aislada desde brote
- Evaluación de resistencia de *F. psychrophilum* aislada desde brote
- Evaluación de resistencia de *V. ordalii* aislada desde brote
- Evaluación de resistencia de *S. phocae* aislada desde brote
- Evaluación de resistencia de *A. salmonicida* aislada desde brote
- Evaluación de resistencia de *P. salmonis* de muestreo dirigido
- Evaluación de resistencia de *F. psychrophilum* de muestreo dirigido
- Evaluación de resistencia de *V. ordalii* de muestreo dirigido
- Evaluación de resistencia de *S. phocae* de muestreo dirigido
- Evaluación de resistencia de *A. salmonicida* de muestreo dirigido

Los generadores de costos y las actividades asociadas a cada uno de estos productos se muestran en la Anexo 7, con sus respectivos costos unitarios.

La fase 2 consideró la asignación de los costos de las actividades y los costos directos a cada uno de los 10 productos identificados obteniendo su costo total unitario, para posteriormente calcular el costo total del Programa, al proyectar este valor al número total de evaluaciones consideradas (Anexo 7).

En este sentido el Programa considera:

- 180 evaluaciones de resistencia *P. salmonis* aisladas desde brote
- 81 evaluaciones de *F. psychrophilum* aisladas desde brote
- 10 evaluaciones de *V. ordalii* aisladas desde brote
- 10 evaluaciones de *S. phocae* aisladas desde brote
- 9 evaluaciones de *A. salmonicida* aisladas desde brote
- 45 evaluaciones de resistencia *P. salmonis* de muestreo dirigido
- 20 evaluaciones de *F. psychrophilum* de muestreo dirigido
- 3 evaluaciones de *V. ordalii* de muestreo dirigido
- 2 evaluaciones de *S. phocae* de muestreo dirigido
- 2 evaluaciones de *A. salmonicida* de muestreo dirigido

De esta forma se determinó que el costo total del Programa, incluyendo todos los Centros de Actividad es de $149.532.529 anual.

Si se considera que este Programa se acopla a las actividades de vigilancia que obligatoriamente deben realizar los productores, se definen como hundidos los costos asociados a estos últimos y los relativos a las actividades vinculadas a los laboratorios de diagnóstico. De esta forma el costo que debe cubrir efectivamente el Programa Oficial de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana es de $94.050.596 anual.

6.4.3. Presentación de la propuesta de Monitoreo a la Autoridad

Se efectuó una reunión con la autoridad en el mes de mayo del presente año, de forma de dar a conocer el sistema monitoreo oficial de la resistencia bacteriana en la salmonicultura, propuesto a través del presente proyecto. Esta reunión se efectuó en dependencias del Servicio Nacional de Pesca, en la ciudad de Valparaíso. A través de presentaciones de resultados obtenidos, y dando a conocer los conceptos que sustentan la propuesta elaborada, se pudieron discutir varios temas que fortalecieron lo establecido originalmente. En la mencionada reunión participaron diversos profesionales de la Unidad de Acuicultura del Servicio.

Por otro lado, la propuesta también fue enviada para su consideración, a representantes de la Subsecretaría de Pesca.

6.5. Otras Actividades

6.5.1. Revisión de normativas y bibliografía científica

La actualización respecto de normativas nacionales e internacionales relacionadas con el fenómeno de la resistencia bacteriana, se efectuó a lo largo de toda la iniciativa. Lo mismo ocurrió con la actualización científica, la que entregó nuevos antecedentes durante la ejecución del proyecto, principalmente a nivel internacional.

a) Actualización normativa

Si bien el tema de la susceptibilidad a antimicrobianos de las bacterias patógenas de la industria salmonicultora, no es abordada explícitamente a la fecha, se está a la espera de la aprobación de las modificaciones a la Ley General de Pesca y Acuicultura, que considera una serie de aspectos que afectaran al Reglamento Sanitario de la Acuicultura, RESA (D.S. 319).

Se ha revisado el documento denominado, “Plan de Uso y Manejo de Antimicrobianos” elaborado por el Ministerio de Economía, y que explícitamente indica:

Título 2. Condiciones específicas para el uso de antimicrobianos

a) Establecer explícitamente en el reglamento la prohibición de aplicación de terapias antimicrobianas con fines profilácticos.

b) Los tratamientos terapéuticos sólo podrán ser aplicados previo diagnóstico, con prescripción extendida por un médico veterinario y siguiendo las especificaciones del registro. Asimismo, toda terapia será administrada bajo la responsabilidad del médico veterinario responsable de la salud del centro.

c) Toda terapia a aplicar requerirá de un diagnóstico clínico debiendo tomarse muestras para confirmar el diagnóstico posteriormente mediante análisis de laboratorio (cultivo y antibiograma). Se debe prever una excepción para abordar las situaciones en que por motivos de fuerza mayor (por ejemplo, cierre de puerto) no pueda realizarse oportunamente la confirmación.

d) Implementar medidas de seguimiento para evaluar la eficacia y pérdida de eficacia de los antimicrobianos.

Titulo 8. Investigación necesaria

El uso de antimicrobianos se funda en la necesidad de combatir las enfermedades. En consecuencia, si se mejora el conocimiento acerca de ellas y de las medidas que pueden ser adoptadas para evitarlas, controlarlas y erradicarlas, se estará, asimismo, propendiendo a que el uso de antimicrobianos

sea racional. De este modo, se plantea la necesidad de realizar los siguientes estudios:

- Estudios de las concentraciones mínimas inhibitorias, con el propósito de conocer el comportamiento de las diferentes cepas de patógenos prevalentes frente a las herramientas terapéuticas disponibles.
- Estudio para la estandarización de antibiogramas para evaluación de efectividad de los antimicrobianos disponibles y la eventual resistencia que se pueda estar generando.
- Estudio de generación de resistencia bacteriana áreas donde se desarrolle acuicultura.

b) Actualización científica

A través de la recopilación bibliográfica efectuada por profesionales de IFOP, con el apoyo de los equipos de trabajo de las entidades participantes del proyecto y de los expertos internacionales consultados, se ha revisado la siguiente bibliografía, la que busca respaldar algunos de las siguientes problemáticas abordadas en las actividades del proyecto:

- Técnicas diagnósticas para bacterias del género *Vibrio*.

- Caracterización de Vibrios patógenos versus ambientales.

- Métodos de evaluación de resistencia bacteriana en el género *Flavobacterium*.

- Métodos de evaluación de resistencia bacteriana para *R. salmoninarum*.

Parte de la bibliografía revisada se enuncia a continuación:

Leyton, Y. y Riquelme, C. Vibrios en los sistemas marinos costeros. Revista de Biología Marina y Oceanografía 43(3): 441-456, Diciembre 2008.

Tsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae,* determined on the basis of 16s RNA sequences. International Journal of Systematic Bacteriology. p. 8-19. 1993.

Rhodes, L.D., Nguyen, O.T., Deinhard, R. K., White, T. M., Harrell, L.W., Roberts, M. C. Characterization of *Renibacterium salmoninarum* with reduced susceptibility to macrolide antibiotics by a standardized antibiotic susceptibility test. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 80: 173–180, 2008.

Nhunga, P. H., Shaha, M. M., Ohkusua, K., Nodaa, M., Hataa, H., Suna, X.S., Iiharaa, H., Gotob, K., Masakic, T., Miyasakad, J., Ezakia T. The DNAj gene as a novel phylogenetic marker for identification of Vibrio species. Systematic and Applied Microbiology 30. 309–315, 2007

Nilsson, W.B., Strom, M. S. Detection and identification of bacterial pathogens of fish in kidney tissue using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S RNA genes. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 48: 175–185, 2002.

Cepeda, C., García-Márquez, S., Santos, Y. Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium. Aquaculture 238. 75–82, 2004.

Bruun, M.S., Schmidt, A.S., Madsen, L., Dalsgaard, I. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum.* Aquaculture 187.201–212, 2000.

6.5.2. Taller de presentación de metodologías

En el mes de agosto de 2009, se realizó el taller de presentación de metodologías en dependencias del Fondo de Investigación Pesquera (FIP), en la ciudad de Valparaíso. En la oportunidad, se presentó el proyecto y se entregó la metodología de trabajo propuesta, así como observaciones y propuestas a la misma, de forma de aclarar y fortalecer el desarrollo de la iniciativa. Asistieron a esta reunión el Sr. Rubén Pinochet ejecutivo del FIP; la Srta. Flor Uribe del Departamento de Acuicultura de la Subsecretaría de Pesca y como parte del equipo de trabajo del proyecto, asistieron a la reunión, la Sra. Maureen Alcayaga y el Sr. Sergio Contreras, investigadores del proyecto por parte de IFOP, y el Sr. Claudio Miranda, investigador a cargo del equipo de la Universidad Católica del Norte.

6.5.3. Taller de entrega resultados

De acuerdo a lo comprometido, se llevó a cabo el taller para presentar los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente iniciativa. Se consideró la participación de representantes del sector salmonicultor, y en particular, de los encargados de temas sanitarios, en las empresas que participaron apoyando la iniciativa.

El taller comprometido se efectuó el pasado 26 mes de mayo, y tal como estaba inicialmente comprometido de acuerdo a carta Gantt, se efectuaría luego de entregado el informe prefinal de la presente iniciativa. El evento se efectuó en el Salón Austral del Hotel Gran Pacífico, en la ciudad de Puerto Montt. Los objetivos de esta actividad eran dar a conocer los resultados del proyecto y sus proyecciones, así como discutir y complementar dichos antecedentes, conociendo la posición de los representantes de la industria.

El programa consideró un repaso por los objetivos del proyecto, un repaso por la metodología y resultados de las campañas de muestreo y aislamiento, una revisión de los resultados y análisis de perfiles y niveles de resistencia bacteriana, y una entrega de los conceptos de zonificación y caracterización de los resultados a través de los scores de resistencia bacteriana.

También se presentaron en forma dinámica y en vivo, las prestaciones del software que sustenta el Sistema de Información Geográfico (SIG) asociado al monitoreo de la Resistencia Bacteriana.

Finalmente se presentó la Propuesta de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura.

Detalles de esta actividad se presentan en el Anexo 8.

6.5.4. Elaboración de manuscrito en inglés

Se elaboró un documento tipo resumen ejecutivo en inglés, que entrega las principales metodologías y resultados asociados al desarrollo de la iniciativa. Este documento, puede ser el sustento de la difusión científica a nivel internacional del proyecto. El manuscrito puede revisarse en su totalidad en el Anexo 9 del presente informe.

7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Considerando la totalidad de los resultados presentados anteriormente derivados de las actividades comprometidas en este estudio, se evidencia el cumplimiento de la totalidad de lo preestablecido para la ejecución del presente proyecto.

Las campañas de muestreo efectuadas (siete completadas) para la recolección de peces se efectuaron sin mayores contratiempos, más allá de las constantes dificultades que se presentaron, principalmente en lo que se refiere al acceso a los centros de cultivo, ya sea por efecto de condiciones meteorológicas adversas, como de las restricciones impuestas por las mismas empresas en resguardo de las condiciones sanitarias y de bioseguridad de sus centros de cultivo.

En relación a las muestras de sedimento desde centros de cultivo, fue posible recolectar muestras desde centros de cultivo de salmónidos, no obstante, su poca representatividad solo permite efectuar una aproximación a la relación entre resistencia bacteriana de patógenos, persistencia de residuos de fármacos en esa matriz y la evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos en comunidades bacterianas ambientales.

Respecto al proceso de aislamiento de agentes patógenos de interés para la industria, se descarto finalmente aislar aquellos microorganismos que carecían de respaldo científico como agentes infecciosos primarios en peces, tal es el caso de *Vibrio spp*., *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomona fluorescens,* y que habían sido señalados en los informes anteriores. Si bien éstos agentes se caracterizan por ser bacterias ubiquitarias ambientales presente en diferentes cuerpos de agua (marinos y dulceacuícolas) y en el suelo, se presentan de igual forma en peces siendo en algunos casos, como lo es *P. fluorescens*, habitante normal del tracto digestivo, considerándose agentes oportunistas, principalmente en aquellas

condiciones en que los peces son sometidos a situaciones de estrés, a deficiencias en la dieta o bien injurias traumáticas; por lo que si bien en una primera aproximación podían entregar información indirecta del estado sanitario general de peces en los centros de cultivo muestreados, el hecho de generar distracción de recursos financieros y de tiempo requeridos para aislar principalmente agentes patógenos de importancia primaria para la industria, no fueron incorporados finalmente en el análisis y en los resultados de este estudio.

En lo que respecta a los patógenos de interés considerados en este estudio, *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnaris*, *Piscirickettsia salmonis, Vibrio ordalii, Streptococcus phocae, Aeromonas salmonicida, Yersinia ruckeri* y *Renibacterium salmoninarum,* se realizaron los procedimientos de aislamiento e identificación inicial la totalidad de las muestras obtenidas, siendo notorio el porcentaje de aislamientos de los patógenos *F. psychrophilum* y *P. salmonis,* antecedentes que coincide con lo reportado por las propias empresas y por los laboratorios de diagnóstico en sus análisis rutinarios.

Es importante destacar el bajo número de aislamientos obtenidos tanto a lo largo de este estudio como desde ceparios de otras entidades (laboratorios de servicio), de los patógenos *A. salmonicida y Y. ruckeri*, donde las prácticas y manejos de vacunación preventivos, así como factores estacionales podrían contribuir a la baja representatividad de éstos, sobre todo para *Y. ruckeri*, donde solo se obtuvieron aislamientos para el año 2008. En el caso particular de *R. salmoninarum*, su nulo aislamiento, coincide con la dificultad de cultivo del agente, dado el hecho de ser una bacteria intracelular de muy difícil aislamiento en condiciones de laboratorio, necesitando de medios de cultivos muy específicos. Por otro lado, su baja prevalencia además, es coincidente con la realidad observada tanto a nivel de los diferentes laboratorios como del

diagnóstico de casos clínicos en terreno a nivel de industria, donde se aprecia un bajo o nulo impacto del microorganismo en este sector productivo.

El hecho de complementar los muestreos de campo con la adquisición de cepas a los laboratorios de diagnóstico desde ceparios o desde muestras de su casuística rutinaria, permitió fortalecer tanto los números muestreales en áreas donde no fue factible el ingreso a muestrear por parte de los equipos de trabajo de IFOP, así como para enriquecer las líneas temporales en algunas Agrupaciones de Concesiones Salmoneras (ACS) o cuerpos de agua dulce donde ya se tenían muestras de otros períodos (año, o estación diferentes), lo que ha permitido generar una mejor línea base de la evolución de la resistencia bacteriana de éstos patógenos frente a diversos antibióticos.

La distribución de aislados, donde los agentes patógenos como *F. psychrophilum* y *P. salmonis* son mayoritarios, coincide con la realidad epidemiológica actual de la industria, siendo las enfermedades causadas por los mismos, las más prevalentes de la salmonicultura nacional tanto en cuerpos de agua dulce y estuarinos como en cuerpos de agua de mar, respectivamente, además de las más diagnosticadas por los profesionales de los Departamentos o Unidades de Salud de las empresas.

En relación a los resultados de la determinación de resistencia antimicrobiana en la totalidad de las cepas aisladas y evaluadas, se ha analizado el perfil de resistencia de 272 cepas de patógenos de interés que incluyen a *F. psychrophilum*, *P. salmonis*, *V. ordalii*, *Streptococcus phocae*, *Y ruckeri* y *Aeromonas salmonicida*, para los antibióticos amoxicilina, eritromicina, florfenicol, oxitetraciclina, acido oxolínico y flumequina (no se consideran los resultados del monitoreo piloto en el análisis general).

El 96,1% de la totalidad de las cepas de *F. psychrophilum* analizadas se caracterizaron por presentar sensibilidad al florfenicol, seguido de oxitetraciclina (85,9%) y flumequina (83,9%), no obstante, un 33,9% y 13,5% de las cepas presentaron resistencia al ácido oxolínico y flumequina, respectivamente. En relación a este último punto, antecedentes recopilados por la industria respecto de efectividad de tratamientos son coincidentes con los resultados informados por este estudio, por lo que el antibiótico a elección actualmente para el tratamiento clínico de la Flavobacteriosis es el florfenicol.

La mayor incidencia de resistencia a agentes antibacterianos podría deberse a procesos de mutaciones que ocurren bajo una presión de selección del fármaco, lo que determina la persistencia de tales mutaciones a nivel cromosomal, permitiendo que la bacteria exhiba una insusceptibilidad metabólica o variaciones de membrana que conduzcan a una mayor impermeabilidad a la droga. Es esperable que la incidencia de resistencia a flumequina sea menor, pues por lo general, se requiere un número mayor de mutaciones para que el microorganismo exhiba una resistencia de importancia clínica.

En el caso de *P. salmonis* el 98,7% de las cepas analizadas presentó sensibilidad a florfenicol, seguido de la amoxicilina con un 92,4%, 91,1% y 82,2% para flumequina y ácido oxolínico respectivamente. En relación a los perfiles de resistencia asociado a quinolonas de las cepas obtenidas de *P. salmonis* y específicamente al porcentaje de cepas sensibles a éstos tipos de antibióticos es llamativo, lo cual podría atribuirse a una reversión de la resistencia del agente patógeno, luego de que el sector productivo acordara desde hace casi 2 años dejar de utilizar las quinolonas como tratamiento de elección, privilegiando en su reemplazo el florfenicol.

Con respecto a la oxitetraciclina y considerando un 75,9 y 24,1% del total de cepas del patógeno analizadas que presentaron perfiles de resistencia tanto sensibles como con sensibilidad intermedia, respectivamente; antecedentes de la industria indicarían resultados variables cuando se realizan tratamientos con dicho fármaco, pudiendo ser el órgano blanco donde se aloja el agente infeccioso la causa de la efectividad o no del éxito del tratamiento, más allá de una resistencia bacteriana propiamente tal. No puede descartarse tampoco la falta de procedimientos estándares para establecer los puntos de corte para definir si una bacteria es sensible o susceptible, siendo en ese caso, el grupo de aislados con sensibilidad intermedia, factible de ser considerados resistentes al establecer nuevos parámetros en los respectivos análisis.

Respecto al perfil de resistencia para el patógeno *V. ordalii*, el 100% de las cepas evaluadas presentaron sensibilidad a ácido oxolínico, seguido de flumequina y oxitetraciclina con un 91,7% de cepas sensibles, lo que se asemeja al escenario presentado el año 2007 en centros de cultivo de agua de mar donde se utilizaban las quinolonas como antibióticos de elección para el tratamiento de cuadros clínicos de vibriosis, no obstante, a raíz de las regulaciones auto impuestas por la propia industria del salmón, hoy en día existe una restricción en el uso de quinolonas para el tratamiento de esta enfermedad, y por otro lado, las estrategias de vacunación implementadas por las empresas frente a este patógeno han generado una disminución de la aparición de cuadros clínicos, siendo actualmente casi nula la identificación de este agente tanto en terreno (signología), como en el diagnóstico de laboratorio para muestras enviadas por los profesionales del área salud de las empresas.

En relación a los resultados de susceptibilidad por antibiótico en *S. phocae*, es posible observar que el 100% de las cepas presentaron sensibilidad a amoxicilina

y eritromicina, y el 100% de los mismos aislados a su vez presentaron resistencia a ácido oxolínico y flumequina, hecho coincidente con el uso masivo de quinolonas durante años en la industria salmonicultora, pero que a diferencia de *P. salmonis*, al parecer no ha revertido durante el tiempo que ha transcurrido desde la baja en el uso de estas sustancias.

Para la cepas analizadas de *Aeromonas salmonicida,* se encuentra que el 83,3% y 66,6% de las cepas presentó sensibilidad al florfenicol y amoxicilina, respectivamente, en tanto que para las quinolonas (acido oxolínico y flumequina), el 66 y 33% de las cepas presentaron resistencia a dichos antibióticos; respectivamente.

Respecto a *Y. ruckeri*, de la totalidad de cepas evaluadas, el 100% presentó sensibilidad a la mayoría de los antibióticos.

No obstante a lo anterior, debido por una parte al bajo número de aislados de los patógenos *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* y por otro lado a la temporalidad de obtención de éstos en la totalidad de las campañas de muestreo, es que no es posible generar explicaciones que permitan evaluar el comportamiento de la resistencia bacteriana a través del tiempo.

Por otro lado, el análisis de los valores de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias, CMI, indican que para las 89 cepas de *Flavobacterium psychrophilum*, se observó un amplio rango de valores a florfenicol, distribuidos bimodalmente, en que la mayoría de las cepas presentaron valores de 0,25-0,5 µg/mL, mientras que otro grupo no menor, evidenció niveles de CMI a florfenicol superiores a 2 µg/mL, siendo estas cepas mayoritariamente aisladas durante el año 2010. La determinación de los valores de CMI de oxitetraciclina para este mismo patógeno evidenció una alta dispersión, en que la mayoría de las cepas en estudio presentó niveles de susceptibilidad ≥ 4 µg/mL. Asimismo, los valores de CMI de las

quinolonas, ácido oxolínico y flumequina presentaron una amplia dispersión, detectándose que un número importante de cepas con valores de CMI mayores a 8 µg/mL y 4 µg/mL, respectivamente. De acuerdo a lo propuesto por algunos investigadores, las cepas que presentaron valores de CMI de ácido oxolínico mayores a 8 µg/mL podrían considerarse cepas resistentes a este antibacteriano, a pesar de que aún no se definen los valores de corte epidemiológico ni los puntos de quiebre clínico para esta especie. Sin embargo, la aparición de resistencia o reducción de la susceptibilidad a este antibacteriano no es rara para esta especie, ya que esto ha sido asociado a mutaciones puntuales en el gen que codifica para la proteína DNA girasa.

Se analizaron 78 cepas de *Piscirickettsia salmonis* aisladas en el período 2008-2010, y se determinaron sus valores de CMI de florfenicol, observándose una distribución unimodal, en que la mayoría de las cepas analizadas presentó valores de CMI de 0,25-2 µg/mL. Por otra parte los valores de CMI de oxitetraciclina evidenciaron una gran dispersión, observándose algunas cepas con valores bastante altos, mientras que la mayoría exhibió niveles de susceptibilidad a este antibacteriano de 0,25-1 µg/mL. En contraposición a lo anterior, los valores de CMI de las quinolonas ácido oxolínico y flumequina evidenciaron un comportamiento de susceptibilidad a estos antibacterianos dependiente del tiempo, ya que se observa una significativa mayor susceptibilidad a ambas quinolonas de las cepas aisladas en el año 2009, en relación a aquellas aisladas en el año 2010, las que presentaron mayoritariamente una menor susceptibilidad a estos 2 antibacterianos, puesto que la mayoría de las cepas recuperadas en el 2009 presentaron valores de CMI de ácido oxolínico de 0,125-0,25 µg/mL, mientras que la mayoría de las cepas aisladas durante el 2010 exhibieron niveles de susceptibilidad a este antibacteriano de 2-4 µg/mL. Asimismo, la mayoría de las cepas aisladas durante el 2009 presentaron valores de CMI de flumequina de 0,25-0,5 µg/mL, mientras que la mayoría de las cepas aisladas durante el año

2010 presentaron valores de CMI de 1-2 µg/mL. Tal vez sea preocupante notar algunas cepas con valores de CMI significativamente altos y que pudieran implicar la presencia de mecanismos de resistencia mediados por genes de resistencia específicos que pudieran ser transferibles.

Respecto de los aislados de *Vibrio ordalii*, se pudo observar una distribución bimodal de los niveles de CMI de florfenicol y oxitetraciclina, en que 3 cepas evidenciaron valores de CMI mucho mayores a las demás. Por lo general, la mayoría de las cepas analizadas presentaron niveles altos de susceptibilidad a estos antibacterianos (≤ 0,5 µg/mL). Debido al bajo número de cepas analizadas no es factible evidenciar si esto tiene una significancia epidemiológica o pudiera ser sólo eventos aislados.

Por otra parte, las cepas de *V. ordalii* presentaron niveles altos de susceptibilidad a quinolonas, tanto a ácido oxolínico como a flumequina, con rangos de 0,0312-0,5 µg/mL y 0,0312-2 µg/mL de CMI para ácido oxolínico y flumequina, respectivamente, observándose solo una cepa con niveles menores de susceptibilidad a estos agentes, en particular a flumequina.

Se analizaron las 7 cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas durante el proyecto y se observó que la totalidad de las cepas resultaron susceptibles a florfenicol, con valores que variaron entre 1 y 8 µg/mL, evidenciando valores moderados, sugiriendo la presencia en al menos 2 cepas de mecanismos de reducción de la susceptibilidad a este antibacteriano, mediados tal vez por variaciones en la permeabilidad o la presencia de bombas de eflujo de tipo inespecíficas. De manera similar las cepas analizadas evidenciaron valores CMI de oxitetraciclina de 1 y 2 µg/mL, los que aunque están dentro del rango de susceptibilidad, son bastante importantes. En contraposición, la totalidad de las cepas de *Y. ruckeri* evidenciaron una gran susceptibilidad a la acción de quinolonas.

Con relación a los análisis para residuos de antimicrobianos realizados, se analizó un total de 205 muestras de músculo y piel, distribuidas en 13 de las 35 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras (ACS), más muestreos en agua dulce. A partir de estas 13 ACS, en 11 de ellas se detectó y cuantificó la presencia de al menos uno de los antimicrobianos de interés del proyecto.

Los antimicrobianos detectados y cuantificados en las 11 ACS con presencia de residuos fueron oxitetraciclina, florfenicol y flumequina, no detectándose presencia de residuos de amoxicilina ni eritromicina.

Esta situación se condice con las tendencias respecto del uso de antimicrobianos en la industria salmonicultora, siendo predominante la elección de florfenicol y oxitetraciclina, como los tratamientos antibacterianos a utilizar en cuadros de Piscirickettsiosis y Flavobacteriosis, siendo éstas enfermedades a su vez, las más prevalentes en el cultivo de salmónidos a nivel nacional.

Asimismo, la mayor detección del analito oxitetraciclina, obedece al hecho de que al momento de efectuar muestreos durante los brotes infecciosos, se aumentan las posibilidades de pesquisa de residuos de este fármaco luego del inicio del respectivo tratamiento, en razón del mayor tiempo de permanencia de residuos de estas sustancia en los músculos de los peces muestreados, y con respecto, por ejemplo, al florfenicol, cuya vida media en el organismo del pez es muy inferior.

Si bien el fenómeno de resistencia bacteriana adquirida a antimicrobianos no es un proceso de reversión corta en el tiempo, al efectuar el análisis de aquellas zonas donde no hubo detección de residuos, con respecto de resultados de perfiles de resistencia, es posible verificar que zonas sin residuos presentaron perfiles mayoritariamente susceptibles a todos los antimicrobianos analizados (ACS16).

No obstante lo anterior, zonas donde fue posible encontrar residuos de antimicrobianos de florfenicol y oxitetraciclina, no necesariamente presentaron perfiles resistentes en sus aislados bacterianos evaluados (ACS 17b, 12a).

Lo anterior se puede explicar sobre la base de que el fenómeno de resistencia obedece a una respuesta a la presión de selección de bacterias a través del uso continuo de antimicrobianos en una población específica de microorganismos, los que a su vez, por diferentes mecanismos, difunden esos genes a través de diversos medios intra e inter especie.

En consecuencia, el tomar muestras aisladas en el tiempo de residuos antimicrobianos en músculo, no necesariamente explicará la emergencia del fenómeno de resistencia bacteriana, sin un monitoreo permanente del uso efectivo de sustancias antimicrobianas (en cantidad utilizada y a través del tiempo), asociados a poblaciones de especies bacterianas, las que a su vez, requieren ser caracterizadas como tales.

Por otro lado, los análisis de los sedimentos provenientes de centros de cultivo evidenció la presencia de niveles moderados de bacterias heterótrofas, no observándose grandes variaciones en las distintas muestras analizadas. Cabe hacer notar que los niveles bacterianos de los sitios control no resultaron significativamente menores que aquellos de los sedimentos ubicados bajo las jaulas de cultivo, lo que sugiere niveles de eutrofización similares para los ambientes sujetos a impacto y aquellos seleccionados como controles, ubicados a 100 m de las balsas jaulas de cultivo.

En las distintas muestras analizadas no se observaron niveles relevantes de bacterias resistentes a florfenicol, pero los niveles de resistencia a oxitetraciclina y

flumequina fueron bastante elevados, siendo solo algo menores a los valores totales de bacterias heterotróficas detectadas, lo cual constituye una incógnita desde el punto de vista de su importancia como factor de riesgo en salud animal, ya que pudieran ser parte del resistoma intrínseco detectado en ambientes naturales, que se ve favorecido por la presión de selección ejercida por residuos de antibacterianos y los altos niveles de materia orgánica que se encuentran habitualmente asociados a ambientes cercanos a centros de cultivo de peces. Sería de gran interés conocer los elementos moleculares involucrados en estos microorganismos, para así definir su real impacto en la microbiota del sedimento y la factibilidad de su transferencia a patógenos de salmones, lo que pudiera constituirse en un riesgo para la eficiencia de las terapias antibacterianas utilizadas en estos sistemas de cultivo.

Se analizaron 4 cepas aisladas de los sedimento en estudio y se determinó su perfil de susceptibilidad a antibacterianos y se pudieron detectar 4 especies bacterianas aisladas desde sedimento bajo las jaulas en el sector de Puerto Cisnes y Seno Magdalena, con presencia de perfiles resistentes a antibacterianos, y que en algunos casos, representó resistencia simultánea a amoxicilina, eritromicina, florfenicol y oxitetraciclina, siendo solamente susceptible a flumequina. Al respecto, el conocer los mecanismos moleculares implicados en la generación de esta resistencia, es un tema de alto interés para conocer el eventual rol de estos agentes bacterianos, en la mantención o aparición de resistencia entre bacterias patógenas de peces.

Con relación a la utilización del análisis de riesgo, debe mencionarse que éste constituye una nueva herramienta en la toma de decisiones en el ámbito de la resistencia bacteriana, siendo previamente, más conocido y documentado su uso en materias relativas a la sanidad animal y comercio internacional.

El modelo de análisis de riesgo desarrollado en el presente estudio permite identificar las áreas más afectadas por el fenómeno de la resistencia bacteriana, considerando además de la frecuencia de presentación de bacterias resistentes, otras variables que también juegan un rol importante, como son la intensidad con la que se presentan las enfermedades bacterianas en las distintas áreas, la frecuencia de uso de los distintos principios activos y las consecuencias de un brote que resiste al tratamiento. El analizar la resistencia bacteriana desde este punto de vista más amplio permite visualizar de mejor manera el impacto de este fenómeno en la salmonicultura nacional, pudiendo servir como herramienta a la toma de decisiones por parte del sector público y privado.

La zonificación de las ACS en mar y los sectores en agua dulce en base a su riesgo de presentar brotes resistentes aquí propuesta, debiera permitir focalizar de mejor manera los recursos para los planes de vigilancia y control de la resistencia que se diseñen e implementen en el futuro y la toma de decisiones relativas a la producción y salud de peces.

A pesar de lo anteriormente expuesto, es importante considerar la robustez del modelo propuesto, sobre todo en el caso de *P. salmonis*, debido al heterogéneo número de aislados evaluados por cada ACS. En este sentido se debe considerar que las ACS mejor representadas fueron la ACS 1 y 2, mientras que el resto en general presentó pocos aislados, no superando en muchas ocasiones los 5 aislados evaluados. Debido a esto, los sectores con mayor número de aislados evaluados, deben ser considerados como los más robustos a la hora de sacar conclusiones.

En la medida que el modelo sea alimentado con nuevos datos de perfiles de resistencia para las ACS con menor número de aislados, sus resultados reflejarán de mejor forma el riesgo de la resistencia bacteriana en estas.

De manera similar, al incorporar información proveniente de otras ACS no evaluadas en el presente estudio, se generará un panorama más completo acerca del fenómeno de la resistencia bacteriana en el ambiente marino.

En el caso de los resultados del modelo de riesgo para *F. psychrophilum* para los sectores de agua dulce evaluados, los resultados son más robustos, dado el mayor número de aislados considerados en ellos. Dentro de estos se observa que aquellas zonas de mayor riesgo de presentar brotes resistentes son los sectores de agua dulce de Chiloé y la provincia de Llanquihue, mientras que aquellos que presentan menor riesgo son los sectores del lago Rupanco y de la provincia de Osorno.

Al no existir datos de prevalencias oficiales para las enfermedades bacterianas de salmónidos, la estimación de su frecuencia a partir de los registros de uso de fármacos puede estar sesgada, principalmente debido al uso de tratamientos basados en el diagnóstico clínico y la aplicación de tratamientos preventivos. Sin embargo, a la fecha esta es la mejor aproximación disponible. En la medida que se desarrollen y apliquen programas de vigilancia específicos para estas enfermedades sus resultados podrán ser incorporados al modelo de análisis de riesgo aquí propuesto, generando estimaciones del riesgo de la resistencia de mayor solidez para la toma de decisiones.

A pesar de que en la mayoría de las ACS se estimó la ocurrencia de brotes resistentes de *P. salmonis* frente a uno o más de los antibióticos evaluados, el impacto expresado en términos del producto perdido debido la resistencia se limita sólo a algunas ACS y antibióticos. Lo anterior se debe a que en la actualidad el principal fármaco utilizado en el control de esta enfermedad es el florfenicol, seguido por la oxitetraciclina, principios activos para los cuales los perfiles de resistencia evaluados no arrojaron la existencia de cepas resistentes. Sin

embargo, de mantenerse las condiciones actuales de uso de antibióticos, es probable que en el mediano plazo se comience a observar resistencia a estos agentes antimicrobianos, como ya se observa en agua dulce, lo que podría generar importantes consecuencias.

La creación de un score para los aislados basado en el resultado de su perfil de resistencia para cada antibiótico permite dar cuenta de los tres niveles de susceptibilidad que se pueden presentar en un aislado (susceptible, intermedio, resistente) y de las posibles combinaciones que se pueden dar al analizar la batería de 5 antibióticos considerados en su conjunto, sin perder información en el proceso.

En términos generales se puede decir que en las ACS en mar se presentan scores mayores que en los sectores de agua dulce, esto debido a que en estos últimos se presentan con mayor frecuencia aislados con scores de resistencia de cero.

Al igual que para el análisis de riesgo de la resistencia, cabe mencionar que en el caso de los scores para las ACS en mar se requiere contar con un mayor número de aislados, para contar con estimaciones más representativas de la realidad en cada ACS, siendo esta situación menos crítica en las ACS 1 y 2. En el caso de los sectores de agua dulce la confianza que se puede tener en los resultados es mayor, dado el mayor número de aislados analizado.

El sector de agua dulce de Chiloé fue el sector con el score más alto, siendo el único dentro de la categoría de resistencia media. El resto de los sectores de agua dulce obtuvo una categorización de resistencia baja. Cabe mencionar que este sector también presentó un alto riesgo de presentar brotes resistentes de flavobacteriosis en el modelo de análisis de riesgo.

Con los resultados de perfiles de resistencia bacteriana obtenidos, se caracterizó zonalmente a las regiones muestreadas, lo que complementado con el análisis de riesgo, se vinculó a un Sistema de Información Geográfico (SIG), herramienta básica para implementar el sistema piloto de monitoreo de la resistencia bacteriana planteado.

El diseño y construcción del S.I.G., permite contar con una poderosa herramienta de consulta y análisis espacial, y que cuenta con información cultural y geográfica que ubican espacialmente al usuario, pudiendo estos consultar sobre la información que esta visualizando, realizar consultas sobre la información tabular, realizar cálculos de distancia, cálculos de áreas, obtener coordenadas, etc.

El uso de esta plataforma para el desarrollo del S.I.G. permite manejar grandes volúmenes de información para lo cual necesariamente debemos contar con bases de datos normalizadas y estandarizadas, las que permiten relaciones de dependencia, ya sea tabular por relaciones de bases de datos, como por ejemplo: conocer por medio de una relación de datos los laboratorios que están realizando las muestras en un registro específico. Por otro lado también se pueden establecer relaciones espaciales como por ejemplo, que estaciones de muestreo están en alguna Agrupación de Concesiones de Salmonicultura (ACS).

La creación de bases de datos relacionales en formato “File Geodatabase” permite tener datos geoespaciales que entregan un alto grado de análisis espacial y la posibilidad de escalar dependiendo de las necesidades de análisis y volúmenes de información que se generen a futuro, a través de los muestreos y evolución de la resistencia de patógenos frente a los quimioterápicos usados en la industria.

Se generaron estructuras de las bases de datos estandarizadas y normalizada, con lo cual se minimiza considerablemente los márgenes de error en la búsqueda e interpretación de los datos, lo que permite realizar consultas y filtrado de información eficazmente, maximizando los tiempos de análisis en la base de datos y relaciones ya sea tabulares, geográficas o ambas.

Para el caso de los perfiles de resistencia podemos tener una visión espacio-temporal de la evolución de estos, como por ejemplo, el perfil de resistencia que presenta la “Oxitetraciclina” el año 2006 es en la ACS 16 en la región de Los Lagos en un rango “sensible” (figura 74); Para el año 2007 se aprecia en la región de Aysén y Los Lagos que está presente sus tres niveles (figura 75); El año 2008 se observa presencia en la zona insular de Los Lagos y Aysén, pero sin alcanzar el nivel de resistencia (figura 76); El año 2009 una marcada presencia en la zona norte de la región de Los Lagos, mostrando resistencia en el área del Estuario de Reloncaví (Barrio 1) y sector Fiordo de Aysén (Barrio 28b) (figura 77); Finalmente para el año 2010 la presencia de Oxitetraciclina en su nivel resistente se aprecia solamente en el barrio 10b en Chiloé (figura 78).

Este análisis visual de la evolución espacio-temporal en la presencia de Oxitetraciclina en los muestreos realizados por IFOP y los históricos catastrados, pueden ser realizados con la interacción del usuario y la información temática presente en el S.I.G. solo con la activación y desactivación de capas de información, por el hecho que cada nivel temático cuenta con su respectiva base de datos, podemos también hacer análisis de la información tabular que posee esta, como por ejemplo consultar cuantas muestras del año 2010 están en el nivel intermedio en la región de Los Lagos, fechas especificas de muestreo, que laboratorios analizaron muestras, etc.

Al realizar el análisis temporal de los perfiles de resistencia, considerando la información histórica podemos apreciar la evolución de esta en un lugar determinado, pero para que estos datos entreguen un mayor valor analítico y una mejor comprensión de la evolución temporal, necesariamente se debe contar con mayor cantidad de información, es decir, esto se traduce en robustas bases de datos espacio-temporales, lo que tiene incidencia en el sistema de alerta temprana.

Con respecto a la Guía Técnica elaborada para apoyar y difundir el correcto uso de antimicrobianos en la acuicultura, se espera que dicho documento sea ampliamente difundido entre los profesionales encargados de las temáticas sanitarias al interior de las empresas productoras de salmón. El trabajo consideró la entrega de conceptos y definiciones fundamentales para la comprensión de los fenómenos de resistencia bacteriana, los mecanismos de acción de los fármacos utilizados en la industria, los procesos y factores implicados en la surgencia y transmisión de la resistencia bacteriana, y una serie de recomendaciones adaptadas de los entidades referentes internacionales, en el manejo de las terapias antimicrobianas en el ámbito de la producción animal.

Por otro lado, se ha elaborado una propuesta de Monitoreo Oficial de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura, la que se generó sobre la base de la experiencia recopilada durante al menos, cuatro años de trabajo, en los procesos de muestreo de peces en centros, procesamiento de muestras, aislamiento de bacterias patógenas, análisis de perfiles y niveles de susceptibilidad antibiótica, y traspaso a bases de datos asociadas a sistemas de información geográfico. En consecuencia, esta propuesta tiene una base concreta y real para ser implementada como parte de los programas oficiales del Estado en el ámbito del resguardo del patrimonio sanitario del país.

El confirmar su factibilidad de implementación a través del monitoreo piloto efectuado en la última etapa de ejecución, y el afinamiento de ciertos procesos, representan una consolidación de lo propuesto. Se suma a ello, el detallado análisis de costo efectuado para su implementación, siendo desde el punto de vista financiero, un programa absolutamente factible de abordar por parte de las autoridades sectoriales, de forma anual.

Cabe mencionar que la fortaleza del programa de monitoreo presentado, recae en el ámbito técnico, siendo una serie de detalles, coordinaciones, y sobre todo su validación para generar obligatoriedades en ciertos aspectos, los que harán realmente factible su implementación. Por esta razón es fundamental la presentación que se efectuó respecto de los resultados del proyecto, y del detalle de la propuesta de monitoreo oficial, a los representantes del Servicio Nacional de Pesca.

Como se ha indicado previamente, la continuidad del trabajo efectuado y su implementación como parte de las acciones que el Estado efectúa en el ámbito sanitario en la Acuicultura, dependen de la validación y apoyo efectivo de las autoridades del sector.

Finalmente, es importante mencionar que el alcanzar los objetivos propuestos con el desarrollo de este proyecto, no hubiese sido posible sin el constante apoyo y buena predisposición de las diferentes empresas productoras de salmón que han participado en este estudio, evidenciado a través de las facilidades entregadas para acceder a los centros de cultivo durante las diferentes campañas de muestreo, tanto de agua dulce como de agua de mar, en las regiones de Los Lagos y Aysén.

8. CONCLUSIONES

A base de las actividades efectuadas y resultados logrados durante la ejecución del presente proyecto, es posible concluir lo siguiente:

- Se han ejecutado la totalidad de las actividades comprometidas en la presente iniciativa, y obtenido inéditos e interesantes resultados a través del exhaustivo análisis del fenómeno de la resistencia bacteriana a antimicrobianos en la actividad salmonicultora nacional.

- Se ha logrado establecer contactos y apoyos para con la iniciativa, de algunos de los mayores referentes a nivel mundial, en los diversos tópicos de la problemática de la resistencia bacteriana a antimicrobianos, considerando expertos en Irlanda, Dinamarca y Reino Unido.

- Durante las campañas de muestreo ejecutadas en el transcurso del proyecto, se realizaron 228 muestreos en centros de cultivo. Los centros muestreados, están incluidos en 24 de las 35 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras (ACS), representando un 68,57%, de acuerdo a la nueva estructura establecida por la autoridad para las regiones de Los Lagos y Aysén.

- Durante la ejecución total del proyecto se ha obtenido un total de 272 aislados de agentes patógenos de interés, y evaluados en lo que respecta a su perfil de resistencia. De éstas, el 57% (155) corresponden a *Flavobacterium psychrophilum*, el 29% (79) a *Piscirickettsia salmonis*, el 4,4% (12) a *Vibrio ordalii*, el 4,8% (13) a *Streptococcus phocae*, el 2,6% (7) a *Yersinia ruckeri* y el 2,2% (6) a *Aeromonas salmonicida*.

- Para ambas regiones (Los Lagos y Aysén) la especie mayormente aislada y evaluada en agua de mar fue *Piscirickettsia salmonis*, mientras que para el caso de agua dulce fue *Flavobacterium psychrophilum.*

- El 96,1% de las cepas de *Flavobacterium psychrophilum* analizadas presentaron sensibilidad al florfenicol. El 94,8% de las cepas son sensibles a amoxicilina, el 85,9% a oxitetraciclina, el 83,9% a flumequina y el 66,03% a acido oxolínico. Por el contrario el 33,9 y 13,5% presentó resistencia a ácido oxolínico y flumequina, respectivamente, el 7% presentó resistencia a oxitetraciclina y el 3,9% a florfenicol.

- En el caso de *Piscirickettsia salmonis* el 98,7% de las cepas analizadas presentó sensibilidad a florfenicol, el 92,4% a amoxicilina, el 91,1% a flumequina, el 82,2% a ácido oxolínico y el 75,9% presentó sensibilidad a oxitetraciclina. El mayor nivel de resistencia se presentó para acido oxolínico y flumequina con un 17,7 y 5%, respectivamente. El 24,1 % de las cepas presentó sensibilidad intermedia a oxitetraciclina.

- En el caso de los aislados de *Vibrio ordalii* analizados, es posible observar que el 100% de las cepas presentó sensibilidad al ácido oxolínico, seguido de la flumequina y oxitetraciclina que presentaron un 91,7% de cepas sensibles, el florfenicol con un 83,3% de cepas sensibles y finalmente la amoxicilina con un 75% de cepas sensibles.

- En el caso de los aislados de *Streptococcus phocae* analizados, es posible observar que el 100% de las cepas presentaron sensibilidad a los antibióticos amoxicilina y eritromicina, como resistencia a acido oxolínico y flumequina. Para el antibiótico oxitetraciclina, un total de 7 cepas presentaron sensibilidad intermedia y 1 cepa presentó resistencia al fármaco.

- Para la cepas analizadas de *Aeromonas salmonicida,* un 83,3% de las cepas presentó sensibilidad al florfenicol, seguido de la amoxicilina con un 66,6% de cepas sensibles. Para el ácido oxolínico, el 66% de las cepas presentaron resistencia a este antibiótico, seguido de oxitetraciclina, flumequina y amoxicilina con un 33% de cepas resistentes para cada uno de los fármacos.

  Para la cepas analizadas de *Yersinia ruckeri,* el 100% de las cepas presentó sensibilidad a los antibióticos amoxicilina, florfenicol, oxitetraciclina, acido oxolínico y flumequina.

- Respecto a las Concentracio*nes Mínimas Inhibi*torias (CMI), se evaluaron 89 cepas de *F. psychrophilum*, 78 cepas de *P. salmonis*, 12 cepas de *V. ordalii* y 7 cepas de *Y. ruckeri*.

- Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias, CMI, para *Flavobacterium psychrophilum* de florfenicol, evidenciaron, en su mayoría, cepas con valores de entre 0,25-0,5 µg/mL, mientras que otro grupo, mayoritariamente de cepas aisladas durante el año 2010, evidenciaron niveles de CMI para este mismo antimicrobiano, superiores a 2 µg/mL.

- La determinación de los valores de CMI de oxitetraciclina para este mismo patógeno, evidenció una alta dispersión, en que la mayoría de las cepas en estudio presentó niveles de susceptibilidad ≥ 4 µg/mL. Asimismo, los valores de CMI de las quinolonas, ácido oxolínico y flumequina presentaron una amplia dispersión, detectándose un número importante de cepas con valores de CMI mayores a 8 µg/mL y 4 µg/mL, respectivamente.

- Por otro lado, para el caso de las CMI para *Piscirickettsia salmonis* aisladas en el período 2008-2010, se determinaron valores de florfenicol, observándose una distribución unimodal, en que la mayoría de las cepas analizadas presentó valores de CMI en el rango 0,25-2 µg/mL.

- Por su parte, los valores de CMI de oxitetraciclina para este mismo patógeno, evidenciaron una gran dispersión, observándose algunas cepas con valores bastante altos, mientras que la mayoría exhibió niveles de susceptibilidad a este antibacteriano de 0,25-1 µg/mL.

- En contraposición a lo anterior, los valores de CMI de las quinolonas ácido oxolínico y flumequina evidenciaron un comportamiento de susceptibilidad a estos antibacterianos, asociado al año de aislamiento, ya que se observa un significativo aumento de la susceptibilidad a ambas quinolonas, de las cepas aisladas en el año 2009, en relación a aquellas aisladas en el año 2010.

- Para el resto de los agentes patógenos evaluados, y en razón de los pocos aislados evaluados respecto de sus CMI, no es factible establecer aseveraciones concluyentes.

- Con relación a los análisis para residuos de antimicrobianos realizados, se analizó un total de 205 muestras de músculo y piel, distribuidas en 13 (37,1%) de las 35 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras (ACS), más muestreos en agua dulce. A partir de estas 13 ACS, sólo en 11 de ellas (85%) se detectó y cuantificó la presencia de al menos uno de los antimicrobianos de interés del proyecto.

- Oxitetraciclina, florfenicol y flumequina, fueron los únicos antimicrobianos detectados y cuantificados en las 11 ACS con presencia de residuos. Amoxicilina y eritromicina, no se detectaron en ninguna de las 13 ACS muestreadas.

- De los tres analitos cuantificados, oxitetraciclina fue el más detectado y cuantificado en las ACS con presencia de residuos en 10 ACS de las 13; en tanto que florfenicol y flumequina se cuantificaron en la ACS 12a – 23a y 17b; respectivamente. Lo anterior, coincide con la actual realidad de la industria, debido a que de los analitos encontrados, oxitetraciclina es el antimicrobiano más utilizado en los centros de cultivo.

- En relación a los análisis efectuados en muestras de sedimentos de centros de cultivo, se puede apreciar una nula pesquisa de residuos en esa matriz, para las localidades muestreadas.

- No obstante lo anterior, esas mismas muestras presentaron bacterias con niveles importantes de perfiles de resistencia a oxitetraciclina y flumequina, tanto en muestras de lejanía como aquellas tomadas bajo las balsas jaulas.

- A partir del modelo de análisis de riesgo propuesto se estimó el número de brotes causados por cepas de *P. salmonis* y *F. psychrophilum* resistentes para centros de cultivo de mar y agua dulce (piscicultura y lago), respectivamente.

- Las ACS de riesgo alto de brotes causados por cepas resistentes de *P. salmonis* son las ACS 1, 10a, 12a y 17b; las de riesgo intermedio son las ACS 2, 9b, 17a y 19a; las de riesgo bajo son las ACS 3a, 3b, 16 y 18c.

- Dada la cantidad de aislados analizados por ACS, la mayor robustez de los resultados en el ambiente marino se encuentra en las ACS 1 y 2.

- Los sectores de agua dulce se agruparon en zonas de riesgo alto y bajo. Dentro del primer grupo se encuentran el sector de agua dulce de Chiloé y la provincia de Llanquihue, mientras que en el segundo se agrupan el lago Rupanco, la provincia de Osorno, el lago Llanquihue y la provincia de Palena.

- En el caso de las estimaciones de los brotes resistentes de *F. psychrophilum*, los resultados del modelo son más robustos, dado el mayor número de aislados de este patógeno analizados.

- A partir de los perfiles de resistencia de cada aislado se diseño un score de resistencia para cada zona en estudio, generándose tres categorías, alta, intermedia y baja.

- La única ACS para la que se estimó un riesgo alto de brotes causados por cepas resistentes de *P. salmonis* fue la ACS 10a; las ACS para las que se estimó un riesgo intermedio son las ACS 1 y 12a; para el resto de las ACS estudiadas se estimó un nivel de riesgo bajo (ACS 2, 3a, 3b, 9b, 16, 17a, 17b, 18c, 19a, 28b y 30a).

- Los sectores de agua dulce se agruparon en zonas de riesgo alto y bajo. Dentro del primer grupo se encuentran la provincia de Llanquihue y el sector de agua dulce de Chiloé, mientras que en el segundo se agrupan el lago Rupanco, la provincia de Osorno, el lago Llanquihue y la provincia de Palena.

- Para la resistencia de *P. salmonis* sólo la ACS 3a fue categorizada como zona de resistencia alta, mientras que la categoría de zona de resistencia media le correspondió solo a la ACS 10a. El resto de las ACS fue categorizado como zonas de resistencia baja (1, 2, 3b, 9b, 12a, 16, 17a, 17b, 18c, 19a, 28b y 30a).

- Dada la cantidad de aislados analizados por ACS, la mayor robustez de los scores de resistencia en el ambiente marino se da en las ACS 1 y 2.

- En el ambiente de agua dulce la mayoría de los scores de resistencia fueron bajos, quedando los sectores así evaluados en la categoría de resistencia baja. El único sector con categoría de resistencia media fue el sector de agua dulce de Chiloé, no habiendo sectores con categoría de resistencia alta.

- Los resultados de agua dulce son más robustos, dado el mayor número de aislados analizados en este ambiente.

- La categorización de sectores presentada corresponde a una visualización presente de los resultados y análisis del proyecto, y debe entenderse que las clasificaciones de las zonas corresponden a un proceso dinámico que variará en función de los nuevos muestreos y evaluaciones de susceptibilidad a antimicrobianos.

- Las herramientas de manejo/remediación del fenómeno de la resistencia bacteriana propuestas, se deben implementar a niveles centrales, locales y personales, los que en su conjunto, permitirán abordar de una manera exitosa esta problemática.

- El Sistema de Información Geográfica se debe entender como una herramienta que debe estar continuamente alimentándose de información, ya que de esta depende el grado de análisis y de interpretación de los datos, considerando que a mayor cantidad de información, mayor será la riqueza de los resultados y análisis que puedan efectuarse.

- Como se puede apreciar en un análisis temporal realizado para la evolución de la resistencia de un fármaco de interés para sectores determinados, es necesario tener en cuenta que se deben establecer mecanismos de almacenamiento y traspaso de información entre instituciones, que cautelen la completa entrega de información histórica, a fin de contar con un completo catastro.

- Los S.I.G. son sistemas dinámicos de almacenamiento, visualización y análisis de información, lo que conlleva a un periodo de inducción en este tipo de tecnologías para comprender arquitecturas y potencialidades de estos; ya que con esta mirada global y particular del manejo de información, estos pueden convertirse en útiles herramientas para la toma de decisiones.

- La Guía de Buenas Prácticas elaborada, representa una base de conocimiento técnico respecto del uso y modulación de sustancias antimicrobianas, y para la mejor comprensión del fenómeno de resistencia bacteriana de agentes patógenos de peces, por lo que requiere de una amplia difusión entre los profesionales encargados del manejo de las temáticas sanitarias en el sector salmonicultor.

- Un programa oficial de monitoreo, requiere para su implementación, generar plataformas técnicas robustas, que consideren la implementación

de técnicas de evaluación de susceptibilidad antimicrobiana y la interpretación de resultados, con un estándar de calidad internacional y validado.

- Con relación a la propuesta de Monitoreo de la Resistencia Bacteriana, esta se diseñó sobre la base de la experiencia de ejecución del presente proyecto, y de los análisis y conclusiones efectuadas. Adicionalmente, fue confirmada respecto de su configuración y factibilidad, con el Monitoreo Piloto y el costeo de su implementación, efectuados.

- Tanto el programa propuesto de monitoreo, así como la guía diseñada para difundir el uso responsable de antimicrobianos y el manejo de la resistencia en la industria salmonicultora, requieren del respaldo de las autoridades pertinentes, de forma de lograr su validación y aplicación sectorial.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alderman, D.J., Hastings, T.S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance—potential for consumer health risks. Int. J. Food Sci. Technol. 33, 139–155.

Alderman, D.J., Michel, C.,1992. Chemotherapy in aquaculture today. Pages 3-24. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Alderman, D.J., Smith, P., 2001. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. Aquaculture 196: 211–243.

Allen, D.A., Austin, B. et Colwell, R.R. 1983. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 599-604.

Alvarado, V., Schafer, J.W., Enriquez, R. & M. Monras. 1990. Salmonicultura en Chile. Estado Actual, Proyecciones y Estado Sanitario. Medio Amb. 11, 9-14.

Andersen, S. R., and R. A. Sandaa. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 60:908–912.

Angulo, F.J. 2000. Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on health. APUA Newsletter 18: 1–6.

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. EUA.

Aoki, T. 1992. Present and future problems concerning the development of resistance in aquaculture. Pages 254-262. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Aoki, T., Kitao, T., Iemura, N., Mitoma, Y., Nomura, T., 1983. The susceptibility of *Aeromonas salmonicida* strains isolated in cultured and wild salmonids to various chemotherapeutics. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49, 17-22.

APHA. 1992. Microbiological examination. In Standard methods for the examination of waste and wastewater., 18th ed. Greenberg, A.E., Clesceri, L.S. & Eaton, A.D. (Eds.). pp. 9.1-9.147, Washington DC. American Public Health Association.

Austin, B. & D.A. Austin. 1987. Gram negative pigmented rods. *In:*Bacterial fish pathogens. Academic Press, London. Pages 225-249.

Austin, B. 1982. Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing unit. *J. Appl. Bacteriol.* 53. 253-268.

Austin, B. 1985b. Chemotherapy of bacterial fish diseases. *In*: Ellis, A. E. Fish and shellfish pathology. Academic Press, London. Pages 19-26.

Barnes, A.C., Hastings, T.S. & S.G.B. Amyes. 1995. Aquaculture antibacterials are antagonized by seawater cations. *J. Fish Dis.* 18: 463-465.

Bast, L., Daly, J.G., deGrandis, S.A. & R.M.W. Stevenson. 1988. Evaluation of profiles of *Aeromonas salmonicida* as epidemiological markers of furunculosis infections in fish. *J. Fish Dis.* 11: 133-145.

Benzécri, J. P. 1973. L'Analyse des Dones. Tome 2: L'Analyse des Correspondences. Paris, Dunod.

Bernoth, E.M. 1991. Possible hazards due to fish drugs. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*. 11: 17-21.

Björklund, H. & G. Bylund. 1990. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture.* 84: 363-372.

Björklund, H., Bondestam, J. & G. Bylund. 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture.* 86: 359-367.

Björklund, H., Eriksson, A. & G. Bylund. 1992. Temperature-related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture.* 102: 17-27.

Björklund, H., Raberg, C.M.I. & G. Bylund. 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture.* 97: 85-96.

Brown, J.H. 1989. Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture.* 20: 34-43.

Brunn, M.S., Schmidt, A.S., Madsen, L. & I. Dalsgaard. 2000. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture.* 187: 201-212.

Capone, D.G., Weston, D.P., Miller, V. & C. Shoemaker. 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture.* 145: 55-75.

CDC. 2001. Interagency Task Force on Antimicrobial Resistance. A public health action to combat antimicrobial resistance. Part I: Domestic Issues. Documento disponible en http://www.cdc.gov/drugresistance/actionplan/index.htm (acceso noviembre de 2008).

Chang, J.W. & F.D. Pien. 1986. Marine acquired infections. Hazards of the ocean environment. *Mar. Infect.* 80, pp. 30, 32, 37, 41.

Chopra, I., Roberts, M.R., 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Molec. Revs. 65, 232-260.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006a. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Approved guideline M-42-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006b. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Approved guideline M-49-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

CLSI. 2005. Method for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; proposed guideline. CLSI document M-49-P.

Coyne, R., Hiney, M. & P. Smith. 1997. Transient presence of oxytetracycline in blue mussels (*Mytilus edulis*) following its therapeutic use at a marine Atlantic salmon farm. *Aquaculture.* 149: 175-181.

Coyne, R., Hiney, M., O'Connor, B., Kerry, J., Cazabon, D. & P. Smith. 1994. Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture.* 123: 31-42.

Cravedi, J.P., Choubert, G. & G. Delous. 1987. Digestability of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestability. *Aquaculture.* 60: 133-141.

Dalsgaard, I. 2001. Selection of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria. Review article. Aquaculture. 196, 267-275.

DeGrandis, S.A. & R.M.W. Stevenson. 1985. Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrob. Ags. Chemother.* 27: 938-942.

DePaola, A. 1995. Tetracycline resistance by bacteria in response to oxytetracycline-contaminated catfish feed. *J. Aquat. Anim. Health*. 7: 155-160.

DePaola, A., Flynn, P.A., McPhearson, R.M. & S.B. Levy. 1988. Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline- and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1861-1863.

EMEA. 2003. Committee for Veterinary Medicinal Products, Future Strategy on Antimicrobial Resistance. EMEA/CVMP/558/03-FINAL.

EMEA. 2000. A risk management strategic plan for controlling antimicrobial resistance through the authorisation of veterinary medicines. EMEA/CVMP/818/99-FINAL.

Enger, O., Husevag, E. & J. Goksϕyr. 1989. Presence of the fish pathogen *Vibrio salmonicida* in fish farm sediments. *Appl. Environ. Microbiol*. 55: 2815-2818.

FAO/WHO/OIE. 2003. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific assessment, Geneva, December 1-5, 2003.

FAO/WHO/OIE. 2004. Second Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Management options, 15-18 March 2004, Oslo, Norway.

FAO/WHO/OIE. 2006. Report of a Joint. Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance, 13–16 June 2006, Seoul, Republic of Korea.

Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T., Ohta, M. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolated. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5336-5342.

Gherna, L.R. 1994. Culture preservation. In: Gerhardt, P., Murray, R.E.G., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds.), Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 278-292.

Giles, J.S., Hariharan, H. & S.B. Heaney. 1995. The plasmid profiles of fish pathogenic isolates of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio ordalii* from the Atlantic and Pacific coasts of Canada. *Can. J. Microbiol.* 41: 209-216.

Goldberg, R.J., Elliot, M., Taylor, R. 2001. Marine aquaculture in the United States: Environmental impacts and policy options. Pew Oceans Comisión. pp. 1-33.

Gratzek, J.B. 1983. Control and therapy of fish diseases. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 27: 297-324.

Grave, K., Lingaas, E., Bangen, M., Rønning, M. 1999. Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996. J. Antimicrob. Chemother. 43, 243-252.

Griffiths, S.G. & W.H. Lynch. 1989. Characterisation of *Aeromonas salmonicida* mutants with low level resistance to multiple antibiotics. *Antimicrob. Ags. Chemother*. 33: 19-26.

Hansen, P.K., Lunestad, B.T. & O.B. Samuelsen. 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Pages 174-178. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Hansen, P.K., Lunestad, B.T. & O.B. Samuelsen. 1993a. Effects of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Can. J. Microbiol*. 39: 1307-1312.

Haug, T. & P.A. Hals. 2000. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*) in freshwater at low temperature. *Aquaculture.* 186: 175-191.

Hawke, J.P. & R.L. Thune. 1992. Systemic isolation and antimicrobic susceptibility of *Cytophaga columnaris* from commercially reared channel catfish *Ictalurus punctatus*. Journal of Aquatic Animal Health, 4:109-113.

Hedges, R.W., Smith, P. & Brazil, G. 1985. Resistance plasmids of Aeromonas. Journal of General Microbiology, 131, 209 1-2095.

Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V. & M. Yndestad. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture.* 133: 175-184.

Hinton, M., Hedges, A.J., Linton, A.H., 1985. The ecology of *Escherichia coli* in market claves fed a milk-substitute diet. J. Appl. Bacteriol. 58, 27–35.

Hoff, K.A. 1989. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1775-1786.

Hustvedt, S.O., Salte, R., Kvendset, O. & V. Vassvik. 1991. Bioavailability of oxolinic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) from medicated feed. *Aquaculture*. 97: 305-310.

Inglis, V., Yimer, E., Bacon, E.J. & S. Ferguson. 1993. Plasmid-mediated antibiotic resistance in *Aeromonas salmonicida* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *J. Fish Dis.* 16: 593-599.

Ishida, N. 1992. Tissue-levels of oxolinic acid after oral or intravascular administration to freshwater and seawater rainbow trout. Aquaculture 102, 9-15.

Jacobsen, M.D. 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimethoprim. *J. Fish Dis.*12: 29-36.

Jacobsen, P. & L. Berglind. 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture.* 70: 365-370.

Johnson, D. E. 2000. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Thomson Editores, S. A. de C. V.

Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Cazabon, D., NicGabhainn, S. & Smith, P. 1994. Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in microorganisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. Aquaculture, 123: 43-54.

Klein, B.U. & K.H. Boehm. 1994. Examinations about transferable antibiotic resistance on obligate and facultative fish pathogenic bacteria. *Internat. Symp. Aquat. Anim. Health.* Univ. Calif. Davis. p. P-41 (Abstract).

Kupka-Hansen, P., Lunestad, B.T. & O.B. Samuelsen. 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Pages 174-178. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

La Rosa, T., Mirto, S., Mazzola, A., Danovaro, R. 2001. Differential responses of benthic microbes and meiofauna to fish-farm disturbance in coastal sediments. Environ. Pollut. 112, 427–434.

Lewin, C.S. 1992. Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms. Pages 288-301. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizootics, Paris.

Logue, J.B., Robinson, C.T., Meier, C. & J.R. Van der Meer. 2004. Relationship between sediment organic matter, bacteria composition, and the ecosystem metabolism of alpine streams. Limnology and Oceanography. 49, 2001–2010.

Lunestad, B.T. & J. Goksϕyr. 1990. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Dis. Aquat. Org.* 9: 67-72.

Lunestad, B.T. 1992. Fate and effects of antimicrobial agents in aquatic environments. Pages 152-161 *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Marshall, S.A., Jones, R.N., Wanger, A., Washington, J.A., Doern, G.V., Leber, A.L., Haugen, T.H. 1996. Proposed MIC quality control guidelines for National Committee for Clinical laboratory standards susceptibility tests using seven veterinary antimicrobial agents: ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, penillin G-novobiocin, pirlimycin, premafloxacin, and pectinomycin. J. Clin. Microbiol. 34, 2027–2029.

Martinsen, B. & T.E. Horsberg. 1995. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolonic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10°C. *Antimicrob. Ags. Chemother.* 39. 1059-1064.

Martinsen, B., Myhr, E., Reed, E. & T. Hastein. 1991. *In vitro* antimicrobial activity of sarafloxacin against clinical isolates of bacteria pathogenic to fish. *J. Aquat. Anim. Health.* 3: 235-241.

Midtvedt, T. & E. Lingaas. 1992. Putative public health risks of antibiotic resistance development in aquatic bacteria. *In*: C. Michel & D. Alderman (Eds.), Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizooties, Paris, pp. 302-314.

Miller, R., Walter, R., Carson, J., Coles, M., Coyne, R., Dalsgaard, I., Gieseker, C., Hsu, H., Mathers, J., Papapetropoulou, M., Petty, B., Teitzel, C., Reimschuessel, R. 2005. Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. Dis. Aquat. Org. 64, 211-222.

Miller, R.A., Walker, R.D., Baya, A., Clemens, K., Coles, M., Hawke, J.P., Henricson, B.E., Hsu, H.M., Mathers, J.J., Oaks, J.L., Papapetropoulou, M., Reimschuessel, R. 2003. Antimicrobial susceptibility testing of aquatic bacteria: quality control disk diffusion ranges for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 at 22 and 28°C. J. Clin. Microbiol. 66, 24–26.

Miranda, C.D. & R. Rojas. 2007a. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. Aquaculture. 266: 39-46.

Miranda, C.D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., Roberts, M.C. 2003. Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria From Chilean Salmon Farms. Antimicrob. Ags. Chemother. 47, 883-888.

Miranda, C.D., Rojas, R. 2007b. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in skin mucus of farmed salmon (*Salmo salar*, Linnaeus) in Chile. Proceedings World Aquaculture 2007, Science for Sustainable Aquaculture, February 26-March 2, 2007 San Antonio, Texas, United States.

Miranda, C.D., Rojas, R., Hurtado, L. 2005. Role of salmon farm sediments as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria in Chilean salmon farming. Proceedings 45st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and

Chemotherapy ICAAC 2005 December 21-26, 2005 Washington, United States.

Miranda, C.D., Zemelman, R. 2002a. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. Aquaculture. 212, 31–47.

Miranda, C.D., Zemelman, R. 2002b. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. Sci. Total Environ. 239, 207–218.

Monnet, D. L., Sørensen, T. L. 1999. Interpreting the effectiveness of a national antibiotic policy and comparing antimicrobial use between countries. The Journal of hospital infection 1999;43(3):239-42.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standard M31-A2. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2005. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; a report. NCCLS document M42-R.

Nygaard, K., Lunestad, B.T., Hektoen, H., Berge, J.A. & V. Hormazabal. 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture.* 104: 31-36.

OIE. 2004. Código sanitario para los animales acuáticos 2004. Análisis de Riesgo. Consideraciones generales. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/fcode/E_00014.htm

OIE. 2004. Handbook on Import Risk Análisis for Animals and Animal Products, Volume 1 and 2. Paris, France.

OIE. 2010. Terrestrial Animal Health Code. Paris, France.

OMS. 2000. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Ginebra. Suiza.

OMS. 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra. Suiza.

Petersen, A., Andersen, J.S., Kaewmak, T., Somsiri, T., Dalsgaard, A. 2002. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in pond environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6036-6042.

Pursell, L., Samuelsen, O.B. & P. Smith. 1995. Reduction in the *in vitro* activity of flumequine against *Aeromonas salmonicida* in the presence of the concentrations of divalent cations found in sea water. *Aquaculture.* 135: 245-255.

Rasmussen, F. 1988. Therapeutics used in fish production: pharmokinetics, residues and withdrawal periods, EIFAC/XV/88Inf. 13, 22p. FAO, Rome.

Roberts, M.C. 1994. Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends in Microbiol.* 2: 353-357.

Rogstad, A., Hormazabal, V., Ellingsen, O.F. & K.E. Rasmussen. 1991. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish: 1. Absorption, distribution and accumulation in Rainbow trout in fresh water. *Aquaculture.* 96: 219-226.

Sϕrum, H., Poppe, T.T. & ∅. Olsvik. 1988. Plasmids in *Vibrio salmonicida* isolated from salmonids with hemorrhagic syndrome (Hitra disease). *J. Clin. Microbiol*. 26: 1679-1683.

Sϕrum, H., Roberts, M.C. & J.H. Crosa. 1990. Isolation and characterization of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida,* pp. 45-48. *In* O. Olsvik & G. Bukholm (ed.). Application of molecular biology in diagnosis of infectious diseases. Norwegian College of Veterinary Medicine. Oslo, Norway.

Sϕrum, H., Roberts, M.C. & J.H. Crosa. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrob. Ags. Chemother.* 36: 611-615.

Saitanu, K., Chongthaleong, A., Endo, M., Umeda, T., Takami, K., Aoki, T. & T. Kitao. 1994. Antimicrobial susceptibilities and detection of transferable R-plasmids from *Aeromonas hydrophila* in Thailand. *Asian Fish. Sci.* 7:41-46.

Saito, K., Egusa, S., Arai, T. & T. Aoki. 1977. Drug resistant bacteria and their conjugative R plasmids isolated from materials related with fish culture in USA. *Fish Pathol*. 12: 77-86.

Samuelsen, O.B. 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture.* 83: 7-16.

Samuelsen, O.B. 1992. The fate of antibiotics/chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. Pages 162-173. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T., Husevag, B., Hϕlleland, T. & A. Ervik. 1992a. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. *Dis. Aquat. Org.* 12: 111-119.

Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T., Ervik, A. & S. Fjelde. 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture.* 126: 283-290.

Sandaa, R.A. & O. Enger. 1994. Transfer in marine sediments of the naturally ocurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4234-4238.

Schlotfeldt, H.J. 1992. Current practices of chemotherapy in fish culture. Pages 25-38. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, París.

Schlotfeldt, H.J., Neumann, W., Fuhrman, H., Pfortmueller, K. & H. Boehm. 1985. Bacterial remarks on increasing resistance of fish pathogenic and facultative fish pathogenic bacteria in lower Saxony (FRG). *Fish Pathol.* 20: 85-91.

Schmidt, A., Bruun, M., Dalsgaard, I., Larsen, J.L. 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl. Environ. Microbiol*. 67: 5675-5682.

Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L. 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish Rainbow trout farms. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4908-4915.

Smith, P. 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture.* 146: 157-269.

Smith, P., Hiney, M.P. & O.B. Samuelsen. 1994a. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. *Ann. Rev.Fish Dis.* 4: 273-313.

Starliper, C.E., Cooper, R.K., Shotts, E.B. & P.W. Taylor. 1993. Plasmid-mediated Romet resistance of *Edwarsiella ictaluri. J. Aquat. Anim. Health.* 5: 1-8.

Steers, E., Foltz, E.L., Graves, B.S., Riden, J. 1959. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. 9, 307–311.

Toranzo, A.E., Barja, J.L., Colwell, R.R. & F.M. Hetrick. 1983. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infect. Immun.* 48: 184-192.

Toranzo, A.E., Combarro, P., Lemos, M.L. & J.L. Barja. 1984. Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 872-877.

Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Bandín, Y, Santos, Y. & J.L. Barja. 1992. Evaluation of the sensibility of bacterial fish pathogens to different antimicrobial compounds. Pages 315-325. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizootics, Paris.

Torsvik, V.L., Sorheim, R. & J. Goksϕyr. 1988. Antibiotic resistance of bacteria from fish farm sediments. ICES Report, C. M. 1 988/F:10.

Van der Heijden, M.H.T., Keukens, H.J., van den Nieuwboer, W.H.F.X., Mengelers, M.J.B. & J.H. Boon. 1994. Plasma disposition of flumequine in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758), african catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) and european eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) after a single peroral administration. *Aquaculture.* 123: 21-30.

Van der Heijden, M.H.T., van Muiswinkel, W.B., Grondel, J.L. & J.H. Boon. 1992. Immunomodulating effects of antibiotics. Pages 219-230. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizootics, Paris.

Vaughan, S., Coyne, R. & P. Smith. 1996. The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a freshwater fish farm. *Aquaculture.* 139: 47-54.

Vezzulli, L., Chelossi, E., Riccardi, G., Fabiano, M. 2002. Bacterial community structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian Sea (Western Mediterranean). Aquac. Int. 10, 123–141.

VICH. 2003. Guidance on pre-approval information for registration of new veterinary medicinal products for food producing animals with respect to antimicrobial resistance. Guidance VICH 27, December 2003, Final.

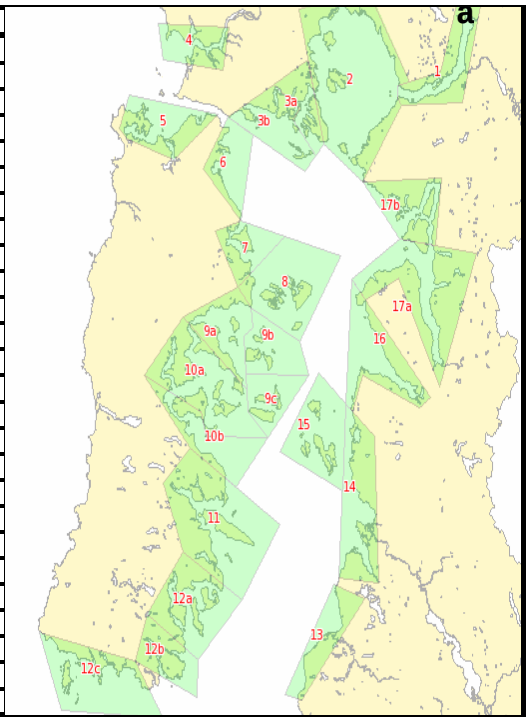
Vose, D. 2004. Risk analysis. A quantitative guide. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Ltd. Great Britain.

Young, H. K. 1993. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. J. Antimicrob. Chemother. 31:627-635.

Zhao, J., and T. Aoki. 1992. Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. Microbiol. Immunol. 36:1051–1060.

F I G U R A S

Nº ACS	Nombre (X Región)
1	ESTUARIO RELONCAVI
2	SENO RELONCAVI
3a	CALBUCO
3b	ABTAO - COLACO
4	MALLLIN
5	ANCUD
6	CHILOE NORTE
7	QUEMCHI
8	BUTACHAUQUES
9a	DALCAHUE
9b	QUENAC
9c	APIAO
10a	CASTRO - LEMUY
10b	CANAL YA
11	COMAU
12a	QUELLON
12b	SAN PEDRO
12c	QUILAN
13	CORCOVADO
14	CHAITEN
15	DESERTORES
16	RENIHUE
17a	COMAU
17b	HORNOPIREN
17b	HORNOPIREN
17b	HORNOPIREN



Nº ACS	Nombre (XI Región)
18a	MELINKA
18b	MORALEDA NORTE
18c	CANAL PEREZ NORTE
18d	CANAL BAEZA
19a	CHAFFERS NORTE
19b	CHAFFERS SUR
19c	CANAL ALANTA
20	CANAL KING
21a	ISLA JORGE
21b	CANAL PEREZ SUR
21c	CANAL NINUALAC
22a	ISLA KENT
22b	CANAL CARRERA DEL CHIVATO
22c	BUTAN
22d	CANAL DARWIN
23a	CANAL VICUÑA
23b	CANAL CHACABUCO
23c	SKYRING
24	BARROS ARANA
25	CUPQUELAN
26a	ESTERO ELEFANTES
26b	CANAL COSTA
27	QUITRALCO
28a	CHURRECUE-HELENA
28b	FIORDO AYSEN
29	ISLA QUEMADA
30a	ISLA ESTER
30b	ISLAS HUICHAS
31a	PANGAL
31b	SENO CANALAD
32	FIORDO PUYUGUAPI
33	YACAF-GALA
34	MELIMOYO
35	RAUL MARIN BALMACEDA

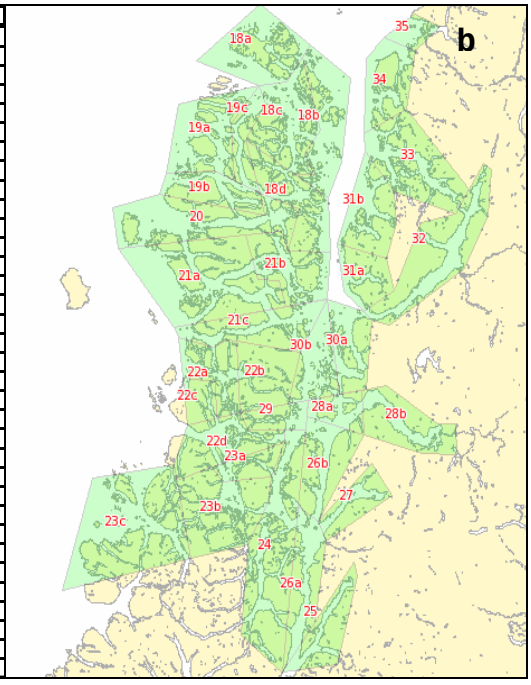


Figura 1 (a,b). Número y áreas de Agrupación de Concesiones Salmoneras en las regiones de Los Lagos y Aysén.

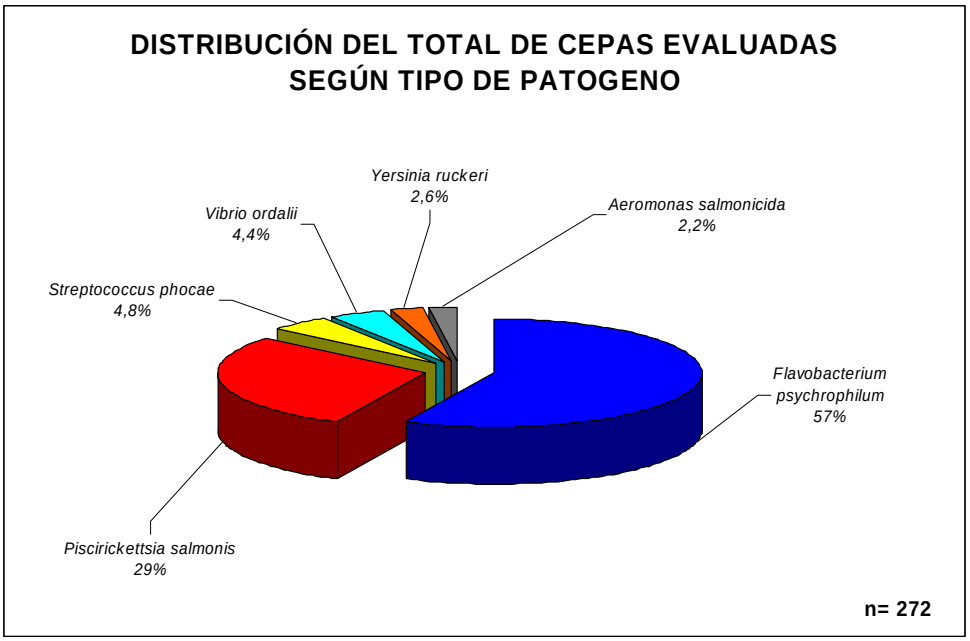


Figura 2. Distribución porcentual del total de cepas evaluadas para obtención de los perfiles de resistencia según patógeno de interés, obtenidas desde centros de cultivo de agua dulce y agua de mar en la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

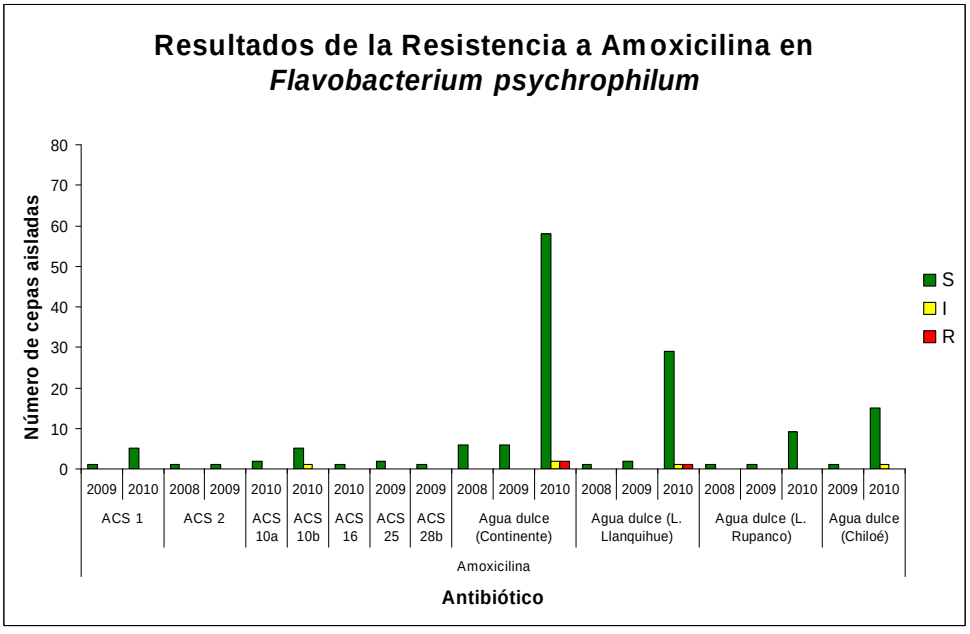


Figura 3. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

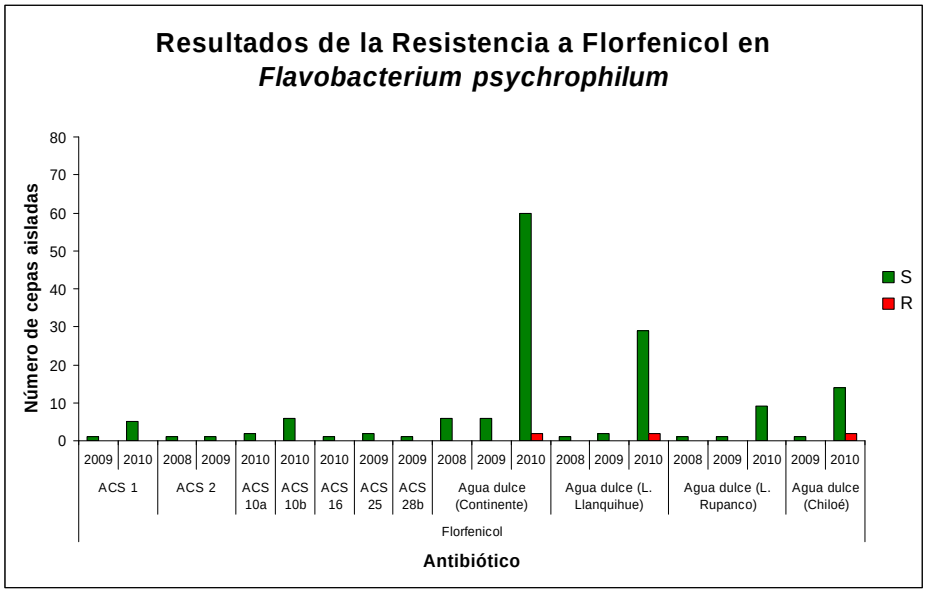


Figura 4. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Flavobacterium* psychrophilum durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

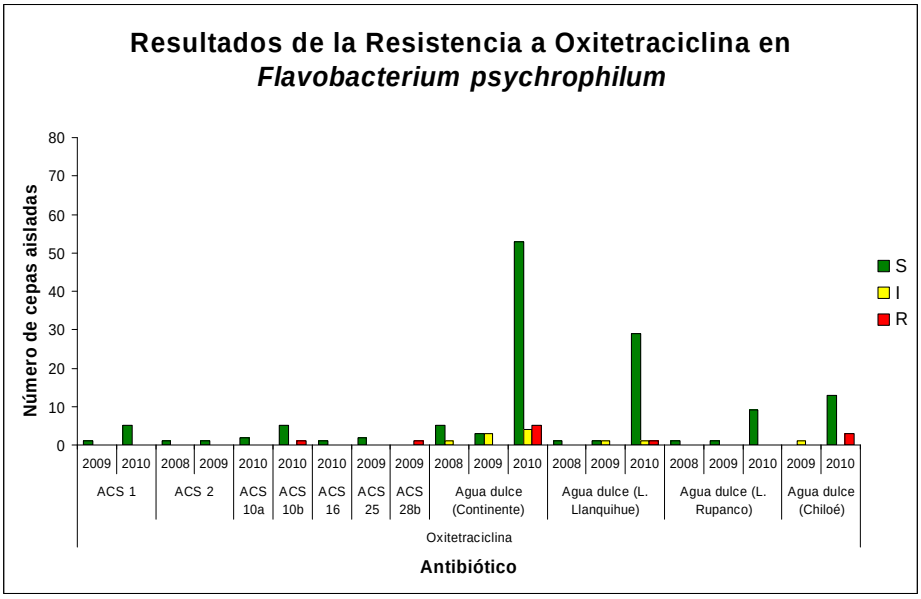


Figura 5. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

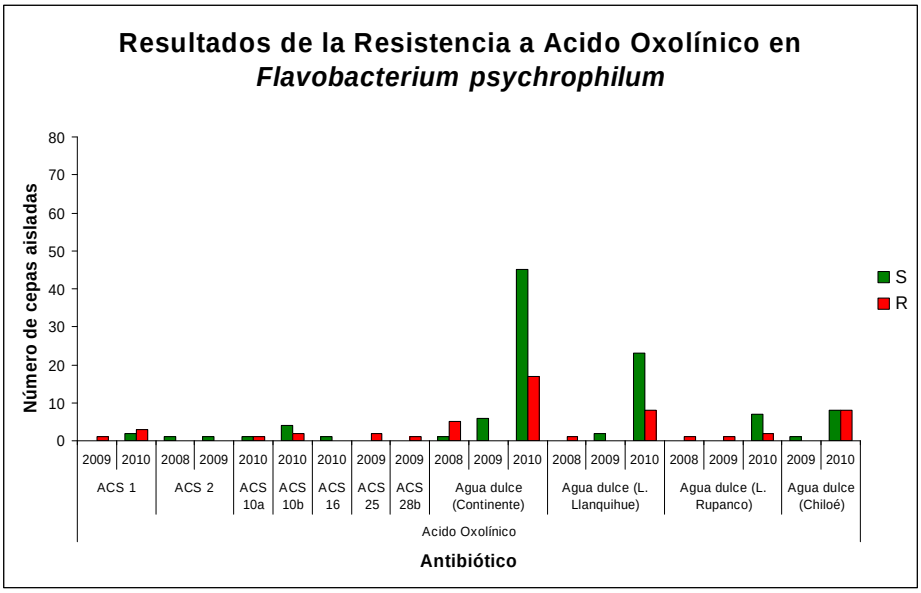


Figura 6. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

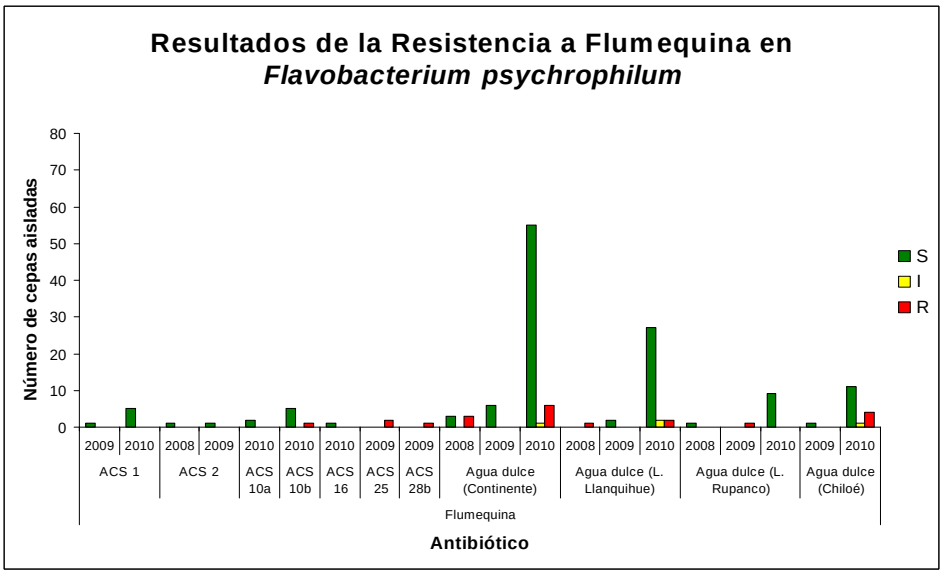


Figura 7. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Flavobacterium psychrophilum* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

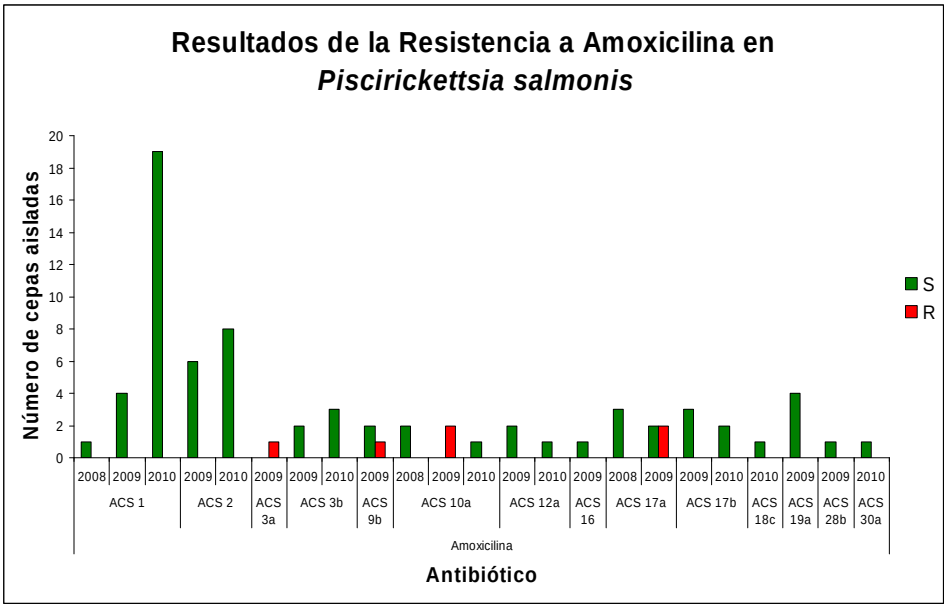


Figura 8. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

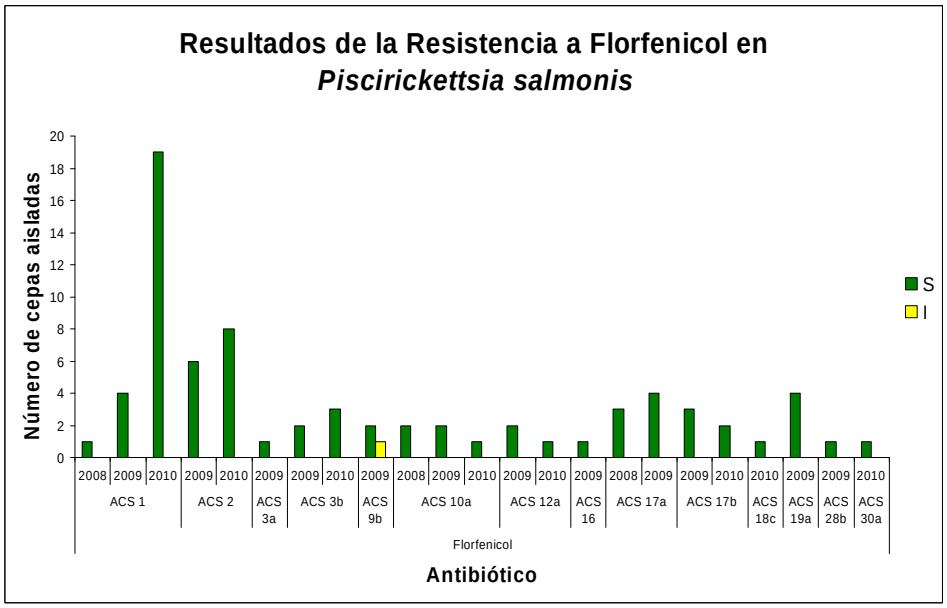


Figura 9. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

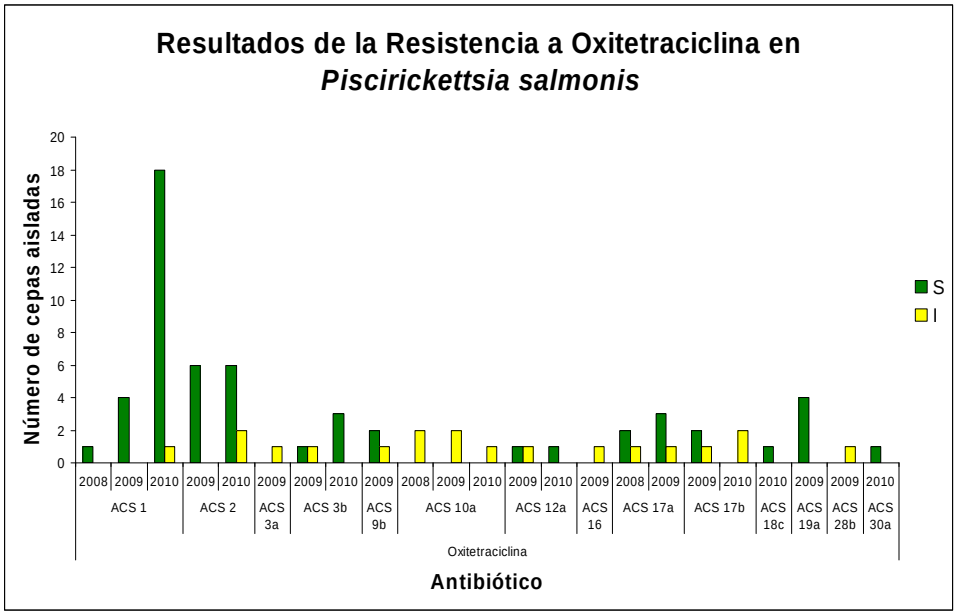


Figura 10. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

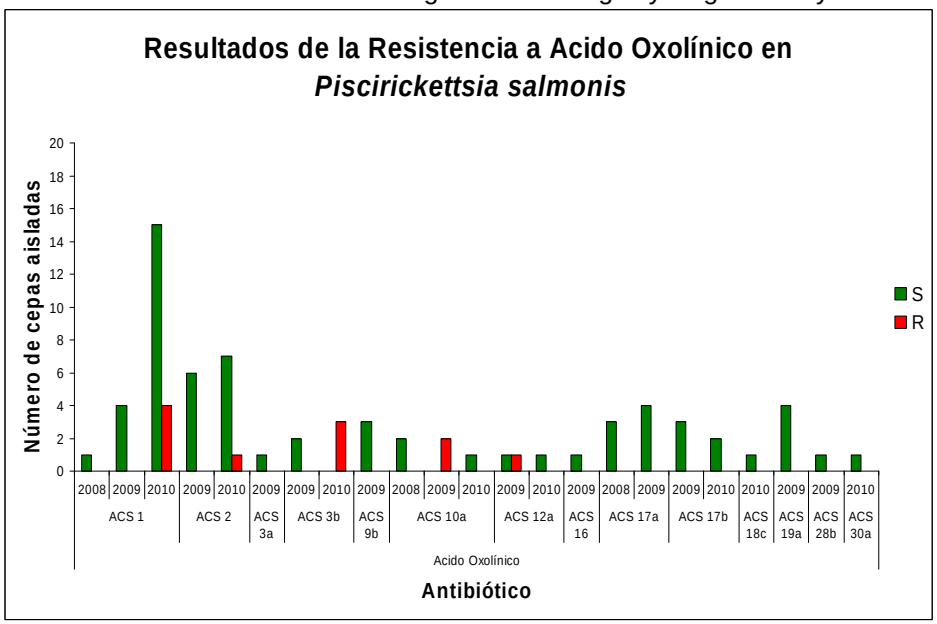


Figura 11. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

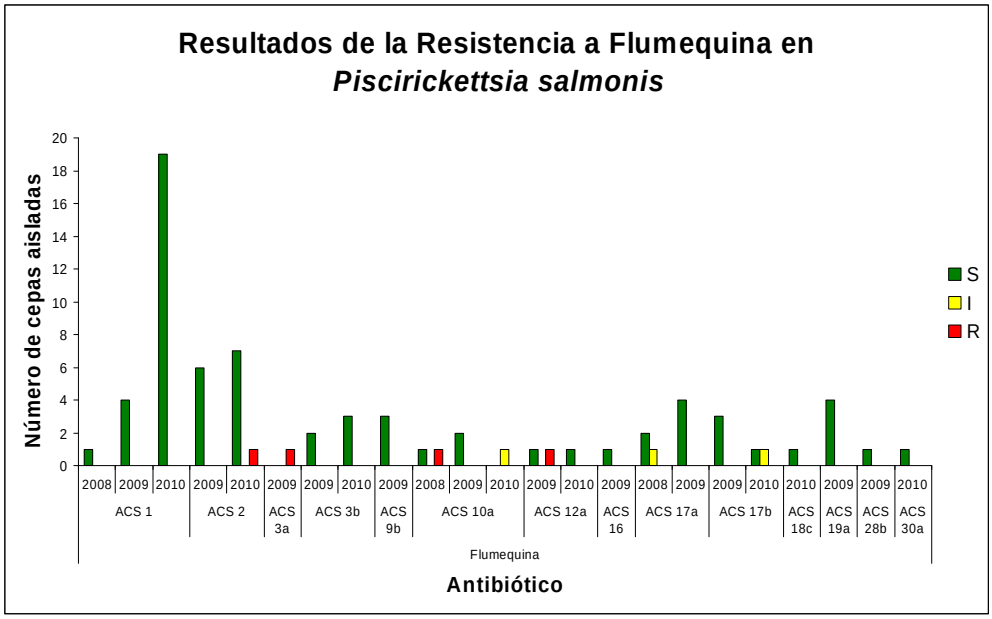


Figura 12. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Piscirickettsia salmonis* durante los años 2008 al 2010 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

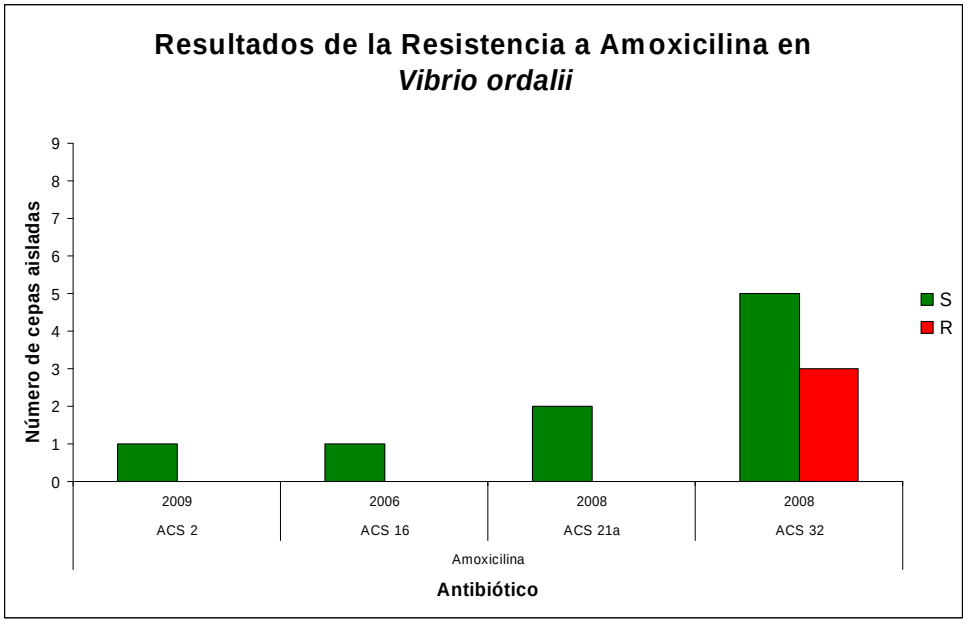


Figura 13. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

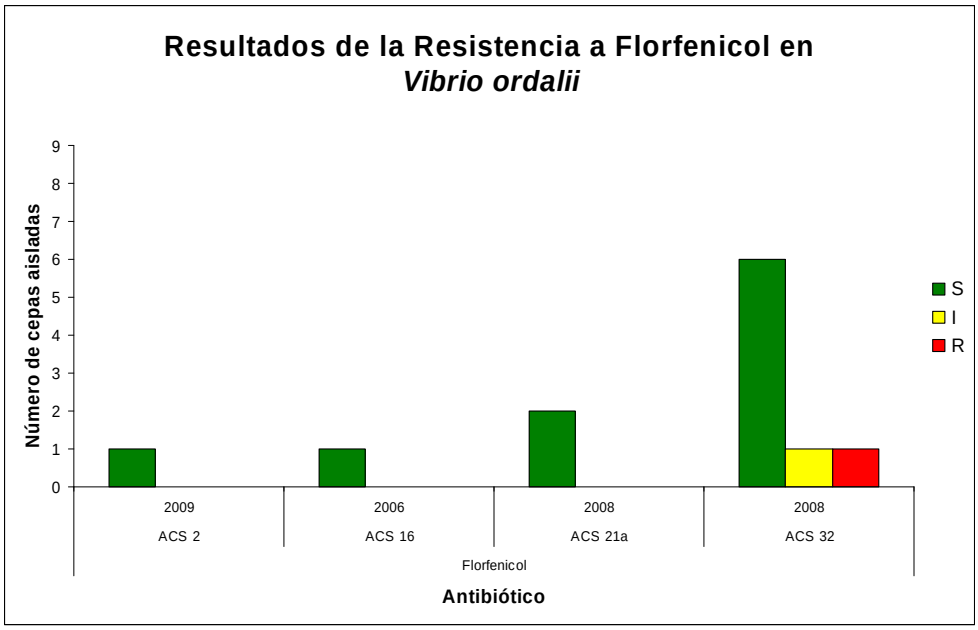


Figura 14. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

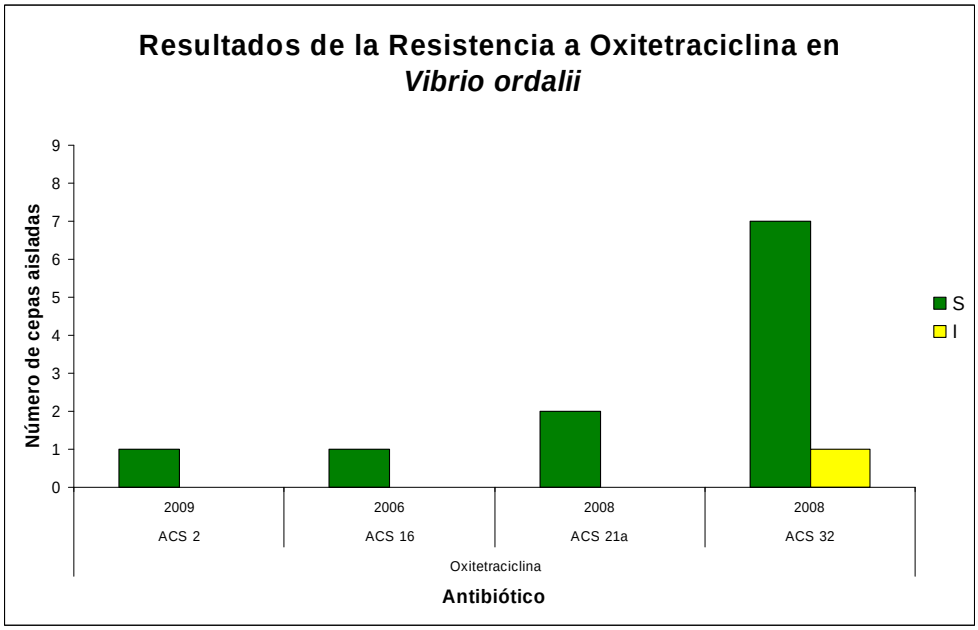


Figura 15. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

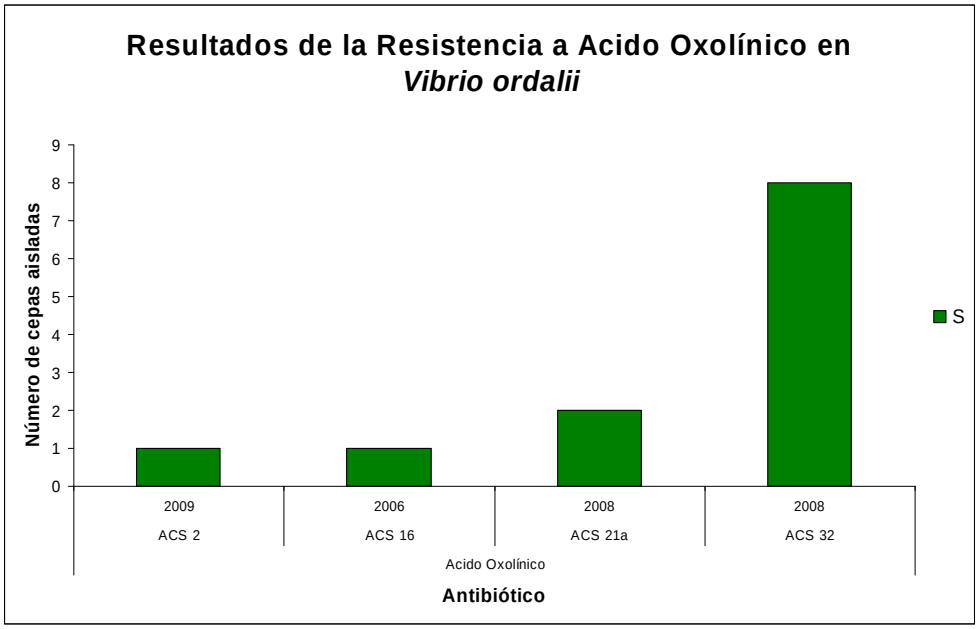


Figura 16. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

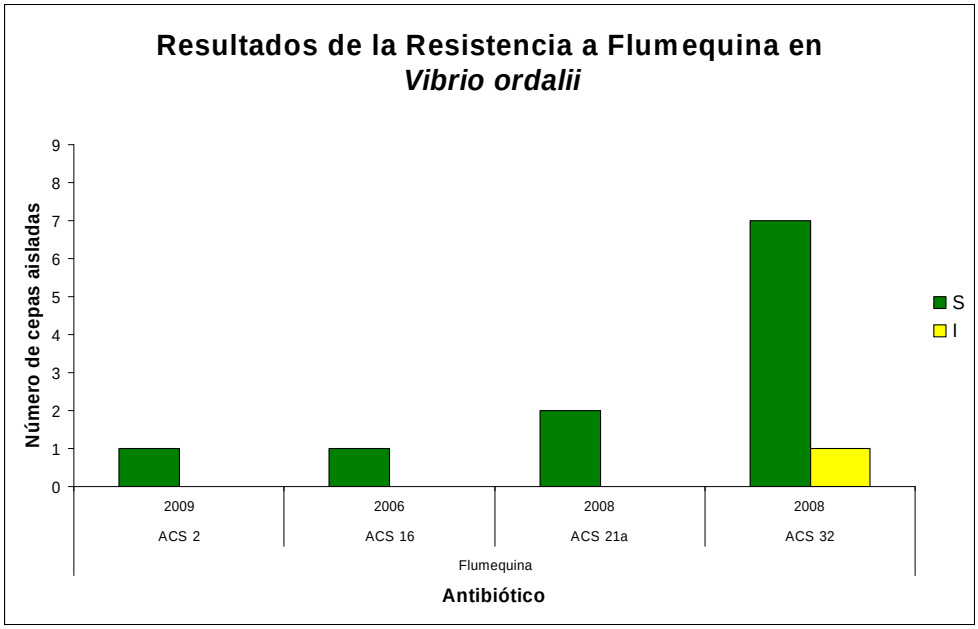


Figura 17. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Vibrio ordalii* entre los años 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

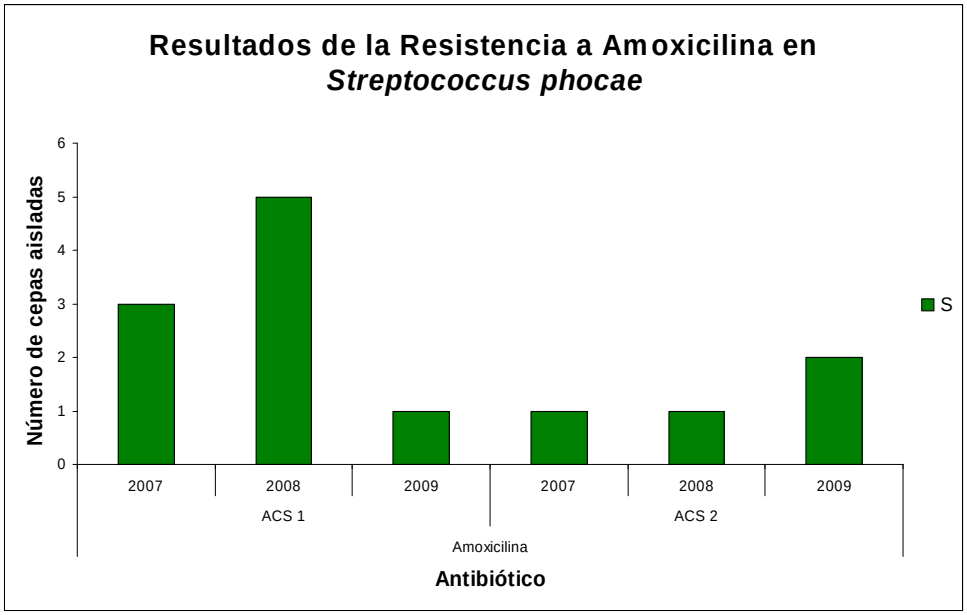


Figura 18. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos.

Figura 19. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Eritromicina en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos.

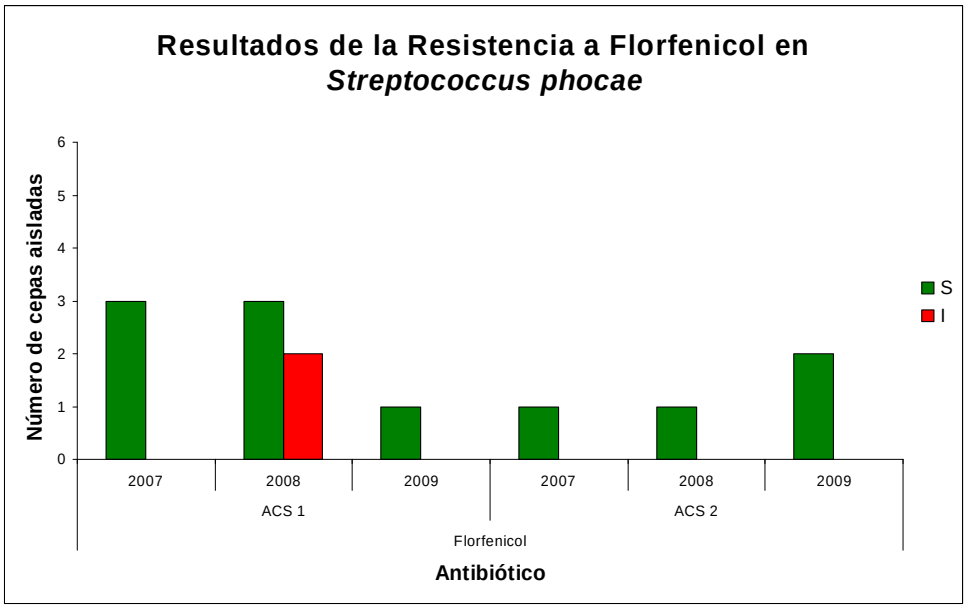


Figura 20. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos.

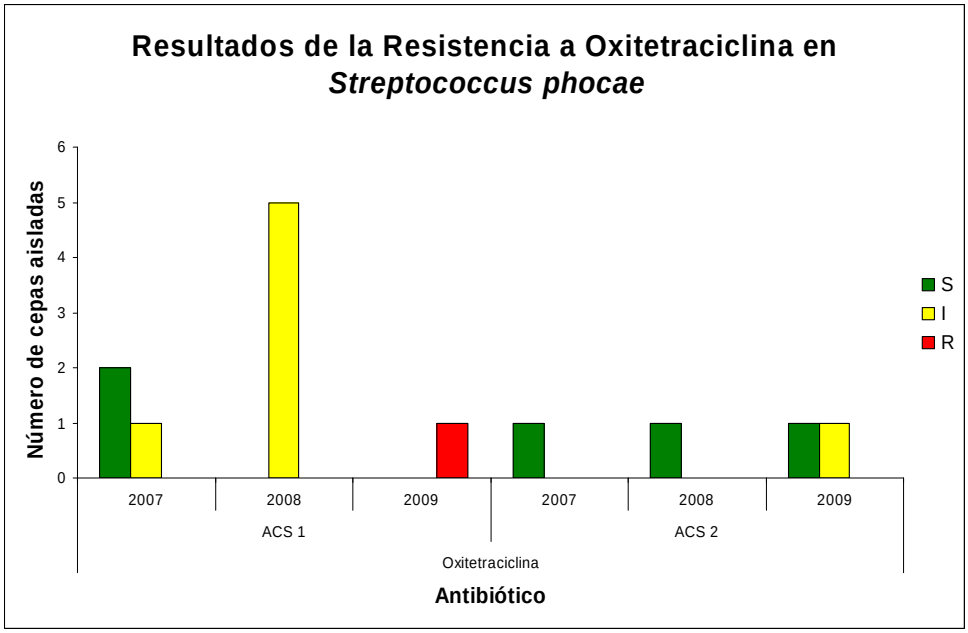


Figura 21. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos.

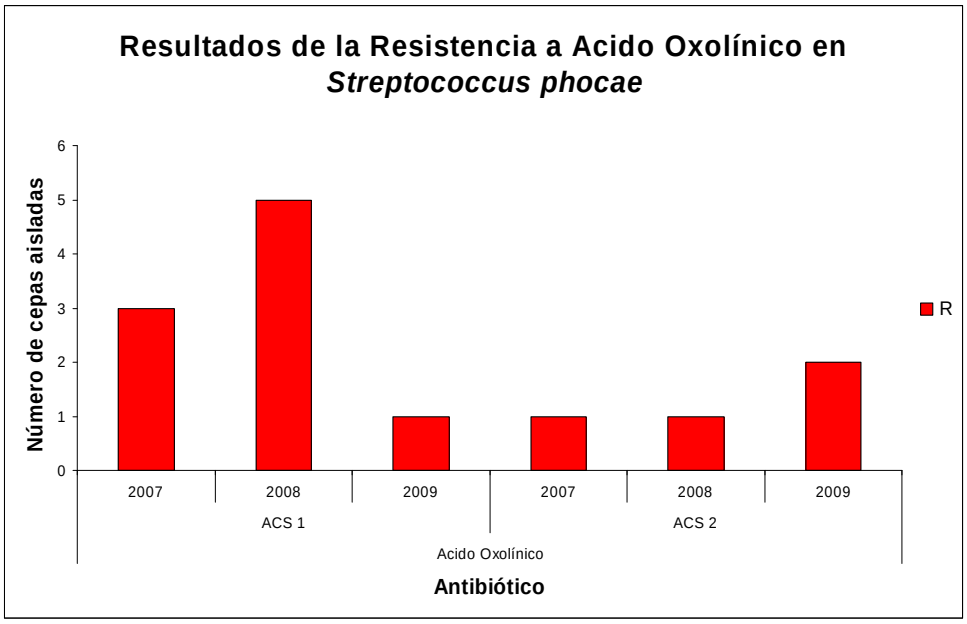


Figura 22. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos.

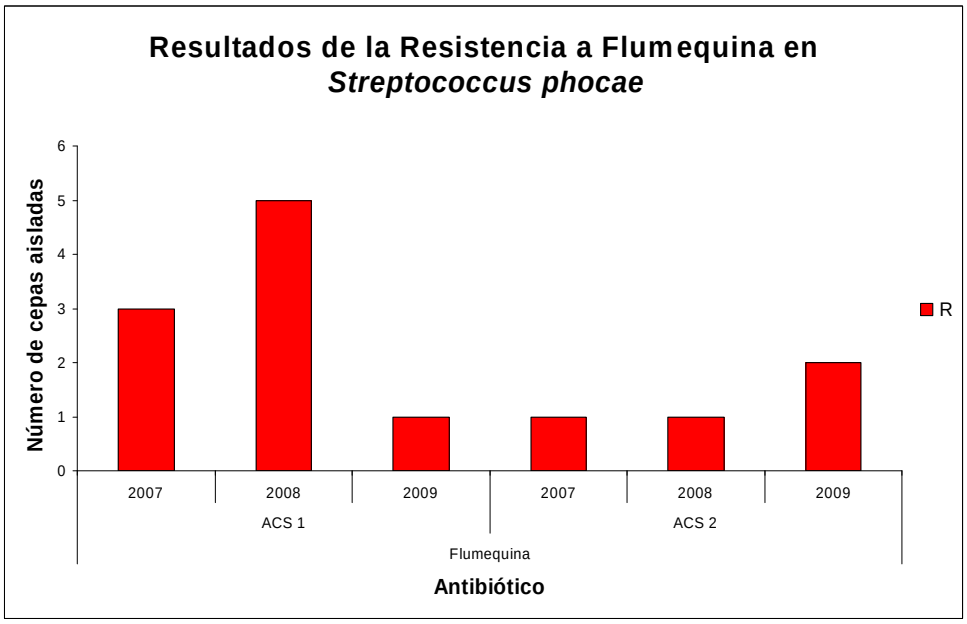


Figura 23. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Streptococcus phocae* entre los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Región de Los Lagos.

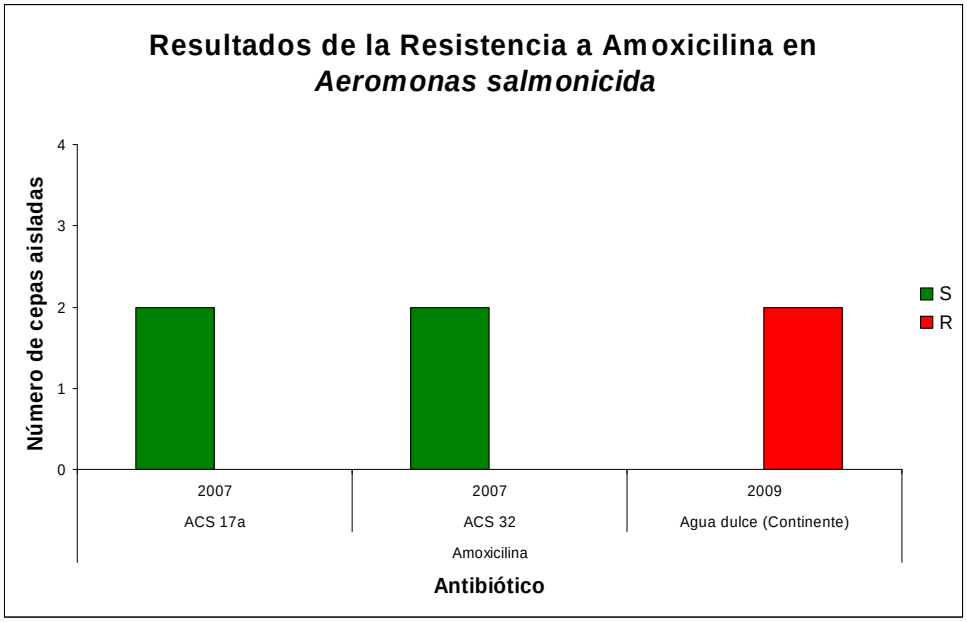


Figura 24. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Aeromonas salmonicida* en los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

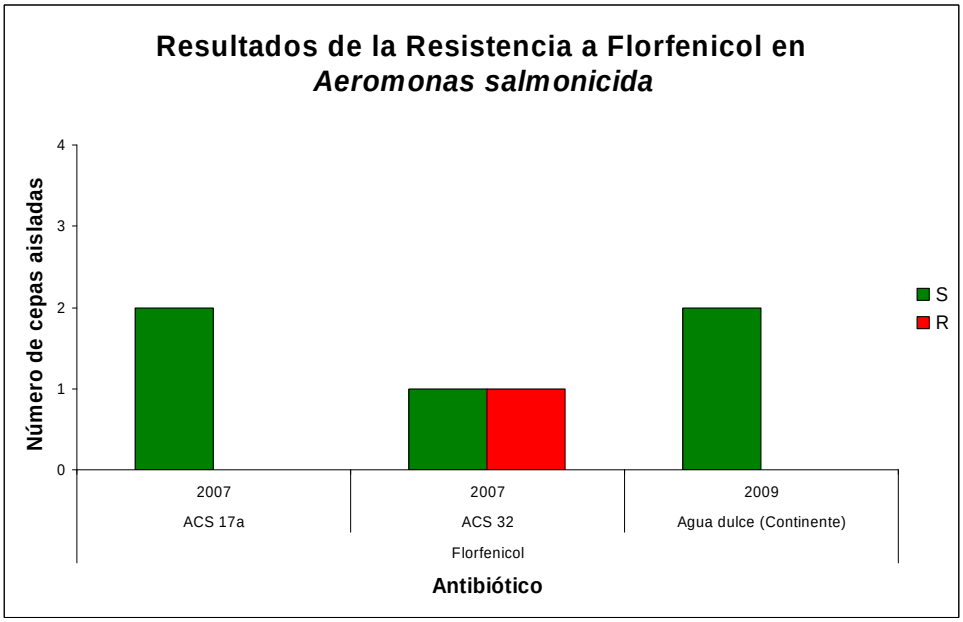


Figura 25. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Aeromonas salmonicida* en los años 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

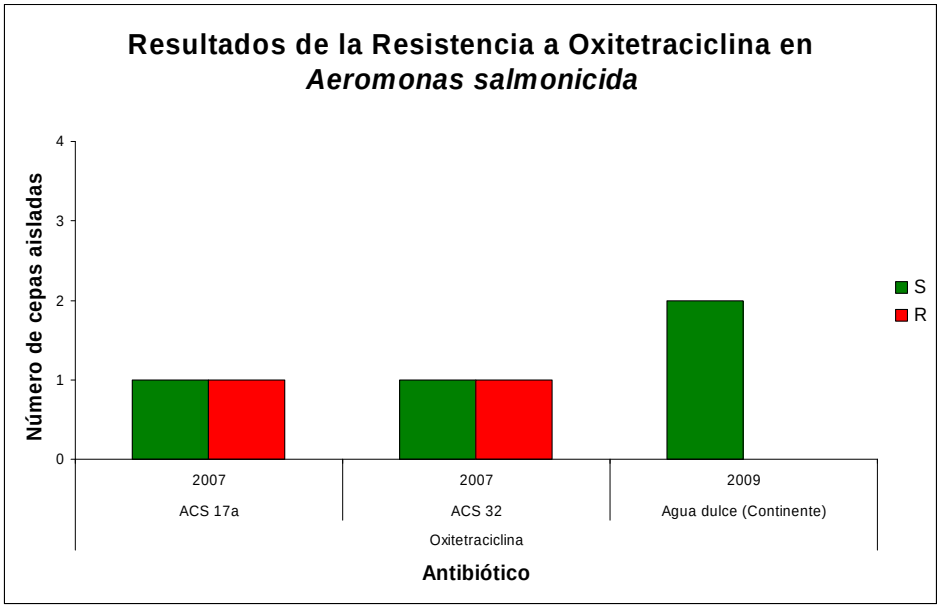


Figura 26. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Aeromonas salmonicida* en los años y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

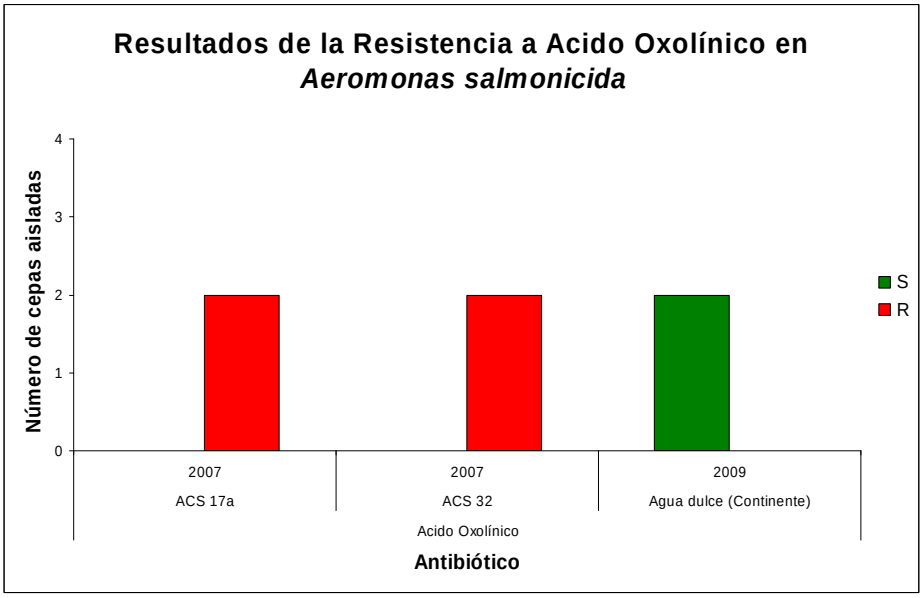


Figura 27. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Aeromonas salmonicida* en los años y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

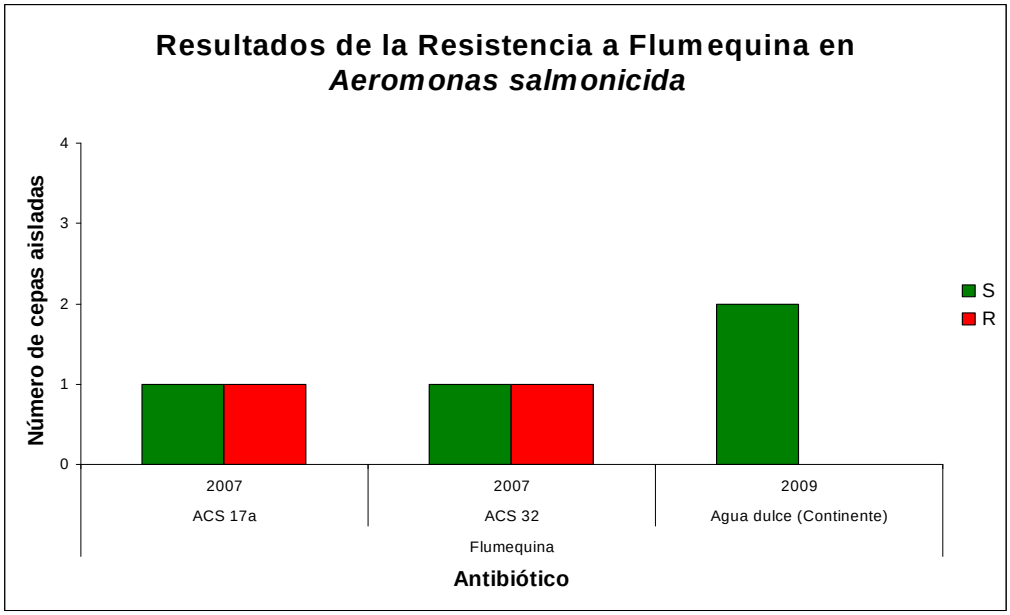


Figura 28. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Aeromonas salmonicida* en los años y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos y Región de Aysén.

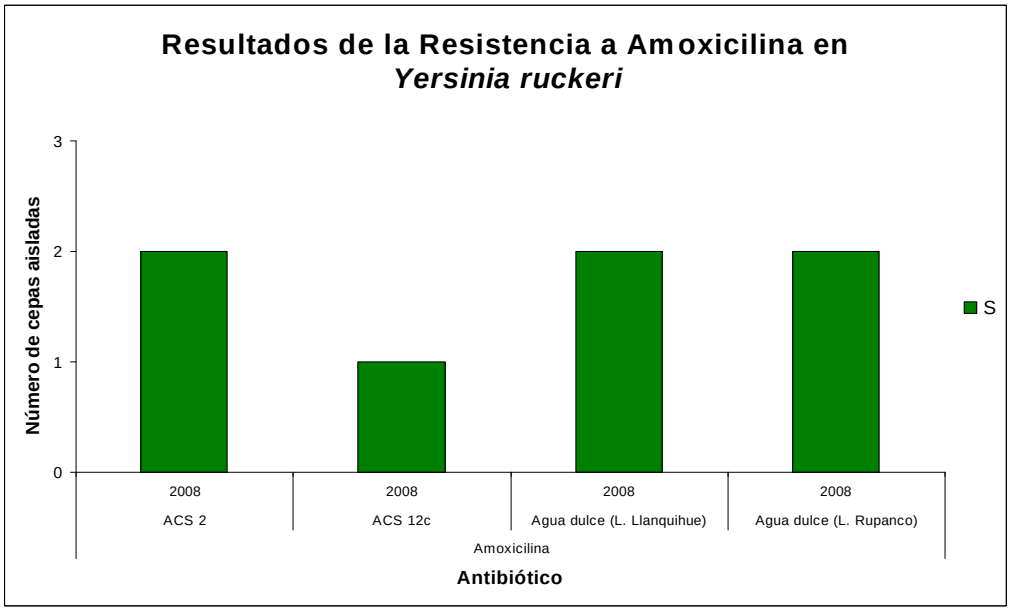


Figura 29. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos.

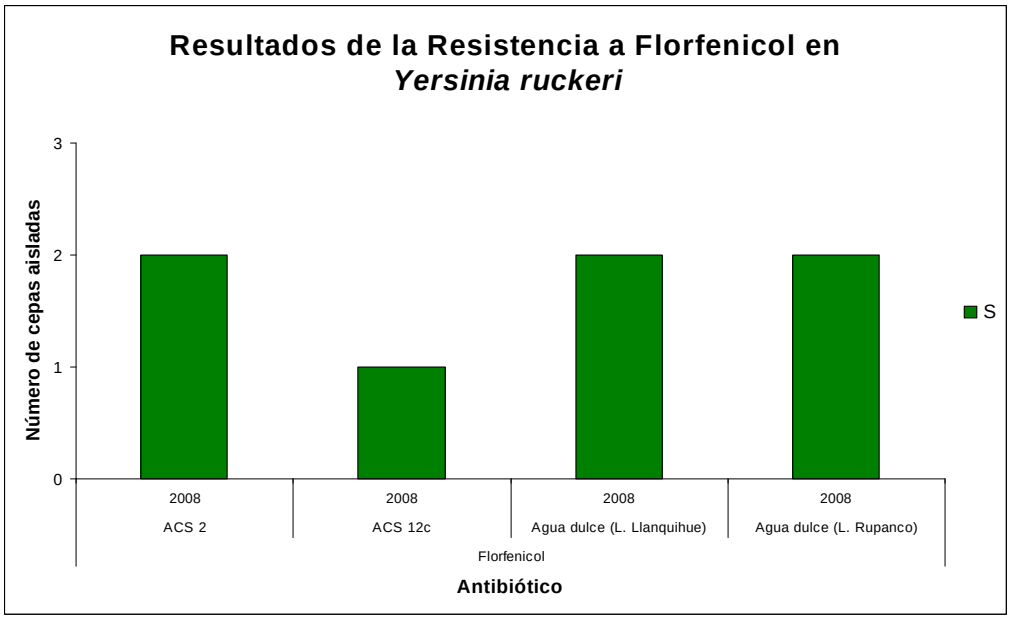


Figura 30. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos.

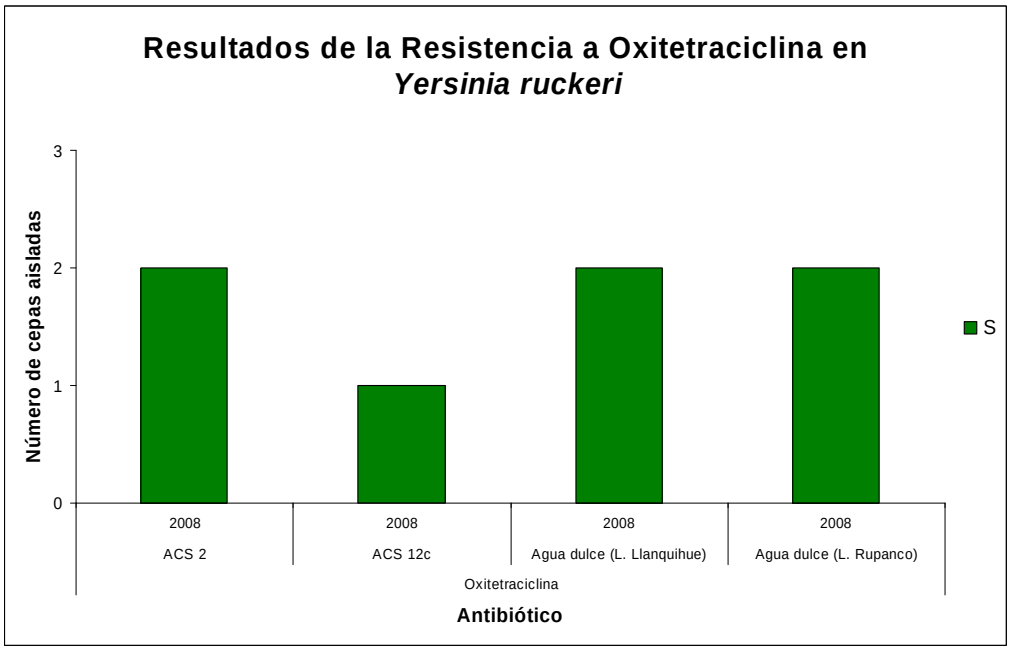


Figura 31. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos.

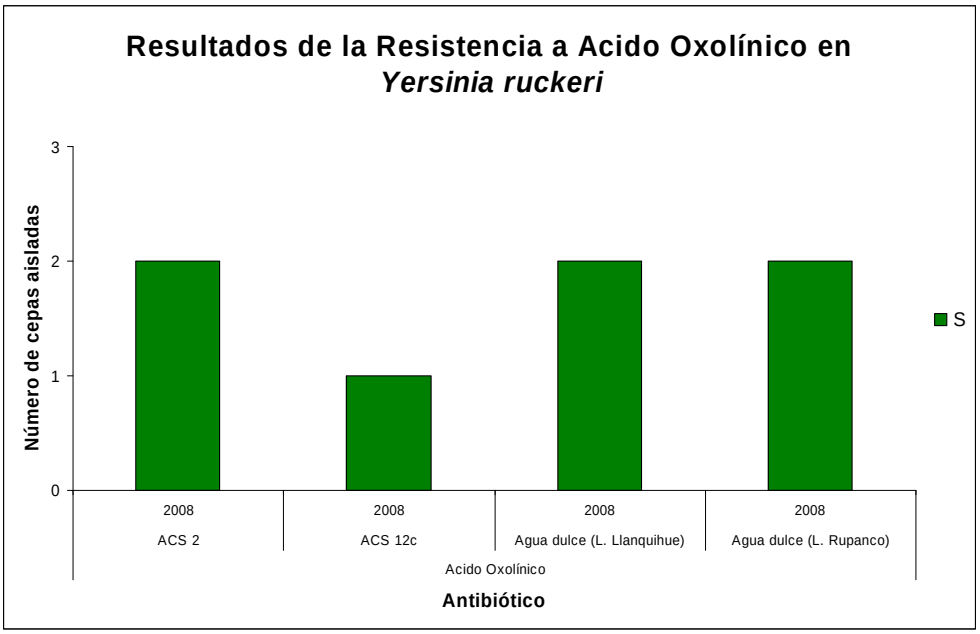


Figura 32. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxolínico en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos.

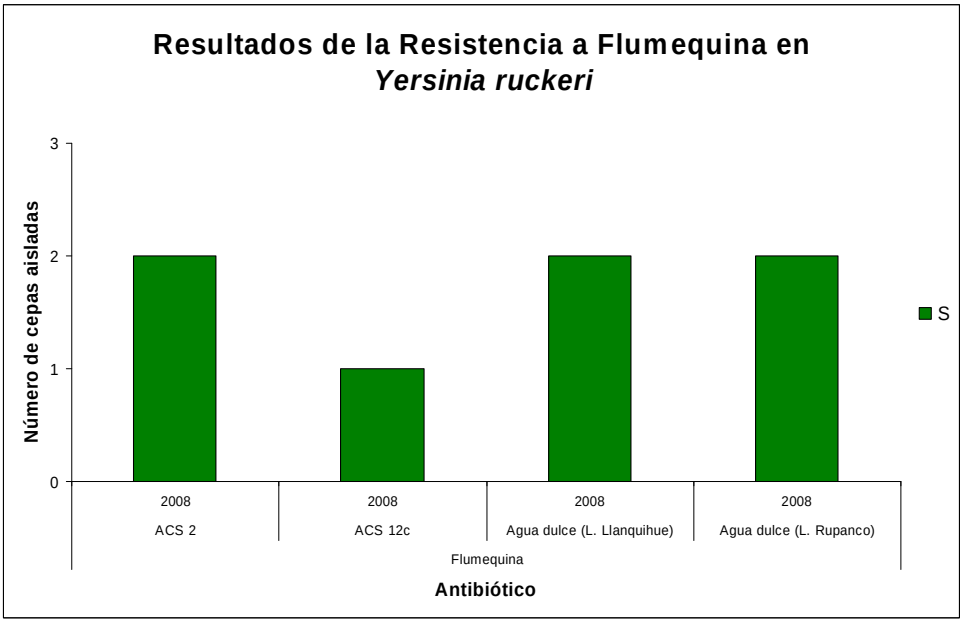


Figura 33. Resultado del número de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Yersinia ruckeri* durante el año 2008 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Región de Los Lagos.

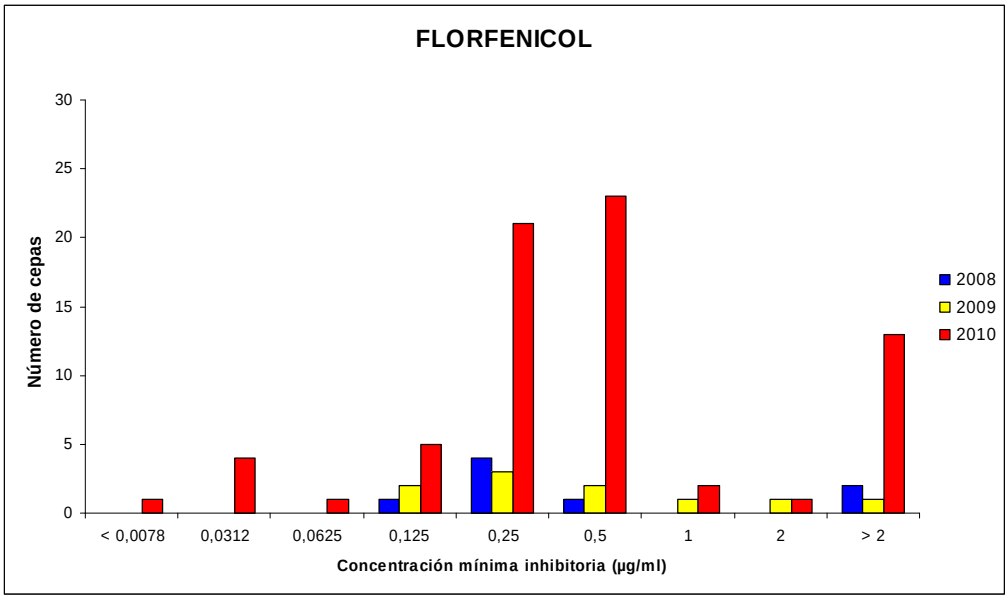


Figura 34. Número de cepas de *Flavobacterium psychrophilum* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico florfenicol.

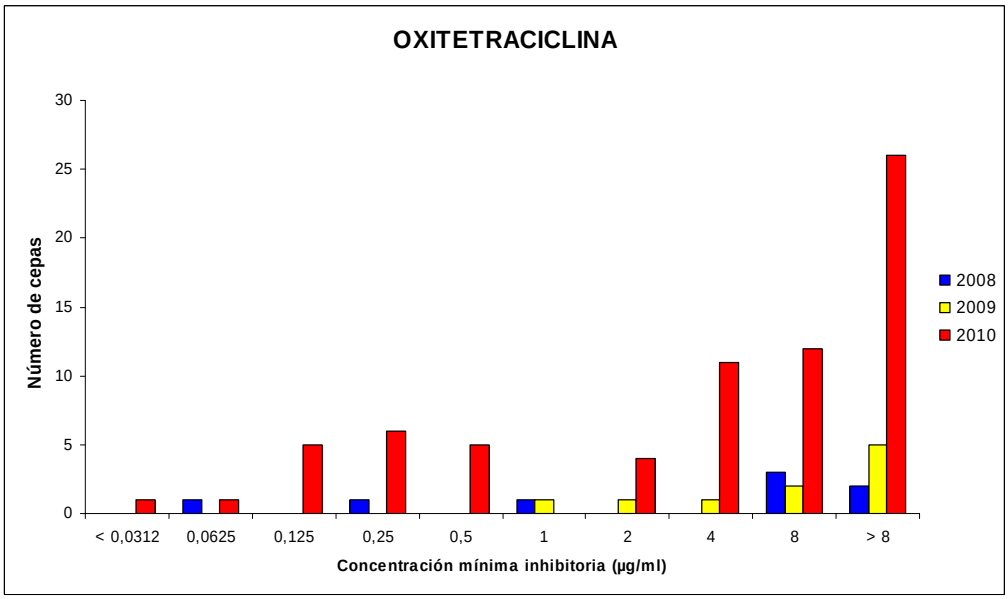


Figura 35. Número de cepas de *Flavobacterium psychrophilum* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Oxitetraciclina.

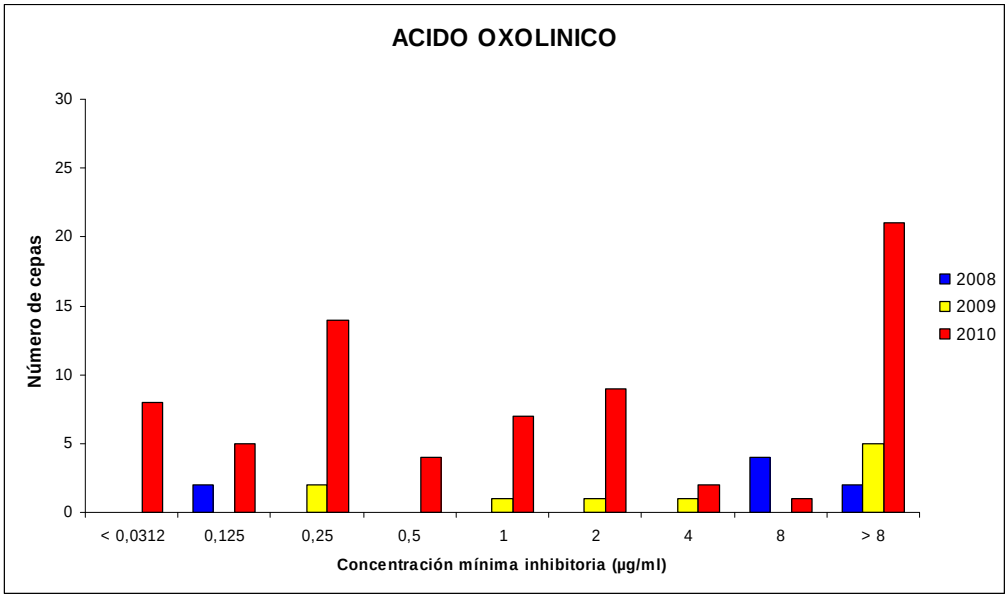


Figura 36. Número de cepas de *Flavobacterium psychrophilum* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el para el antibiótico Acido Oxolínico.

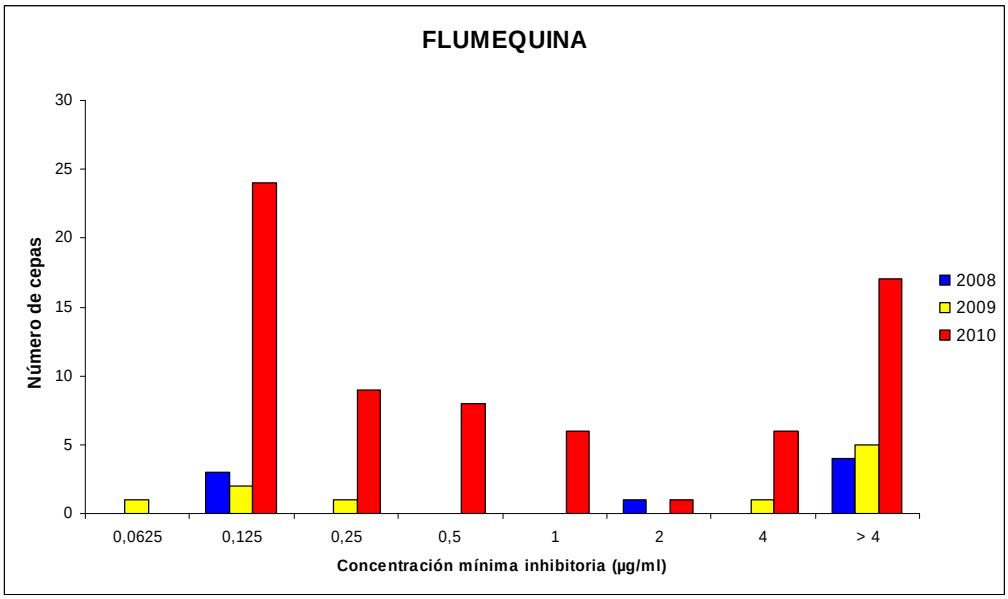


Figura 37. Número de cepas de *Flavobacteriun psychrophilum* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el para el antibiótico Flumequina.

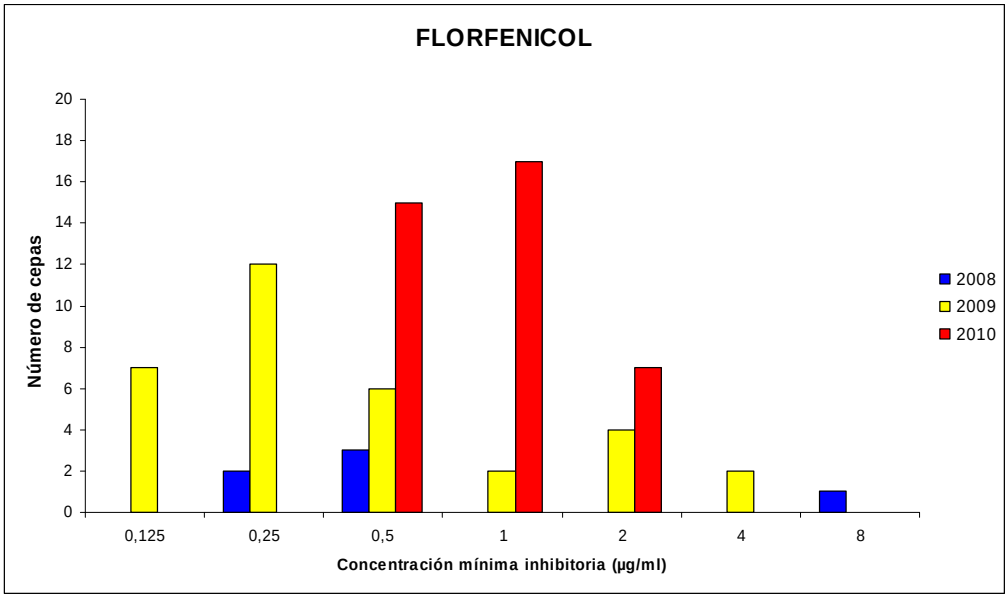


Figura 38. Número de cepas de *Piscirickettsia salmonis* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el para el antibiótico Florfenicol.

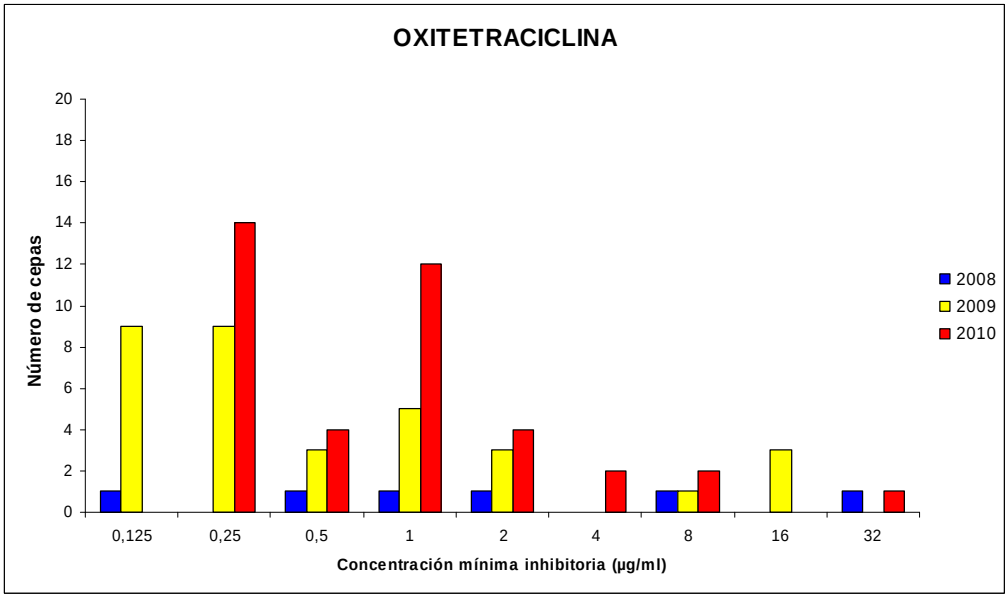


Figura 39. Número de cepas de *Piscirickettsia salmonis* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Oxitetraciclina.

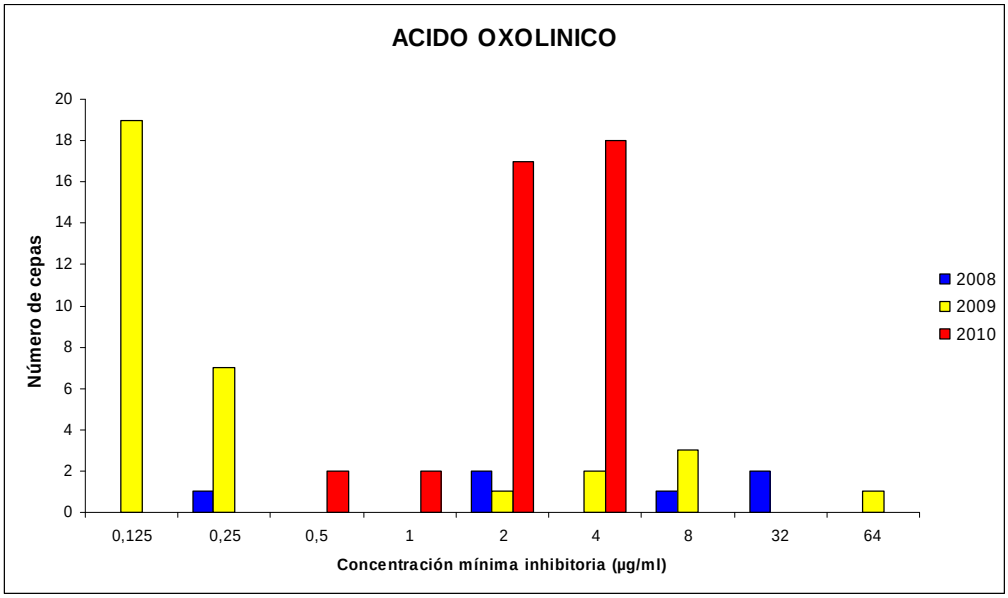


Figura 40. Número de cepas de *Piscirickettsia salmonis* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Acido Oxolínico.

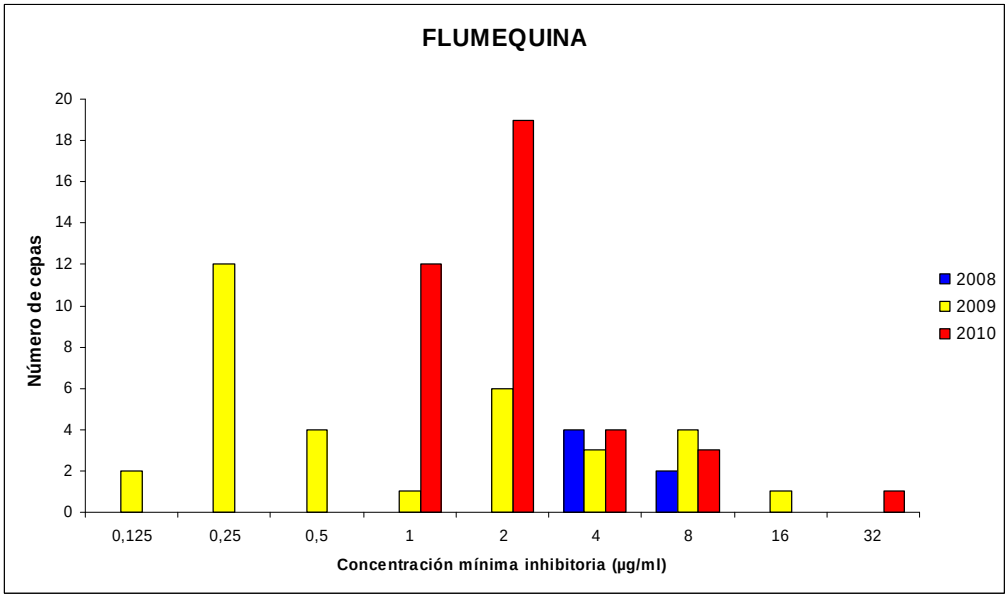


Figura 41. Número de cepas de *Piscirickettsia salmonis* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2008 y 2010 para el antibiótico Flumequina.

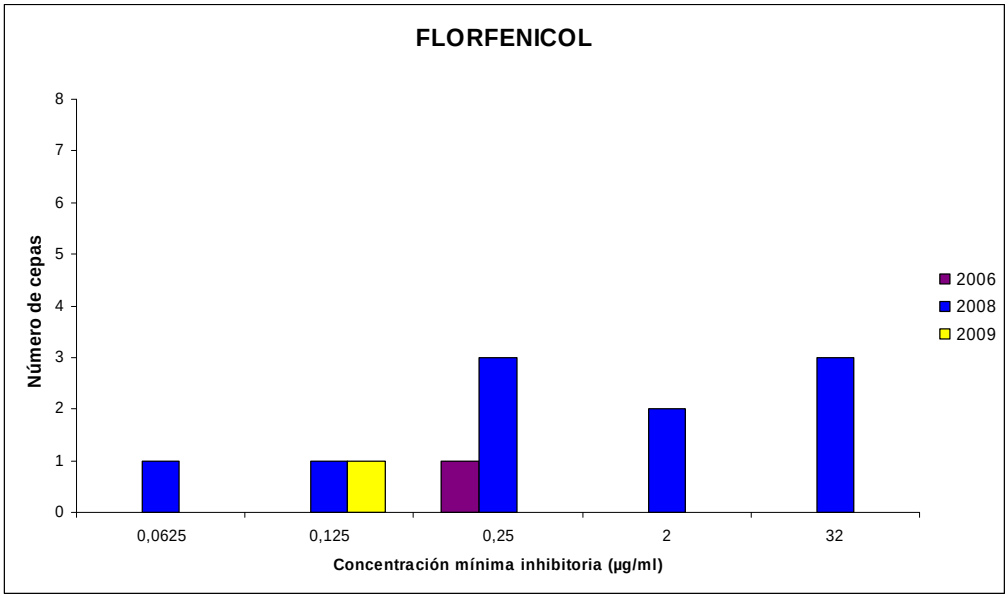


Figura 42. Número de cepas de *Vibrio ordalii* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2006 y 2009 para el antibiótico Florfenicol.

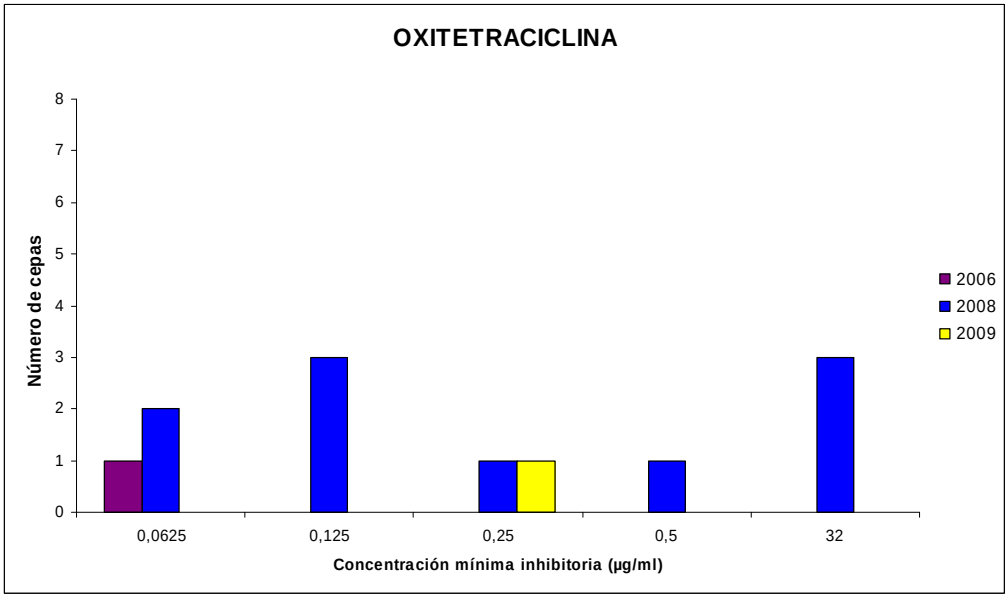


Figura 43. Número de cepas de *Vibrio ordalii* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2006 y 2009 para el antibiótico Oxitetraciclina.

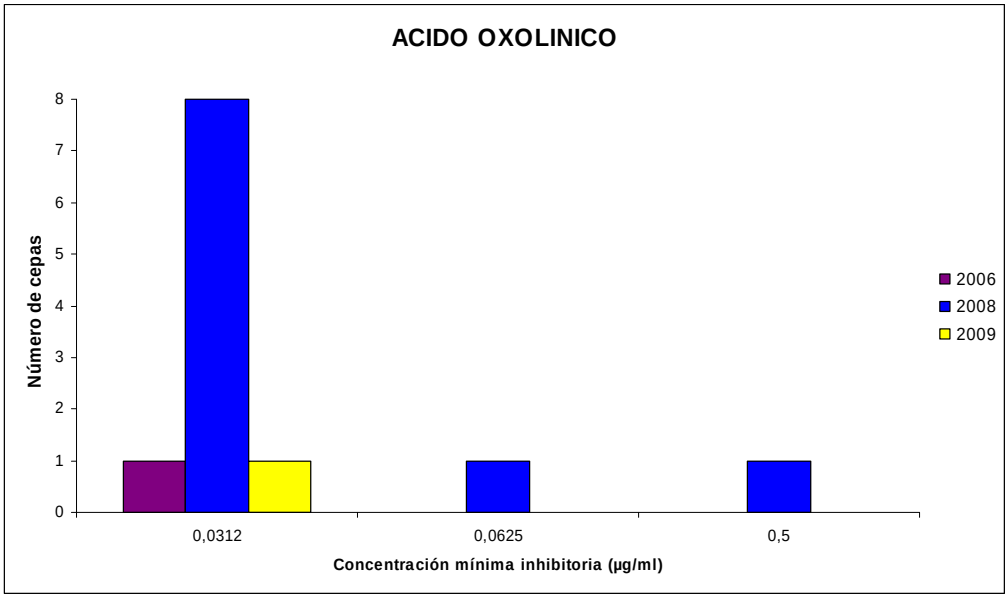


Figura 44. Número de cepas de *Vibrio ordalii* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2006 y 2009 para el antibiótico Acido Oxolínico.

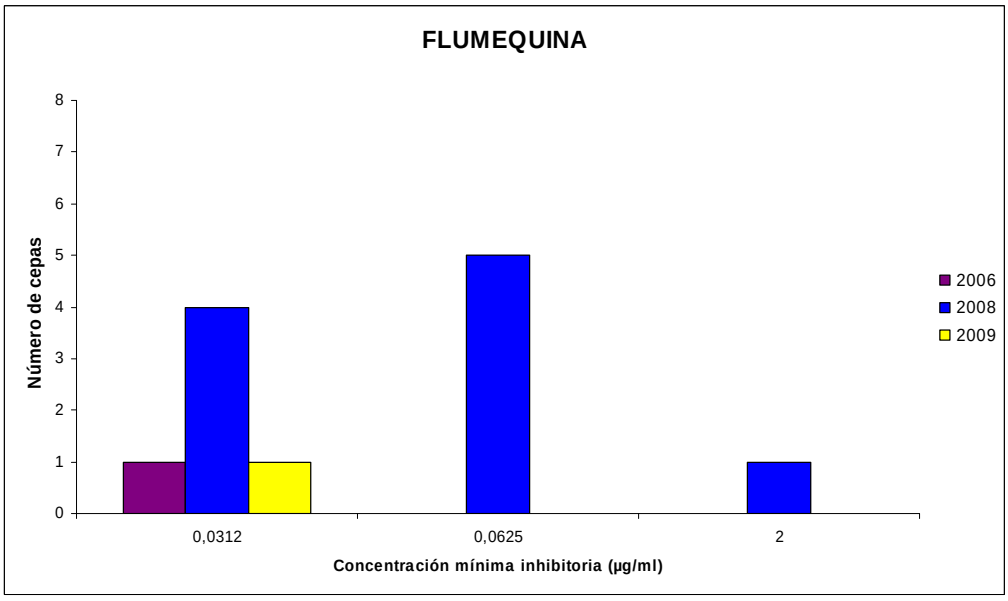


Figura 45. Número de cepas de *Vibrio ordalii* con su respectivo resultado de CMI entre los años 2006 y 2009 para el antibiótico Flumequina.

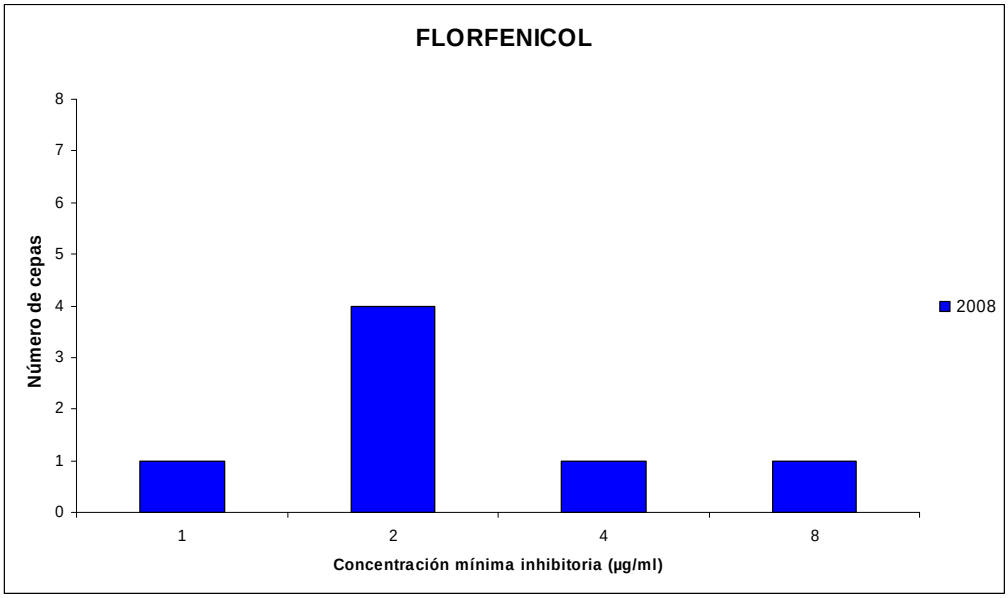


Figura 46. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* con su respectivo resultado de CMI el año 2008 para el antibiótico Florfenicol.

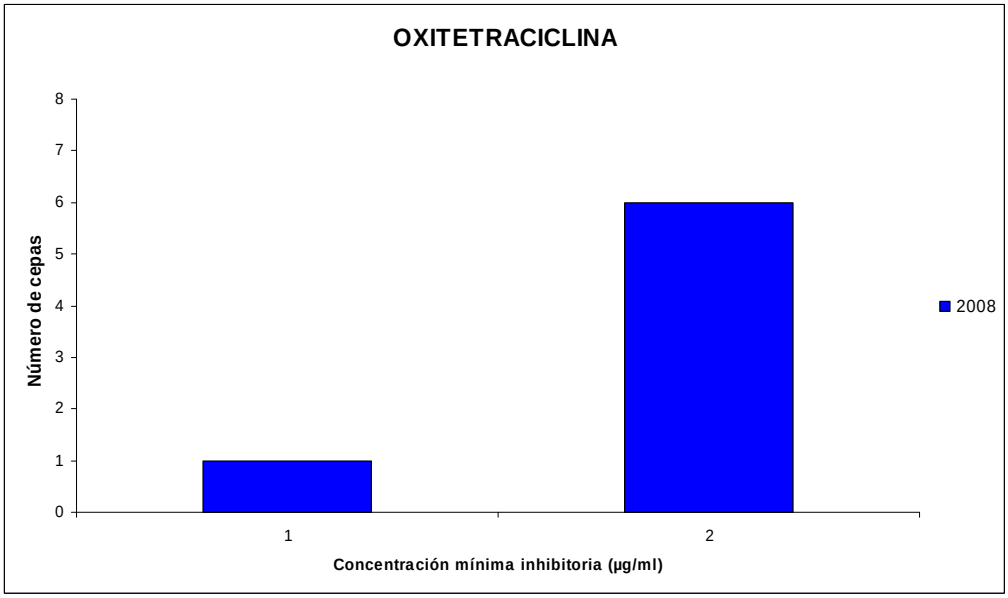


Figura 47. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* con su respectivo resultado de CMI el año 2008 para el antibiótico Oxitetraciclina.

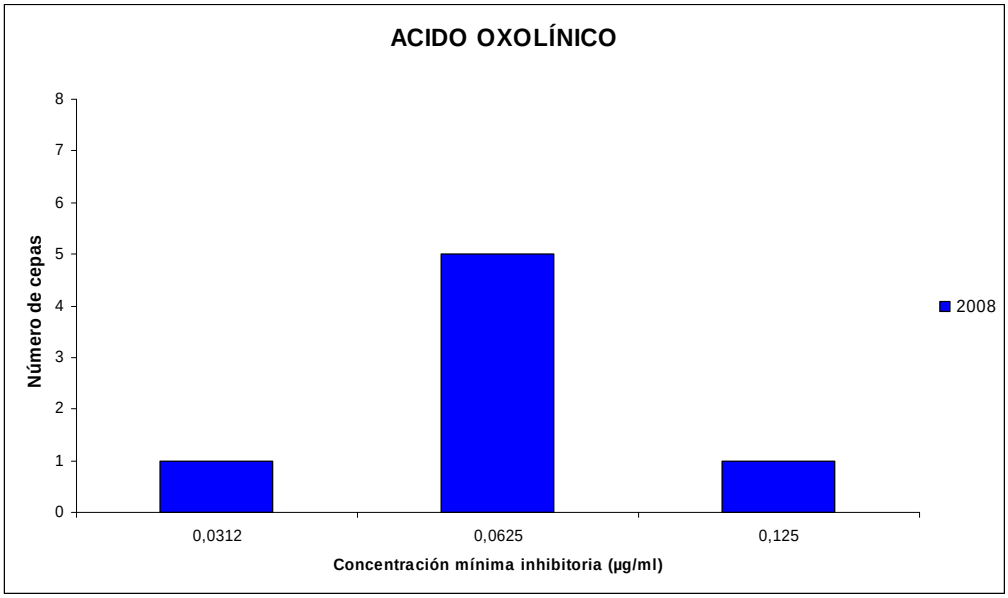


Figura 48. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* con su respectivo resultado de CMI el año 2008 para el antibiótico Acido Oxolínico.

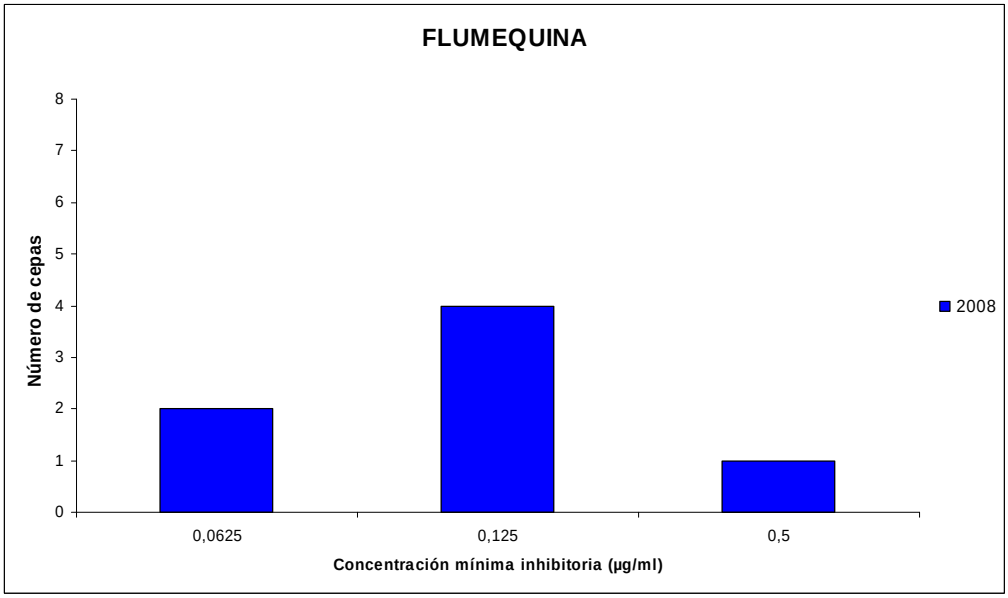


Figura 49. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* con su respectivo resultado de CMI el año 2008 para el antibiótico Flumequina.

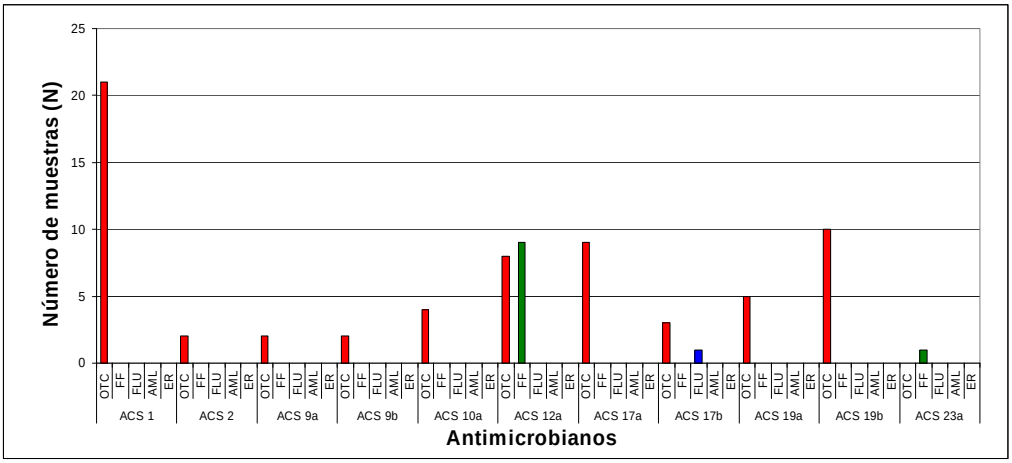


Figura 50. Distribución de la cantidad de muestras con presencia de residuos según Agrupación de Concesión Salmonera (ACS) de origen, y por antimicrobiano de interés. ACS: Agrupación de Concesiones Salmoneras; OTC: Oxitetraciclina; FF; Florfenicol; FLU; Flumequina; AML: Amoxicilina; ER: Eritromicina

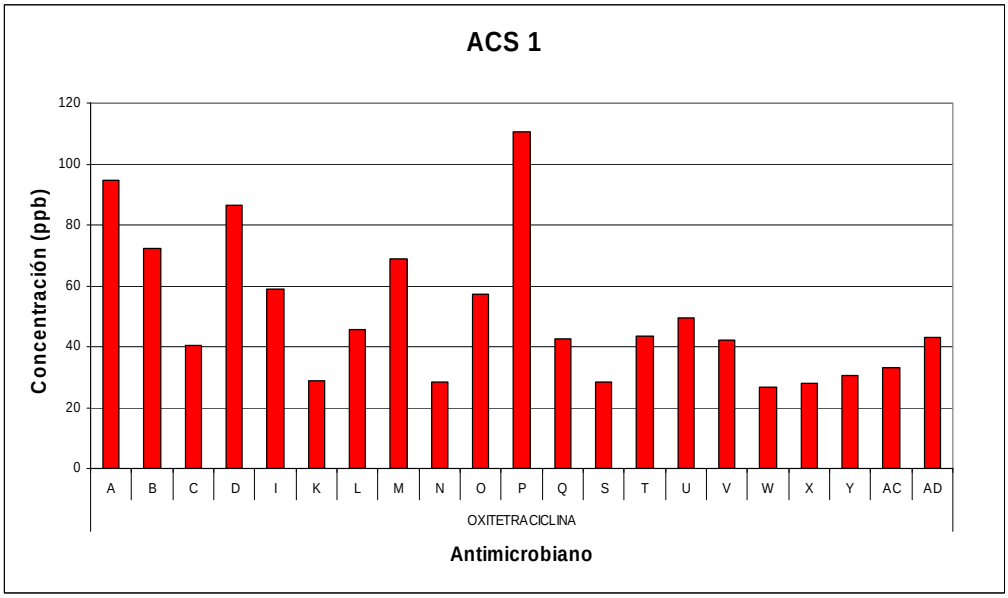


Figura 51. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 1.

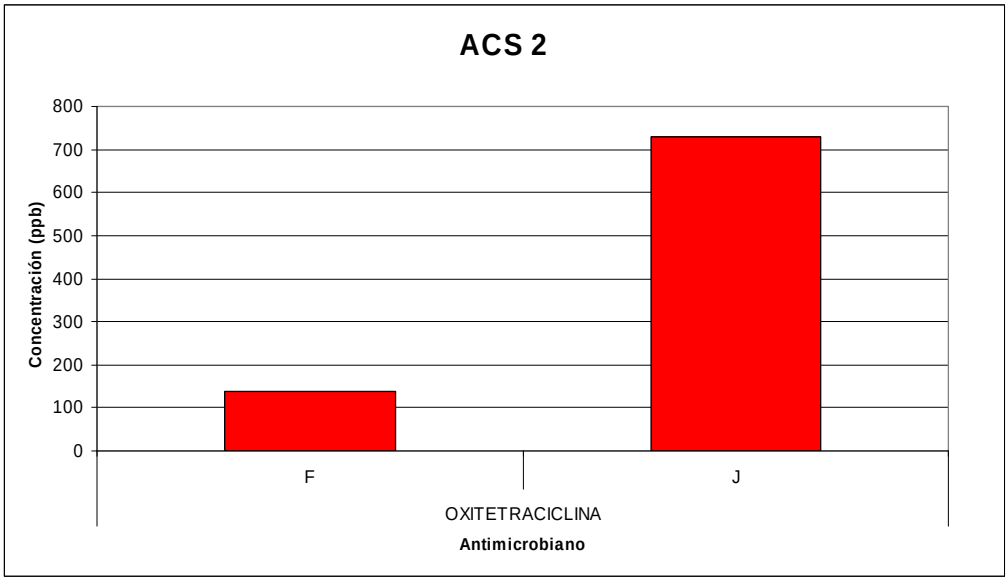


Figura 52. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 2.

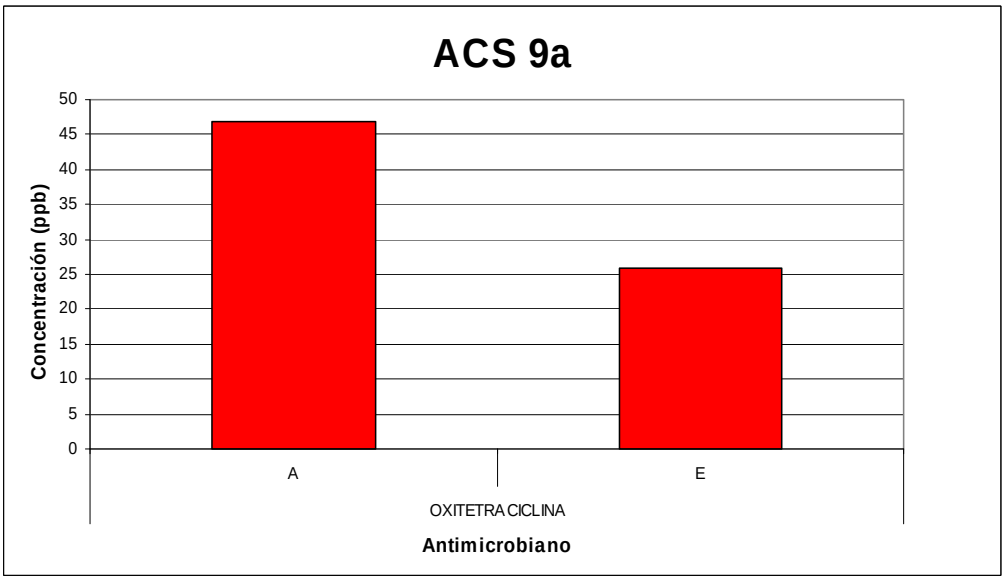


Figura 53. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 9a.

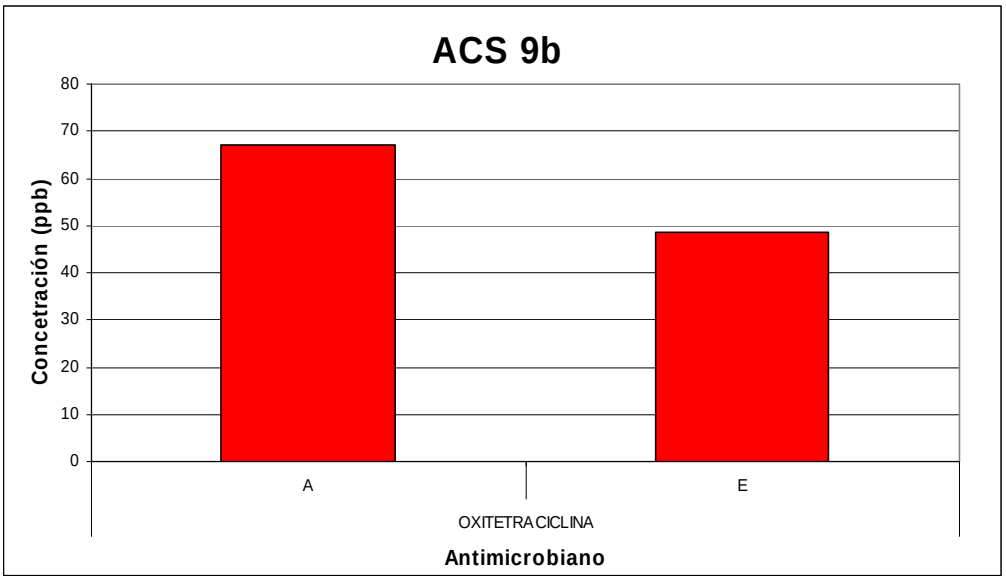


Figura 54. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 9b.

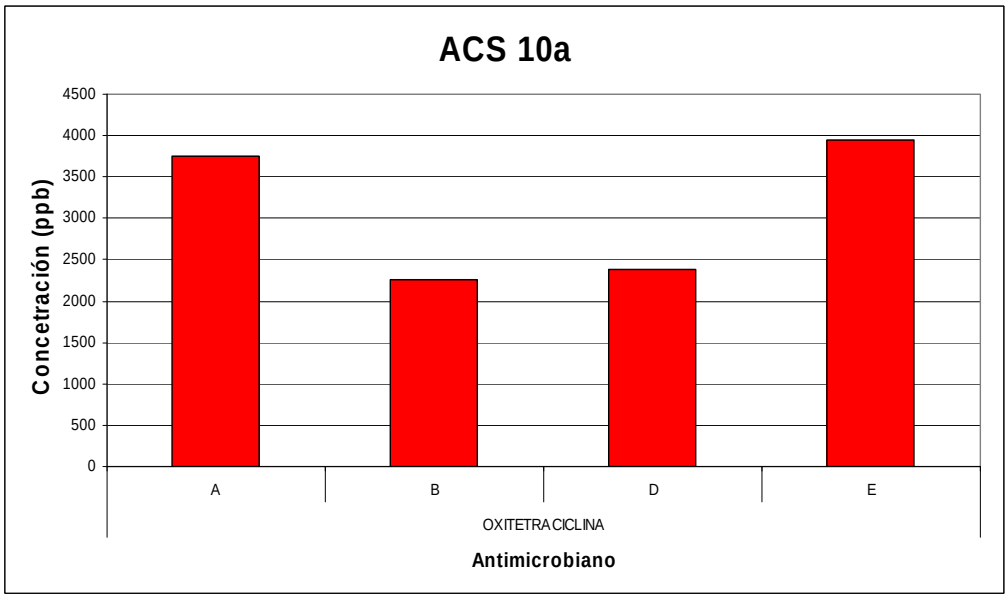


Figura 55. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 10a.

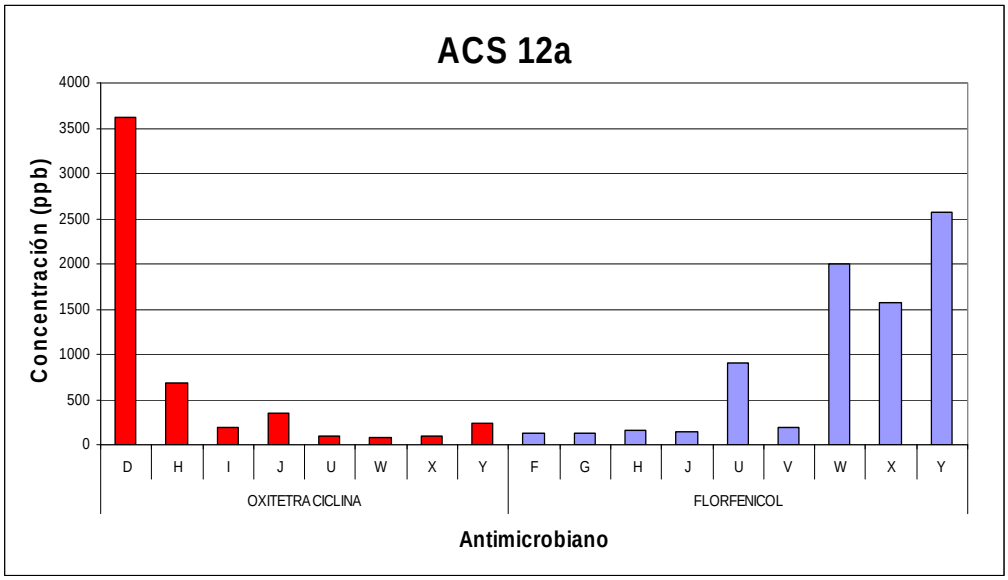


Figura 56. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina y Florfenicol en la Agrupación de Concesión Salmonera 12a.

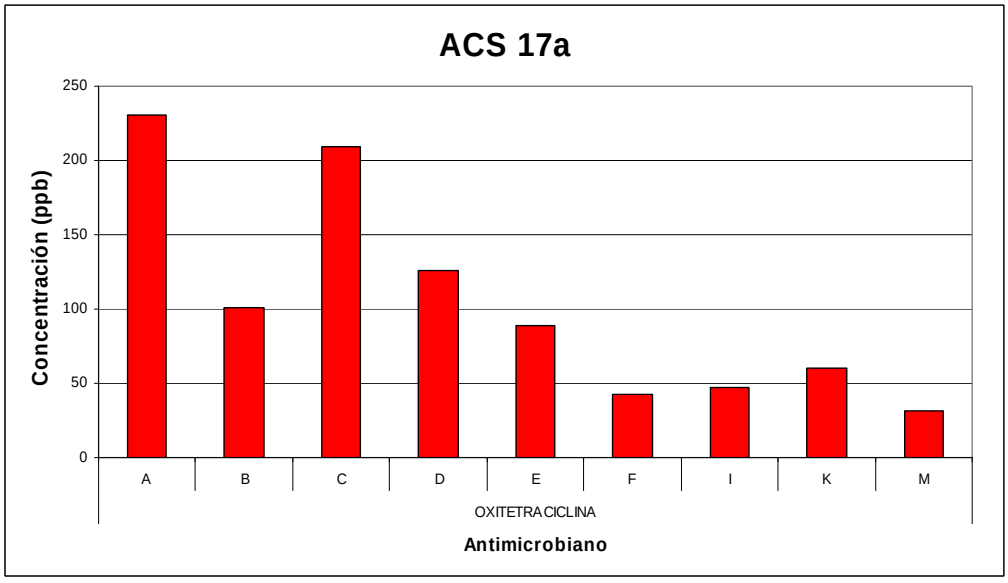


Figura 57. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 17a.

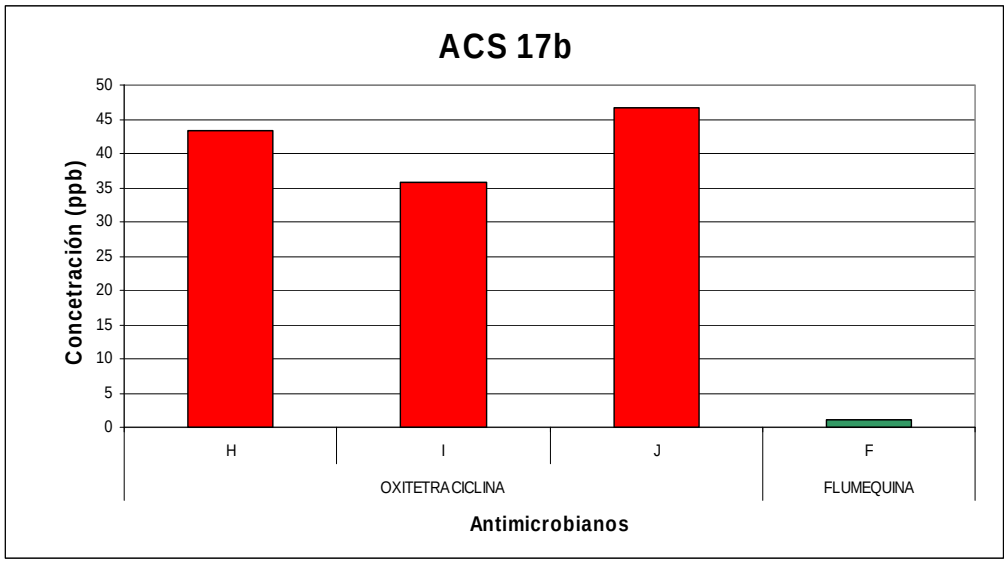


Figura 58. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina y Flumequina en la Agrupación de Concesión Salmonera 17b.

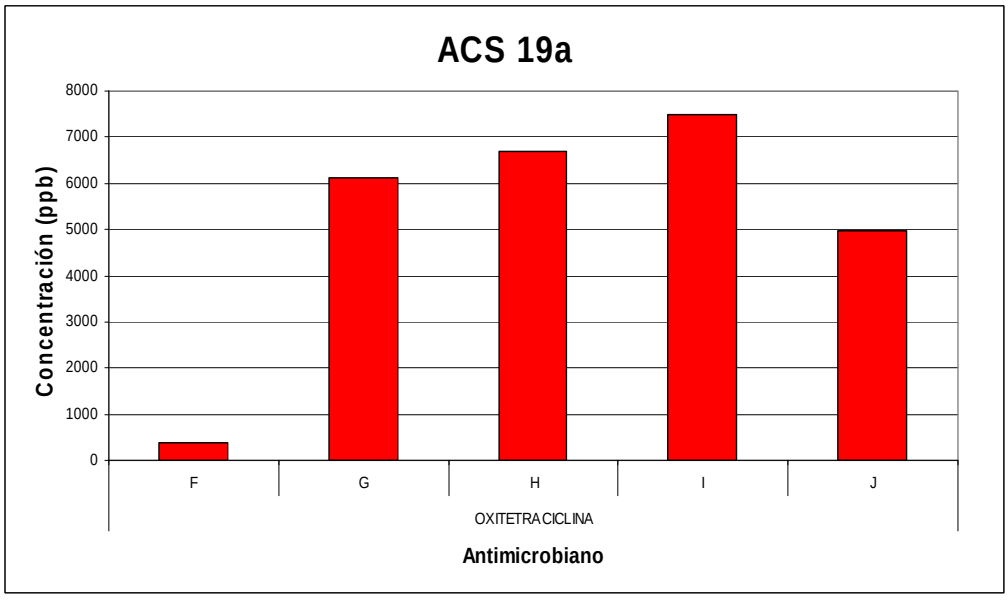


Figura 59. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 19a.

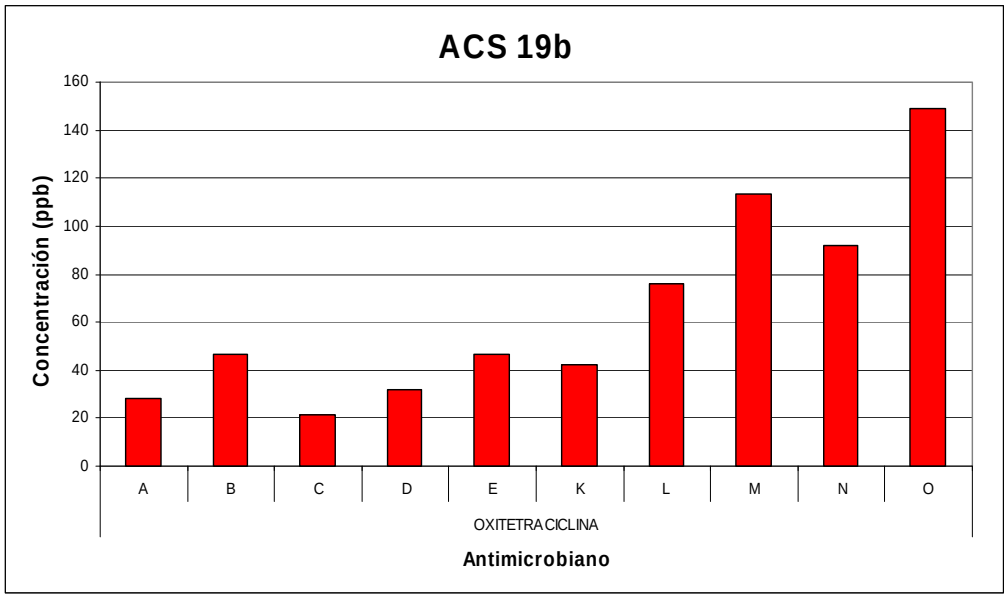


Figura 60. Distribución de los resultados de cuantificación de Oxitetraciclina en la Agrupación de Concesión Salmonera 19b.

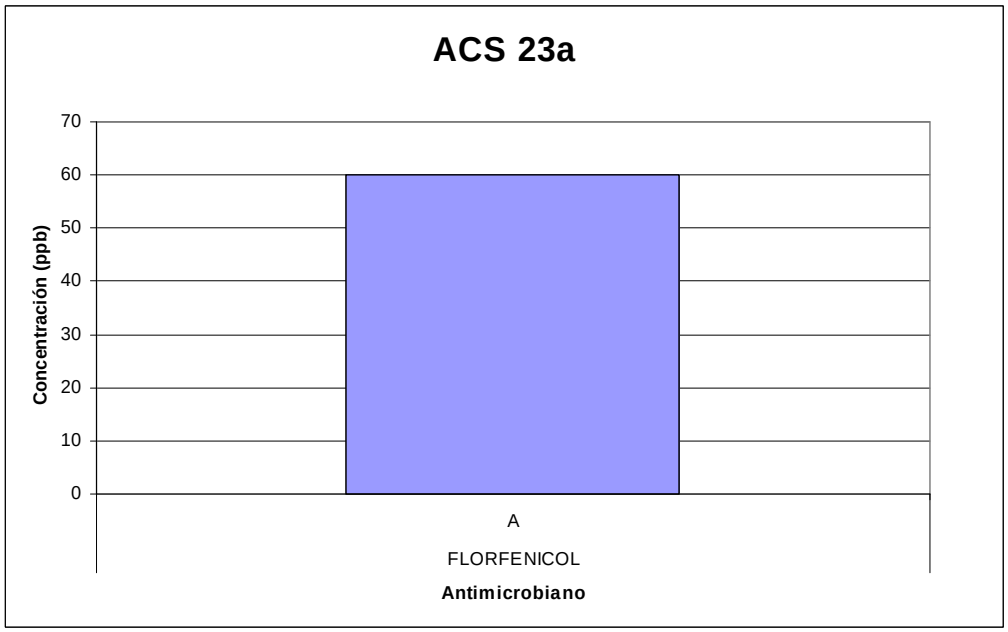


Figura 61 Distribución de los resultados de cuantificación de Florfenicol en la Agrupación de Concesión Salmonera 23a.

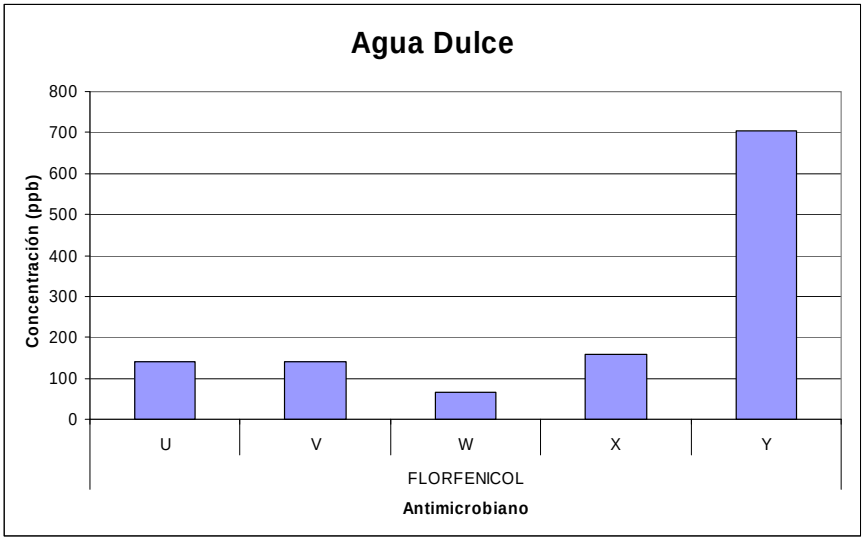
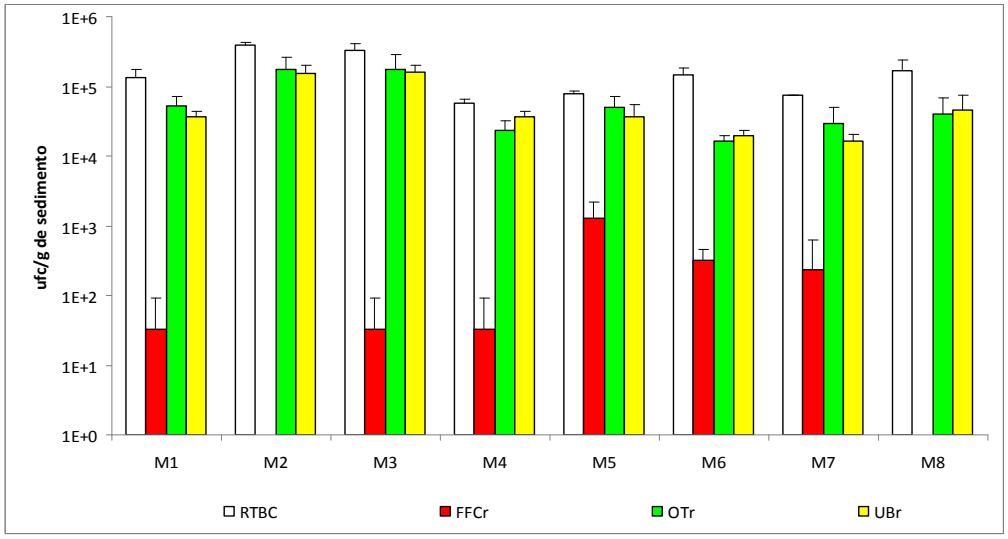


Figura 62 Distribución de los resultados de cuantificación de Florfenicol en centros de cultivo de agua dulce.



M1	Extremo Puerto Cisne	M2	Centro Puerto Cisne
M3	Extremo Puerto Cisne	M4	100 metros Puerto Cisne
M5	Extremo Seno Magdalena	M6	Central Seno Magdalena
M7	Extremo Seno Magdalena	M8	100 metros Seno Magdalena

Figura 63. Recuento cultivable de bacterias heterótrofas totales (RTBC) y resistentes a Florfenicol (FFCr), Oxitetraciclina (OTr) y Flumequina (UBr) presente en sedimentos de centros de cultivo de salmones en Chile.

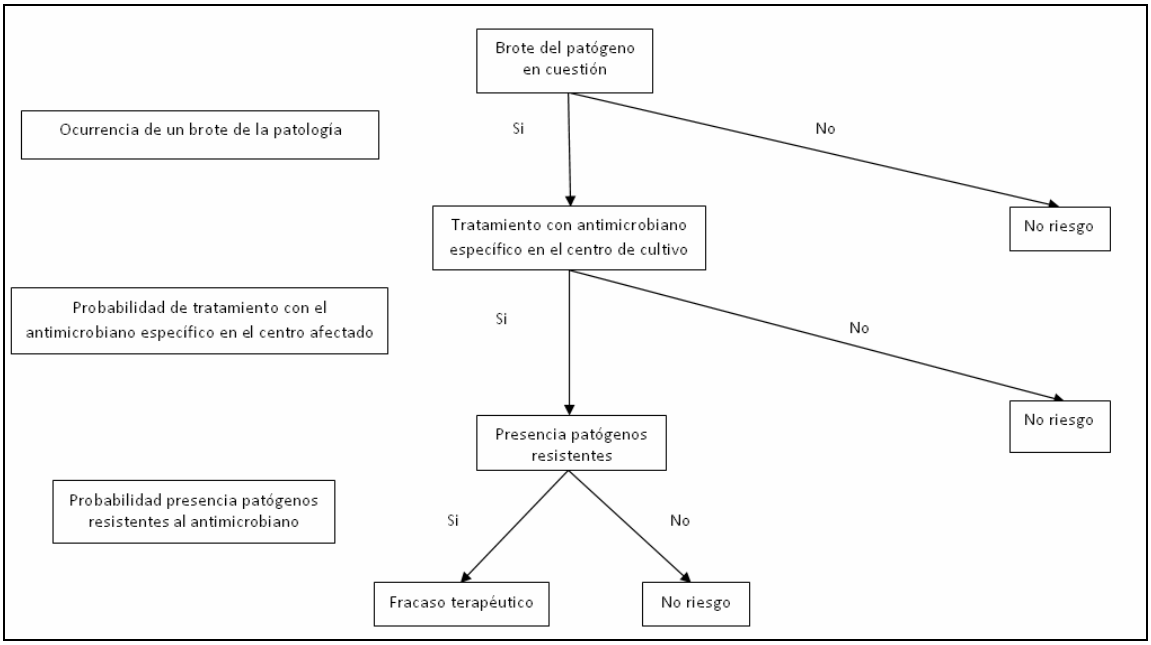


Figura 64. Diagrama de flujo de la conceptualización del análisis de riesgo de la resistencia bacteriana

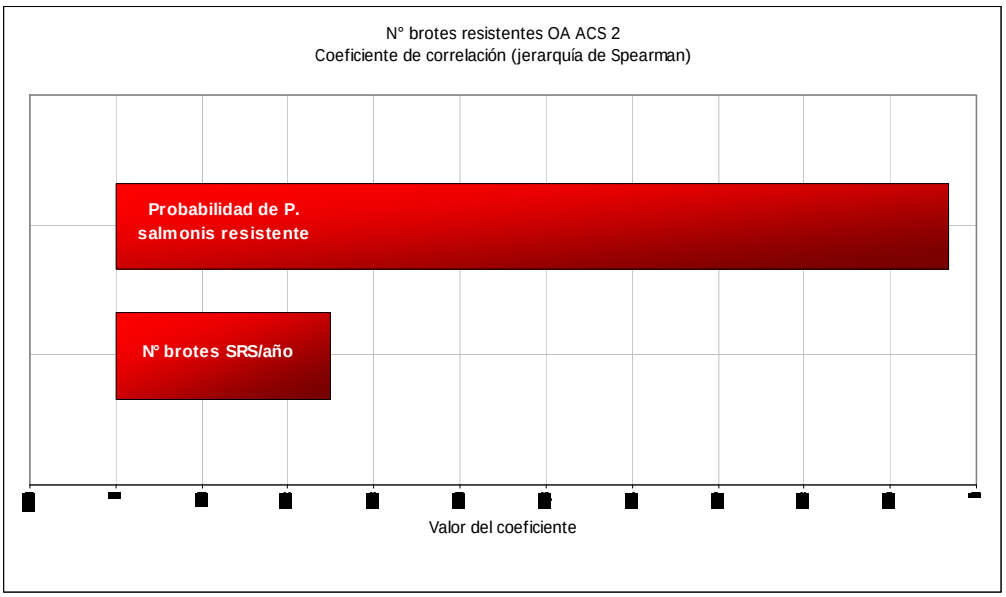


Figura 65. Gráfico de tornado (correlación de Spearman) para el N° de brotes de Piscirickettsiosis (SRS) causado por cepas resistentes a OA en la ACS 2.

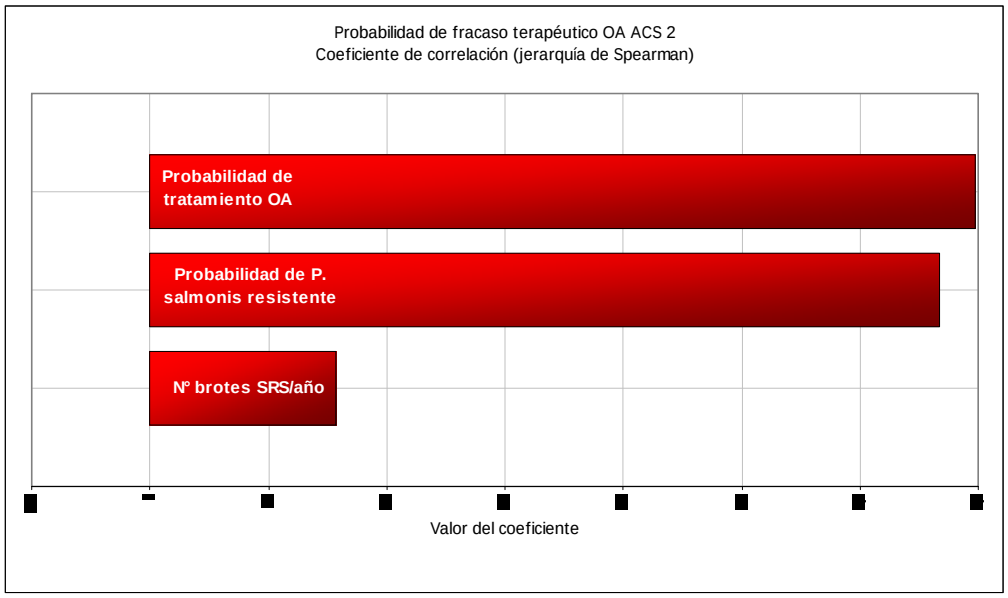


Figura 66. Gráfico de tornado (correlación de Spearman) para la probabilidad de fracaso terapéutico frente a un brote de Piscirickettsiosis tratado con OA en la ACS 2

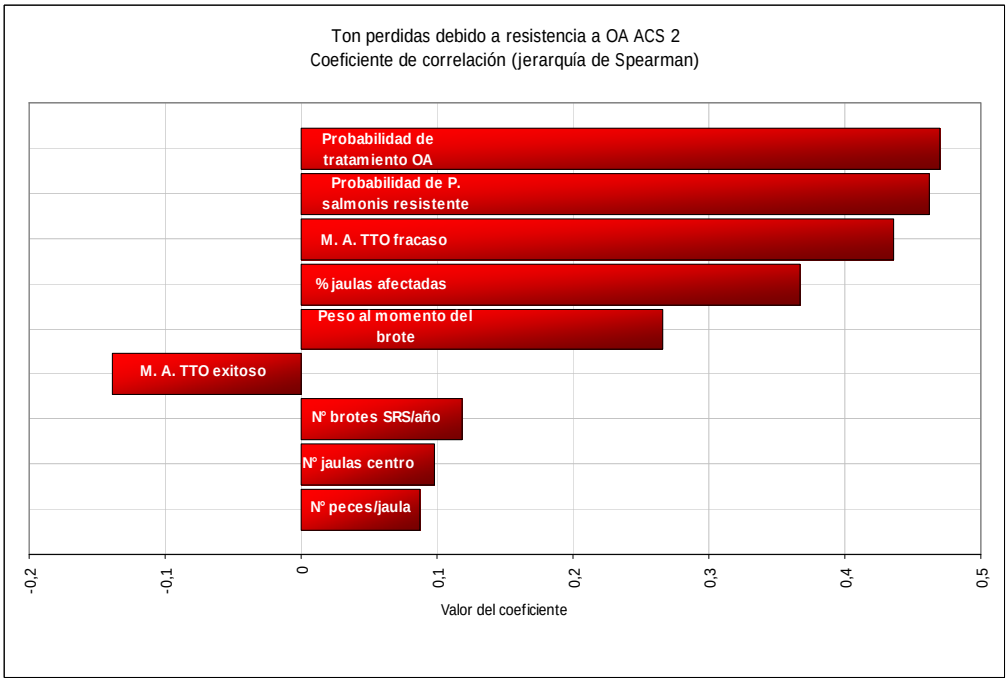


Figura 67. Gráfico de tornado (correlación de Spearman) para las pérdidas (Ton de producto) debido al fracaso terapéutico frente a *P. salmonis* con OA en la ACS 2

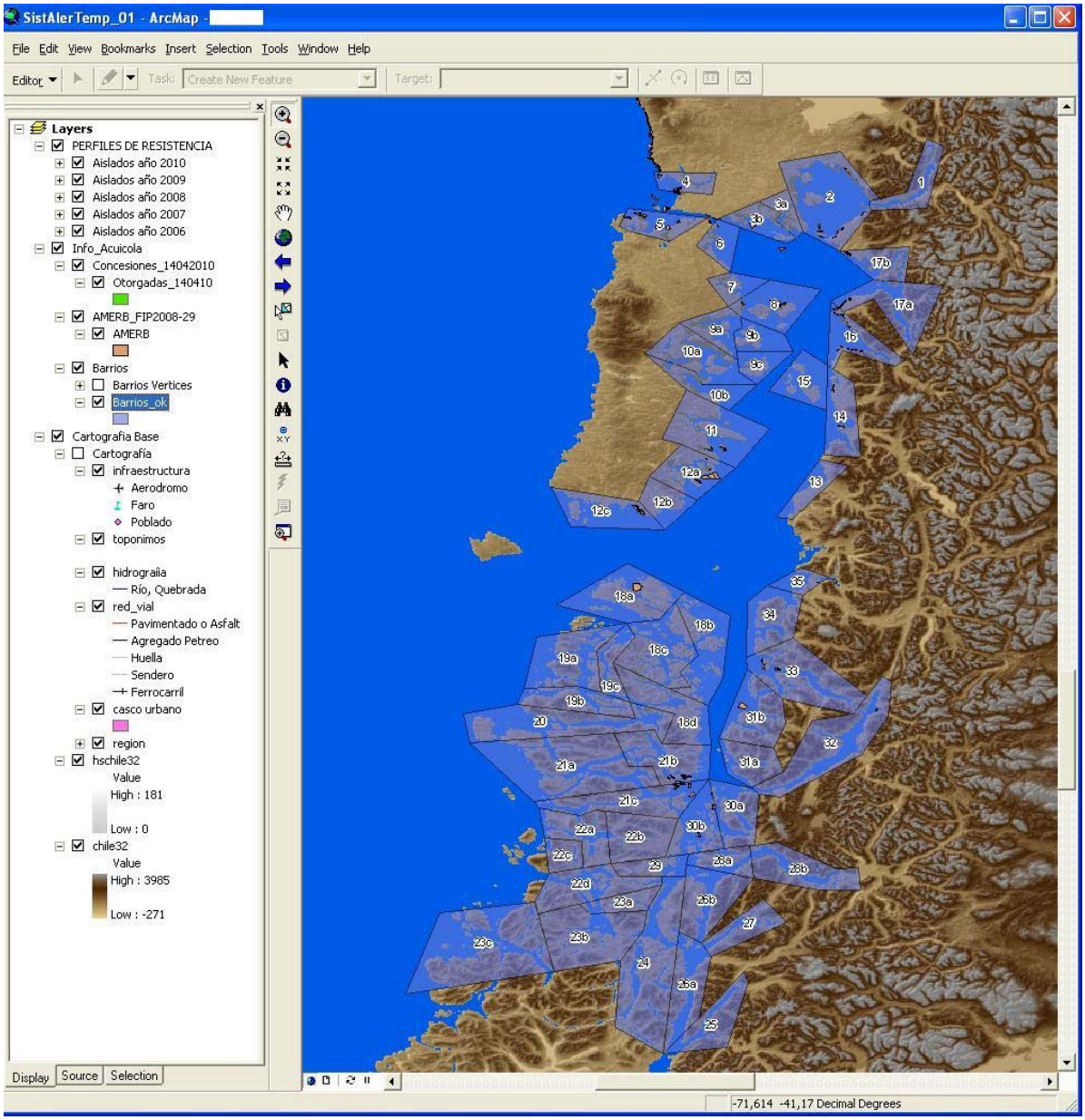


Figura 68. Vista general de la cartografía base contenida en el Sistema de Información Geográfica (S.I.G.)

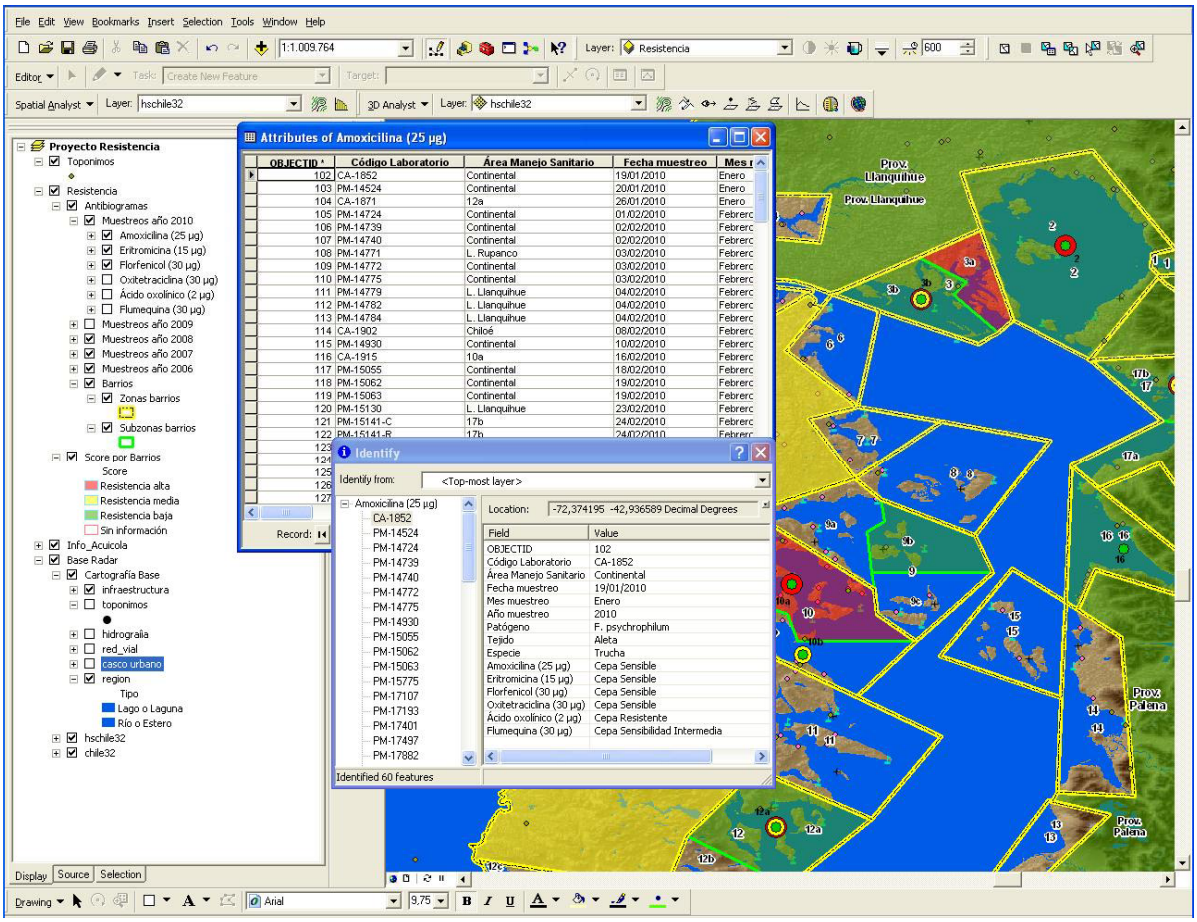


Figura 69. Ejemplo de Información de los perfiles de resistencia bacteriana desplegada en el S.I.G. implementado.

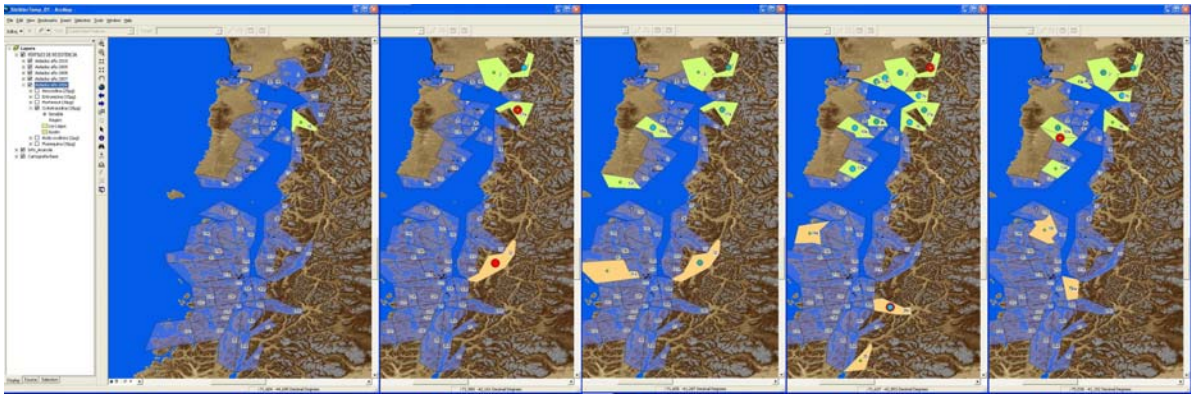


Figura 70. Ejemplo de Visualización espacio-temporal de perfiles de resistencia bacteriana.

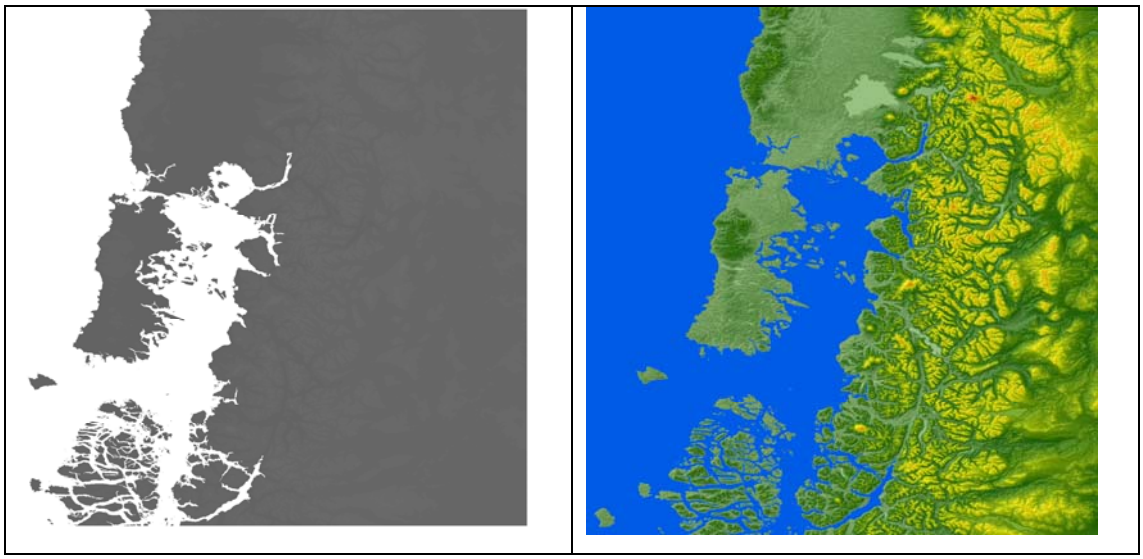


Figura 71. Imagen de Radar e imagen geo-procesada en DEM.

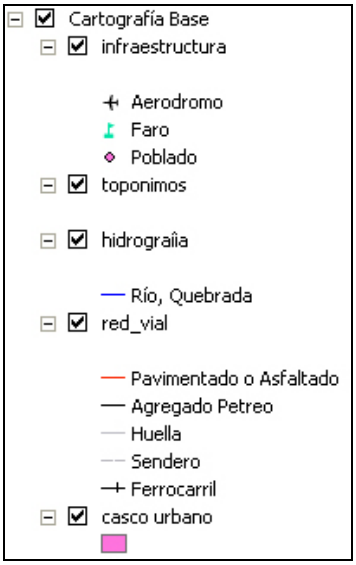


Figura 72. Simbología de la cartografía vectorial base.

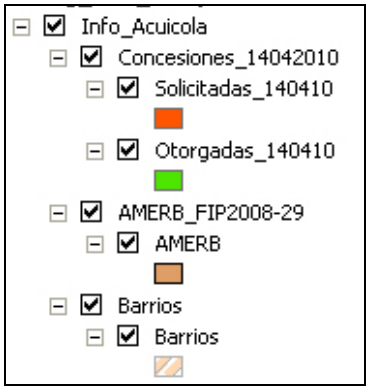


Figura 73. Simbología asociada a la información cartográfica de carácter acuícola.

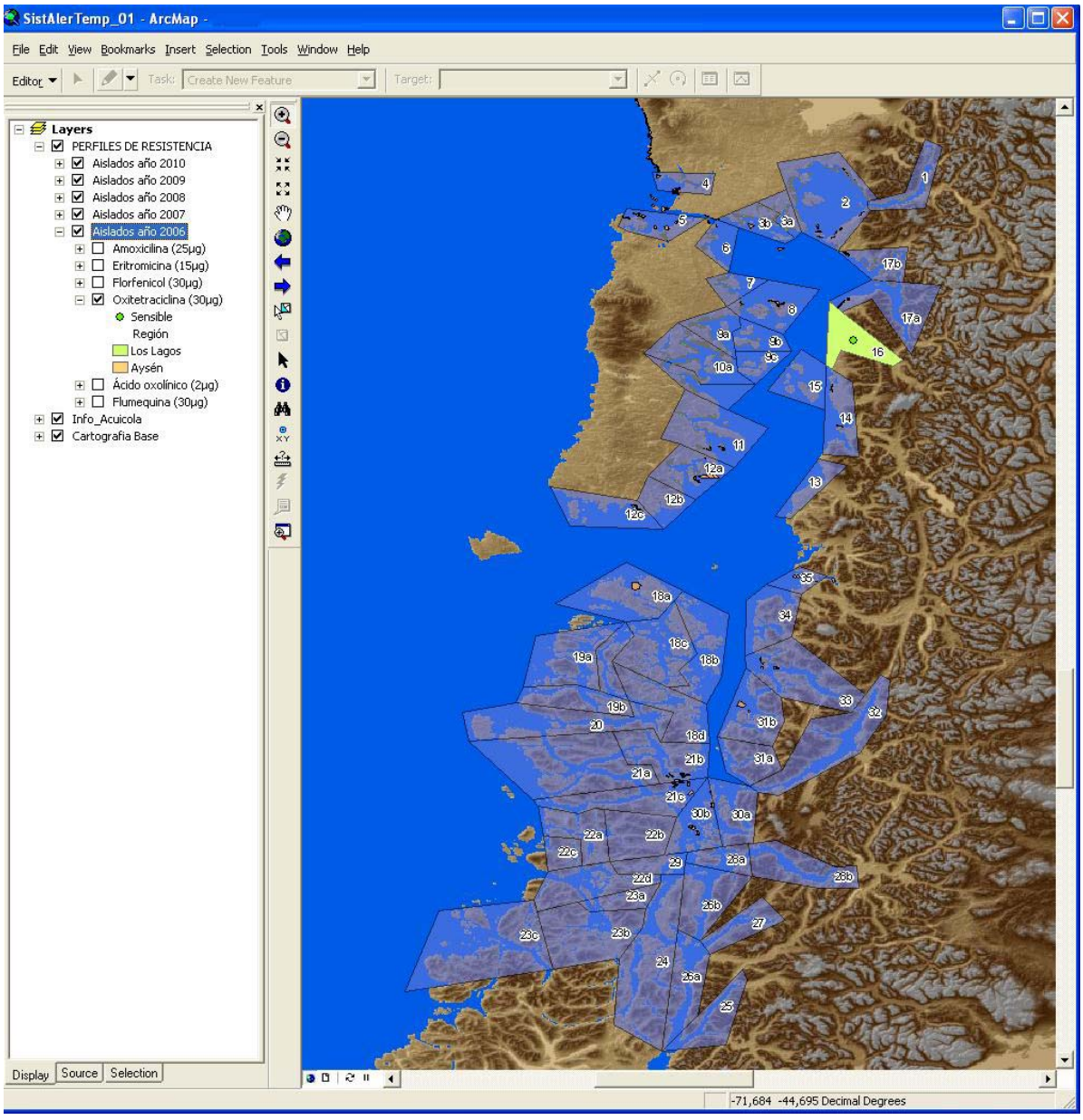


Figura 74. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2006.

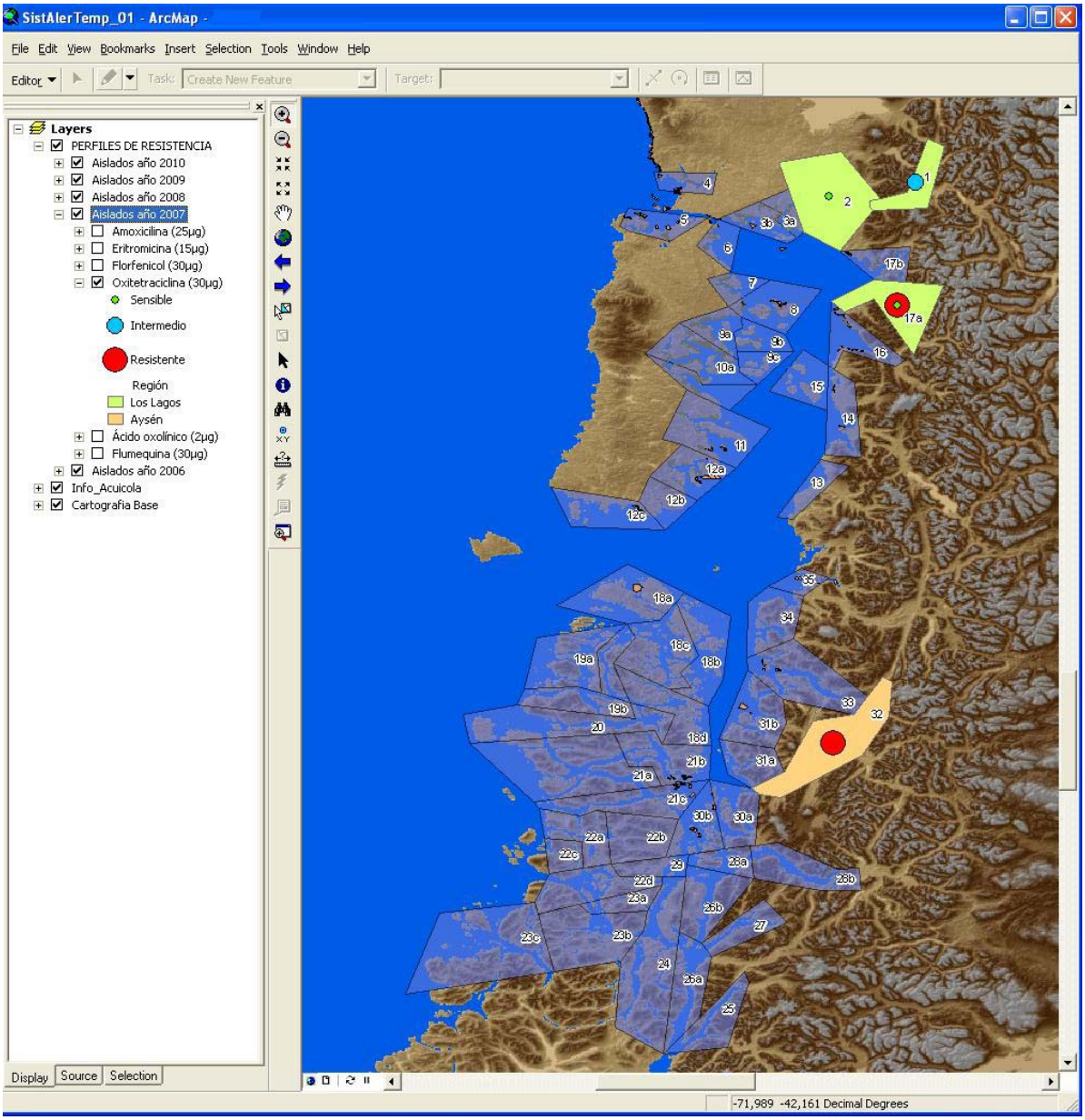


Figura 75. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2007.

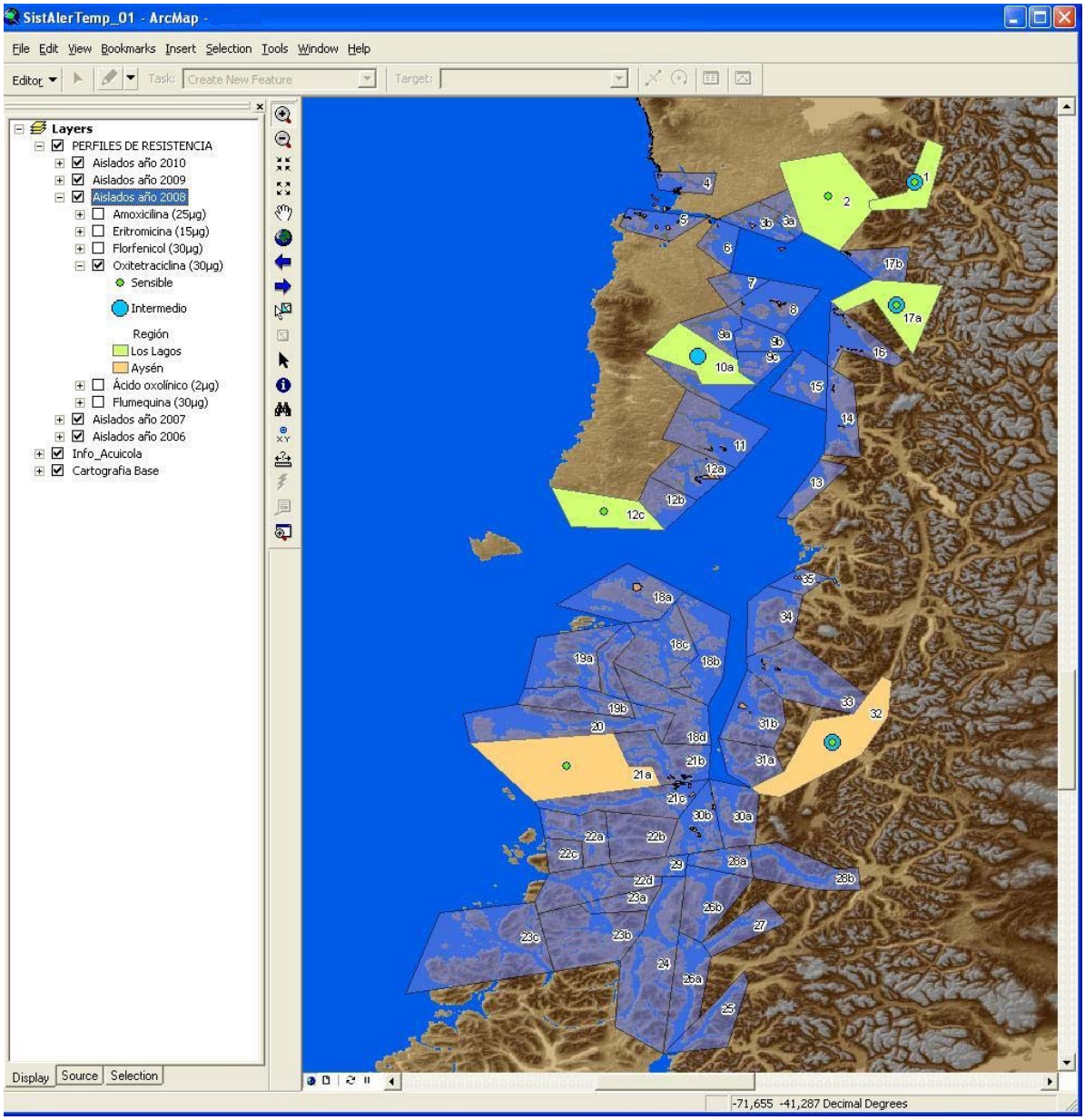


Figura 76. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2008.

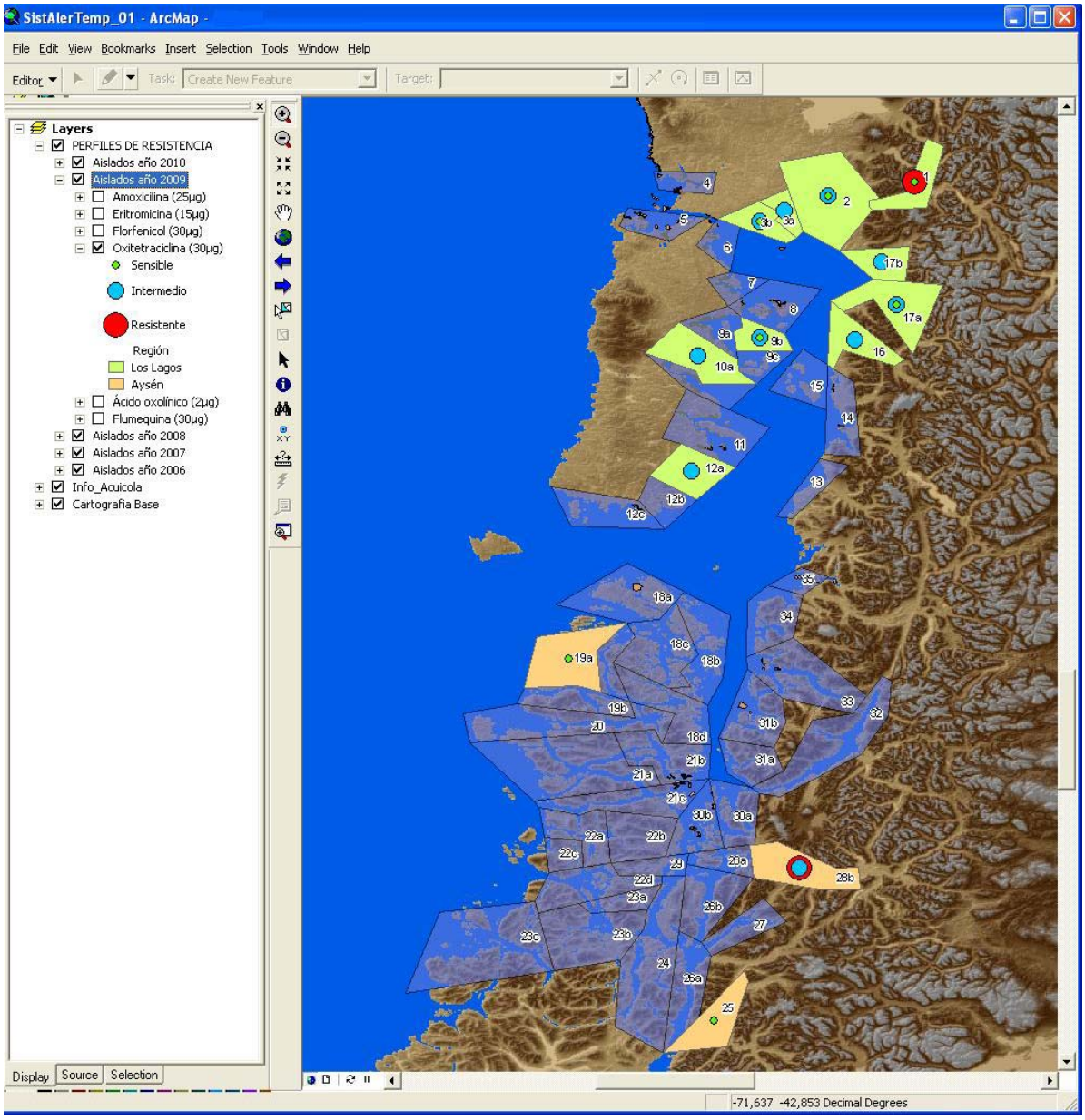


Figura 77. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2009.

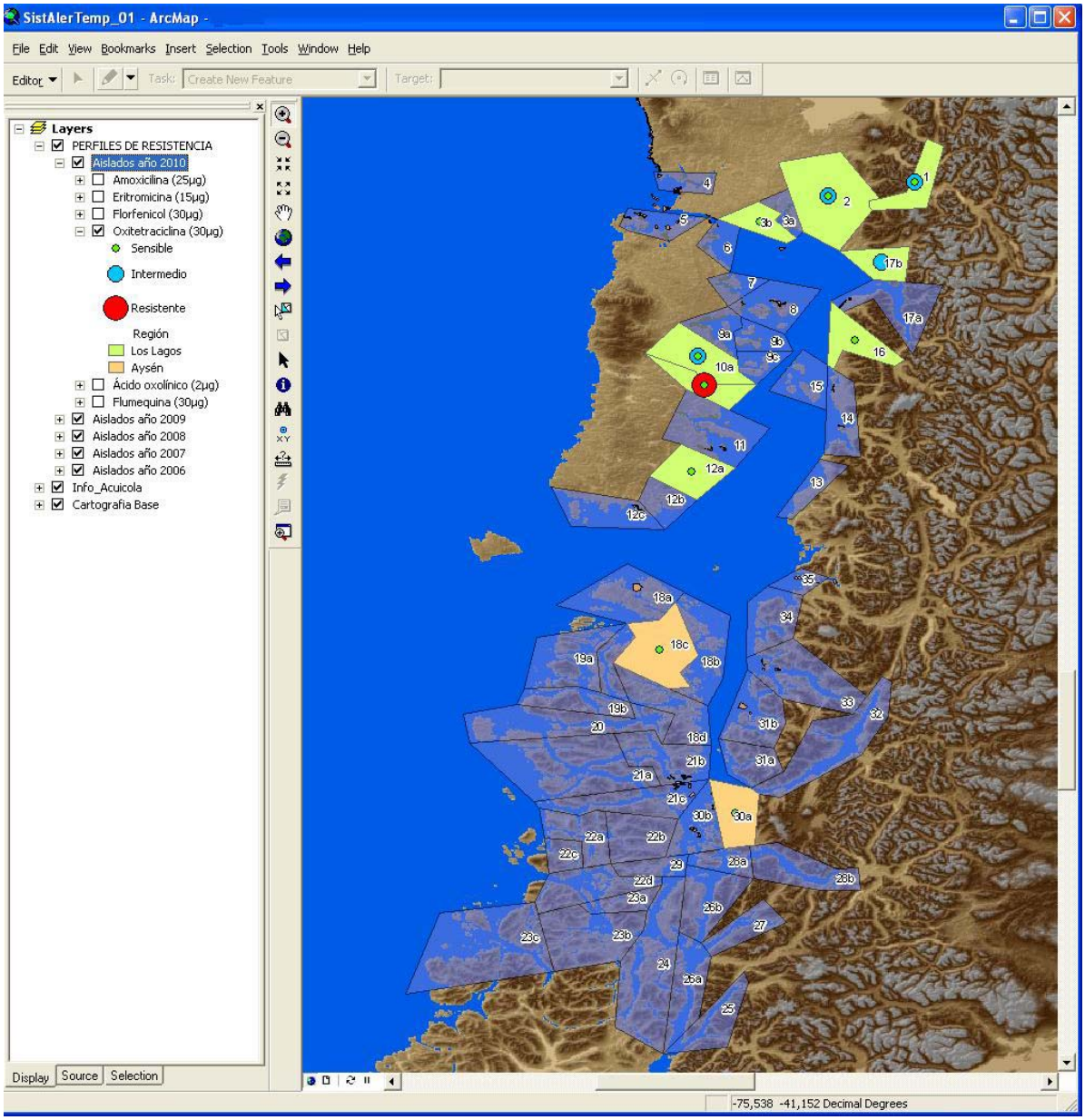


Figura 78. Ejemplo de visualización de perfiles de resistencia bacteriana georreferenciados para el fármaco oxitetraciclina para el año 2010.

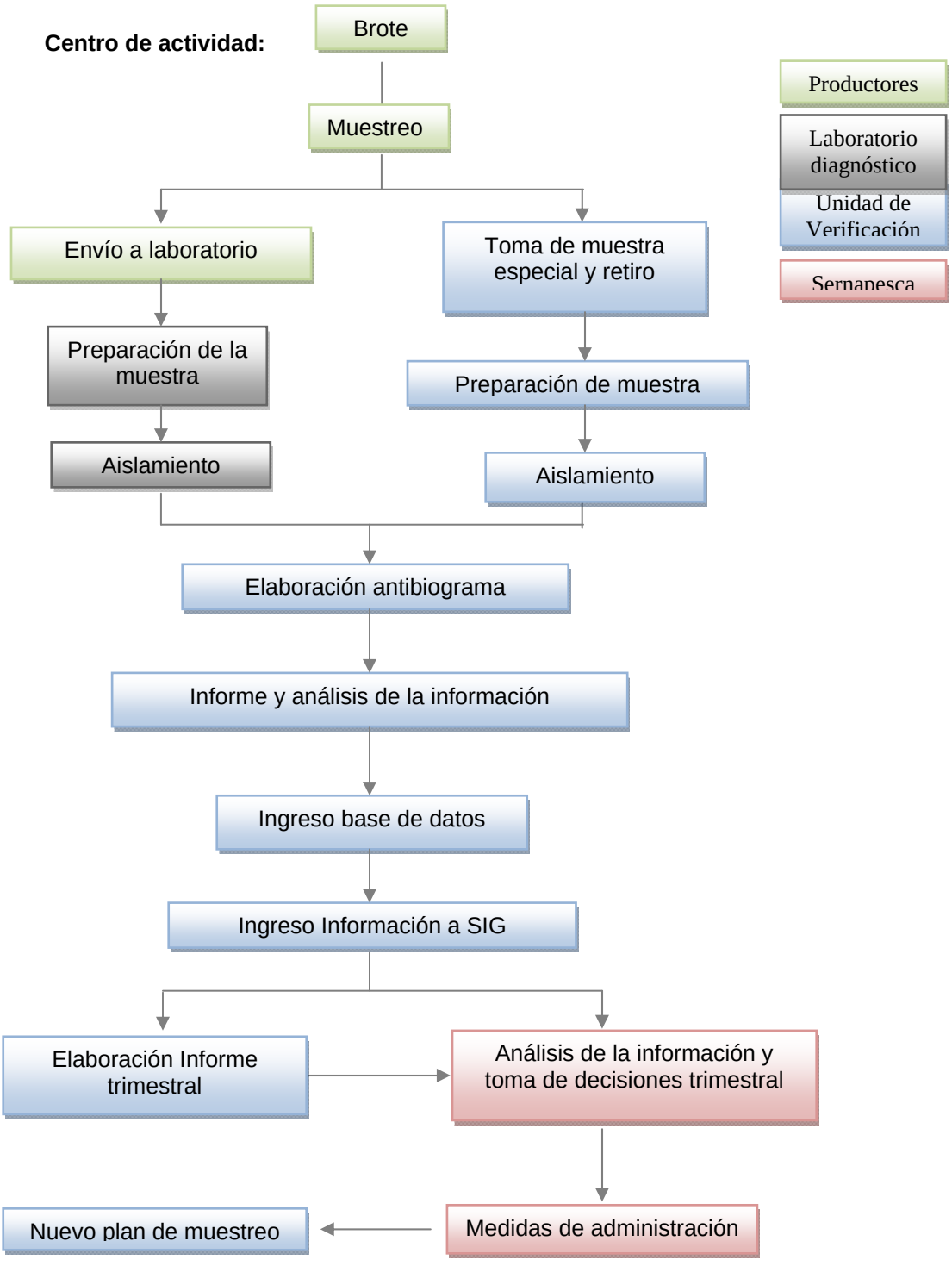


Figura 79. Diagrama de Flujo del Programa Oficial de Vigilancia de Resistencia Bacteriana.

T A B L A S

Tabla 1. Centros de cultivo muestreados por región y por Agrupación de Concesiones Salmoneras (ACS), durante las campañas de muestreo, a Noviembre de 2010.

Región	ACS	Nº centros muestreados
Los Lagos	1	18
	2	8
	3a	1
	3b	3
	9a	2
	9b	7
	10a	4
	11	6
	12a	10
	16	3
	17a	5
	17b	7
	Lago	6
	Piscicultura	7
Aysén	18c	2
	19a	5
	19b	3
	20	1
	22a	3
	22b	1
	22d	1
	23a	2
	25	8
	28b	6
	29	1
	30a	2
Total	**24 (1)**	**122**

ACS: Agrupación de Concesiones Salmoneras
(1) : No considera muestreos en agua dulce.

Tabla 2. Cantidad total de muestras obtenidas durante las campañas de muestreo, por Agrupación de Concesiones Salmoneras (ACS), a Noviembre de 2010.

Región	ACS	Nº muestras obtenidas
Los Lagos	1	42
	2	16
	3a	1
	3b	10
	9a	4
	9b	18
	10a	7
	11	12
	12a	20
	16	4
	17a	9
	17b	14
	Lago	19
	Piscicultura	9
Aysén	18c	3
	19a	12
	19b	4
	20	1
	22a	6
	22b	1
	22d	2
	23a	6
	25	10
	28b	10
	29	2
	30a	2
Total	**24** (1)	**244** (2)

ACS: Agrupación de Concesiones Salmoneras
(1): No considera muestreos en agua dulce.
(2): No considera cepas evaluadas, adquiridas desde laboratorios.

Tabla 3. Resultados de perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos a partir antibiogramas de muestras(1) obtenidas desde centros de cultivo de agua de mar y centros estuarinos en ACS en la Región de Los Lagos y Región de Aysén y desde centros de agua dulce de la Región de Los Lagos.

							PERFIL DE RESISTENCIA (ANTIBIOGRAMA)					
Código Laboratorio	Agrupación Concesión Salmonera	Fecha de muestreo	AÑO	Patógeno	Tejido	Especie	AML	E	FFC	OT	OA	UB
AY-977	25	26-03-2009	2009	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	R	R
AY-978	25	26-03-2009	2009	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	S	—	S	S	R	R
PM-10822	Agua dulce (L. Rupanco)	13-05-2009	2009	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	R	R
PM-10824	Agua dulce (Continente)	13-05-2009	2009	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	S	S
AY-1068	28b	28-05-2009	2009	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	S	—	S	R	R	R
PM-11109	1	04-06-2009	2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-4244	Agua dulce (Continente)	23-06-2008	2008	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	S	—	S	I	R	R
PM-4584	Agua dulce (Continente)	07-07-2008	2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	S	—	S	S	R	S
PM-13329	Agua dulce (L. Llanquihue)	05-11-2009	2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-13677	Agua dulce (Continente)	25-11-2009	2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-13792	Agua dulce (Continente)	01-12-2009	2009	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-14034	Agua dulce (Continente)	10-12-2009	2009	*F. psychrophilum*	Úlcera	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-12101	Agua dulce (L. Llanquihue)	05-08-2009	2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
CA-1852	Agua dulce (Continente)	19-01-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	S	—	S	S	R	I
CA-1902	Agua dulce (Chiloé)	08-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	I
PM-14524	Agua dulce (Continente)	20-01-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	R	R
PM-14724	Agua dulce (Continente)	01-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Cavidad	Salar	S	—	S	I	S	S
PM-14739	Agua dulce (Continente)	02-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-14740	Agua dulce (Continente)	02-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	R	S
PM-14771	Agua dulce (L. Rupanco)	03-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Coho	S	—	S	S	R	S
PM-14772	Agua dulce (Continente)	03-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	R
PM-14779	Agua dulce (L. Llanquihue)	04-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Coho	R	—	R	I	S	S
PM-14782	Agua dulce (L. Llanquihue)	04-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-14784	Agua dulce (L. Llanquihue)	04-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-14930	Agua dulce (Continente)	10-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-14775	Agua dulce (Continente)	03-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	I	R	S
PM-15055	Agua dulce (Continente)	18-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-15062	Agua dulce (Continente)	19-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	R	—	R	R	S	S
PM-15063	Agua dulce (Continente)	19-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	R	—	S	R	S	S
CA-1214	Agua dulce (Chiloé)	22-04-2009	2009	*F. psychrophilum*	Cavidad	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-5044	2	29-07-2008	2008	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-4584	Agua dulce (Continente)	07-07-2008	2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-4758	Agua dulce (Continente)	15-07-2008	2008	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	S	—	S	S	R	R
PM-4638	Agua dulce (Continente)	09-07-2008	2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-4242	Agua dulce (L. Rupanco)	23-06-2008	2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	S	—	S	S	R	S
PM-4282	Agua dulce (Continente)	24-06-2008	2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	S	—	S	S	R	R
PM-3872	Agua dulce (L. Llanquihue)	09-06-2008	2008	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	S	—	S	S	R	R
CA-2089	Agua dulce (Chiloé)	26-03-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	S	—	S	S	S	S
CA-2090	Agua dulce (Chiloé)	26-03-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	S	—	S	S	R	S
CA-2108	Agua dulce (Chiloé)	31-03-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-15688	Agua dulce (L. Llanquihue)	26-03-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-15775	Agua dulce (Continente)	30-03-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Ulcera	Salar	S	—	S	S	R	S
PM-15784	Agua dulce (L. Rupanco)	31-03-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-16012	Agua dulce (L. Llanquihue)	13-04-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	S	—	S	S	R	I
PM-16013	Agua dulce (L. Llanquihue)	12-04-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-15130	Agua dulce (L. Llanquihue)	23-02-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia-Aleta	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-12918	Agua dulce (Continente)	07-10-2009	2009	*F. psychrophilum*	Bazo	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-13339	2	05-11-2009	2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-13548	Agua dulce (L. Llanquihue)	17-11-2009	2009	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-16712	Agua dulce (L. Llanquihue)	17-05-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
CA-2279	10a	27-05-2010	2010	*F. psychrophilum*	Lesión	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-16900	16	28-05-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-15659	Agua dulce (L. Llanquihue)	25-03-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta-Lesión	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18821	Agua dulce (L. Llanquihue)	01-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta-Lesión	Trucha	S	—	S	S	R	I
PM-18854	Agua dulce (Continente)	05-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta	Trucha	S	—	S	S	R	R
PM-19018	Agua dulce (L. Llanquihue)	15-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-19019	Agua dulce (L. Llanquihue)	15-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-19020	Agua dulce (L. Rupanco)	15-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta-Úlcera	Trucha	S	—	S	S	S	S
CA-2335	10a	10-06-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
CA-2382	Agua dulce (Chiloé)	23-06-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-17107	Agua dulce (Continente)	05-06-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	R	S
PM-17193	Agua dulce (Continente)	10-06-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	I	—	S	I	S	S
PM-17401	Agua dulce (Continente)	23-06-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-17497	Agua dulce (Continente)	25-06-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-17851	Agua dulce (L. Llanquihue)	19-07-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	R	R	R	R
PM-17882	Agua dulce (Continente)	21-07-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-17961-C	Agua dulce (L. Llanquihue)	28-07-2010	2010	*F. psychrophilum*	Columna	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-17961-B	Agua dulce (L. Llanquihue)	28-07-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-17982	Agua dulce (L. Llanquihue)	30-07-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-17995	1	02-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Coho	S	—	S	S	R	S
PM-18014	Agua dulce (Continente)	03-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18037	Agua dulce (L. Llanquihue)	05-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18046	Agua dulce (L. Llanquihue)	05-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-18137	Agua dulce (L. Llanquihue)	10-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18190	Agua dulce (Continente)	13-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-18241	Agua dulce (L. Rupanco)	18-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18345	Agua dulce (Continente)	25-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-18350	Agua dulce (Continente)	25-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18351	Agua dulce (Continente)	25-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	R
PM-18352	Agua dulce (Continente)	25-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18403	Agua dulce (Continente)	30-08-2010	2010	*F. psychrophilum*	Úlcera	Trucha	S	—	S	S	S	S
CA-2662	Agua dulce (Chiloé)	01-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	R	R
PM-18478	Agua dulce (Continente)	07-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-18484	Agua dulce (L. Rupanco)	08-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18498	Agua dulce (L. Llanquihue)	08-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
CA-2697	Agua dulce (Chiloé)	10-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	R	R
PM-18758	Agua dulce (L. Llanquihue)	28-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18798	Agua dulce (Continente)	30-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18799	Agua dulce (Continente)	30-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	R	R	R	R
PM-18800	Agua dulce (Continente)	30-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	R	R	R
PM-18801	Agua dulce (Continente)	30-09-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	R	S	S
CA-2769	Agua dulce (Chiloé)	01-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	—	S	S	S	S

En colores: S = Sensible; I = Sensibilidad Intermedia; R =Resistente.
AML: amoxicilina; E: eritromicina; FFC: florfenicol; OT: oxitetraciclina; OA: acido oxolínico; UB: flumequina N.I: espécie no identificada por laboratório.

CA-2770	Agua dulce (Chiloé)	01-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	–	S	S	S	S
CA-2771	Agua dulce (Chiloé)	01-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	–	R	R	R	R
CA-2778	Agua dulce (Chiloé)	06-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	–	R	R	R	R
CA-2779	Agua dulce (Chiloé)	06-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	I	–	S	R	S	S
PM-18899	Agua dulce (Chiloé)	07-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	R	S
CA-2787	10b	08-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	I	–	S	R	S	S
CA-2792	10b	08-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
CA-2793	10b	08-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	R	S
CA-2794	10b	08-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	R	R
PM-18956	Agua dulce (L. Llanquihue)	13-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	I	–	S	S	S	S
PM-18957	Agua dulce (L. Llanquihue)	13-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	R	S
PM-18958	Agua dulce (L. Llanquihue)	13-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-18977	Agua dulce (Continente)	14-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-18985	Agua dulce (Continente)	14-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-18986	Agua dulce (Continente)	14-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-18987	Agua dulce (Continente)	14-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-18992	Agua dulce (Continente)	14-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19002	Agua dulce (Continente)	14-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19013	Agua dulce (Continente)	15-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19014	Agua dulce (Continente)	15-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
CA-2815	Agua dulce (Chiloé)	18-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19028	Agua dulce (Continente)	19-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	R	S
PM-19035	Agua dulce (L. Rupanco)	19-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19068	Agua dulce (L. Llanquihue)	21-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19069	Agua dulce (L. Llanquihue)	21-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19219	Agua dulce (L. Llanquihue)	30-10-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19221	Agua dulce (Continente)	02-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19249	Agua dulce (Continente)	03-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
CA-2905	Agua dulce (Chiloé)	04-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19322	Agua dulce (L. Llanquihue)	08-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19323	Agua dulce (L. Llanquihue)	08-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	R	R
PM-19324	Agua dulce (L. Llanquihue)	08-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
CA-2922	10b	09-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19367	1	11-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19404	Agua dulce (L. Rupanco)	12-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
CA-2959	Agua dulce (Chiloé)	12-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19416	Agua dulce (Continente)	15-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19428	Agua dulce (Continente)	16-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	R	S
PM-19429	Agua dulce (Continente)	16-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19430	Agua dulce (Continente)	16-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19456	Agua dulce (Continente)	17-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Cavidad	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19464	Agua dulce (Continente)	17-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	R	S
PM-19485	Agua dulce (Continente)	18-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19517	Agua dulce (L. Rupanco)	18-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19585	Agua dulce (Continente)	23-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19587	Agua dulce (Continente)	23-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19593	Agua dulce (Continente)	23-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
CA-3011	10b	23-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19635	Agua dulce (Continente)	25-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19655	Agua dulce (Continente)	25-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19667	Agua dulce (Continente)	26-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19743	Agua dulce (L. Llanquihue)	30-11-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Coho	S	–	S	S	S	S
PM-19753	Agua dulce (L. Rupanco)	01-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19803	Agua dulce (Continente)	03-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	I	–	S	I	S	S
PM-19816	Agua dulce (Continente)	04-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19890	Agua dulce (Continente)	07-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-19910	Agua dulce (L. Llanquihue)	10-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19912	Agua dulce (Continente)	10-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19915	Agua dulce (Continente)	10-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-19951	Agua dulce (Continente)	10-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-16479-R	1	06-05-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-16477-R	1	06-05-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	R	S
PM-16478-R	1	06-05-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	R	S
PM-10115	9b	12-03-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	R	–	I	I	S	S
PM-10112	9b	11-02-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-10116	9b	12-03-2009	2009	*P. salmonis*	Bazo	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-10312	2	02-04-2009	2009	*P. salmonis*	Cerebro	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-10387	17a	08-04-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-10399	2	09-04-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-10612	1	28-04-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-10628	17b	29-04-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-10629	17b	29-04-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-10695	1	05-05-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-10696	1	05-05-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Coho	S	–	S	S	S	S
PM-10727	1	07-05-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-10795	19a	11-05-2009	2009	*P. salmonis*	Ulcera	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-10141	17a	17-05-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	S	–	S	I	S	S
PM-5454	17a	20-08-2008	2008	*P. salmonis*	Lesión	Salar	S	–	S	I	S	S
PM-11787	19a	14-07-2009	2009	*P. salmonis*	Riñon-Hígado-Úlcera	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-11922	2	23-07-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro-Ulcera	Coho	S	–	S	S	S	S
PM-11947	3b	23-07-2009	2009	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	S	–	S	I	S	S
PM-11980	17b	24-07-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Trucha	S	–	S	I	S	S
PM-12010	3b	05-08-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Coho	S	–	S	S	S	S
AY-1140	28b	28-07-2009	2009	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	–	S	I	S	S
CA-1670	12a	15-10-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Coho	S	–	S	S	S	S
PM-13249	19a	29-10-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-13250	19a	29-10-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-13648	17a	18-12-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Salar	R	–	S	S	S	S
PM-10107	2	11-03-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Coho	S	–	S	S	S	S
PM-7140	10a	16-10-2008	2008	*P. salmonis*	Riñón	Coho	S	–	S	I	S	S
PM-7149-C	17a	16-10-2008	2008	*P. salmonis*	Cerebro	Salar	S	–	S	S	S	I
PM-7149-R	17a	16-10-2008	2008	*P. salmonis*	Riñón	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-4809	1	18-07-2008	2008	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	–	S	S	S	S
PM-4939	10a	24-07-2008	2008	*P. salmonis*	Riñón	Coho	S	–	S	I	S	R
PM-9893	3a	25-02-2009	2009	*P. salmonis*	Caverna Muscular	Trucha	R	–	S	I	S	R
PM-11172	2	09-06-2009	2009	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	S	–	S	S	S	S
PM-11807	2	15-07-2009	2009	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	S	–	S	S	S	S
770483	10a	04-06-2009	2009	*P. salmonis*	Cavidad pericárdica	Trucha	R	–	S	I	R	S
770486	10a	04-06-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	R	–	S	I	R	S
CA-1646	12a	13-10-2009	2009	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	S	–	S	I	R	R
PM-15742	18c	29-03-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Salar	S	–	S	S	S	S
PM-15929	1	07-04-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	–	S	S	S	S

PM-15970	2	09-04-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-15141-C	17b	24-02-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-15141-R	17b	24-02-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	I	S	I
PM-15911-C	12a	06-04-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-15911-R	12a	06-04-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-15941-C	2	08-04-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-15941-R	2	08-04-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	I	S	R
PM-13680	16	26-11-2009	2009	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-14187	17a	18-12-2009	2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Trucha	R	—	S	S	S	S
CA-1871	12a	26-01-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
CA-1915	10a	16-02-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	I	S	I
PM-15932	1	07-04-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	I	S	S
PM-17972	1	06-07-2010	2010	*P. salmonis*	Lesión	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18236	1	17-08-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18339	30a	24-08-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón-Bazo-Hígado	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18629-H	1	15-09-2010	2010	*P. salmonis*	Hígado	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18629-C	1	15-09-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18703	1	23-09-2010	2010	*P. salmonis*	Bazo-Hígado	Coho	S	—	S	S	R	S
PM-18704-R	2	23-09-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18704-C	2	23-09-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-18788-H	1	29-09-2010	2010	*P. salmonis*	Hígado	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18788-C	1	29-09-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18925	3b	08-10-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	S	—	S	S	R	S
PM-18926	3b	08-10-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-19061-R	1	20-10-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-19061-C	1	20-10-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	R	S
PM-19190	3b	29-10-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón-Bazo-Hígado-Cerebro-Úlcera	Coho	S	—	S	S	R	S
PM-16477-R	1	06-05-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-16477-C	1	06-05-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-16478-R	1	06-05-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-16478-C	1	06-05-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-16479-R	1	06-05-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-16479-C	1	06-05-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-17876-R-H	1	21-07-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón-Hígado	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-17876-C	1	21-07-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-17985-R	1	30-07-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Coho	S	—	S	S	S	S
PM-17985-C	1	30-07-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	S	—	S	S	S	S
PM-17991-R	2	30-07-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-17991-C	2	30-07-2010	2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	S	—	S	S	S	S
PM-18326	1	24-08-2010	2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	—	S	S	S	S
BV-803-210-PM	32	06-03-2008	2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
BV-803-211-PM	32	21-03-2008	2008	*V. ordalii*	Absceso	Salar	S	—	S	S	S	S
BV-609-51-PM	16	11-09-2006	2006	*V. ordalii*	Úlcera	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-3513	32	27-05-2008	2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	R	—	R	S	S	S
PM-2660	32	23-04-2008	2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	R	—	S	S	S	I
PM-5126	32	31-07-2008	2008	*V. ordalii*	Úlcera	Salar	R	—	I	I	S	S
PM-5125	32	01-08-2008	2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-143	21a	08-01-2008	2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-3579	32	29-05-2008	2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-3515	32	27-05-2008	2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-5791	2	11-09-2009	2009	*V. ordalii*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-505	21a	18-01-2008	2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-10612	1	28-04-2009	2009	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	R	R	R
PM-3843	1	06-06-2008	2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	I	I	R	R
PM-6072	1	29-09-2008	2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	I	R	R
PM-3844	1	06-06-2008	2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	I	R	R
PM-4792	1	07-07-2008	2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	I	R	R
PM-5432	1	19-08-2008	2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	I	I	R	R
BV-801-171-PM	1	11-12-2007	2007	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	S	R	R
BV-801-172-PM	1	11-12-2007	2007	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	S	R	R
BV-801-173-PM	1	17-12-2007	2007	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	I	R	R
BV-902-264-PM	2	29-01-2009	2009	*S. phocae*	Riñón	Trucha	S	S	S	S	R	R
BV-902-317-PM	2	29-01-2009	2009	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	I	R	R
BV-801-318-PM	2	26-12-2007	2007	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	S	R	R
BV-802-319-PM	2	13-02-2008	2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	S	S	S	S	R	R
BV-804-217-PM	Agua dulce (L. Rupanco)	08-04-2008	2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
BV-804-272-PM	Agua dulce (L. Llanquihue)	11-04-2008	2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
BV-805-316-PM	Agua dulce (L. Llanquihue)	05-05-2008	2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-5684	2	03-09-2008	2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-4663	12c	09-07-2008	2008	*Y. ruckeri*	Hígado	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-2550	Agua dulce (L. Rupanco)	17-04-2008	2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-4579	2	07-07-2008	2008	*Y. ruckeri*	Aleta	Salar	S	—	S	S	S	S
PM-12479	Agua dulce (Continente)	04-09-2009	2009	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	R	—	S	S	S	S
PM-12481	Agua dulce (Continente)	04-09-2009	2009	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	R	—	S	S	S	S
BV-711-177-PM	17a	16-11-2007	2007	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	S	—	S	R	R	R
BV-712-178-PM	17a	27-11-2007	2007	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	S	—	S	S	R	S
BV-708-175-PM	32	28-08-2007	2007	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	S	—	S	S	R	R
BV-709-176-PM	32	28-08-2007	2007	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	R	—	S	R	R	S

(1) Considerada la totalidad de cepas bacterianas evaluadas tanto desde muestreos directos como de cepas adquiridas a laboratorios

Interpretación de zonas de inhibición de antibiogramas de Gram negativos y S. phocae

Agente antimicrobiano	Abrev	Conc (µg)	Criterio de lectura (mm)		
			Resistente	Intermedio	Sensible
Acido oxolínico	OA	2	≤ 10		≥ 11
Amoxicilina	AML	25	≤ 13		≥ 17
Streptococcus phocae			≤ 18		≥ 24
Enrofloxacina	ENR	5	≤ 16	17-20	≥ 21
Eritromicina	E	15	≤ 13	14-22	≥ 23
Streptococcus phocae			≤ 15	16-20	≥ 21
Estreptomicina	S	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Florfenicol	FFC	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Flumequina	UB	30	≤ 16	17-19	≥ 20
Furazolidona	FR	100	≤ 14	15-16	≥ 17
Oxitetraciclina	OT	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Sulfametoxazol trimetoprim	SXT	25	≤ 10	11-15	≥ 16

Interpretación de zonas de inhibición de antibiogramas de *P. salmonis*

Agente antimicrobiano	Abrev	Conc (µg)	Criterio de lectura (mm)		
			Resistente	Intermedio	Sensible
Acido oxolínico	OA	2	≤ 10		≥ 11
Amoxicilina	AML	25	≤ 16		≥ 17
Enrofloxacina	ENR	5	≤ 17	18-21	≥ 22
Eritromicina	E	15	≤ 13	14-17	≥ 18
Florfenicol	FFC	30	≤ 16	17-20	≥ 21
Flumequina	UB	30	≤ 20	21-24	≥ 25
Oxitetraciclina	OT	30	≤ 10	11-18	≥ 19
Sulfametoxazol trimetoprim	SXT	25	≤ 10	11-15	≥ 16

Tabla 4. Resultados de niveles de resistencia, por Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos florfenicol, oxitetraciclina, acido oxolínico y flumequina a partir de los análisis realizados a la totalidad de las cepas bacterianas evaluadas.

						CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA (µg/ml)					
Código Laboratorio	Agrupación Concesión Salmonera	Fecha de muestreo	Patógeno	Tejido	Especie	AML	E	FFC	OT	OA	UB
AY-977	25	26/03/2009	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,5	> 8	> 8	> 4
AY-978	25	26/03/2009	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	—	—	0,5	1	> 8	> 4
PM-10822	Agua dulce (L. Rupanco)	13/05/2009	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,25	> 8	> 8	> 4
PM-10824	Agua dulce (Continente)	13/05/2009	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P
AY-1068	28b	28/05/2009	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	—	—	1	> 8	> 8	> 4
PM-11109	1	04/06/2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	> 2	> 8	> 8	> 4
PM-4244	Agua dulce (Continente)	23/06/2008	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-4584	Agua dulce (Continente)	07/07/2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	—	—	> 2	> 8	8	> 4
PM-13329	Agua dulce (L. Llanquihue)	05/11/2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-13677	Agua dulce (Continente)	25/11/2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-13792	Agua dulce (Continente)	01/12/2009	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-14034	Agua dulce (Continente)	10/12/2009	*F. psychrophilum*	Ulcera	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-12101	Agua dulce (L. Llanquihue)	05/08/2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	4	1	0,25
CA-1852	Agua dulce (Continente)	19/01/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	—	—	0,125	8	4	4
CA-1902	Agua dulce (Chiloé)	08/02/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,125	4	8	> 4
PM-14524	Agua dulce (Continente)	20/01/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,125	8	4	4
PM-14724	Agua dulce (Continente)	01/02/2010	*F. psychrophilum*	Cavidad	Salar	—	—	0,5	> 8	2	0,5
PM-14739	Agua dulce (Continente)	02/02/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	> 2	> 8	2	0,5
PM-14740	Agua dulce (Continente)	02/02/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,25	4	> 8	4
PM-14771	Agua dulce (L. Rupanco)	03/02/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Coho	—	—	0,25	4	> 8	4
PM-14772	Agua dulce (Continente)	03/02/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	4	> 8	> 4
PM-14779	Agua dulce (L. Llanquihue)	04/02/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Coho	—	—	> 2	> 8	2	0,5
PM-14782	Agua dulce (L. Llanquihue)	04/02/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	4	> 8	4
PM-14784	Agua dulce (L. Llanquihue)	04/02/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,125	0,125	0,125	0,125
PM-14930	Agua dulce (Continente)	10/02/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	—	—	0,5	0,125	0,25	0,5
PM-14775	Agua dulce (Continente)	03/02/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	> 8	> 8	0,125
PM-15055	Agua dulce (Continente)	18/02/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	> 2	> 8	2	1
PM-15062	Agua dulce (Continente)	19/02/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	—	—	> 2	> 8	2	1
PM-15063	Agua dulce (Continente)	19/02/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	—	—	1	> 8	0,25	0,125
CA-1214	Agua dulce (Chiloé)	22/04/2009	*F. psychrophilum*	Cavidad	Trucha	—	—	0,125	8	0,25	0,0625
PM-5044	2	29/07/2008	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	—	—	0,25	1	0,125	0,125
PM-4584	Agua dulce (Continente)	07/07/2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	—	—	> 2	> 8	8	> 4
PM-4758	Agua dulce (Continente)	15/07/2008	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	—	—	0,25	8	8	> 4
PM-4638	Agua dulce (Continente)	09/07/2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	> 2	> 8	8	2
PM-4242	Agua dulce (L. Rupanco)	23/06/2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	—	—	0,125	0,0625	> 8	0,125
PM-4282	Agua dulce (Continente)	24/06/2008	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	—	—	0,25	8	8	> 4
PM-3872	Agua dulce (L. Llanquihue)	09/06/2008	*F. psychrophilum*	Aleta	Salar	—	—	0,25	8	> 8	> 4
CA-2089	Agua dulce (Chiloé)	26/03/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	—	—	0,25	8	1	0,125
CA-2090	Agua dulce (Chiloé)	26/03/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	—	—	0,25	4	> 8	> 4
CA-2108	Agua dulce (Chiloé)	31/03/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-15688	Agua dulce (L. Llanquihue)	26/03/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	4	0,25	0,125
PM-15775	Agua dulce (Continente)	30/03/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Ulcera	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-15784	Agua dulce (L. Rupanco)	31/03/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-16012	Agua dulce (L. Llanquihue)	13/04/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Aleta	Trucha	—	—	0,0625	> 8	> 8	4
PM-16013	Agua dulce (L. Llanquihue)	12/04/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	—	—	> 2	> 8	2	1
PM-15130	Agua dulce (L. Llanquihue)	23/02/2010	*F. psychrophilum*	Branquia-Aleta	Trucha	—	—	0,5	2	1	0,125
PM-12918	Agua dulce (Continente)	07/10/2009	*F. psychrophilum*	Bazo	Salar	—	—	0,125	8	2	0,125
PM-13339	2	05/11/2009	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	2	0,25	0,125
PM-13548	Agua dulce (L. Llanquihue)	17/11/2009	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	2	> 8	4	4
PM-16712	Agua dulce (L. Llanquihue)	17/05/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	> 2	> 8	1	1
CA-2279	10a	27/05/2010	*F. psychrophilum*	Lesión	Trucha	—	—	0,5	> 8	> 8	2
PM-16900	16	28/05/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	2	8	1	0,25
PM-15659	Agua dulce (L. Llanquihue)	25/03/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta-Lesión	Trucha	—	—	0,25	2	1	0,125
PM-18821	Agua dulce (L. Llanquihue)	01/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta-Lesión	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18854	Agua dulce (Continente)	05/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta	Trucha	—	—	0,25	8	> 8	> 4
PM-19018	Agua dulce (L. Llanquihue)	15/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta	Trucha	—	—	0,25	> 8	0,25	0,125
PM-19019	Agua dulce (L. Llanquihue)	15/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta	Trucha	—	—	0,125	8	0,25	0,125
PM-19020	Agua dulce (L. Rupanco)	15/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo-Branquia-Aleta-Ulcera	Trucha	—	—	0,25	> 8	0,25	0,125
CA-2335	9	10/06/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
CA-2382	Agua dulce (Chiloé)	23/06/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-17107	Agua dulce (Continente)	05/06/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-17193	Agua dulce (Continente)	10/06/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-17401	Agua dulce (Continente)	23/06/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-17497	Agua dulce (Continente)	25/06/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-17851	Agua dulce (L. Llanquihue)	19/07/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-17882	Agua dulce (Continente)	21/07/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,5	> 8	0,25	0,125
PM-17961-C	Agua dulce (L. Llanquihue)	28/07/2010	*F. psychrophilum*	Columna	Trucha	—	—	0,5	> 8	0,25	0,125
PM-17961-B	Agua dulce (L. Llanquihue)	28/07/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,5	8	> 8	> 4
PM-17982	Agua dulce (L. Llanquihue)	30/07/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	0,25	0,25	0,125
PM-17995	1	02/08/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Coho	—	—	> 2	> 8	> 8	> 4
PM-18014	Agua dulce (Continente)	03/08/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	8	> 8	> 4
PM-18037	Agua dulce (L. Llanquihue)	05/08/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	1	> 8	0,5	0,125
PM-18046	Agua dulce (L. Llanquihue)	05/08/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	—	—	0,5	> 8	0,25	0,125
PM-18137	Agua dulce (L. Llanquihue)	10/08/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	0,5	0,25	0,125
PM-18190	Agua dulce (Continente)	13/08/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-18241	Agua dulce (L. Rupanco)	18/08/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18345	Agua dulce (Continente)	25/08/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-18350	Agua dulce (Continente)	25/08/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18351	Agua dulce (Continente)	25/08/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	8	> 8	> 4
PM-18352	Agua dulce (Continente)	25/08/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,5	> 8	0,25	0,125
PM-18403	Agua dulce (Continente)	30/08/2010	*F. psychrophilum*	Ulcera	Trucha	—	—	P	P	P	P
CA-2662	Agua dulce (Chiloé)	01/09/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18478	Agua dulce (Continente)	07/09/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-18484	Agua dulce (L. Rupanco)	08/09/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18498	Agua dulce (L. Llanquihue)	08/09/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
CA-2697	Agua dulce (Chiloé)	10/09/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,5	> 8	> 8	> 4
PM-18758	Agua dulce (L. Llanquihue)	28/09/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	8	> 8	> 4
PM-18798	Agua dulce (Continente)	30/09/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,25	4	> 8	> 4
PM-18799	Agua dulce (Continente)	30/09/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18800	Agua dulce (Continente)	30/09/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18801	Agua dulce (Continente)	30/09/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P
CA-2769	Agua dulce (Chiloé)	01/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P

En colores: ND = sin desarrollo del patógeno; P = resultado de CMI pendiente; N.I: especie no informada

AML: amoxicilina; E: eritromicina; FFC: florfenicol; OT: oxitetraciclina; OA: acido oxolínico; UB: flumequina

CA-2770	Agua dulce (Chiloé)	01/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,5	4	2	> 4
CA-2771	Agua dulce (Chiloé)	01/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	> 2	> 8	> 8	> 4
CA-2778	Agua dulce (Chiloé)	06/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	> 2	> 8	> 8	> 4
CA-2779	Agua dulce (Chiloé)	06/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	> 2	> 8	1	0,5
PM-18899	Agua dulce (Chiloé)	07/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,5	0,25	> 8	> 4
CA-2787	10b	08/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	> 2	> 8	1	0,5
CA-2792	10b	08/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	0,5	0,25	0,125
CA-2793	10b	08/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	8	> 8	> 4
CA-2794	10b	08/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18956	Agua dulce (L. Llanquihue)	13/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	> 2	8	2	1
PM-18957	Agua dulce (L. Llanquihue)	13/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	4	> 8	> 4
PM-18958	Agua dulce (L. Llanquihue)	13/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	> 2	> 8	2	1
PM-18977	Agua dulce (Continente)	14/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	0,25	0,5	0,25
PM-18985	Agua dulce (Continente)	14/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18986	Agua dulce (Continente)	14/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18987	Agua dulce (Continente)	14/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-18992	Agua dulce (Continente)	14/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,25	0,125	< 0,0312	0,125
PM-19002	Agua dulce (Continente)	14/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	0,125	< 0,0312	0,25
PM-19013	Agua dulce (Continente)	15/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19014	Agua dulce (Continente)	15/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
CA-2815	Agua dulce (Chiloé)	18/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	0,0312	0,25	< 0,0312	0,125
PM-19028	Agua dulce (Continente)	19/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-19035	Agua dulce (L. Rupanco)	19/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19068	Agua dulce (L. Llanquihue)	21/10/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,0312	0,5	0,125	0,125
PM-19069	Agua dulce (L. Llanquihue)	21/10/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19219	Agua dulce (L. Llanquihue)	30/10/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19221	Agua dulce (Continente)	02/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-19249	Agua dulce (Continente)	03/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
CA-2905	Agua dulce (Chiloé)	04/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19322	Agua dulce (L. Llanquihue)	08/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	4	< 0,0312	0,25
PM-19323	Agua dulce (L. Llanquihue)	08/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19324	Agua dulce (L. Llanquihue)	08/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	0,25	0,125	0,25
CA-2922	10b	09/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	2	0,5	0,125
PM-19367	1	11/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19404	Agua dulce (L. Rupanco)	12/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
CA-2959	Agua dulce (Chiloé)	12/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,0312	0,0625	< 0,0312	0,125
PM-19416	Agua dulce (Continente)	15/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	0,125	< 0,0312	0,25
PM-19428	Agua dulce (Continente)	16/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	< 0,0078	< 0,0312	< 0,0312	0,25
PM-19429	Agua dulce (Continente)	16/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,0312	0,5	< 0,0312	0,125
PM-19430	Agua dulce (Continente)	16/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,5	2	0,25	0,25
PM-19456	Agua dulce (Continente)	17/11/2010	*F. psychrophilum*	Cavidad	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19464	Agua dulce (Continente)	17/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-19485	Agua dulce (Continente)	18/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,25	0,25	0,125	0,5
PM-19517	Agua dulce (L. Rupanco)	18/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19585	Agua dulce (Continente)	23/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19587	Agua dulce (Continente)	23/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19593	Agua dulce (Continente)	23/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
CA-3011	10b	23/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19635	Agua dulce (Continente)	25/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	0,25	0,5	0,125	0,25
PM-19655	Agua dulce (Continente)	25/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-19667	Agua dulce (Continente)	26/11/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19743	Agua dulce (L. Llanquihue)	30/11/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Coho	—	—	P	P	P	P
PM-19753	Agua dulce (L. Rupanco)	01/12/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	> 8	0,5	0,5
PM-19803	Agua dulce (Continente)	03/12/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19816	Agua dulce (Continente)	04/12/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-19890	Agua dulce (Continente)	07/12/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-19910	Agua dulce (L. Llanquihue)	10/12/2010	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19912	Agua dulce (Continente)	10/12/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19915	Agua dulce (Continente)	10/12/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-19951	Agua dulce (Continente)	10/12/2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	—	—	P	P	P	P
PM-16479	1	06/05/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-16477	1	06/05/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-16478	1	06/05/2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	—	—	P	P	P	P
PM-10115	9b	12/03/2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	2	0,5	0,25	0,25
PM-10112	9b	11/02/2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	0,125	0,125	0,5
PM-10116	9b	12/03/2009	*P. salmonis*	Bazo	Trucha	—	—	0,25	0,125	0,125	0,25
PM-10312	2	02/04/2009	*P. salmonis*	Cerebro	Salar	—	—	0,5	0,25	0,25	0,25
PM-10387	17a	08/04/2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	—	—	0,25	0,25	0,125	0,25
PM-10399	2	09/04/2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	—	—	0,25	0,25	0,125	0,25
PM-10612	1	28/04/2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	—	—	0,5	0,25	0,25	0,25
PM-10628	17b	29/04/2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	0,25	0,125	0,25
PM-10629	17b	29/04/2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	0,25	0,125	0,5
PM-10695	1	05/05/2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,25	0,25	0,25	0,25
PM-10696	1	05/05/2009	*P. salmonis*	Riñón	Coho	—	—	0,125	0,125	0,125	0,25
PM-10727	1	07/05/2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	—	—	0,25	0,125	0,125	0,5
PM-10795	19a	11/05/2009	*P. salmonis*	Ulcera	Trucha	—	—	0,25	0,125	0,125	0,25
PM-10141	17a	17/05/2009	*P. salmonis*	Riñón	Salar	—	—	0,5	1	0,125	8
PM-5454	17a	20/08/2008	*P. salmonis*	Lesión	Salar	—	—	0,25	0,125	0,25	4
PM-11787	19a	14/07/2009	*P. salmonis*	Riñon-Higado-Ulcera	Trucha	—	—	0,5	0,25	0,125	8
PM-11922	2	23/07/2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro-Ulcera	Coho	—	—	0,5	0,25	0,125	0,25
PM-11947	3b	23/07/2009	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	—	—	2	2	0,25	0,5
PM-11980	17b	24/07/2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Trucha	—	—	0,125	2	0,125	2
PM-12010	3b	05/08/2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Coho	—	—	0,125	0,125	0,125	2
AY-1140	28b	28/07/2009	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	0,25	2	0,125	0,25
CA-1670	12a	15/10/2009	*P. salmonis*	Riñón	Coho	—	—	0,25	0,125	0,25	2
PM-13249	19a	29/10/2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Trucha	—	—	0,125	0,5	0,125	0,125
PM-13250	19a	29/10/2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Trucha	—	—	0,125	0,5	0,125	0,125
PM-13648	17a	18/12/2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Salar	—	—	0,125	0,125	0,25	1
PM-10107	2	11/03/2009	*P. salmonis*	Riñón	Coho	—	—	1	1	8	2
PM-7140	10a	16/10/2008	*P. salmonis*	Riñón	Coho	—	—	0,25	8	2	4
PM-7149-C	17a	16/10/2008	*P. salmonis*	Cerebro	Salar	—	—	0,5	1	32	8
PM-7149-R	17a	16/10/2008	*P. salmonis*	Riñón	Salar	—	—	0,5	2	32	8
PM-4809	1	18/07/2008	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	0,5	8	4
PM-4939	10a	24/07/2008	*P. salmonis*	Riñón	Coho	—	—	8	32	2	4
PM-9893	3a	25/02/2009	*P. salmonis*	Caverna Muscular	Trucha	—	—	2	8	4	8
PM-11172	2	09/06/2009	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	—	—	2	1	2	4
PM-11807	2	15/07/2009	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	—	—	0,5	1	4	2
770483	10a	04/06/2009	*P. salmonis*	Cavidad pericárdica	Trucha	—	—	4	16	8	4
770486	10a	04/06/2009	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	4	16	8	4
CA-1646	12	13/10/2009	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	—	—	1	16	64	16
PM-15742	18c	29/03/2010	*P. salmonis*	Riñón	Salar	—	—	2	0,5	1	8
PM-15929	1	07/04/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	2	4	2	2

PM-15970	2	09/04/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	1	4	4	4
PM-15141-C	17b	24/02/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	0,5	1	2	8
PM-15141-R	17b	24/02/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	1	2	8
PM-15911-C	12a	06/04/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	2	2	4	2
PM-15911-R	12a	06/04/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	2	1	4
PM-15941-C	2	08/04/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	1	8	0,5	2
PM-15941-R	2	08/04/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	1	8	0,5	2
PM-13680	16	26/11/2009	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	0,125	1	0,125	8
PM-14187	17a	18/12/2009	*P. salmonis*	Riñón-Cerebro	Trucha	—	—	0,25	0,125	0,125	2
CA-1871	12a	26/01/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	2	2	4	4
CA-1915	10a	16/02/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	2	2	32
PM-15932	1	07/04/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	2	32	2	4
PM-17972	1	06/07/2010	*P. salmonis*	Lesión	Trucha	—	—	0,5	0,25	2	1
PM-18236	1	17/08/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	2	1	4	2
PM-18339	30a	24/08/2010	*P. salmonis*	Riñón-Bazo-Hígado	Trucha	—	—	1	0,5	2	2
PM-18629-H	1	15/09/2010	*P. salmonis*	Hígado	Trucha	—	—	1	0,25	2	1
PM-18629-C	1	15/09/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	1	0,25	2	1
PM-18703	1	23/09/2010	*P. salmonis*	Bazo-Hígado	Coho	—	—	1	0,25	4	2
PM-18704-R	2	23/09/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	1	0,25	4	2
PM-18704-C	2	23/09/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	1	0,25	4	2
PM-18788-H	1	29/09/2010	*P. salmonis*	Hígado	Trucha	—	—	1	0,5	4	1
PM-18788-C	1	29/09/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	1	0,5	4	1
PM-18925	3b	08/10/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	—	—	1	1	4	2
PM-18926	3b	08/10/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	1	1	4	2
PM-19061-R	1	20/10/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	0,25	2	1
PM-19061-C	1	20/10/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	0,5	0,25	2	1
PM-19190	3b	29/10/2010	*P. salmonis*	Riñón-Bazo-Hígado-Cerebro-Úlcera	Coho	—	—	P	P	P	P
PM-16477-R	1	06/05/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	1	1	4	2
PM-16477-C	1	06/05/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	1	1	4	2
PM-16478-R	1	06/05/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	1	4	1
PM-16478-C	1	06/05/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	0,5	1	4	1
PM-16479-R	1	06/05/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	1	4	1
PM-16479-C	1	06/05/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	0,5	1	4	1
PM-17876-R/Hg	1	21/07/2010	*P. salmonis*	Ri/Hg	Trucha	—	—	1	0,25	2	2
PM-17876-C	1	21/07/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	1	0,25	2	2
PM-17985-R	1	30/07/2010	*P. salmonis*	Riñón	Coho	—	—	0,5	0,25	2	2
PM-17985-C	1	30/07/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Coho	—	—	0,5	0,25	2	2
PM-17991-R	2	30/07/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	0,5	0,25	2	2
PM-17991-C	2	30/07/2010	*P. salmonis*	Cerebro	Trucha	—	—	0,5	0,25	2	2
PM-18326	1	24/08/2010	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	—	—	2	1	4	1
BV-803-210-PM	32	06/03/2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	32	0,5	0,5	2
BV-803-211-PM	32	21/03/2008	*V. ordalii*	Absceso	Salar	—	—	0,25	0,125	0,0312	0,0312
BV-609-51-PM	16	11/09/2006	*V. ordalii*	Úlcera	Salar	—	—	0,25	0,0625	0,0312	0,0312
PM-3513	32	27/05/2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	32	32	0,0312	0,0625
PM-2660	32	23/04/2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	32	32	0,0312	0,0312
PM-5126	32	31/07/2008	*V. ordalii*	Úlcera	Salar	—	—	0,0625	32	0,0312	0,0625
PM-5125	32	01/08/2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	0,25	0,125	0,0625	0,0625
PM-143	21a	08/01/2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	0,25	0,0625	0,0312	0,0625
PM-3579	32	29/05/2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	2	0,125	0,0312	0,0625
PM-3515	32	27/05/2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	2	0,0625	0,0312	0,0312
PM-5791	2	11/09/2009	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	0,125	0,25	0,0312	0,0312
PM-505	21a	18/01/2008	*V. ordalii*	Riñón	Salar	—	—	0,125	0,25	0,0312	0,0312
PM-10612	1	28/04/2009	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
PM-3843	1	06/06/2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
PM-6072	1	29/09/2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
PM-3844	1	06/06/2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
PM-4792	1	07/07/2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
PM-5432	1	19/08/2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-801-171-PM	1	11/12/2007	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-801-172-PM	1	11/12/2007	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-801-173-PM	1	17/12/2007	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-902-264-PM	2	29/01/2009	*S. phocae*	Riñón	Trucha	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-902-317-PM	2	29/01/2009	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-801-318-PM	2	26/12/2007	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-802-319-PM	2	13/02/2008	*S. phocae*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-804-217-PM	Agua dulce (L. Rupanco)	08/04/2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	—	—	2	2	0,0625	0,125
BV-804-272-PM	Agua dulce (L. Llanquihue)	11/04/2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	—	—	2	2	0,0625	0,125
BV-805-316-PM	Agua dulce (L. Llanquihue)	05/05/2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	—	—	2	2	0,0625	0,125
PM-5684	2	03/09/2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	—	—	8	2	0,0625	0,125
PM-4663	12	09/07/2008	*Y. ruckeri*	Hígado	Salar	—	—	4	2	0,125	0,5
PM-2550	Agua dulce (L. Rupanco)	17/04/2008	*Y. ruckeri*	Riñón	Salar	—	—	1	1	0,0312	0,0625
PM-4579	2	07/07/2008	*Y. ruckeri*	Aleta	Salar	—	—	2	2	0,0625	0,0625
PM-12479	Agua dulce (Continente)	04/09/2009	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
PM-12481	Agua dulce (Continente)	04/09/2009	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-711-177-PM	17a	16/11/2007	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-712-178-PM	17a	27/11/2007	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-708-175-PM	32	28/08/2007	*A. salmonicida*	Riñón	Salar	N.D	N.D	—	—	—	—
BV-709-321-PM	32	11/09/2007	*A. salmonicida*	Riñón	N.I	N.D	N.D	—	—	—	—

Tabla 5. Distribución de CMI de 89 cepas de *Flavobacterium psychrophilum.*

Antibacteriano	CMI_{50} (µg/mL)	CMI_{90} (µg/mL)	Rango (µg/mL)
Florfenicol	0,5	> 2	<0,0078->2
Oxitetraciclina	8	> 8	0,0312->8
Ácido oxolínico	2	> 8	<0,0312->8
Flumequina	0,5	> 4	0,0625->4

Tabla 6. Distribución de CMI de 78 cepas de *Piscirickettsia salmonis.*

Antibacteriano	CMI_{50} (µg/mL)	CMI_{90} (µg/mL)	Rango (µg/mL)
Florfenicol	0,5	2	0,125-8
Oxitetraciclina	0,5	8	0,125-32
Ácido oxolínico	2	4	0,125-64
Flumequina	2	8	0,125-32

Tabla 7. Distribución de CMI de 12 cepas de *Vibrio ordalii.*

Antibacteriano	CMI_{50} (µg/mL)	CMI_{90} (µg/mL)	Rango (µg/mL)
Florfenicol	0,25	32	0,0625-32
Oxitetraciclina	0,125	32	0,0625-32
Ácido oxolínico	0,0312	0,0625	0,0312-0,5
Flumequina	0,0312	0,0625	0,0312-2

Tabla 8. Distribución de CMI de 7 cepas de *Yersinia ruckeri.*

Antibacteriano	CMI_{50} (µg/mL)	CMI_{90} (µg/mL)	Rango (µg/mL)
Florfenicol	2	8	1-8
Oxitetraciclina	2	2	1-2
Ácido oxolínico	0,0625	0,125	0,0312-0,125
Flumequina	0,125	0,5	0,0625-0,5

Tabla 9. Metodología analítica utilizada según el compuesto problema, y su respectiva referencia técnica.

ANALITO	TÉCNICA ANALÍTICA	REFERENCIA METODOLÓGICA
Oxitetraciclina	HPLC-Arreglo de Diodos	Björklund, H.V., Rabergh. C.M.I and Bylund, G., 1991. Residues de Oxytetracycline in Wild Fish and Sediments from Fish Farms. Aquaculture, 86: 359-367.
Florfenicol	HPLC-Arreglo de Diodos	Hormazabal, V., Steffenak I. And Yndestad. M. 1994. Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediments by High Performance Chromatography.
Flumequina	HPLC-Fluorescencia	Journal Of Chromatography. Determination of oxolinic acid and Flumequine in Seawater Marine Sediment in Japanese Oyster. 17 (AC), 929-945. 1990.
Amoxicilina	HPLC-Fluorescencia	S/R
Eritromicina	HPLC-MS/MS	S/R

Tabla 10. Cantidad total de muestras ingresadas a laboratorio para análisis de residuos de antimicrobianos en músculo, por Agrupación de Concesión Salmonera y centros de agua dulce.

ACS	Nº muestras ingresadas
1	40
2	10
9a	5
9b	10
10a	10
12a	30
16	5
17a	15
17b	15
19a	10
19b	15
23a	5
28b	10
Agua Dulce	25
Total	**205**

Tabla 11. Clasificación cualitativa de los resultados de residuos de antimicrobianos en muestras de músculo y piel, por antimicrobiano, según la Agrupación de Concesión Salmonera y centros de agua dulce.

ACS	Antimicrobiano				
	OT	FFC	UB	AML	E
1	CR	ND	ND	ND	ND
2	CR	ND	ND	ND	ND
9a	CR	ND	ND	ND	ND
9b	CR	ND	ND	ND	ND
10a	CR	ND	ND	ND	ND
12a	CR	CR	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	ND	ND
17a	CR	ND	ND	ND	ND
17b	CR	ND	CR	ND	ND
19a	CR	ND	ND	ND	ND
19b	CR	ND	ND	ND	ND
23a	ND	CR	ND	ND	ND
28b	ND	ND	ND	ND	ND
Agua Dulce	ND	CR	ND	ND	ND

ACS: Agrupación de Concesión Salmonera; OTC: Oxitetraciclina; FF: Florfenicol; FLU: Flumequina; AML: Amoxicilina; ER: Eritromicina; CR: Con Residuos; ND: No Detectado.

Tabla 12. Cantidad y porcentaje de muestras con presencia de residuos en músculo para cada una de las 11 Agrupaciones de Concesiones Salmoneras y centros de agua dulce, por antimicrobiano de interés.

ACS	Antimicrobiano									
	OT		FFC		UB		AML		E	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	21	52,5	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	20	0	0	0	0	0	0	0	0
9a	2	40	0	0	0	0	0	0	0	0
9b	2	20	0	0	0	0	0	0	0	0
10a	4	40	0	0	0	0	0	0	0	0
12a	8	26,7	9	30	0	0	0	0	0	0
17a	9	60	0	0	0	0	0	0	0	0
17b	3	20	0	0	1	7	0	0	0	0
19a	5	50	0	0	0	0	0	0	0	0
19b	10	66,7	0	0	0	0	0	0	0	0
23a	0	0	1	20	0	0	0	0	0	0
Agua Dulce	0	0	5	20	0	0	0	0	0	0

ACS: Agrupación de Concesión Salmonera; OT: Oxitetraciclina; FF: Florfenicol; UB: Flumequina; AML: Amoxicilina; E: Eritromicina.

Tabla 13. Cantidad de residuos de antimicrobianos detectados en muestras de músculo y piel en la totalidad de muestras analizadas para cada Agrupación de Concesiones Salmoneras.

ACS	Código muestra	Antimicrobiano (ppb)		
		OT	FFC	UB
1	A	94,7	-	-
1	B	72,3	-	-
1	C	40,3	-	-
1	D	86,4	-	-
1	I	58,9	-	-
1	K	28,8	-	-
1	L	45,4	-	-
1	M	68,8	-	-
1	N	28,4	-	-
1	O	57,4	-	-
1	P	110,7	-	-
1	Q	42,7	-	-
1	S	28,5	-	-
1	T	43,3	-	-
1	U	49,3	-	-
1	V	42,2	-	-
1	W	26,8	-	-
1	X	27,8	-	-
1	Y	30,4	-	-
1	AC	33,2	-	-
1	AD	43,1	-	-
2	F	139	-	-
2	J	731	-	-
9a	A	46,8	-	-
9a	E	25,9	-	-
9b	A	67,2	-	-
9b	E	48,6	-	-
10a	A	3760,5	-	-
10a	B	2266,2	-	-
10a	D	2386,3	-	-
10a	E	3941,3	-	-
12a	D	3623,3	-	-
12a	F	-	123,5	-
12a	G	-	133,2	-
12a	H	676,6	151,4	-
12a	I	184,2	-	-
12a	J	346,9	135,1	-
12a	U	95,5	905,3	-
12a	V	-	185,2	-
12a	W	74,1	2005,9	-
12a	X	87,4	1575	-
12a	Y	242,8	2564,7	-
17a	A	230,6	-	-
17a	B	100,9	-	-
17a	C	209,1	-	-
17a	D	125,7	-	-
17a	E	88,8	-	-
17a	F	42,4	-	-
17a	K	59,9	-	-
17a	M	31,7	-	-
17b	F	-	-	1,2
17b	H	43,4	-	-
17b	I	35,7	-	-
17b	J	46,6	-	-
19a	F	387,8	-	-
19a	G	6104,1	-	-
19a	H	6683,2	-	-
19a	I	7482,5	-	-
19a	J	4957,5	-	-
19b	A	28,1	-	-
19b	B	46,8	-	-
19b	C	21,7	-	-
19b	D	31,8	-	-
19b	E	46,3	-	-
19b	K	42	-	-
19b	L	76,1	-	-
19b	M	113,5	-	-
19b	N	91,8	-	-
19b	O	148,8	-	-
23a	A	-	60	-
Agua Dulce	U	-	141	-
Agua Dulce	V	-	140	-
Agua Dulce	W	-	65	-
Agua Dulce	X	-	160	-
Agua Dulce	Y	-	704	-

ACS: Agrupación de Concesión Salmonera; OT: Oxitetraciclina; FFC: Florfenicol; UB: Flumequina; ppb: partes por billón.

Tabla 14. Resultados de residuos de cuatro fármacos bajo estudio, en muestras de sedimentos marino, provenientes de dos sectores de la Región de Aysén.

Tipo de Muestra	sector	Grupo	Fecha de Muestreo	Fecha de Recepción	Identificación de la Muestra	Fecha análisis	Resultados Acido Oxolínico ppb	Resultados Flumequina ppb	Resultados Florfenicol ppb	Resultados Oxitetraciclina ppb
sedimento	Seno Magdalena	1	02/12/2010	07/12/2010	1- extremo 1	21-2 y 28-2-2011	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
sedimento	Seno Magdalena	1	02/12/2010	07/12/2010	1- centro	21-2 y 28-2-2011	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
sedimento	Seno Magdalena	1	02/12/2010	07/12/2010	1- extremo 2	21-2 y 28-2-2011	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
sedimento	Seno Magdalena	1	02/12/2010	07/12/2010	1- 200 mts	21-2 y 28-2-2011	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
sedimento	Puerto Cisnes	2	03/12/2010	07/12/2010	2- extremo 1	21-2 y 28-2-2011	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
sedimento	Puerto Cisnes	2	03/12/2010	07/12/2010	2- centro	21-2 y 28-2-2011	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
sedimento	Puerto Cisnes	2	03/12/2010	07/12/2010	2- extremo 2	21-2 y 28-2-2011	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
sedimento	Puerto Cisnes	2	03/12/2010	07/12/2010	2- 200 mts	21-2 y 28-2-2011	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado

Acido Oxolínico: HPLC Fluorescencia Límite de detección : 2.0 ppb Límite de cuantificación: 5.0 ppb	Flumequina: HPLC Fluorescencia Límite de detección : 2.0 ppb Límite de cuantificación: 5.0 ppb	Florfenicol: HPLC DAD Límite de detección : 50 ppb Límite de cuantificación : 100 ppb	Oxitetraciclina: HPLC DAD Límite de detección : 50 ppb Límite de cuantificación : 100 ppb

Tabla 15. Porcentaje (%) de materia inorgánica y materia orgánica en muestra de sedimento, para 2 centros de cultivo en sectores Seno Magdalena (A) y Puerto Cisnes (B), Región de Aysén.

Centro	*Número réplica*	*Muestra (g)*	*Materia Inorgánica seca (%)*	*Materia Orgánica (%)*
A	1	0,5841	94,42	5,58
A	2	0,5837	92,73	7,27
A	3	0,5859	98,04	1,96
A	4	0,5855	92,29	7,71
B	5	0,7592	100,00	0,00
B	6	0,7686	91,22	8,78
B	7	0,7484	94,77	5,23
B	8	0,5534	90,81	9,19

Tabla 16. Gramos (g) de materia inorgánica y materia orgánica en muestras sedimento, para 2 centros de cultivo en sectores Seno Magdalena (A) y Puerto Cisnes (B), Región de Aysén.

Centro	*Número muestra*	*Materia Inorgánica (g)*	*Materia Orgánica (g)*
A	1	0,5515	0,0326
A	2	0,5413	0,0424
A	3	0,5745	0,0115
A	4	0,5404	0,0452
B	5	0,7592	0,0000
B	6	0,7011	0,0675
B	7	0,7092	0,0391
B	8	0,5025	0,0508

Tabla 17. Descripción de los expertos participantes en el estudio.

Experto	Años de experiencia	Ambiente de experiencia
A	11	Mar y agua dulce
B	20	Mar y agua dulce
C	16	Mar y agua dulce
D	14	Mar y agua dulce
E	11	Mar y agua dulce
F	11	Mar y agua dulce
G	17	Mar y agua dulce
H	11	Mar y agua dulce

Tabla 18. Valores esperados del número de estanques/jaulas en una piscicultura, centro de lago y centro de engorda, aportados por los expertos participantes del estudio

	Experto	Máximo	Mínimo	Moda
Nº estanques en una piscicultura	A	200	14	100
	B	50	20	40
	C	300	14	70
	D	100	10	30
	E	100	50	100
	F	120	56	70
	G	350	20	60
	H	100	30	50
	Experto	Máximo	Mínimo	Moda
Nº Jaulas en un centro de lago	A	N/S	N/S	N/S
	B	N/S	N/S	N/S
	C	60	20	24
	D	140	12	20
	E	N/S	N/S	N/S
	F	62	10	48
	G	80	10	40
	H	60	20	36
	Experto	Máximo	Mínimo	Moda
Nº Jaulas en un centro de mar	A	28	14	14
	B	18	10	14
	C	30	6	24
	D	20	10	16
	E	20	12	20
	F	24	12	20
	G	20	14	18
	H	24	18	20

N/S: información no suministrada por el experto

Tabla 19. Valores esperados del número de peces por estanque en una piscicultura, aportados por los expertos participantes del estudio

	Salmón del Atlántico			Trucha Arcoiris			Salmón Coho		
Experto	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda
A	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
B	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
C	180000	50000	100000	N/S	N/S	N/S	150000	50000	100000
D	350000	40000	60000	400000	50000	60000	350000	50000	60000
E	600000	120000	200000	400000	120000	150000	250000	80000	150000
F	80000	4500	40000	150000	30000	50000	150000	40000	50000
G	150000	50000	70000	150000	50000	50000	150000	50000	50000
H	220000	30000	35000	200000	30000	35000	N/S	N/S	N/S

N/S: información no suministrada por el experto

Tabla 20. Valores esperados del número de peces por jaula en un centro de lago, aportados por los expertos participantes del estudio

	Salmón del Atlántico			Trucha Arcoiris			Salmón Coho		
Experto	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda
A	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
B	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
C	N/S	N/S	N/S	120000	80000	85000	120000	80000	85000
D	100000	50000	50000	150000	50000	60000	150000	50000	60000
E	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S	N/S
F	N/S	N/S	N/S	180000	60000	80000	340000	60000	80000
G	60000	30000	50000	60000	30000	50000	60000	30000	50000
H	120000	35000	50000	120000	35000	50000	N/S	N/S	N/S

N/S: información no suministrada por el experto

Tabla 21. Valores esperados del número de peces por jaula en un centro de engorda, aportados por los expertos participantes del estudio

	Salmón del Atlántico			Trucha Arcoiris			Salmón Coho		
Experto	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda
A	75000	35000	45000	75000	35000	55000	N/S	N/S	N/S
B	60000	40000	50000	75000	60000	60000	75000	40000	60000
C	N/S	N/S	25000	N/S	N/S	28000	N/S	N/S	28000
D	55000	20000	40000	55000	20000	30000	55000	20000	30000
E	60000	40000	60000	N/S	N/S	N/S	50000	40000	50000
F	60000	35000	50000	65000	40000	55000	67000	36000	55000
G	70000	40000	50000	70000	40000	50000	70000	40000	50000
H	65000	40000	50000	75000	50000	60000	N/S	N/S	N/S

N/S: información no suministrada por el experto

Tabla 22. Valores esperados de los parámetros relativos a un brote de piscirickettsiosis (SRS)

	Proporción jaulas afectadas SRS			Mortalidad acumulada brote controlado			Proporción mortalidad acumulada fracaso terapéutico		
Experto	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda
A	100%	30%	50%	2%	1%	1%	0,4	0,1	0,15
B	100%	10%	100%	2%	1%	2%	0,5	0,3	0,4
C	42%	4%	17%	10%	1%	5%	N/S	N/S	N/S
D	100%	10%	40%	30%	8%	10%	0,4	0,1	0,2
E	50%	10%	25%	10%	2%	5%	0,12	0,05	0,1
F	100%	10%	90%	15%	2%	4%	N/S	N/S	N/S
G	100%	1%	26%	50%	2%	6%	0,6	0,1	0,2
H	100%	5%	100%	50%	0%	2%	0,65	0,05	0,1

N/S: información no suministrada por el experto

Tabla 23. Valores esperados del peso promedio de los peces al presentar un brote de Piscirickettsiosis.

	Peso peces brote SRS (Kg.)		
Experto	Máximo	Mínimo	Moda
A	N/S	0,2	1,5
B	2	0,25	1,5
C	2,8	0,7	2
D	4	0,5	1,5
E	2,8	0,15	0,6
F	2,6	0,45	1
G	3	0,2	2,5
H	3,5	0,8	2

N/S: información no suministrada por el experto

Tabla 24. Valores esperados de los parámetros relativos a un brote de Flavobacteriosis

	Proporción estanques afectados flavobacteriosis			Mortalidad acumulada brote controlado			Mortalidad acumulada fracaso terapéutico		
Experto	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda	Máximo	Mínimo	Moda
A	100%	10%	70%	15%	2%	5%	80%	20%	25%
B	50%	10%	30%	3%	2%	2%	20%	10%	20%
C	90%	1%	30%	40%	3%	10%	N/S	N/S	N/S
D	70%	5%	30%	30%	5%	10%	40%	20%	25%
E	80%	10%	25%	80%	5%	8%	25%	10%	10%
F	100%	15%	90%	10%	2%	5%	N/S	N/S	N/S
G	100%	10%	40%	7%	1%	4%	70%	10%	20%
H	100%	1%	70%	5%	1%	2%	80%	5%	15%

N/S: información no suministrada por el experto

Tabla 25. Distribución estimada del número anual de brotes de Piscirickettsiosis, para las ACS estudiadas

ACS	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
1	71	101	134	10	85	118
2	19	36	61	6	26	46
3a	0	2	8	1	0	5
3b	5	15	29	4	9	22
9b	16	35	56	6	26	45
10a	29	50	78	7	39	62
12a	24	45	69	7	34	56
16	2	11	23	3	6	17
17a	17	34	56	6	25	44
17b	69	100	136	10	84	117
18c	2	12	26	3	7	18
19a	37	60	95	8	48	73
28b	12	27	45	5	19	36
30a	0	3	10	2	0	6

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 26. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *P. salmonis* resistentes a flumequina para las ACS estudiadas

ACS	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	**0,1**	**5,5**	**22,1**	**3,6**	**1,0**	**12,3**
3a	**0,0**	**1,3**	**5,8**	**1,1**	**0,0**	**3,6**
3b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12a	**0,2**	**18,0**	**55,2**	**9,4**	**4,4**	**34,5**
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 27. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *P. salmonis* resistentes a ácido oxolínico para las ACS estudiadas

ACS	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
1	**2,6**	**25,2**	**61,0**	**9,9**	**11,1**	**42,7**
2	**0,2**	**5,6**	**24,5**	**3,7**	**1,0**	**12,8**
3a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3b	**0,7**	**8,5**	**20,4**	**3,4**	**3,5**	**14,6**
9b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10a	**1,5**	**30,0**	**65,5**	**11,1**	**12,1**	**48,9**
12a	**0,1**	**18,0**	**54,3**	**9,5**	**4,4**	**34,7**
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 28. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *P. salmonis* resistentes a amoxicilina para las ACS estudiadas

ACS	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3a	**0,0**	**1,3**	**6,2**	**1,1**	**0,0**	**3,6**
3b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9b	**0,0**	**14,0**	**45,6**	**7,4**	**3,4**	**27,2**
10a	**2,6**	**30,0**	**62,9**	**11,0**	**12,1**	**49,4**
12a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17a	**1,2**	**17,0**	**44,1**	**7,3**	**5,9**	**29,5**
17b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 29. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *P. salmonis* con flumequina para las ACS estudiadas

ACS	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12a	**0,0**	**1,2**	**8,1**	**1,0**	**0,1**	**3,0**
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 30. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *P. salmonis* con ácido oxolínico para las ACS estudiadas

ACS	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	**0,0**	**0,3**	**2,4**	**0,3**	**0,0**	**0,9**
3a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3b	**0,1**	**1,5**	**6,6**	**1,0**	**0,3**	**3,5**
9b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12a	**0,0**	**0,8**	**5,3**	**0,7**	**0,1**	**2,2**
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 31. Distribución estimada de la cantidad (Ton) de producto perdido debido a la resistencia a flumequina en las ACS estudiadas durante un año

ACS	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12a	**0,1**	**182,4**	**2214,1**	**285,9**	**4,9**	**766,1**
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 32. Distribución estimada de la cantidad (Ton) de producto perdido debido a la resistencia a ácido oxolínico en las ACS estudiadas durante un año

ACS	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	**0,1**	**44,7**	**692,2**	**75,6**	**0,7**	**185,1**
3a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3b	**0,4**	**222,5**	**2851,6**	**325,0**	**9,0**	**816,3**
9b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12a	**0,0**	**114,7**	**2638,9**	**193,4**	**2,6**	**479,5**
16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 33. Distribución estimada del número anual de brotes de Flavobacteriosis, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	40	63	91	8	50	76
Lago Llanquihue	19	37	59	6	27	47
Lago Rupanco	16	33	55	6	24	43
Provincia Osorno	3	15	29	4	9	22
Provincia Llanquihue	110	151	194	12	131	171
Provincia Palena	22	45	68	7	34	56
X continente	218	281	337	17	254	309

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 34. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a flumequina, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	2,5	17,5	44,9	6,8	7,6	30,4
Lago Llanquihue	0,2	3,4	12,4	1,9	0,9	6,9
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,3	2,9	11,7	1,4	1,1	5,5
Provincia Llanquihue	0,2	10,1	46,4	6,9	1,9	23,5
Provincia Palena	0,0	9,0	38,5	5,8	1,9	20,3
X continente	7,3	25,3	62,6	9,2	12,7	43,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 35. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a oxitetraciclina, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	1,4	14,0	40,1	6,2	5,1	25,5
Lago Llanquihue	0,0	2,2	10,1	1,5	0,4	5,2
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,2	2,3	9,3	1,2	0,7	4,7
Provincia Llanquihue	0,3	15,1	46,4	8,2	4,2	30,5
Provincia Palena	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
X continente	4,9	19,6	53,4	8,4	8,1	34,7

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 36. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a ácido oxolínico, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	8,6	31,5	66,1	8,2	19,0	44,5
Lago Llanquihue	1,9	10,1	20,9	3,2	5,2	15,9
Lago Rupanco	0,6	9,0	25,9	4,6	2,6	17,6
Provincia Osorno	1,0	4,6	11,9	1,8	2,1	7,8
Provincia Llanquihue	11,4	40,2	96,2	12,3	21,5	61,8
Provincia Palena	2,6	18,0	44,2	7,2	7,1	30,5
X continente	42,2	81,9	133,1	15,2	58,3	109,5

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 37. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a florfenicol, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0,6	10,5	38,6	5,6	3,0	20,9
Lago Llanquihue	0,2	3,4	13,2	2,0	0,8	7,2
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,0	1,2	7,1	0,9	0,2	2,9
Provincia Llanquihue	0,2	10,1	49,0	6,8	1,8	23,0
Provincia Palena	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
X continente	1,5	14,6	52,3	7,1	5,5	28,4

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 38. Distribución estimada del número anual de brotes causados por cepas de *F. psychrophilum* resistentes a amoxicilina, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lago Llanquihue	0,1	2,2	11,1	1,5	0,4	5,2
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Llanquihue	0,6	15,1	55,4	8,2	4,4	30,4
Provincia Palena	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
X continente	2,3	17,3	59,2	8,4	6,1	32,6

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 39. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con flumequina para las ACS estudiadas

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lago Llanquihue	0,0	0,2	1,1	0,2	0,0	0,5
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,0	0,3	2,2	0,3	0,0	0,9
Provincia Llanquihue	0,0	0,3	1,4	0,2	0,0	0,7
Provincia Palena	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
X continente	0,1	0,8	2,6	0,4	0,3	1,5

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 40. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con oxitetraciclina para las ACS estudiadas

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0,1	1,7	7,7	1,0	0,5	3,5
Lago Llanquihue	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Llanquihue	0,1	5,6	16,9	3,1	1,5	11,8
Provincia Palena	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
X continente	0,1	5,6	16,9	3,1	1,5	11,8

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 41. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con ácido oxolínico para las ACS estudiadas

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lago Llanquihue	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Llanquihue	0,3	2,1	6,1	1,0	0,8	4,0
Provincia Palena	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
X continente	0,3	2,1	6,1	1,0	0,8	4,0

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 42. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con florfenicol para las ACS estudiadas

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0,4	8,4	33,1	4,5	2,3	16,5
Lago Llanquihue	0,1	3,0	11,5	1,8	0,7	6,5
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,0	1,0	7,1	0,8	0,2	2,5
Provincia Llanquihue	0,1	5,4	28,8	3,7	1,0	12,5
Provincia Palena	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
X continente	1,1	9,5	31,8	4,2	3,9	17,4

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 43. Distribución estimada del número anual de tratamientos fallidos contra *F. psychrophilum* realizados con amoxicilina para las ACS estudiadas

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lago Llanquihue	0,0	0,2	1,1	0,2	0,0	0,5
Lago Rupanco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Osorno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Llanquihue	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Provincia Palena	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
X continente	0,0	0,2	1,1	0,2	0,0	0,5

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 44. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a flumequina, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0	0	0	0	0	0
Lago Llanquihue	141	38484	515321	54258	1577	141203
Lago Rupanco	0	0	0	0	0	0
Provincia Osorno	333	217728	6043000	410558	5780	892948
Provincia Llanquihue	67	132944	3619066	237555	4647	493014
Provincia Palena	0	0	0	0	0	0
X continente	1096	389155	7345604	562984	27998	1408234

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 45. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a oxitetraciclina, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	1364	881070	19786870	1657585	45833	3066302
Lago Llanquihue	0	0	0	0	0	0
Lago Rupanco	0	0	0	0	0	0
Provincia Osorno	0	0	0	0	0	0
Provincia Llanquihue	718	2901813	63884940	4609033	178763	9688193
Provincia Palena	0	0	0	0	0	0
X continente	718	2901813	63884940	4609033	178763	9688193

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 46. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a ácido oxolínico, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0	0	0	0	0	0
Lago Llanquihue	0	0	0	0	0	0
Lago Rupanco	0	0	0	0	0	0
Provincia Osorno	0	0	0	0	0	0
Provincia Llanquihue	860	1080660	23642240	1546759	67648	3839770
Provincia Palena	0	0	0	0	0	0
X continente	860	1080660	23642240	1546759	67648	3839770

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 47. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a florfenicol, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	5432	4166904	75669070	6698977	188185	13320570
Lago Llanquihue	1373	715887	10068890	888294	47302	2273415
Lago Rupanco	0	0	0	0	0	0
Provincia Osorno	1909	646786	10406070	1080675	22624	2463361
Provincia Llanquihue	4286	2886037	66402960	4744184	128369	10526330
Provincia Palena	0	0	0	0	0	0
X continente	7888	4248710	67825420	5517091	346947	14061710

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 48. Distribución estimada del número anual de alevines/smolts perdidos debido a la resistencia a amoxicilina, para los distintos sectores estudiados

División	Mínimo	Media	Máximo	Desv Est	5%	95%
Agua dulce Chiloé	0	0	0	0	0	0
Lago Llanquihue	86	38748	697749	59913	1738	139315
Lago Rupanco	0	0	0	0	0	0
Provincia Osorno	0	0	0	0	0	0
Provincia Llanquihue	0	0	0	0	0	0
Provincia Palena	0	0	0	0	0	0
X continente	86	38748	697749	59913	1738	139315

Desv Est: desviación estándar; 5%: percentil 5; 95%: percentil 95

Tabla 49. Resultados de perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos a partir antibiogramas de muestras obtenidas desde centros de cultivo de agua de mar en ACS localizadas en la Región de Los Lagos y desde centros de agua dulce de la Región de Los Lagos, durante la puesta en marcha del plan piloto.

							PERFIL DE RESISTENCIA (ANTIBIOGRAMA)					
Código Laboratorio	Agrupación Concesión Salmonera	Fecha de muestreo	AÑO	Patógeno	Tejido	Especie	AML	E	FFC	OT	OA	UB
PM-20038	Agua Dulce (L. Llanquihue)	16-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20040	Agua Dulce (L. Llanquihue)	16-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20267	Agua dulce (L. Rupanco)	29-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	S	-	S	S	S	S
PM-20306	Agua dulce (L. Rupanco)	30-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	R	S
PM-20308	Agua dulce (L. Rupanco)	30-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20326	Agua dulce (L. Rupanco)	30-12-2010	2010	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
CA-3283	Agua dulce (Chiloé)	20-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
CA-3284	Agua dulce (Chiloé)	20-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
CA-3484	Agua dulce (Chiloé)	02-03-2011	2011	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20341	Agua dulce (Continente)	04-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	-	S	S	S	S
PM-20366	Agua dulce (L. Rupanco)	04-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	R	S
PM-20525	Agua Dulce (L. Llanquihue)	12-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20529	Agua Dulce (L. Llanquihue)	12-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20624	Agua Dulce (L. Llanquihue)	18-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20756	Agua Dulce (L. Llanquihue)	25-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	R	S
PM-20757	Agua Dulce (L. Llanquihue)	25-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20852	Agua Dulce (L. Llanquihue)	29-01-2011	2011	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20908	Agua dulce (Continente)	02-02-2011	2011	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-20930	Agua Dulce (L. Llanquihue)	02-02-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-21048	Agua dulce (L. Rupanco)	07-02-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-21066	Agua Dulce (L. Llanquihue)	08-02-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón-Bazo	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-21185	Agua dulce (Continente)	14-02-2011	2011	*F. psychrophilum*	Cavidad	Salar	S	-	S	S	S	S
PM-21463	Agua dulce (Continente)	25-02-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Salar	P	-	P	P	P	P
PM-21464	Agua dulce (Continente)	25-02-2011	2011	*F. psychrophilum*	Branquia	Salar	S	-	S	S	S	S
PM-21623	Agua dulce (L. Rupanco)	03-03-2011	2011	*F. psychrophilum*	Branquia	Trucha	S	-	S	S	R	S
PM-21647	Agua Dulce (L. Llanquihue)	04-03-2011	2011	*F. psychrophilum*	Aleta	Trucha	S	-	S	S	S	S
PM-21712	Agua dulce (L. Rupanco)	08-03-2011	2011	*F. psychrophilum*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	R	S
PM-21302	16	17-02-2011	2011	*P. salmonis*	Riñón	Trucha	S	-	S	S	R	S

En colores: S = Sensible; I = Sensibilidad Intermedia; R =Resistente.
AML: amoxicilina; E: eritromicina; FFC: florfenicol; OT: oxitetraciclina; OA: acido oxolínico; UB: flumequina P: resultado pendiente.

Tabla 50. Identificación y perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de cepas bacterianas provenientes de sedimentos marinos para 2 sectores evaluados en la Región de Aysén.

Cepa	Origen	Identificación	Perfil de Susceptibilidad					
			Agente Antimicrobiano					
			AML	E	FFC	OTC	OA	UB
S1	Puerto Cisnes	*Brevundimonas vesicularis*	**S**	**S**	**S**	**R**	**N/E**	**S**
S2	Seno Magdalena	*Pseudomonas stutzeri*	**S**	**S**	**R**	**S**	**N/E**	**S**
S3	Seno Magdalena	*Brevundimonas vesicularis*	**S**	**S**	**R**	**S**	**N/E**	**S**
S4	Seno Magdalena	*Pseudomonas fluorescens*	**R**	**R**	**R**	**R**	**N/E**	**S**

AML: Amoxicilina; E: Eritromicina; FFC: Florfenicol; OTC: Oxitetraciclina; OA: Ácido Oxolínico; UB: Flumequina
S: Sensible; R: Resistente; N/E: No evaluado.

A N E X O S

A N E X O 1

Detalle personal participante por actividad.
Proyecto FIP N° 2008-65

PERSONAL PARTICIPANTE POR ACTIVIDAD

Objetivo específico 4.1:

Determinar la distribución y cuantificación de residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina, asi como la distribución y cuantificación de bacterias patógenas de salmones resistentes a estas sustancias en zonas de cultivo.

PERSONAL	ACTIVIDADES					TOTAL
	Contacto y reunión con expertos (HH)	Campañas y sitios de muestreo (HH)	Recolección de muestras (HH)	Procesamiento y análisis de muestras (HH)	Zonificación de áreas de cultivo (HH)	
Maureen Alcayaga	40	20	10	15	30	115
Sergio Contreras	80	90	20	25	80	295
Carolina Asencio	40	90	20	25	40	215
Evelyn Henríquez	0	0	0	0	50	50
Mario Rivas	0	120	380	270	15	785
Lino Cáceres	0	60	380	250	0	690
Christian Espinoza	40	40	0	0	200	280
Paula Miranda	30	120	40	160	90	440
Claudio Miranda	30	0	0	200	30	260
Rodrigo Rojas	30	0	0	200	30	260
Luz Hurtado	0	0	0	130	0	130
Marco Rozas	0	0	0	80	0	80
Harry Bohle	0	0	0	180	0	180
Eugenio Tapia	0	0	0	180	0	180
Alexis Martinez	0	0	0	180	0	180
Marcos Godoy	0	0	0	180	0	180
Paola Alvarez	0	0	0	240	0	240
TOTAL	290	540	850	2315	565	4560

Objetivo específico 4.2.:

Confeccionar un manual para médicos veterinarios (y administradores de centro de cultivo) de procedimientos estandarizados que tienda a reducir (o de las pautas para) el uso de antibióticos en la producción de salmones autoridad, desde la puesta en vigencia de la normativa sanitaria.

PERSONAL	ACTIVIDADES			TOTAL
	Categorización de áreas (HH)	Diseño plan de restauración (HH)	Confección Manual de buenas prácticas de uso racional de antimicrobianos (HH)	
Sergio Contreras	60	100	100	260
Carolina Asencio	40	60	60	160
Evelyn Henríquez	10	5	0	15
Christian Espinoza	15	0	5	20
Paula Miranda	60	80	60	200
Claudio Miranda	40	60	80	180
Rodrigo Rojas	30	40	60	130
Luz Hurtado	0	20	40	60
TOTAL	255	365	405	1025

Objetivo específico 4.3:

Establecer las bases para instaurar en forma permanente un programa de monitoreo sistemático y oficial de la resistencia bacteriana patógena de salmones que propenda a la disminución del uso de antibióticos.

PERSONAL	ACTIVIDADES	TOTAL
	Elaboración del sistema de monitoreo de la resistencia bacteriana (HH)	
Sergio Contreras	300	300
Carolina Asencio	120	120
Evelyn Henríquez	15	15
Christian Espinoza	110	110
Paula Miranda	220	220
Mario Rivas	60	60
Lino Cáceres	15	15
Claudio Miranda	80	80
Rodrigo Rojas	20	20
Luz Hurtado	20	20
TOTAL	960	960

Objetivo específico 4.4:

Validar el sistema de monitoreo propuesto.

PERSONAL	ACTIVIDADES				TOTAL
	Monitoreo piloto del sistema de monitoreo (HH)	Procesamiento y análisis de muestras (HH)	Modificación y ajustes al Sistema de Monitoreo (HH)	Evaluación de los requerimientos de la autoridad (HH)	
Sergio Contreras	100	0	200	150	450
Carolina Asencio	60	100	70	70	300
Evelyn Henríquez	0	0	0	30	30
Mario Rivas	310	250	0	0	560
Lino Cáceres	300	250	0	0	550
Christian Espinoza	150	0	130	45	325
Paula Miranda	180	110	135	120	545
Claudio Miranda	0	160	0	20	180
Rodrigo Rojas	0	120	0	0	120
Luz Hurtado	0	130	0	0	130
Marco Rozas	0	80	0	0	80
Harry Bohle	0	160	0	0	160
Eugenio Tapia	0	160	0	0	160
Alexis Martinez	0	160	0	0	160
Marcos Godoy	0	120	0	0	120
Paola Alvarez	0	180	0	0	180
TOTAL	1100	1980	535	435	4050

Actividades generales del proyecto

Realización de taller, reuniones y elaboración de informes

PERSONAL	ACTIVIDADES GENERALES				TOTAL
	Revisión normativas y bibliografía científica (HH)	Talleres (HH)	Reuniones periódicas (HH)	Elaboración de informes (HH)	
Maureen Alcayaga	50	30	10	20	110
Sergio Contreras	60	40	40	90	230
Carolina Asencio	40	20	25	40	125
Evelyn Henríquez	0	0	0	20	20
Christian Espinoza	10	5	15	20	50
Paula Miranda	50	20	20	50	140
Claudio Miranda	60	30	20	58	168
Rodrigo Rojas	58	0	0	80	138
Luz Hurtado	0	0	0	40	40
Marco Rozas	0	10	10	0	20
Marcos Godoy	0	10	10	0	20
TOTAL	328	165	150	418	1061

A N E X O 2

Presentación inicial del proyecto efectuada al Fondo de Investigación Pesquera

"Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura"

Proyecto FIP 2008-65

Departamento de Salud Hidrobiológica
División de Investigación en Acuicultura
Instituto de Fomento Pesquero

Valparaíso, agosto 2009

ANTECEDENTES DEL PROYECTO

- Directora del Proyecto : Sra. Maureen Alcayaga Godoy
- Departamento: Salud Hidrobiológica
- Presupuesto Indicativo: M$ 200.000
- Presupuesto Propuesta: M$ 197.775

- Duración: 24 meses
- Fecha de Inicio: 06 de marzo de 2009

INSTITUCIONES

Ejecutor
INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Instituciones Subcontratadas
UNIVERSIDAD CATOLICA DEL NORTE
SOCIEDAD ADL DIAGNOSTIC CHILE LTDA.
LABORATORIO BIOVAC S.A.

Apoyo
INSTITUTO TECNOLOGICO DEL SALMON S.A. (INTESAL)

PROBLEMA U OPORTUNIDAD

Las enfermedades infecciosas en salmonicultura se han convertido en un problema sanitario y económico importante para la industria nacional

Línea base inexistente respecto del estatus de la resistencia bacteriana frente a los principales antimicrobianos utilizados en producción

Perdida del efecto antimicrobiano de sustancias quimioterapéuticas de uso rutinario + pocas alternativas = problemas en el manejo sanitario requerido para hacer rentable la actividad

Establecimiento de un programa de monitoreo/vigilancia de la resistencia bacteriana en las regiones de Los Lagos y Aysén

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo General

Optimizar la utilización de los antimicrobianos en la salmonicultura, mediante la evaluación de resultados del monitoreo de la resistencia en bacterias patógenas para el salmón.

Objetivos Específicos

1. Determinar la distribución y cuantificación de residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina, así como la distribución y cuantificación de bacterias patógenas de salmones resistentes a estas sustancias.
2. Confeccionar una manual para médicos veterinarios (y administradores de centros de cultivo) de procedimientos estandarizados que tienda a reducir (o de las pautas) el uso de antibióticos en la producción de salmones.
3. Establecer las bases para instaurar en forma permanente un programa de monitoreo sistemático y oficial de la resistencia bacteriana patógena de salmones que propenda a la disminución del uso de antibióticos.
4. Validar el sistema de monitoreo propuesto.

ESTADO DEL ARTE

Producción intensiva

aparición de enfermedades

intensificación en el uso de agentes microbianos

consecuencias en salud humana y veterinaria

persistencia de antibióticos en producto final

aparición de resistencia bacteriana

Resistencia bacteriana:

- Tratamiento no efectivos
- Repetición de tratamientos
- Aumento en los costos de producción

El uso profiláctico de antibióticos es una práctica habitual. El uso de antibióticos en salmones sanos favorece la diseminación bacteriana, ya que al aumentar su exposición a la droga, posibilita una mayor de selección de mutantes resistentes, favoreciendo su supervivencia frente a la presión selectiva de los antimicrobianos

La forma más habitual de tratamiento es por medio de alimento medicado:
- 20 a 30% del antibiótico es ingerido por los peces
- 70 a 80% restante se distribuye en medio ambiente

Se debe considerar el costo que genera el medicar a los peces (mano de obra, alimento medicado, etc). Además, por el fenómeno de resistencia, muchas veces los tratamientos no son efectivos, lo que genera la repetición de tratamientos, ejerciéndose una mayor presión de selección de resistencia

Países y organizaciones mundiales que han trabajado en mecanismos de control y prevención de la resistencia bacteriana

FAO + OMS + OIE. Año 2003. Grupo de trabajo relacionado con el manejo, riesgo e implementación de programas de monitoreo de la resistencia bacteriana en Medicina Veterinaria.

UE. Comittee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). Año 2000. Plan Estratégico relacionado con la resistencia bacteriana en Medicina Veterinaria.

Comité Internacional para la Armonización (VICH). Trabajos en la medición de parámetros para autorizar la medicación con antibióticos y sus consecuencias en la generación de resistencia bacteriana.

Estados Unidos. Año 1991. Grupo de acción para combatir la Resistencia Antimicrobiana. Integrado por diferentes agencias federales.

En Chile:

No existen una entidad enfocada en la problemática de resistencia bacteriana, aún cuando existen estudios científicos que indican que esta problema existe en la acuicultura de la Región de Los Lagos

METODOLOGIA

Obj. Especifico 4.1. *Determinar la distribución y cuantificación de residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina, así como la distribución y cuantificación de bacterias patógenas de salmones resistentes a estas sustancias en zonas de cultivo*

1. Contacto y reuniones con expertos
2. Campañas y sitios de muestreo
3. Recolección de muestras (peces y sedimentos)
4. Procesamiento y análisis de las muestras
5. Aislamiento e identificación inicial de cepas patógenas
6. Determinación de resistencia a antibióticos
7. Perfil de resistencia a antibióticos (antibiograma)
8. Nivel de resistencia a antibióticos (CMI)
9. Análisis de residuos de antibióticos en peces y sedimentos
10. Contenido de materia orgánica en sedimentos
11. Recuento bacteriano en sedimentos (bacterias totales cultivables y resistentes)
12. Zonificación de las áreas de cultivo (análisis de riesgo)

METODOLOGIA

- Se realizaran muestreos dirigidos y pasivos.
- Los muestreos dirigidos se realizaran cuando el centro presente brote de enfermedad.
- Los muestreos pasivos se realizaran cuando el centro no muestre signología clínica característica asociada a la presencia de agentes patógenos.
- Para ambos tipo de muestreos se realizaran 4 campañas, con una duración aproximada de dos meses cada una, en un periodo de 12 meses, comenzando en el mes de mayo 2009 y finalizando en marzo de 2010.
- Para los muestreos dirigidos o en brote, el centro será muestreado dos veces, antes de iniciar una terapia con antibióticos y después de su finalización.
- En cada oportunidad se colectaran 15 peces, las cuales corresponderán a peces moribundos o mortalidad fresca del día.
- Se consideran 5 peces para la determinación de residuos de antibióticos en músculo.
- En cada campaña también se pretende recolectar muestras de sedimentos en los que se determinará la distribución y cuantificación de bacterias resistentes y de residuos de antibióticos.

METODOLOGIA

- La evaluación de la resistencia bacteriana se realizará en:
  - *Flavobacterium (incluye F. psychrophilum y columnaris)*
  - *Yersinia ruckeri*
  - *Vibrio ordalii*
  - *Aeromonas salmonicida*
  - *Renibacterium salmoninarum*
  - *Streptococcus phocae*
  - *Piscirickettsia salmonis*
- Se evaluará la resistencia a los siguientes antimicrobianos:
  - Oxitetraciclina
  - Florfenicol
  - Eritromicina
  - *Amoxicilina*
  - *Flumequina*

METODOLOGIA

El número de cepas patógenas resistentes a obtener al término de los muestreos es el siguiente:

a) Desde muestras de peces

Especie Patógena	Número de Cepas obtener por campaña de Muestreo	Numero Total de patógenos
Piscirickettsia salmonis	8	32
Renibacterium salmoninarum	5	20
Vibrio ordalii	6	24
Flavobacterium (incluye F. psychrophilum y columnaris)	6	24
Streptococcus phocae	5	20
Aeromonas salmonicida atípica	5	20
Yersinia ruckeri	5	20
TOTAL	**40**	**160**

METODOLOGIA

b) Desde muestras de sedimentos

Cepa resistente a:	Número de Cepas Resistentes a obtener por campaña de muestreo	Numero Total de Cepas Resistentes
Oxitetraciclina	8	32
Florfenicol	8	32
Eritromicina	8	32
Amoxicilina	8	32
Flumequina	8	32
TOTAL	**40**	**160**

METODOLOGIA

Matriz	Análisis	Ejecutor
Peces	Aislamiento e identificación de bacterias patógenas resistentes	Laboratorio ADL.
	Concentraciones Mínimas Inhibitorias de crecimiento bacteriano y sus perfiles de resistencia	Universidad Católica del Norte
	Determinación y cuantificación de residuos de antibióticos	Laboratorio Biovac
Sedimentos	Recuento de bacterias totales y resistentes	Universidad Católica del Norte
	Determinación del contenido de materia orgánica	Universidad Católica del Norte
	Determinación y cuantificación de residuos de antibióticos	Laboratorio Biovac

METODOLOGIA

Obj. Especifico 4.2. *Confeccionar un manual para médicos veterinarios (y administradores de centros de cultivo) de procedimientos estandarizados que tienda a reducir (o las pautas para) el uso de antibióticos en la producción de salmones*

a) Categorización de las zonas según residuos de antibióticos y prevalencia estacional de bacterias resistentes

b) Diseño de un plan de restauración de acuerdo a la categorización de las zonas

c) Confección de un Manual de Buenas Practicas de Uso Racional de Antimicrobianos en la salmonicultura

METODOLOGIA

Obj. Especifico 4.3. *Establecer las bases para instaurar en forma permanente un programa de monitoreo sistemático y oficial de la resistencia bacteriana patógena de salmones que propenda a la disminución del uso de antibióticos*

- Elaboración de un sistema de monitoreo/vigilancia de la resistencia bacteriana patógena de peces salmonídeos, que contará con:

1. Base de datos georreferenciada por zona sanitaria definida
2. Programa de muestreo apropiado para cada zona sanitaria
3. Sistema de información geográfica actualizable
4. Sistema de Alerta Temprana frente a la evolución de resistencia bacteriana patógena

METODOLOGIA

Obj. Especifico 4.4. *Validar el sistema de monitoreo propuesto*

Una vez elaborado el Sistema de Monitoreo/Vigilancia, se implementara su puesta en marcha, contemplando un monitoreo piloto por el periodo de dos meses.

Esto permitirá realizar las modificaciones y ajuste necesarios al plan de monitoreo propuesto, a fin de obtener el Sistema de Monitoreo Oficial que estará a disposición de la autoridad competente.

Adicionalmente y como parte de la propuesta a entregar a la Autoridad Competente, se identificaran los requerimientos de recursos humanos, equipos e infraestructura, junto al tipo de inversiones y costos operacionales necesarios para que la autoridad realice el seguimiento (o vigilancia), control y fiscalización de la resistencia bacteriana en la salmonicultura.

PLAN DE ACTIVIDADES

CARTA GANTT DE ACTIVIDADES	AÑO 1												AÑO 2											
Actividades Objetivo especifico 4.1																								
Contacto y reunión con expertos	■	■																						
Campañas y sitios de muestreo		■	■		■	■		■	■		■	■												
Recolección de muestras		■	■		■	■		■	■		■	■												
Procesamiento y análisis de muestras		■	■		■	■		■	■		■	■												
Zonificación de áreas de cultivo													■	■										
Actividades Objetivo especifico 4.2																								
Categorización de áreas														■	■									
Diseño plan de restauración														■	■									
Confección Manual de buenas practicas de Uso racional de Antimicrobianos														■	■									
Actividades Objetivo especifico 4.3																								
Elaboración del Sistema de Monitoreo de la Resistencia bacteriana													■	■	■									
Actividades Objetivo especifico 4.4																								
Monitoreo piloto del Sistema de Monitoreo															■	■								
Procesamiento y análisis de muestras															■	■								
Modificación y ajustes al Sistema de Monitoreo																	■							
Evaluación de requerimientos de la Autoridad																■	■							
Actividades Generales del Proyecto																								
Revisión normativas y bibliografía científica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							
Talleres																								
Taller presentación metodología y actividades	■																							
Taller de difusión y discusión de los resultados																	■							
Reuniones																								
Reuniones Periódicas Subsecretaria Ejecutiva FIP	■			■			■			■			■			■			■			■		
Reuniones de equipo de trabajo y subcontratados	■						■						■					■					■	
Elaboración y entrega de informes																								
Elaboración y entrega de informe de avance						■																		
Elaboración y entrega de pre-Informe final												■												
Elaboración y entrega de manuscrito en inglés																								■
Elaboración y entrega de informe final																								■

EQUIPO DE TRABAJO TECNICO Y PROFESIONAL

Personal	Título	Función
INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO		
Maureen Alcayaga	Médico Veterinario. Lc. Med. Vet.	Responsable y coordinadora general del proyecto.
Sergio Contreras	Médico Veterinario. M.Sc.Acuicultura	Revisión y análisis de bibliografía científica y legislación vigente nacional e internacional. Elaboración de informes
Evelyn Henriquez	Ingeniero Civil	Análisis de riesgo, proceso de análisis jerárquico y costeo de procesos
Carolina Asencio	Ing. Gestión Calidad y Ambiente Tecnico Unvs. Cs. Ambientales	Revisión y análisis de bibliografía. Elaboración de informes. Apoyo y seguimiento presupuestario
Rigo Obando	Cartógrafo	Responsable de la implementación sist. geográficos digitales, configuración sistema de alerta
Mario Rivas	Técnico	Actividades de muestreo en la región de Los Lagos
Lino Cáceres	Técnico	Actividades de muestreo en la región de Aysén
UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL NORTE (SUBCONTRATO)		
Claudio Miranda	Biólogo Marino, PhD Microbiologia	Encargado grupo UCN. Responsable de la ejecución de los análisis de resistencia bacteriana
Rodrigo Rojas	Biólogo Marino, MSc del Mar	Apoyo técnico – científico, grupo UCN
Luz Hurtado	Ingeniero en Acuicultura	Apoyo técnico – científico, grupo UCN
LABORATORIO ADL (SUBCONTRATO)		
Marco Rozas	Médico Veterinario	Encargado grupo ADL. Apoyo técnico en el desarrollo del proyecto
Harry Bohlé	Tecnólogo Médico	Apoyo técnico en el desarrollo del proyecto. ADL
Eugenio Tapia	Tecnólogo Médico	Apoyo técnico en el desarrollo del proyecto. ADL
Alexis Martínez	Bioquímico	Apoyo técnico en el desarrollo del proyecto. ADL
LABORATORIO BIOVAC (SUBCONTRATO)		
Marcos Godoy	Biólogo Marino Médico Veterinario	Encargado grupo Biovac. Apoyo técnico en el desarrollo del proyecto
Paola Álvarez	Laboratorista Químico Industrial	Apoyo técnico en el desarrollo del proyecto. Biovac

RESULTADOS ESPERADOS

RESULTADO ESPERADO	OBJETIVO ESPECIFICO ASOCIADO
Zonificación de la resistencia bacteriana y acumulación de sustancias antimicrobianas	Objetivo especifico 4.1
Manual de procedimientos estandarizados para uso veterinario que propenda a la disminución de antimicrobianos	Objetivo especifico 4.2
Programa de vigilancia sistematizada para la resistencia bacteriana en la salmonicultura	Objetivo especifico 4.3
Programas de mojara del monitoreo reglamentario para el control del uso de fármacos en la acuicultura	Objetivo especifico 4.4
Manuscritos en inglés, con motivo de, eventualmente, ser presentado en una revista de divulgación científica	Objetivo general
Conclusiones y recomendaciones emanadas del taller de difusión y discusión metodológica	Objetivo general

PROPUESTAS DE MODIFICACIONES METODOLÓGICAS

Metodología actual	Modificación propuesta	Fundamento de la modificación
El aislamiento y determinación de resistencia bacteriana se realizara en los siguientes agentes bacterianos: - *Piscirickettsia salmonis* - *Renibacterium salmoninarum* - *Aeromonas salmonicida* - *Flavobacterium psychrophilum* - *Flavobacterium columnaris* - *Vibrio ordalii* - *Streptococcus phocae* - *Yersinia ruckeri*	- Se elimina: *Renibacterium salmoninarum*	- De acuerdo a los diagnósticos realizados por los laboratorios de diagnostico y a la experiencia y opinión de profesionales del área de salud de las empresas salmoneras, *Renibacterium salmoninarum,* actualmente no es un patógeno de importancia. - Por otra parte, *Vibrio ordalii* es poco diagnosticado a diferencia de *Vibrio spp,* el que requiere ser secuenciado a fin de confirmar las especies presentes, ya que dentro de estos se encuentra un grupo de vibrios ulcerativos que has sido informados como causantes de problemas sanitarios en los centros de cultivo.

PROPUESTAS DE MODIFICACIONES METODOLÓGICAS

Metodología actual	Modificación propuesta	Fundamento de la modificación
La determinación de resistencia se evaluará frente a los siguientes antimicrobianos: oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina.	- Se incluye: ácido oxolínico.	Dentro de los antimicrobianos autorizados para se utilizados en las terapias antimicrobianas, además de los listados, se encuentra el ácido oxolínico, el que hasta hace un año atrás era ampliamente utilizado en la industria.
Las campañas de muestreos consideraran la distribución y cuantificación de bacterias resistentes y determinación de residuos de antibióticos en sedimentos.	- La determinación de residuos de antibióticos en sedimentos se realizará sólo una vez durante la ejecución del proyecto. La obtención de la muestra estará asociada a la toma de muestras para INFAs que se realiza en los centros de cultivo. - Ejecutar la actividad, en los únicas dos empresas que lo están evaluando, pero bajo la modalidad de “muestra ciega”. - Eliminar esta actividad del proyecto, por los efectos que puede generar en el resto de las acciones comprometidas.	- Existe un rechazo por parte de las empresas participantes en el proyecto, para autorizar la toma de muestras de sedimento bajo las jaulas de cultivo, para la determinación de residuos de antibióticos. Las razones expuestas están asociadas a la eventual divulgación y uso de los resultados obtenidos en las mediciones; y a la complejidad para efectuar la toma de muestras.

"Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura"

Proyecto FIP 2008-65

Departamento de Salud Hidrobiológica
División de Investigación en Acuicultura
Instituto de Fomento Pesquero

Valparaíso, agosto 2009

A N E X O 3

Registro gráfico de algunos de los antibiogramas efectuados para determinar perfiles de resistencia

Imagen 1. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

Imagen 2. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de riñón, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

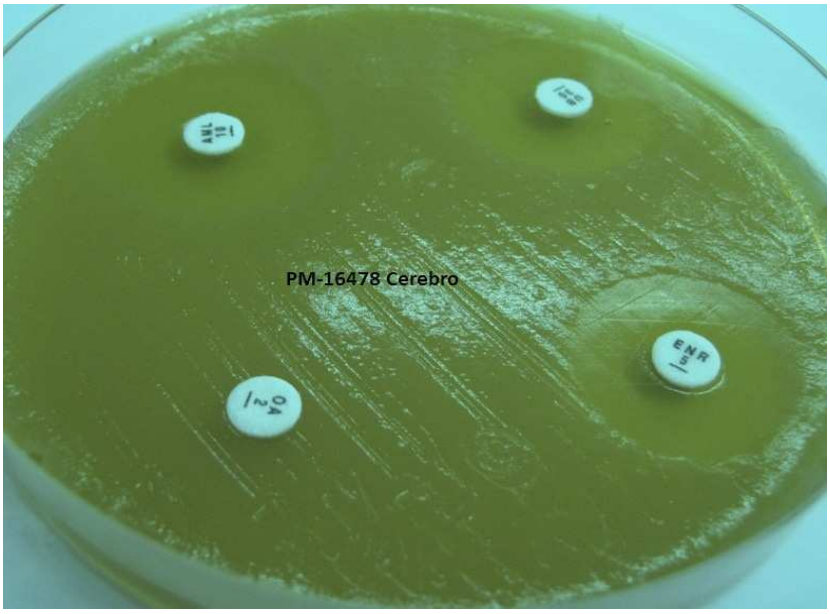


Imagen 3. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

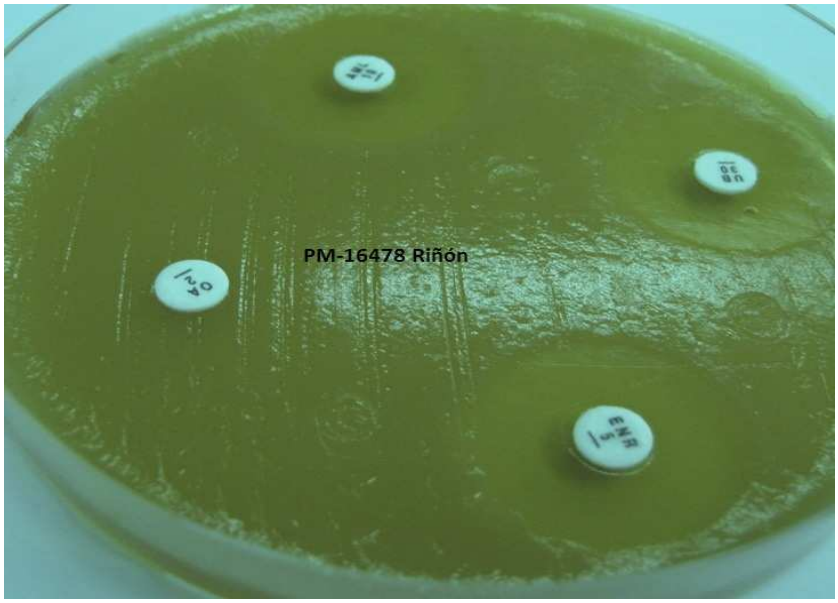


Imagen 4. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de riñón, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

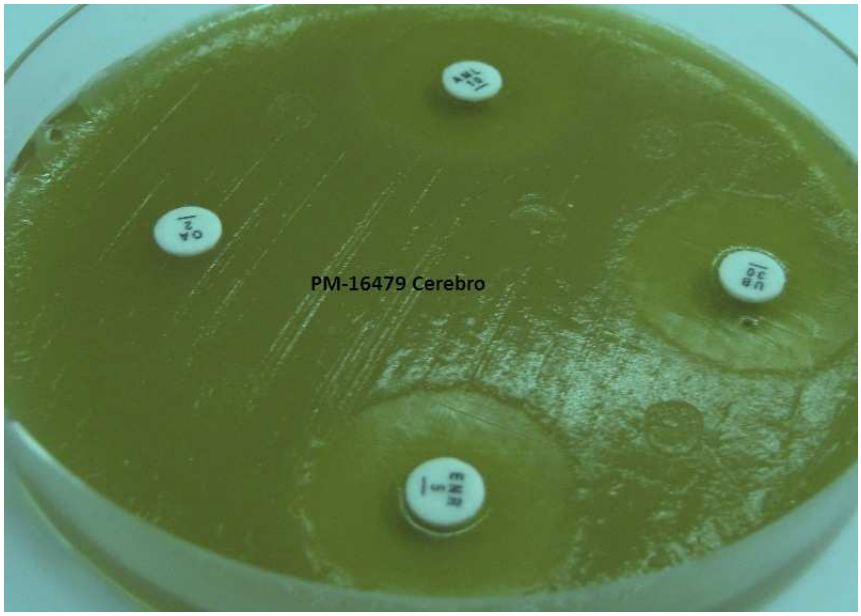


Imagen 5. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

Imagen 6. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de riñón, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

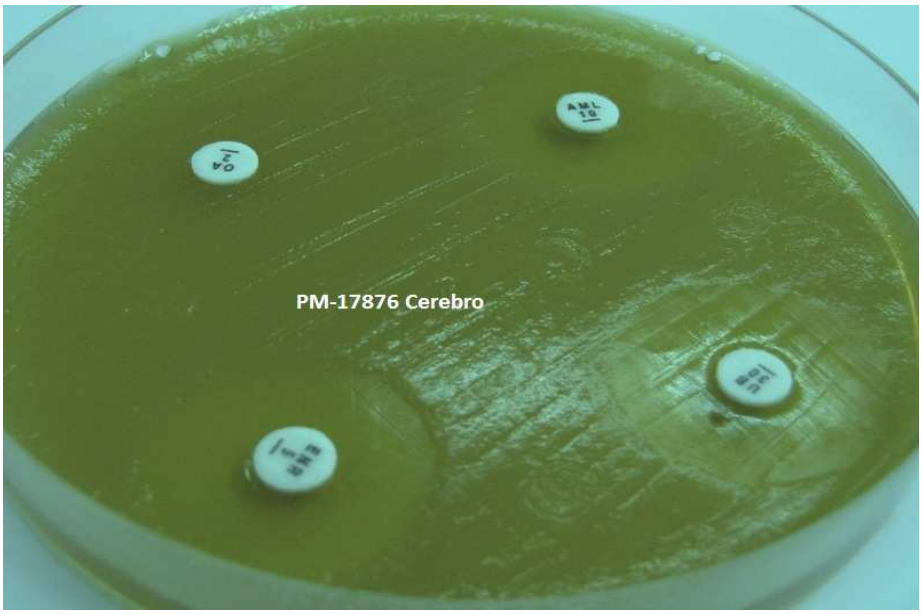


Imagen 7. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

Imagen 8. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de riñón, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

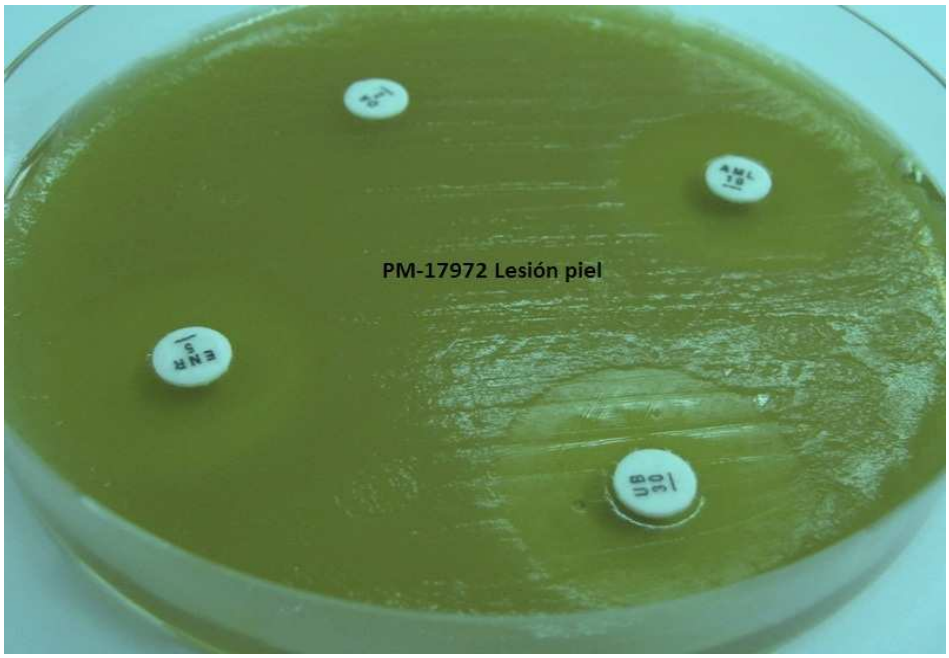


Imagen 9. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de lesión de piel, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

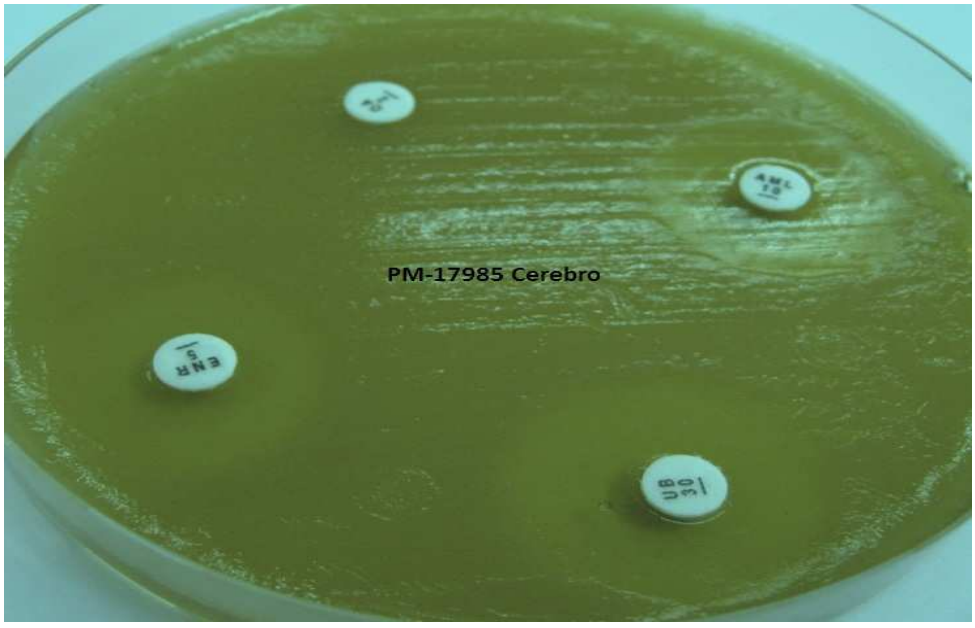


Imagen 10. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

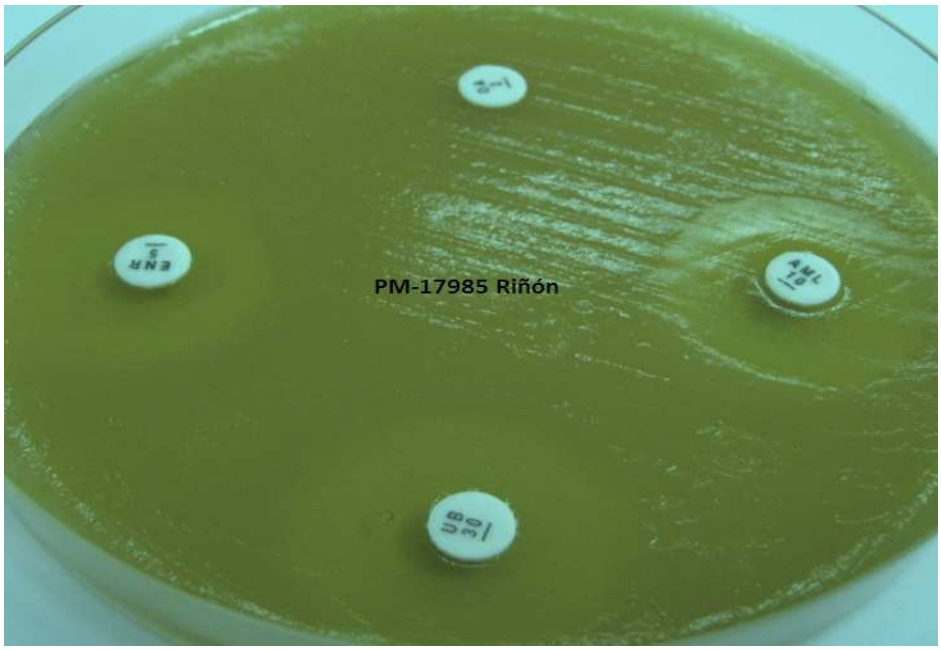


Imagen 11. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de riñón, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

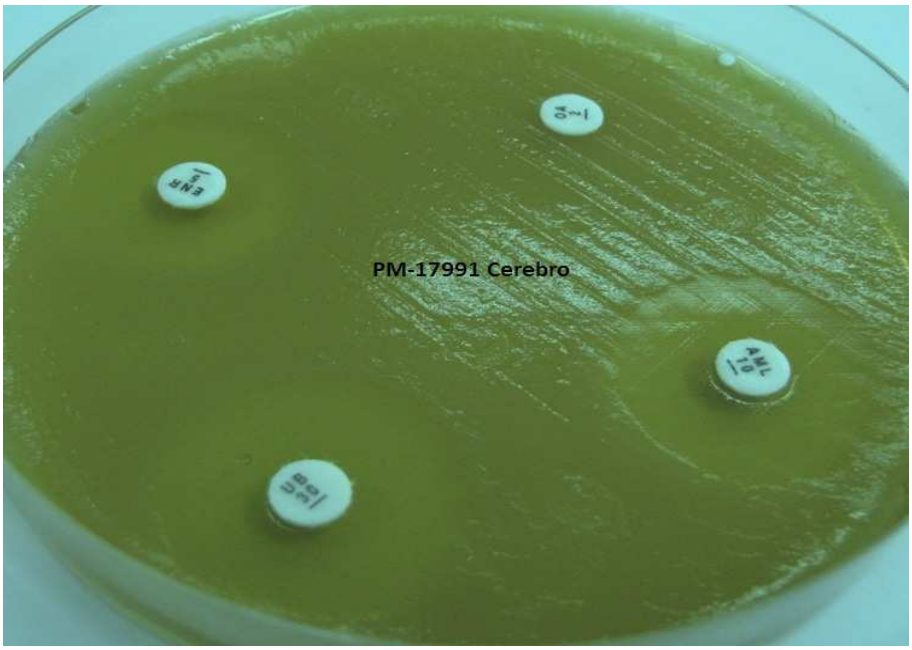


Imagen 12. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

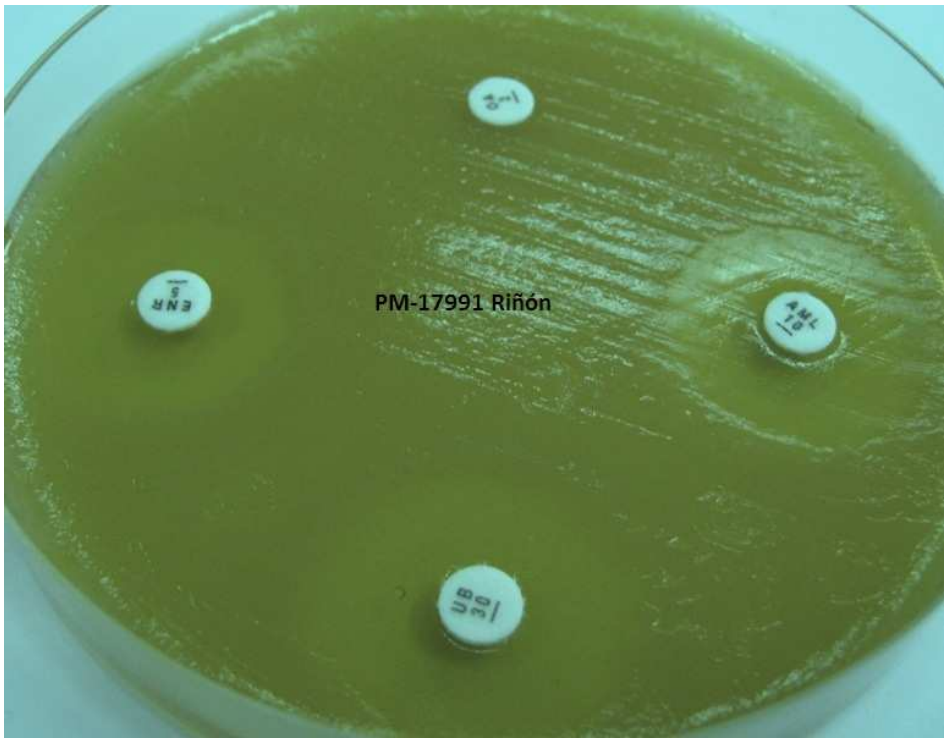


Imagen 13. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de riñón, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

Imagen 14. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

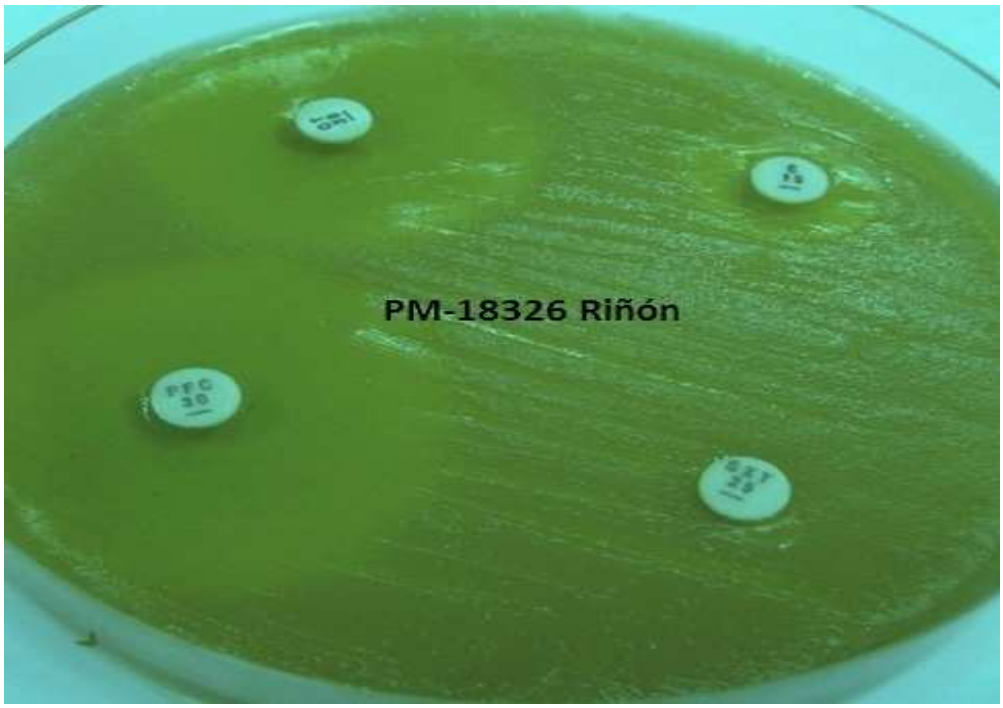


Imagen 15. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de riñón, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

Imagen 16. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

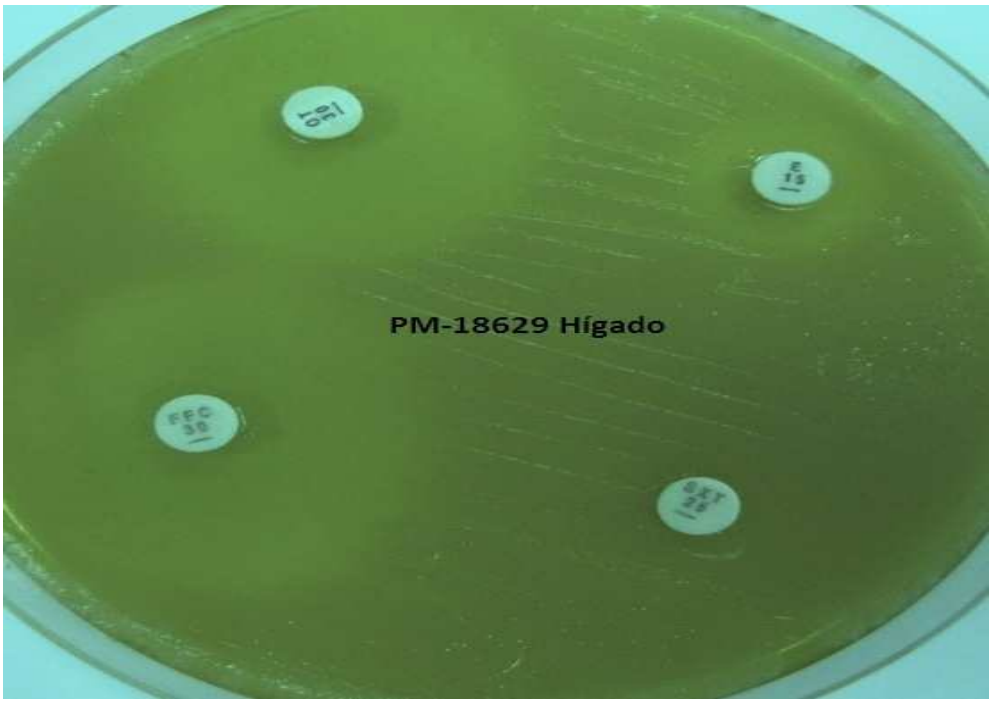


Imagen 17. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de hígado, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

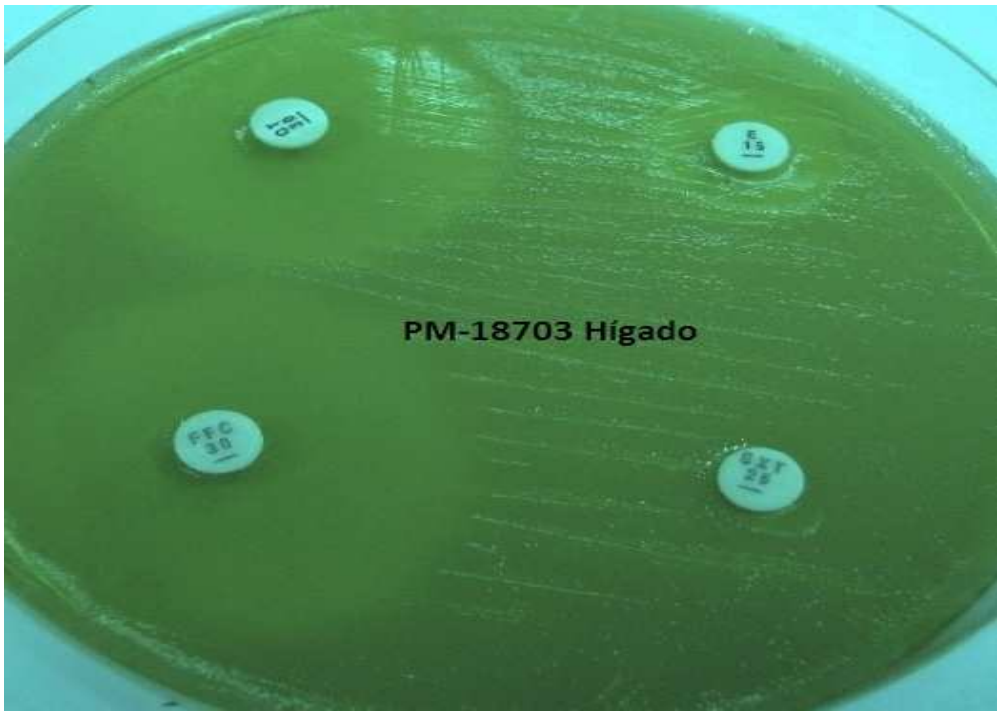


Imagen 18. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de hígado, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

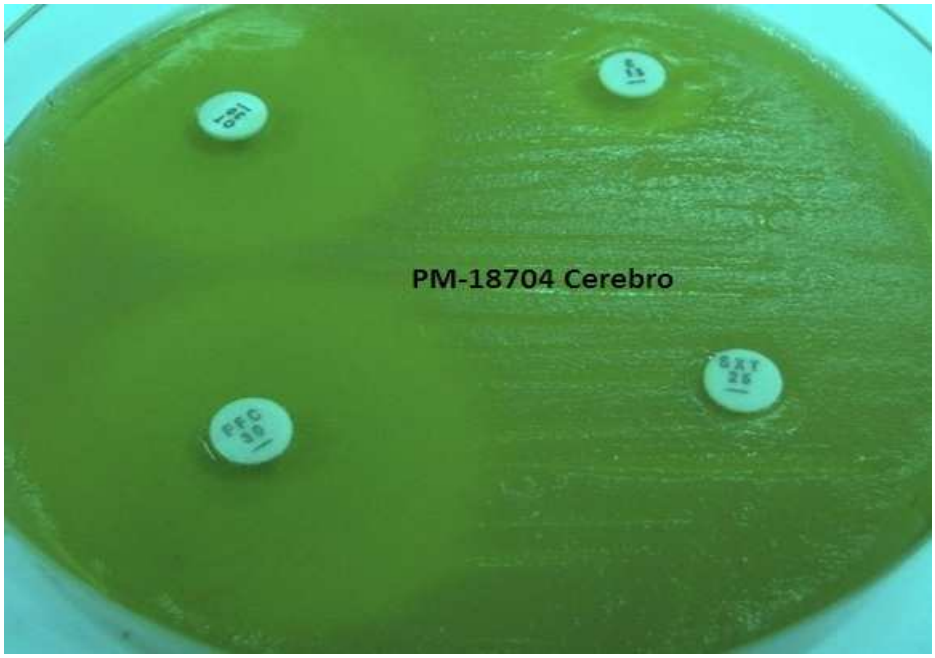


Imagen 19. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

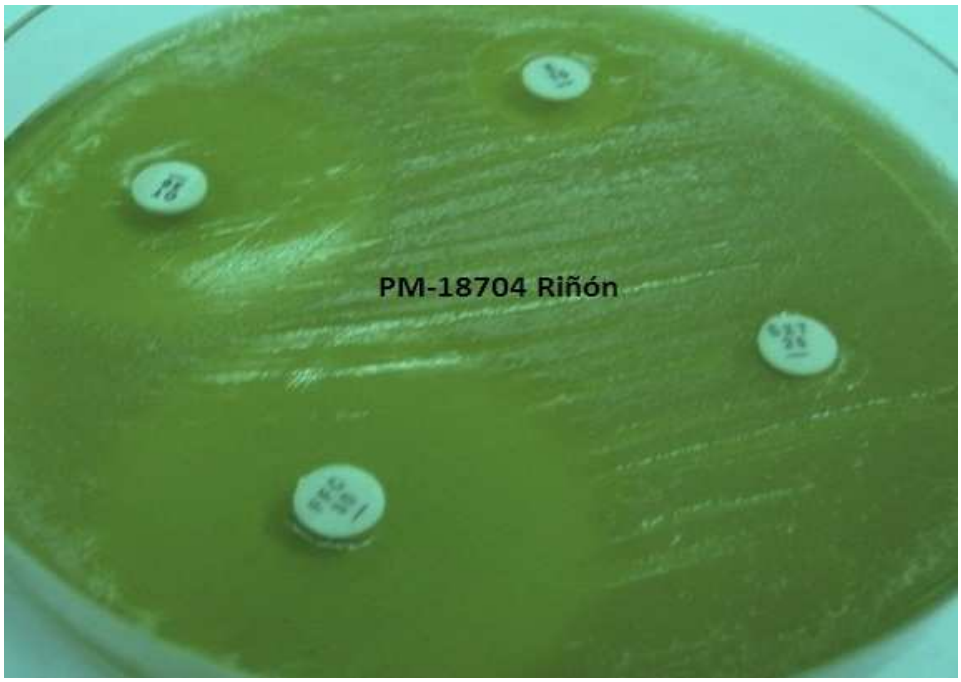


Imagen 20. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de riñón, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

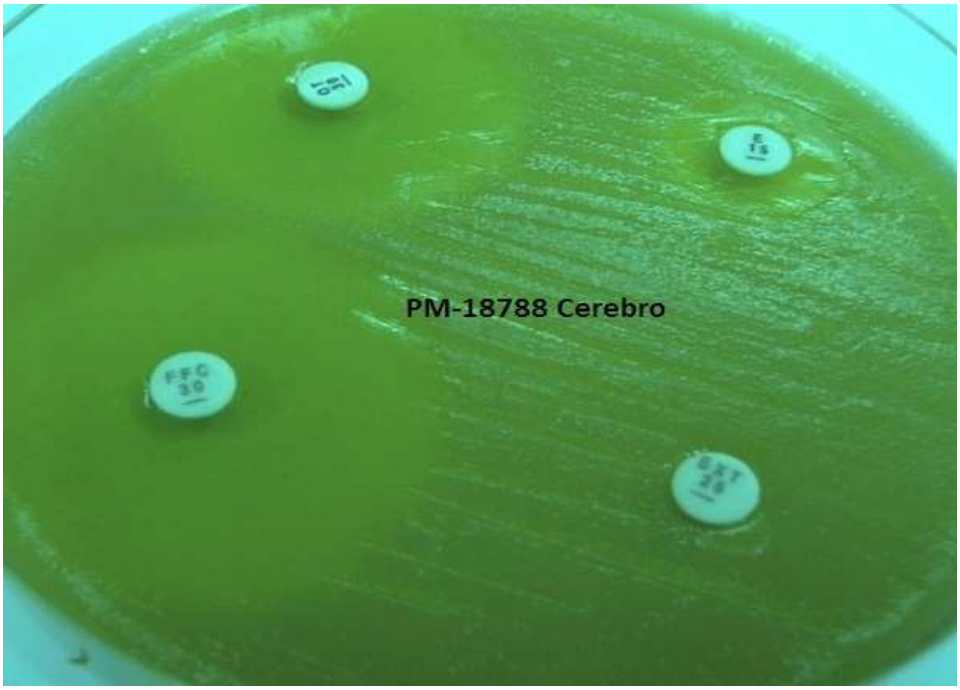


Imagen 21. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

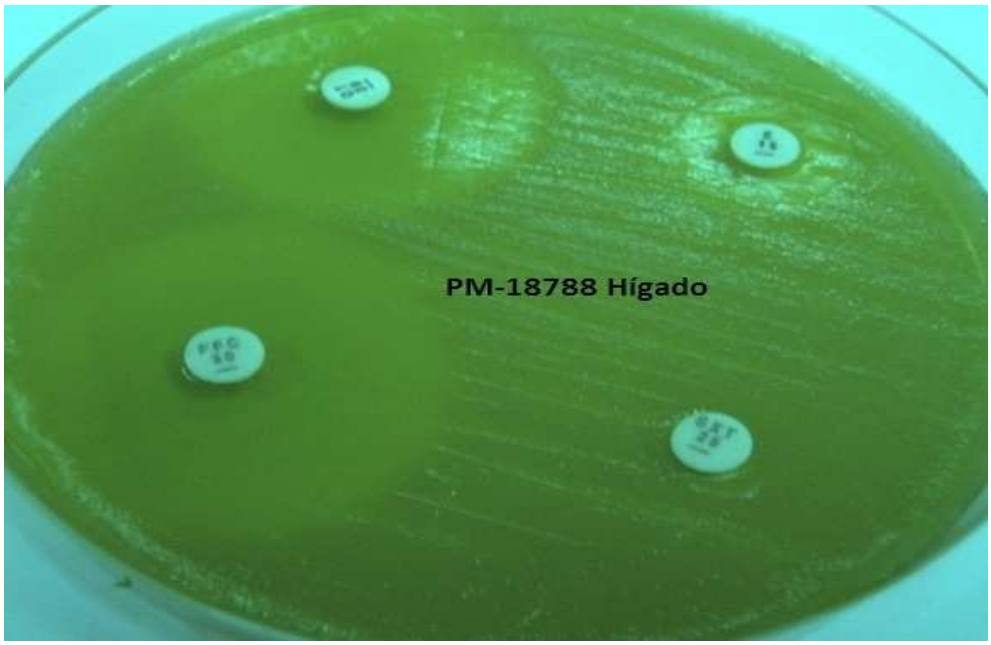


Imagen 22. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de hígado, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

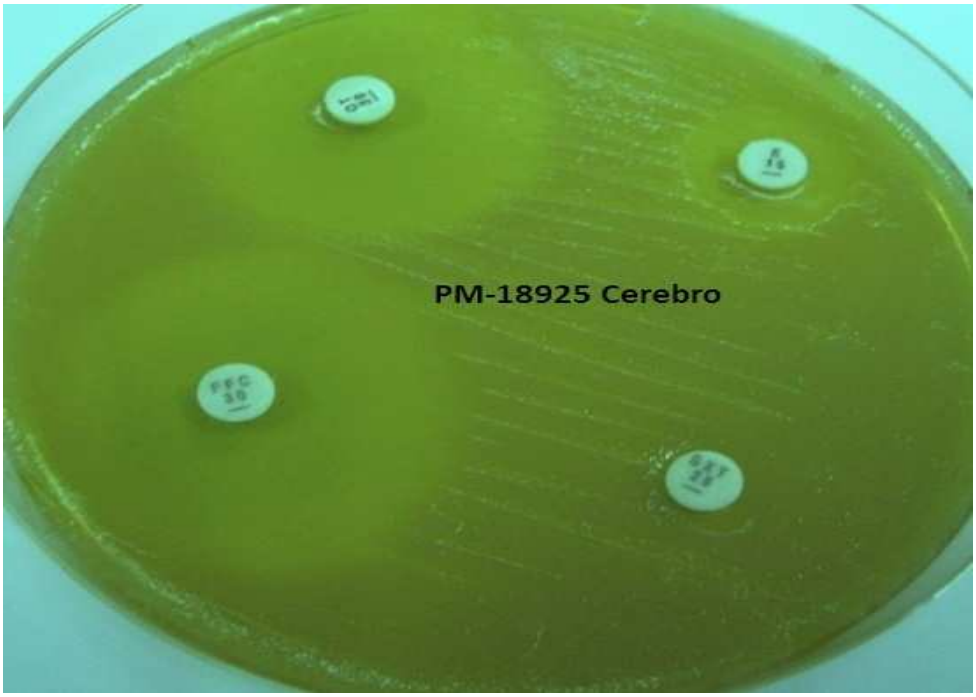


Imagen 23. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

Imagen 24. Antibiograma para *P. salmonis*, de aislado de cerebro, en placa con sensidiscos de 4 diferentes antimicrobianos.

A N E X O 4

Guía Buenas Prácticas uso Antimicrobianos

Guía Técnica

Buenas Prácticas de Uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura

Autores
Sergio Contreras Lynch
Claudio Miranda Pérez

- Marzo 2011 -

Índice

I.	Prologo	3
II.	Introducción	4
III.	Antecedentes generales	6
IV.	Situación del uso de fármacos en la industria salmonicultora nacional	15
V.	Características y mecanismos de acción de los fármacos administrados a peces	21
VI.	Mecanismos determinantes de resistencia bacteriana	30
VII.	Situación de la resistencia bacteriana en la industria salmonicultora nacional	37
VIII.	Técnicas de evaluación de la susceptibilidad bacteriana	41
IX.	Recomendaciones y medidas de control en el uso de antimicrobianos	45
X.	Bibliografía	47
XI.	Acrónimos más utilizados	62
XII.	Glosario	63
XIII.	Sitios de interés en la *web*	65
XIV.	Agradecimientos	66

I. Prologo

La presente iniciativa surge como parte de los productos desarrollados a partir de la ejecución del proyecto “Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura” financiado por el Fondo de Investigación Pesquera, FIP, no obstante, también representa en parte, el trabajo de investigación, efectuado durante los últimos años, en materias de monitoreo y evaluación de la susceptibilidad de agentes patógenos de peces de cultivo a antimicrobianos, fenómeno denominado comúnmente como resistencia bacteriana. Este trabajo ha sido realizado de manera conjunta por el Instituto de Fomento Pesquero a través del Departamento de Salud Hidrobiológica, y la Universidad Católica del Norte, a través del Laboratorio de Patobiología Acuática del Departamento de Acuicultura.

El uso consciente y eficaz de los antimicrobianos en cualquier industria productiva animal, como medio de control de enfermedades, requiere de un conocimiento base para la toma de decisiones tanto a nivel productivo como por parte de las autoridades regulatorias. En este sentido, el conocer el grado y evolución de la resistencia bacteriana en la industria salmonicultora, manejar las diferentes alternativas terapéuticas disponibles, y las implicancias económico-productivas que la elección de un determinado principio activo pueda traer, representa una forma directa para instaurar el principio del uso racional de antimicrobianos en este sector.

El presente documento representa una oportunidad, tanto para interiorizarse del concepto de uso racional de antimicrobianos, como para introducirse en la temática de la resistencia bacteriana en organismos acuáticos, así como para conocer el estado de situación y proyecciones que pueden establecerse en esta área.

En este sentido, este trabajo está enfocado tanto para público en general con algún conocimiento biológico-científico, como para estudiantes, y especialmente, para los profesionales e investigadores vinculados a la industria salmonicultora.

II. Introducción

El sector acuicultor nacional, y en particular, el salmonicultor, se ha desarrollado a un nivel que puede catalogarse de mundial, y si bien en un comienzo, mucho del conocimiento base y procesos utilizados fueron adaptaciones de otras realidades, el propio desarrollo de la industria obligó a la generación propia y de alto valor, desarrollándose subsectores de alta especialización, y que incluso han llevado a exportar este conocimiento a otras latitudes.

El control de los agentes bacterianos patógenos en la industria salmonicultora ha sido un constante desafío para el sector, siendo una de causas de mayores pérdidas a lo largo de todo el proceso productivo.

Esta área del conocimiento ha presentado diversas variables que han dificultado el manejo de los agentes patógenos, entre las que se pueden mencionar, la escasa plataforma de productos profilácticos específicos, las características propias y particulares de los agentes que afectan la industria nacional, la falta de una mayor variedad de herramientas y mecanismos de control directo e indirecto frente a brotes, así como de metodologías estandarizadas para evaluar y controlar este problema, entre otros.

Por su parte, y en cuanto a investigación aplicada propiamente tal, la falta de un mayor conocimiento de las respuestas de los organismos acuáticos a los tratamientos en condiciones reales de cultivo en nuestras aguas, y a su vez las consecuencias de generar las condiciones de desarrollo de las poblaciones de patógenos específicos en ese mismo entorno, son materias que todavía deben ser reforzadas.

Sin duda que la aplicación de los modelos animales homeotermos a la realidad de la industria cultivadora de peces, representó una aproximación que interfirió en la generación de conocimiento nuevo y específico, siendo hoy reconocida la necesidad de estudios particulares en materias fisiológicas, bioquímicas e incluso moleculares de los peces, y en sus diferentes etapas de cultivo, frente a los desafíos de agentes bacterianos, o frente a la aplicación de ciertos principios activos como método de tratamiento de enfermedades, todo ello, en un entorno complejo como lo representa el ambiente acuático por si mismo.

Fue durante esta etapa de crecimiento de la industria salmonicultora nacional, cuando a mediados de 2007, se debió enfrentar la primera gran contingencia sanitaria de este sector productivo, por efecto del brote oficial de la Anemia Infecciosa del Salmón, ISA.

El impacto de la aparición de este agente viral en el país marcó un hito en la historia de esta industria, haciendo replantear una serie de conceptos y prioridades, tanto a nivel del mismo sector privado, como a nivel de las autoridades sectoriales.

Previo a esta situación, esta intensiva expansión trajo como consecuencia colateral un aumento en la ocurrencia de enfermedades de etiología bacteriana en las especies cultivadas, con la consecuente intensificación del uso de agentes antimicrobianos como medida de tratamiento primaria. Adicionalmente, otras implicancias fueron los problemas de la persistencia de residuos en el producto final (filetes), y la aparición del fenómeno de resistencia bacteriana de los agentes patógenos de peces a los antimicrobianos.

En este sentido, cabe mencionar el reporte entregado por el Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, con fecha 14 de julio 2009, en el marco de la Ley 20.285 sobre el Acceso a la Información Publica, donde se indica que, de acuerdo a datos estimados, en el año 2007 el uso de antimicrobianos en la industria del salmón alcanzó los 358.635 kg., mientras que para el año 2008, el total reportado fue de 325.616 kg.

La forma más habitual de administración de antibacterianos en peces corresponde a su incorporación en el alimento. El uso de alimentos medicados representa un alto costo operacional y ambiental por la alteración de la microbiota presente en los sedimentos marinos y la columna de agua, y el efecto potencial de la presión de selección que estos residuos pudieran ejercer sobre los microorganismos que presenten resistencia bacteriana y que consecuentemente pudieran transmitirla a o cepas patógenas de salmones y humanos (Alderman & Hastings, 1998; Angulo, 2000; Furushita *et al*., 2003).

Debido a la disminución del apetito que experimentan los peces que sufren enfermedades bacterianas y a la baja palatabilidad del alimento suplementado con drogas (Hustvedt *et al*., 1991), aproximadamente solo el 20-30% del antibacteriano administrado es ingerido por los peces (Lunestad, 1992; Samuelsen, 1992). Además, algunos agentes antibacterianos, entre ellos oxitetraciclina, presentan una absorción a nivel del tracto gastrointestinal de peces muy baja, con lo cual una alta proporción no metabolizada del antibiótico es liberada al ambiente por medio de la orina y las fecas de los peces (Björklund & Bylund, 1990; Cravedi *et al*., 1987; Jacobsen, 1989; Rogstad *et al*., 1991).

En el cultivo industrial de peces a nivel mundial, el amplio uso de antibióticos como tratamiento de enfermedades bacterianas ha sido asociado desde hace años con la ocurrencia de resistencia bacteriana en *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida, Edwardsiella tarda, Edwardsiella icttaluri*, *Vibrio anguillarum, Vibrio salmonicida, Pasteurella piscicida* y *Yersinia ruckeri* (De Paola *et al*., 1995).

El presente documento representa un aporte y guía en lo referido a instaurar una utilización consciente de antimicrobianos en la industria, así como a aportar en el conocimiento y manejo del fenómeno de la resistencia bacteriana, factores indispensables en la búsqueda de establecer una actividad salmonicultora sustentable.

III. Antecedentes generales

3. 1. Conceptos generales

Antimicrobianos (antibióticos)

El concepto inicial de antibiótico se restringía inicialmente solo a las sustancias de origen natural que tenían la capacidad de eliminar microorganismos, no obstante, hoy en día, el término es aceptado transversalmente para referirse tanto a sustancias de origen natural como sintético, como es el caso de los quimioterapeuticos, que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos.

Aquellas sustancias lo suficientemente inocuas (no tóxicas a concentraciones útiles) para los hospederos, se utilizan como agentes terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en los seres humanos, animales y plantas.

Resistencia bacteriana

Existen dos características en muchas especies de bacterias que contribuyen a la generación de la denominada resistencia bacteriana a Agentes Antimicrobianos (AAM); por un lado, su rápida multiplicación, suficiente para duplicar su número cada 20 a 30 minutos, y por otro lado, su alta capacidad para adaptarse a los cambios en el entorno y sobrevivir en condiciones desfavorables, lo que resulta en el desarrollo de mutaciones que las protegen de éstas.

La capacidad de las bacterias a adaptarse a los cambios externos mediante estos mecanismos se denomina desarrollo de resistencia frente a presiones de selección, y permite que los organismos resistentes proliferen en las condiciones en las que el antimicrobiano se encuentra presente.

Vale decir, el cambio en la susceptibilidad de ciertos agentes bacterianos, enfrentados a sustancias antimicrobianas, es lo que se denomina, resistencia bacteriana a antibióticos.

La capacidad de adaptación bacteriana responde a la condición de independencia de sus propios recursos genéticos. Las células individuales tienen acceso a una gran variedad de genes “itinerantes” que se mueven de una célula bacteriana a otra, y se pueden diseminar a través de las poblaciones bacterianas mediante una serie de elementos genéticos móviles, de los cuales plásmidos y elementos transponibles son los de mayor importancia en el desarrollo del fenómeno.

La resistencia bacteriana puede ser clasificada en dos grupos:

- La resistencia inherente o intrínseca: La especie bacteriana no suele ser susceptible a un antimicrobiano en particular. Esto puede ser debido a la incapacidad del agente antibacteriano para entrar la célula de las bacterias y llegar a su sitio de destino, o la falta de afinidad entre los antibacterianos y su destino (sitio de acción), o la ausencia del sitio específico en el sitio blanco.

- La resistencia adquirida: La especie bacteriana es normalmente susceptible a un fármaco en particular, pero ciertas cepas exhiben resistencia a este antimicrobiano, la

que está mediada por la adquisición de mutaciones o elementos genéticos que codifican para su resistencia y que son incorporados a la célula bacteriana a través de una serie de mecanismos.

Cuando se desarrolla la resistencia bacteriana, el antibiótico ya no es capaz de contrarrestar al agente infeccioso. Un bajo nivel de resistencia puede ser detectada por un ligero aumento en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el antibiótico respecto de su valor inicial, pero que no es necesariamente de importancia clínica. Un mayor grado de resistencia se caracteriza por una CMI que supera, a veces por varios órdenes de magnitud a las concentraciones de la droga requeridas para ejercer su acción en forma eficaz, manteniendo las condiciones seguras para el hospador.

3.2. Metodologías de evaluación de la resistencia bacteriana

Para determinar el estado y evolución de la resistencia bacteriana es necesario utilizar tecnologías modernas, rápidas y confiables. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se utilizan para seleccionar al agente antimicrobiano que debería utilizarse para el tratamiento de una enfermedad bacteriana patógena especifica, como también para conocer el estado de resistencia de las poblaciones bacterianas patógenas (Alderman y Smith, 2001; Miller *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005).

Tradicionalmente se ha utilizado la metodología de difusión en placa (antibiogramas), que si bien entrega datos relativamente rápidos (24 a 48 horas), dependiendo de las características de crecimiento de la especie patogénica analizada, no cuantifican la magnitud de la resistencia, y generalmente, se realizan a temperaturas apropiadas para organismos terrestres y no acuáticos.

Estos ensayos debieran ser complementados con otras técnicas tendientes a determinar específicamente los niveles de resistencia o susceptibilidad a los fármacos ensayados, como es el caso de la determinación de las Concentraciones Mínimas Bactericidas o CMB y/o Concentraciones Mínimas Inhibitorias o CMI, usualmente realizadas en laboratorios más sofisticados (Branson, 2001). Estos resultados pueden ser entonces utilizados para confirmar los resultados de antibiogramas y permiten visualizar de mejor forma el comportamiento de las poblaciones bacterianas frente al uso intensivo de un fármaco en particular.

A pesar de que el método más preciso corresponde a la determinación de la CMI de un determinado antibiótico frente a un microorganismo patógeno, el método de difusión en agar o antibiograma, es el más utilizado para este propósito en los laboratorios de diagnóstico.

Al respecto, el tamaño de las zonas de inhibición pueden ser comparadas entre diversos análisis, y en la medida en que el método utilizado esté estandarizado y bien ejecutado, es factible obtener una buena indicación de la variación de los patrones de susceptibilidad.

En nuestro país, la falta sistematización en la evaluación de susceptibilidad de patógenos de peces a AAM a nivel de la industria salmonicultora, sumada a la complejidad que representan el cultivo de bacterias exigentes e intracelulares, y que son las de mayor impacto en la industria, han generado una falta de estandarización tanto en las técnicas utilizadas, como en la respectiva evaluación de dichos resultados.

A pesar de que a nivel internacional, hay esfuerzos por abordar esta problemática, como por ejemplo, las recomendaciones para las metodologías de laboratorio entregadas por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI/NCCLS), que ya en el año 2005 elaboró protocolos estándares para la determinación de susceptibilidad a agentes antimicrobianos de varias especies bacterianas patógenas de peces, considerando tanto las condiciones de cultivo, medios utilizados y criterios de lectura de los resulotados (CLSI, 2005; CLSI, 2006a, 2006b), la problemática específica de la estandarización de los ensayos de susceptibilidad para muchos agentes patógenos relevantes para la actividad salmonicultora nacional no ha podido aún ser resuelta.

Es así como en la actualidad aún no se cuenta con metodologías estandarizadas para la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos de muchas especies patógenas de salmónidos de gran importancia para la industria salmonicultora Chilena, y que presentan características de crecimiento y requerimientos nutricionales muy diferentes, entre las cuales se encuentran las especies *Piscirickettsia salmonis*, *Streptococcus phocae*, *Vibrio ordalii*, *Flavobacterium psychrophilum* y *Aeromonas salmonicida*.

Como un desafío tanto o más complejo que el anterior, se encuentra la definición de cuando un microorganismo analizado ha de considerarse resistente, intermedio o susceptible a la actividad del antimicrobiano ensayado, para lo que deben definirse los denominados valores de puntos de corte (*cut-offs*) y puntos de quiebre (*breakpoints*) establecidos para cada especie bacteriana patógena de salmones y frente a cada sustancia antimicrobiana en particular.

3.3. Consideraciones en la interpretación de resultados de evaluación de resistencia bacteriana

De acuerdo a Smith *et al.* (2006), para la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana efectuada a través de las técnicas de difusión en medio de cultivo sólido en placa (antibiogramas), los factores que determinan el tamaño de las zonas de inhibición son complejas, pues además del contenido propio del disco que contiene el antimicrobiano evaluado, deben considerarse factores relacionados a la difusión del agente a través del medio de cultivo utilizado, la actividad biológica del agente antibacteriano en ese medio, y aquellos factores relacionados a la tasa de crecimiento del organismo ensayado en el medio de cultivo seleccionado.

Dentro de los problemas más frecuentes asociados a la técnica de difusión en placa (antibiograma), se encuentran:

a) Variabilidad del medio de cultivo utilizado:

Diferentes tipos de agar pueden ser usados entre y dentro de los laboratorios de diagnóstico, y esto puede afectar las tasas de difusión del antibiótico, consistencia y profundidad del agar, producir una disminución de la actividad *in-vitro* de algunos antibióticos debido a la concentración de los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} en medios preparados con agua de mar (Pursell *et al.*, 1995; Lunestad & Samuelsen, 2001), etc. Esta variabilidad puede causar resultados inconsistentes, determinando una gran dificultad para realizar una comparación entre los resultados.

b) Variabilidad en los métodos de inoculación de las placas:

Los métodos pueden variar entre, e incluso dentro de los laboratorios que realizan estos análisis, si no es utilizado un procedimiento estandarizado.

c) Variabilidad en la potencia de los discos de antibiótico utilizado:

Esto puede ser debido a varias razones, por ejemplo, el uso en diferentes laboratorios de sensidiscos con distintas potencias, almacenamiento deficiente, uso de discos ya expirados o almacenados en condiciones deficientes, etc.

d) Diferencias entre los antibióticos a utilizar:

Pueden haber diferencias entre las sustancias antimicrobianas utilizadas en la práctica veterinaria de campo y aquellos usados en los discos (comprobado en el caso de sulfonamidas potenciadas, Douglas *et al.*, 2007), lo que ha puesto en evidencia la necesidad de ensayar en los laboratorios, los mismos tipos de compuestos antimicrobianos utilizados en los tratamientos, y no de manera genérica.

e) Ensayo de cultivos impuros.

Es primordial la necesidad imperiosa de que los cultivos bacterianos a ensayar no se encuentren contaminados con otras cepas bacterianas, ya que ello producirá lecturas erróneas de los halos de inhibición producidos o que la cepa contaminante inhiba el crecimiento de la cepa patogénica de interés.

f) Diferencias en las condiciones de incubación:

Estas deben ser apropiadas para el microorganismo específico. Por lo tanto se deben utilizar las condiciones de cultivo que sean óptimas para el crecimiento bacteriano de la especie a ensayar, tal es el caso de la especie *F. psychrophilum*, la que requiere condiciones de incubación a tem,peraturas menores a lo habitual por su carácter psicrófilo.

g) Variabilidad en la lectura de los resultados:

Puede haber una gran variabilidad en la lectura de zonas de inhibición debido a las dificultades en la determinación de los límites de las zonas de inhibición, en especial cuando estos no son uniformes. Asimismo, el número de lecturas realizadas o la diversidad de personas que realizan este proceso pueden producir variaciones que incidirian en el resultado final del ensayo.

Una vez abordados y resueltos todos los factores previamente descritos, se estará en condiciones de poder generar análisis de susceptibilidad confiables y reproducibles, que permitirán caracterizar la respuesta del microorganismo ensayado a la sustancia antimicrobiana analizada.

Es así como un microorganismo es definido como **susceptible** cuando es inhibido *in vitro* por una concentración de un agente antimicrobiano asociada con una alta probabilidad de éxito terapéutico.

Por otro lado, un microorganismo es definido como **resistente** si es inhibido *in vitro* por una concentración de un agente antimicrobiano asociada con una alta probabilidad de fracaso terapéutico.

Finalmente, un microorganismo es definido como **intermedio** o de susceptibilidad/resistencia intermedia, cuando es susceptible a una concentración n del antimicrobiano que no permite asegurar un éxito terapeútico, causando un efecto incierto del tratamiento en las dosis y condiciones establecidas para este.

El uso de valores de corte (*cut-offs*) y de puntos de quiebre (*breakpoints*) permite la clasificación de las cepas en grupos sobre la base de los resultados obtenidos en el laboratorio.

Así, los puntos de quiebre clínico son concentraciones discriminatorias de cada antimicrobiano utilizados en la interpretación de los resultados de los ensayos de susceptibilidad, para definir a las cepas bacterianas como susceptible, intermedio o resistente al fármaco (Turnidge & Paterson, 2007).

Por otro lado, el uso de valores de corte (*cut-off*) epidemiológicos, permite definir si un microorganismo es definido como silvestre (*wild-type*, WT), es decir que carece de mecanismos de resistencia adquiridos o mutacionales, y se considera que nunca ha entrado en contacto con el fármaco ensayado y se expresa como WT < X mg/L. Los microorganismos WT pueden o no responder clínicamente al tratamiento con antimicrobianos.

Las consideraciones microbiológicas, clínicas, farmacológicas y farmacocinéticas son muy importantes para establecer los puntos de quiebre, aunque la mezcla ideal de

estos componentes aún no se encuentra establecida (MacGowan & Wise, 2001). Los términos resistente y susceptible (y probablemente no para el caso de los aislados definidos como intermedios), entregan el significado clínico de los resultados generados en los ensayos de susceptibilidad realizados en el laboratorio.

El problema de establecer el significado válido de la información generada por los ensayos de susceptibilidad, por lo tanto, depende críticamente de la validez de los valores de quiebre previamente definidos (Sirot *et al.*, 1996; Goldstein *et al.*, 1996; Bywater *et al.*, 2006).

3.4. Experiencias internacionales en el manejo del fenómeno de la resistencia bacteriana en acuicultura

En varios países la legislación sobre la disponibilidad y uso de drogas en acuicultura es inadecuada, debido a que ha sido originalmente formulada con una orientación hacia los problemas de medicina veterinaria terrestre (Alderman & Michel, 1992; Schlotfeldt, 1992). Además, se debe considerar que diversos factores ambientales, como temperatura, pH, concentración de iones y salinidad, tienen influencia sobre la farmacocinética de la mayoría de las drogas utilizadas en peces (Rasmussen, 1988; Lunestad & Goksϕyr, 1990; Martinsen *et al*., 1991; Björklund *et al*., 1992; Ishida, 1992; Van der Heijden *et al*., 1994; Barnes *et al*., 1995; Martinsen & Horsberg, 1995; Pursell *et al*., 1995; Vaughan & Smith, 1996; Haug & Hals, 2000).

Diversos países y organizaciones relacionadas con la salud animal y humana, han estado trabajando en los mecanismos de prevención y control de la resistencia bacteriana. Así, la FAO, en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE), han formado desde 2003 un grupo de trabajo relacionado con el manejo, riesgo e implementación de programas de monitoreo de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria. Este grupo ha hecho énfasis especial en la evaluación del riesgo, buenas prácticas veterinarias y planes de monitoreo (FAO/WHO/OIE, 2003; FAO/WHO/OIE, 2004). Además, la Conferencia Veterinaria Internacional sobre Armonización (VICH), entidad que reúne a expertos de la Unión Europea, Estados Unidos y Japón con el fin de uniformar criterios científicos en relación a la resistencia bacteriana, ha estado trabajando en los parámetros que se deben medir para autorizar la medicación con antibióticos y sus consecuencias en la generación de resistencia bacteriana (VICH, 2003).

En países como Noruega, Reino Unido y Estados Unidos de Norteamérica, el uso de antibacterianos en acuicultura está fuertemente restringido, regulado y controlado. Los reglamentos no sólo aprueban los tipos de antibióticos que pueden emplearse, sino también que suelen especificar las especies a las que se pueden administrar, así como establecen el diagnóstico, la dosis, la duración y el período de carencia que debe observarse antes del sacrificio, cuando se utiliza un antibiótico como agente terapéutico.

La Unión Europea a través del Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) dependiente de la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products desarrolló en el año 2000 un Plan Estratégico relacionado con la resistencia bacteriana en medicina veterinaria. Dentro de este plan, se incluye la entrega de información de países miembros sobre el estado de resistencia, planes de monitoreo, uso prudente de antimicrobianos, entre otros (EMEA, 2003).

Por su parte, Estados Unidos creó en 1999 un Grupo de Acción para combatir la Resistencia Antimicrobiana integrado por agencias federales como la Food and Drug Administration, Center for Diseases Control, National Health Institute, Agency for Health Care Research and Quality, Health Care Financing Administration, Health Resources and Services Administration, Department of Agriculture, Department of Defense, Department of Veterinarian Affairs y la Environmental Protection Agency. Este grupo ha creado un Plan de Acción incremental para combatir la amenaza creciente de resistencia bacteriana y contempla un programa de vigilancia nacional, entrega de datos confiables sobre la susceptibilidad de microorganismos a diferentes drogas, un plan de monitoreo del uso de drogas, adopción de políticas para el uso apropiado de drogas, mejoramiento del diagnóstico de enfermedades, plan de disminución de transmisión de infecciones, investigación y desarrollo (personal e infraestructura), entre otros (CDC, 2001).

Sin embargo, en Chile la situación es diferente, no existiendo una entidad preocupada y focalizada en la problemática transversal de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

3.5. Impactos generados por el fenómeno de resistencia bacteriana

El uso de antimicrobianos en acuicultura selecciona bacterias resistentes en el ambiente, y existen evidencias epidemiológicas y moleculares que señalan que los genes que median esta resistencia pueden ser transmitidos de bacterias acuáticas a otras bacterias capaces de producir infecciones en humanos y animales (Capone *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2002; Furushita *et al.*, 2003).

Aunque la administración de agentes antibacterianos es un medio efectivo para el control de las infecciones bacterianas en peces en cultivo (Gratzek, 1983), existe una creciente preocupación acerca de sus consecuencias sobre la salud pública (Bernoth, 1991), el medio ambiente (Hansen *et al*., 1992; Kupka-Hansen *et al*., 1992) y los animales tratados (Van der Heijden *et al*., 1992).

Diversos autores han enfatizado la necesidad de analizar los efectos negativos del uso de antimicrobianos en los cultivos de peces (Austin, 1985b; Lunestad, 1992; Midtvedt & Lingaas, 1992; Smith *et al*., 1994a), ya que es sabido que el uso de agentes antibacterianos se relaciona directamente con la emergencia de cepas bacterianas resistentes a estos compuestos, generándose un riesgo para la salud pública (Midtvedt & Lingaas, 1992; Monnet y Sørensen, 1999).

Los problemas de salud pública que ocasiona el desarrollo de resistencia no están restringidos a los microorganismos patógenos de cultivos *per se*, sino que a toda la *taxa* microbiana expuesta a los compuestos utilizados, incluyendo especies productoras de infecciones en humanos y otras asociadas con actividades marinas (Saito *et al*., 1977; Chang & Pien, 1986), así como a parte importante de la fauna autóctona presente en las vecindades del sistema de cultivo (Samuelsen *et al*., 1992a; Capone *et al*., 1996; Coyne *et al*., 1997).

La exposición repetida de poblaciones bacterianas a los antimicrobianos favorece la selección de las cepas con mayor resistencia (Lewin, 1992). De esta manera, continuas exposiciones van eliminando la mayoría de las bacterias susceptibles, sobreviviendo una población reducida de bacterias resistentes, que incrementan de

número rápidamente, en ausencia de competencia con los microorganismos susceptibles (Midtvedt & Lingaas, 1992; Young, 1993). Por lo tanto, el uso masivo de agentes antimicrobianos en sistemas de cultivos acuícolas puede ser un factor determinante en el reemplazo de microorganismos susceptibles por otros resistentes (Aoki, 1992; Lewin, 1992).

Estudios recientes han demostrado que antibacterianos como oxitetraciclina, flumequina y ácido oxolínico (y que han sido ampliamente utilizados en la industria nacional) persisten por meses en el sedimento de los sistemas de cultivo después de su administración (Jacobsen & Berglind, 1988; Björklund *et al*., 1990; Hansen *et al*., 1992; Nygaard *et al*., 1992; Samuelsen, 1992; Samuelsen *et al*., 1994; Hektoen *et al*., 1995; Smith, 1996). De igual modo, algunos investigadores (Jacobsen & Berglind, 1988; Samuelsen, 1989), han informado una vida media de 10 semanas y 32-64 días, respectivamente, para la oxitetraciclina en sedimentos de centros de cultivo. Algunas bacterias ictiopatógenas sobreviven en el sedimento por un tiempo prolongado (Enger *et al*., 1989; Hoff., 1989) y la persistencia de agentes antibacterianos en el sedimento aumenta la posibilidad de que estas bacterias desarrollen resistencia a ellos (Schlotfeldt *et al*., 1985; Björklund *et al*., 1991, Miranda *et al.*, 2005).

Por lo general, la mayoría de los estudios tendientes a dilucidar la problemática del uso de antibióticos en cultivos de salmones, se restringe a la determinación de la frecuencia de microorganismos resistentes al antibacteriano utilizado en el sistema, y de la concentración residual del antibacteriano en los peces y el sedimento ubicado bajo el cultivo (Björklund *et al*., 1991; Coyne *et al*., 1994; Hektoen *et al*., 1995). Existen muy pocos estudios acerca de los elementos genéticos involucrados en la resistencia que presentan las bacterias de estos cultivos y ellos son, en su mayoría, referidos a bacterias ictiopatógenas aisladas de patologías en cultivos (Toranzo *et al*., 1984; DeGrandis & Stevenson, 1985; DePaola *et al*., 1988; Sϕrum *et al*., 1990; Starliper *et al*., 1993; Saitanu *et al*., 1994).

En Chile, existen sólo dos estudios que describen los elementos genéticos presentes en bacterias provenientes de cultivos de salmones, y que evidencian una gran heterogenicidad de genes *tet*, que codifican para resistencia a tetraciclinas (Miranda *et al*., 2003), y genes *floR*, que codifican para resistencia a florfenicol (Miranda y Rojas, 2007a). Por lo anterior, es evidente la necesidad de estudiar la resistencia de bacterias patógenas de peces para evaluar su rol en la eficiencia de las terapias antimicrobianas implementadas en los centros de cultivo de salmones en Chile. Adicionalmente cabe mencionar que el traslado de peces desde ambientes de agua dulce (ríos y lagos) hacia ambientes marinos, facilita la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos y la aparición de patógenos en nichos ecológicos geográficamente lejanos (Goldberg *et al*., 2001), siendo esta una actividad rutinaria en la industria nacional.

En los cultivos de salmones se ha demostrado que el uso de oxitetraciclina conduce a un aumento en la frecuencia de la microbiota resistente de los sedimentos ubicados bajo las jaulas de peces (Torsvik *et al*., 1988; Hansen *et al*., 1993a; Kerry *et al*., 1994), así como al aumento de cepas ictiopatógenas resistentes a oxitetraciclina y otros antibióticos (Nygaard *et al*., 1992; Toranzo *et al*., 1992, Bruun *et al*., 2000). Puede sugerirse, entonces, que el incremento de resistencia a oxitetraciclina durante el período de medicación puede limitar la efectividad del tratamiento, por conducir a la aparición de bacterias patógenas de peces resistentes a este antibiótico (DePaola, 1995). Así por ejemplo, se ha demostrado la transferencia de resistencia mediada por plásmidos a cepas de *Y. ruckeri* (DeGrandis & Stevenson, 1985; Klein & Boehm, 1994).

Por lo general, la resistencia a oxitetraciclina, florfenicol y amoxicilina es codificada extracromosomalmente en plásmidos, los que pueden ser transferidos horizontalmente a otras bacterias de la misma o diferente especie (Lewin, 1992). La mayoría de los determinantes de resistencia a estos antibióticos se localizan en plásmidos y transposones (Chopra & Roberts, 2001; Miranda *et al.,* 2003), lo que evidencia la alta posibilidad de su diseminación en el sistema de cultivo en particular y el medio natural en general (Roberts, 1994). Además, algunos estudios han demostrado la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina en bacterias ictiopatógenas (Sϕrum *et al*., 1992; Zhao & Aoki, 1992; Andersen & Sandaa, 1994).

Es necesario considerar que el reservorio de la mayoría de las bacterias patógenas para salmones aún no ha sido definido claramente, aunque existen estudios que describen una elevada prevalencia de bacterias pigmentadas en agua dulce (Allen *et al*., 1983) y marina (Austin, 1982), sugiriendo la presencia de *Flavobacterium* en estos sistemas (Austin & Austin, 1987). Se han identificado plásmidos en bacterias ictiopatógenas como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwarsiella tarda* y *Yersinia ruckeri,* que codifican resistencia hasta a 5 agentes antibacterianos (Aoki *et al*., 1983; Toranzo *et al*., 1983; DeGrandis & Stevenson, 1985; Hedges *et al*., 1985; Bast *et al*., 1988; Sϕrum *et al*., 1988; Griffiths & Lynch, 1989; Sϕrum *et al*., 1990; Inglis *et al*., 1993; Sandaa & Enger, 1994; Giles *et al*., 1995).

IV. Situación del uso de fármacos en la industria salmonicultora nacional

La industria salmonicultora Chilena ha debido enfrentar a lo largo de su historia, una serie de desafíos en todo ámbito, siendo los aspectos sanitarios y el control de las enfermedades que afectan la producción animal, uno de los más complejos y persistentes.

La prevalencia sostenida de agentes patógenos de etiología bacteriana, viral, fúngica y parasitaria en los cultivos, ha llevado al sector, a tener que interactuar permanentemente con las enfermedades en su producción. Por otro lado, a medida que se incrementaron las producciones totales por centro, fueron apareciendo nuevos agentes patógenos que se sumaban a aquellos que ya estaban presentes.

No obstante lo previamente indicado, las herramientas terapéuticas de control de los brotes infecciosos, especialmente vinculados a bacterias, han sido escasas y poco diversificadas (ver Tabla N° 1). Es así como la industria salmonicultora nacional dispone solo de 6 sustancias antimicrobianas asociadas a productos farmacéuticos autorizados para su uso.

Desde el uso masivo de eritromicina para enfrentar la Enfermedad Bacteriana del Riñón, BKD, para luego pasar al uso intensivo de oxitetraciclina, flumequina y ácido oxolínico, hoy la industria también dispone del agente antimicrobiano florfenicol, que por sus características, ha sido ampliamente incorporado en el manejo rutinario de control de brotes infecciosos en los centros de cultivo del sector.

Tabla 1. Principios activos asociados a los productos antimicrobianos autorizados para su uso en acuicultura en Chile, según registro del Servicio Agrícola y Ganadero.

Principio activo	Grupo	Características/Observaciones*
Ácido oxolínico	Quinolonas	Mala biodisponibilidad en ambientes marinos.
Amoxicilina	Betalactámicos	Amplio espectro. Problemas para su dosificación en alimento.
Eritromicina	Macrólidos	Recomendado para bacterias Gram positivas. De elección contra BKD y Estreptococosis.
Florfenicol	Fenicoles	Excelente biodisponibilidad, rápida excreción.
Flumequina	Fluoroquinolonas	Menores dosis que otras quinolonas. Mayor facilidad para su administración a través de alimento en fase marina.
Oxitetraciclina	Tetraciclinas	Mala biodisponibilidad en ambientes marinos. No es de elección contra agentes intracelulares.

(*): Revisar antecedentes técnicos asociados a uso en acuicultura en Capítulo V.

Sobre la base del análisis de la información entregada por las empresas productoras de salmones al Servicio Nacional de Pesca, Sernapesca, respecto de los tratamientos antimicrobianos efectuados, para el período 2005-2009, se pueden observar ciertas tendencias (ver Tablas 2 a la 7, y figuras 1 a la 4).

Entre ellas cabe mencionar la sostenida disminución del uso de ácido oxolínico y flumequina en los tratamientos efectuados, especialmente desde el año 2008 a la fecha.

Por otro lado, se ha observado una sostenida dispensación terapéutica de oxitetraciclina y un aumento sostenido en el uso de florfenicol a partir de 2008.

Tabla Nº 2. Producción* (toneladas cosechadas), consumo de antibióticos (en Ton.) y porcentaje relativo de consumo durante el período 2005-2009.

Año	Cosecha (Ton)	Consumo antibióticos (Ton)	% Consumo de antibióticos relativo a la producción
2005	614435	242,36	0,04
2006	647302	341,41	0,05
2007	600862	379,79	0,06
2008	630647	333,98	0,05
2009	474174	183,46	0,04

(*): De acuerdo al Anuario Estadístico de Pesca 2005-2009.

Desde el punto de vista de la especie cultivada, es posible verificar una tendencia al alza en el uso total de antimicrobianos para la especie Salmón del Atlántico *(S. salar*) hasta el año 2007, para luego presentar una disminución marcada por efecto del impacto productivo generado por el virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAv). Por otro lado, para efectos de las especies trucha arcoiris (*O. mykiss*) y Salmón del Pacífico (*O. kisutch*) se observa un uso relativamente sostenido, con su mayor magnitud evidenciada en el año 2008 (ver Tabla 3).

Tabla Nº 3. Consumo de antibióticos (Ton.) en las distintas especies salmonídeas cultivadas en Chile para el periodo 2005-2009.

Especie/Año	2005	2006	2007	2008	2009
S. chinook	0,86	5,12	0,00	0,04	0,86
S. Pacífico	48,27	34,04	44,57	36,31	42,26
T. arcoiris	54,22	84,13	84,55	108,59	80,73
S. Atlántico	138,89	218,13	250,67	189,03	59,57

Por otro lado, con relación al tipo de principio activo utilizado, se ratifica el preferente y marcado uso de dos antimicrobianos, florfenicol y oxitetraciclina, presentando el primero un aumento en su utilización hasta el año 2008, y el segundo, una disminución a lo largo del periodo revisado (ver Tabla 4 y Figura 1).

Es evidente el descenso en la utilización de ácido oxolínico y flumequina, siendo ya el año 2009, casi irrelevante, al igual que el resto de los antimicrobianos autorizados.

Tabla 4. Consumo de antibióticos (Ton.) en la salmonicultura nacional, según principio activo, durante el periodo 2005-2009.

Principio activo	2005	2006	2007	2008	2009
Florfenicol	33,45	102,00	139,98	189,38	113,24
Flumequina	95,78	95,05	72,56	35,50	3,11
Ác. Oxolínico	50,90	38,25	74,77	26,09	2,90
Eritromicina	2,03	1,99	2,10	8,31	1,53
Oxitetraciclina	60,08	103,88	88,56	74,34	62,20
Amoxicilina	0,11	0,24	1,73	0,35	0,47
Sulfa+TMP	0,00	0,00	0,09	0,02	0,01

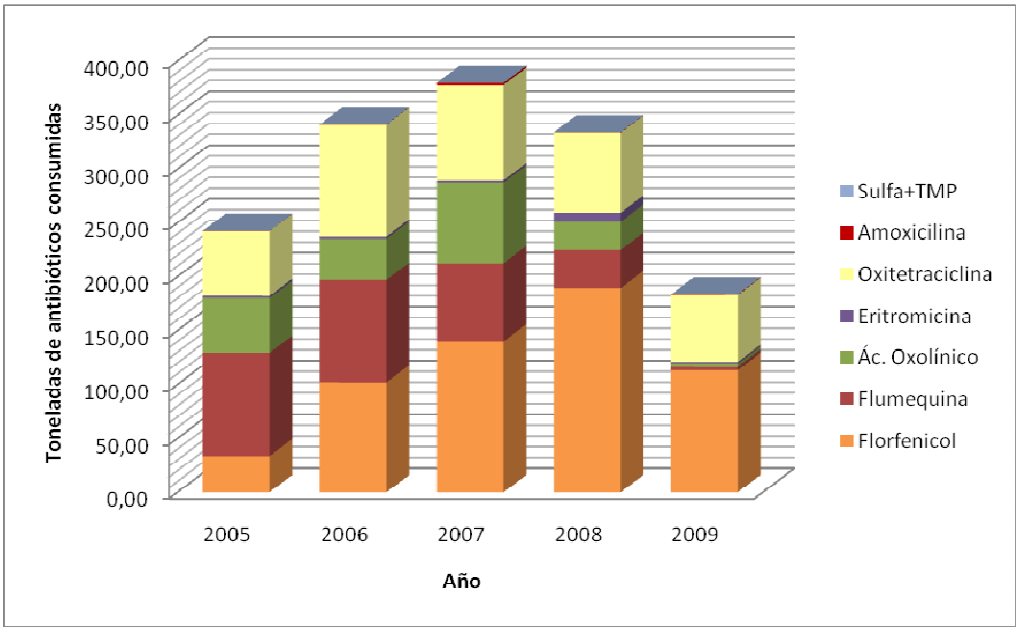


Figura Nº 1. Cantidad de antibióticos utilizados según principio activo, en la salmonicultura nacional durante el periodo 2005-2009.

Por otra parte, si se efectúa un análisis de utilización de antimicrobianos de acuerdo a los diagnósticos informados por los productores a la autoridad, se confirma que la mayor parte de los antimicrobianos entregados a los grupos en producción para combatir enfermedades bacterianas, son para enfrentar brotes de Piscirickettsiosis, siendo ésta muy relevante respecto de las siguientes enfermedades mayormente informadas (Flavobacteriosis/Vibriosis), a lo largo de todo el periodo analizado (ver Tabla 5 y Figura 2).

Tabla 5. Consumo de antibióticos, según diagnóstico bacteriano informado, para todas las especies salmónidas cultivadas, durante el periodo 2005-2009.

Diagnóstico	2005	2006	2007	2008	2009
Piscirickettsiosis	185,62	241,86	256,41	232,09	131,99
Vibriosis	14,75	14,81	27,80	23,30	5,79
Flavobacteriosis	9,45	48,27	30,81	31,90	16,10
BKD	15,05	3,18	9,30	19,42	10,19
Estreptococosis	1,46	0,47	2,76	1,60	2,82
Cuadro mixto	14,38	30,94	38,30	14,21	15,39
Otro	0,22	1,87	11,17	3,24	0,55

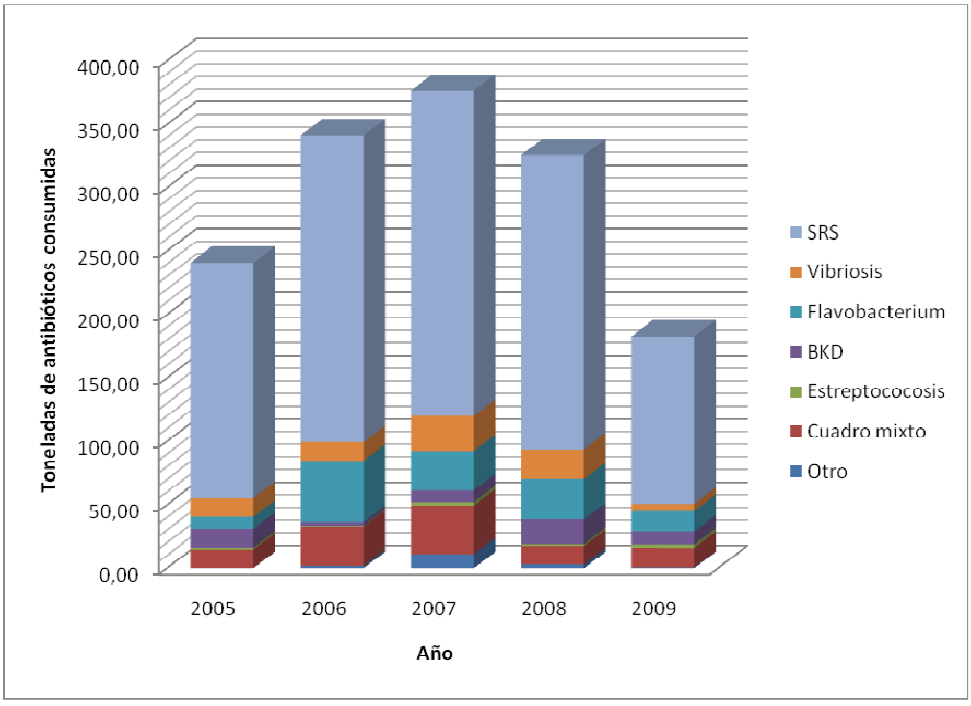


Figura Nº 2. Consumo de antibióticos según diagnóstico bacteriano informado para todas las especies salmónidas cultivadas durante el periodo 2005-2009.

Las tendencias de uso de antimicrobianos según principio activo, se mantienen al realizar un análisis para aquellos centros de producción ubicados en mar o estuario, siendo Florfenicol por mucho, la sustancia mayormente utilizada, seguido de Oxitetraciclina (ver Tabla 6 y Figura 3).

Tabla 6. Cantidad de antibióticos (Ton.), según principio activo, utilizados en los centros de cultivo ubicados en mar y estuario durante el periodo 2005-2009.

Principio activo	2005	2006	2007	2008	2009
Florfenicol	30,25	80,81	133,13	171,26	110,20
Flumequina	94,74	93,59	72,07	34,65	2,93
Ác. Oxolínico	50,90	37,75	74,74	26,06	2,78
Eritromicina	1,63	1,51	0,80	6,99	1,16
Oxitetraciclina	55,73	75,72	72,46	51,24	52,36
Amoxicilina	0,00	0,07	1,40	0,04	0,00
Sulfa+TMP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

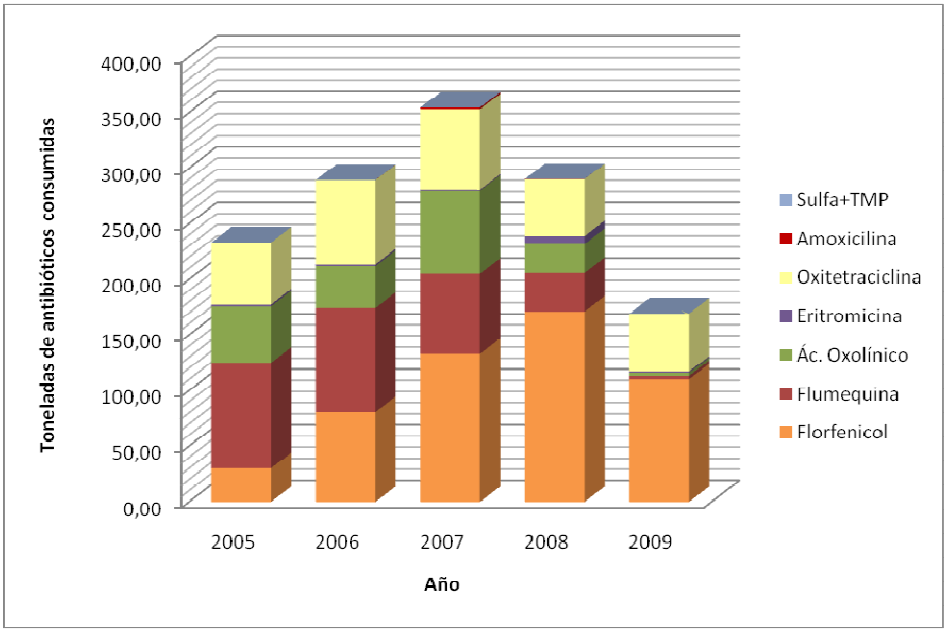


Figura Nº 3. Principios activos utilizados en los centros de cultivo ubicados en mar y estuario durante el periodo 2005-2009.

Al revisar la utilización de estas sustancias en unidades productivas emplazadas en agua dulce, se observa un uso inferior de cantidades absolutas, siendo en este tipo de dependencias, mayor el uso de oxitetraciclina, seguido de florfenicol (ver Tabla 7 y Figura 4).

Tabla 7. Cantidad de antibióticos (Ton.), según principio activo, utilizados en los centros de cultivo ubicados en agua dulce, durante el periodo 2005-2009.

Principio activo	2005	2006	2007	2008	2009
Florfenicol	3,20	21,18	6,85	18,07	3,04
Flumequina	1,04	0,55	0,49	0,53	0,18
Ác. Oxolínico	0,00	0,04	0,03	0,03	0,12
Eritromicina	0,40	0,48	1,30	1,32	0,37
Oxitetraciclina	4,36	28,15	15,80	23,07	9,84
Amoxicilina	0,10	0,17	0,34	0,31	0,47
Sulfa+TMP	0,00	0,00	0,09	0,02	0,01

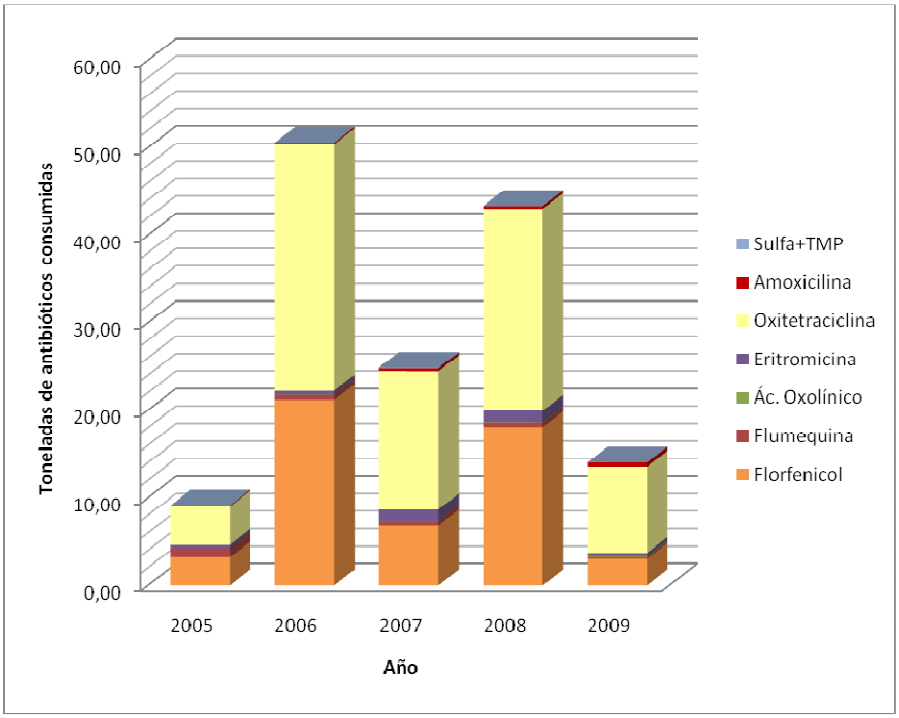


Figura Nº 4. Principios activos utilizados en los centros de cultivo ubicados en agua dulce, durante el periodo 2005-2009.

V. Características y mecanismos de acción de los fármacos administrados a peces

5.1. Generalidades

La elección correcta del tipo de fármaco a utilizar en un tratamiento es vital para lograr alcanzar una efectividad del mismo, más allá de las características propias que pueda presentar el aislado bacteriano al que se está enfrentando.

En la elección del agente antibacteriano no solo debe considerarse la eficacia teórica de la droga sobre un agente en particular, sino además, el asegurarse que el principio activo sea capaz de llegar en una cantidad suficiente al sitio de interés.

Otros aspectos a considerar son las interacciones que pueda tener dicho alimento medicado con el entorno acuático, especialmente marino, y posteriormente, con la flora digestiva del propio pez bajo tratamiento.

En relación a los efectos del agua de mar sobre la composición fisicoquímica del alimento medicado, es conocido el efecto de cationes metálicos bivalentes y trivalentes, los que tienen un gran efecto como complejos químicos, en grupos como las quinolonas, fluoroquinolonas y tetraciclinas, siendo esto de relevancia en una industria donde estos grupos han sido ampliamente utilizados.

Al respecto, se ha propuesto que para la correcta evaluación de susceptibilidad de agentes patógenos marinos de peces, frente a los diversos antimicrobianos utilizados, es un requisito importante utilizar antibiogramas con medios que contengan apropiadas concentraciones de cationes bivalentes.

Cabe mencionar que la mayoría de los agentes antibacterianos utilizados en Chile son de amplio espectro, aunque la mayoría de los agentes patogénicos más prevalentes en el país, son bacterias Gram negativas.

La excepción la generan los agentes *Renibacterium salmoninarum* y *Streptococcus phocae*, ambos Gram positivos, no obstante, el único antibiótico utilizado para este espectro específico es la eritromicina.

5.2. Oxitetraciclina

Perteneciente al grupo de las tetraciclinas, este fármaco presenta una actividad bacteriostática y es de amplio espectro, ejerciendo su acción sobre el proceso de síntesis de proteínas de la bacteria. Aunque por lo general son productos naturales de fermentación, se han desarrollado posteriormente nuevos compuestos semisintéticos asociados a este grupo.

El extensivo uso de este principio activo en la acuicultura se debe principalmente a su disponibilidad en la mayoría de los mercados, además de su bajo costo.

Un aspecto farmacológico importante de indicar es su capacidad como agente quelante, vale decir, su capacidad de generar complejos con cationes bivalentes. El efecto negativo de ello radica en que dichos compuestos presentan una alta capacidad para interactuar con calcio y magnesio en aguas de alta dureza, quedando una importante concentración de éstos, microbiológicamente inertes, y dado que están eléctricamente cargados, no pueden traspasar fácilmente la barrera biológica lipídica de las membranas celulares.

Se ha reportado su uso en las siguientes enfermedades bacterianas de peces:

- Piscirickettsiosis (*P. salmonis*) en salmón del Atlántico, salmón del Pacífico, trucha arcoiris en fase marina.
- Vibriosis de agua fría (*V. salmonicida*) en salmón del Atlántico en fase marina.
- Enfermedad entérica de la Boca Roja (*Y. ruckeri*) en salmón del Atlántico en fase marina.
- Furunculosis (*A. salmonicida*) en salmón del Pacífico en agua dulce.
- Enfermedad columnar (*F. columnaris*) en trucha arcoiris.
- Estreptococosis (*S. phocae*) en trucha arcoiris.

Su uso amplio y sistemático en la acuicultura mundial ha generado reportes de emergencia de resistencia bacteriana en varios países, principalmente asociada a casos de furunculosis. No obstante, en el resto de las enfermedades bacterianas también se han reportado aumentos en la frecuencia de hallazgo de dicho fenómeno.

En todas las especies de peces estudiadas, se ha evidenciado que este antibiótico posee una baja biodisponibilidad, especialmente en peces marinos, que por efecto de la necesidad de osmorregulación, constantemente están incorporando a su tracto digestivo agua salobre generando modificaciones en el medio, con la consecuente formación de quelantes y a su vez, exacerbando todavía más, la ya baja biodisponibilidad de este fármaco.

La sumatoria de los efectos previamente mencionados genera en la práctica empírica, la necesidad de una administración de mayores dosis frente a los pobres resultados terapéuticos observados.

Por su parte, la baja metabolización del fármaco en el pez, implica una alta excreción por vía de fecas y excreciones, con la consecuente liberación al medio generando los efectos ecológicos asociados a su actividad seleccionante de cepas resistentes e inhibiendo diversos procesos mediados por microorganismos que se desarrollan habitualmente en el medio acuático, como es la nitrificación.

Productos y dosis autorizados en el país

De acuerdo al Registro de Medicamentos de Productos veterinarios autorizados para el uso en Acuicultura del Servicio Agrícola y Ganadero, existen 5 productos comerciales disponibles para ser utilizados en la salmonicultura, asociados al principio activo oxitetraciclina. A continuación se entregan sus características y dosis autorizadas (Ver tabla N°8).

Tabla 8. Productos autorizados para uso en acuicultura, con oxitetraciclina como principio activo.

Nº de registro SAG	Nombre Genérico	Nombre Comercial	Forma Farm.	Empresa Fabricante	Importador (Registrante)	Dosis prospecto	Periodo Resguardo
309	Oxitetraxiclina 40%		Polvo	Laboratorio Veterinario Quimagro S.A.	Laboratorio Veterinario Quimagro S.A.	55-83 mg/KgPV/día/10 días	60 días
1380	Oxitetraciclina 80%	Zanil 80%	Polvo	Centrovet Ltda.	Centrovet Ltda.	75 mg/KgPV/día/10 días	600 grados días.
149	Oxitetraciclina 50%	Terrivet 50%	Polvo	Veterquímica S.A.	Veterquímica S.A.	75 mg/KgPV/15 días	600 grados días.
485	Oxitetraciclina 80%	Terrivet 80%	Polvo	Veterquímica S.A.	Veterquímica S.A.	75 mg/KgPV/día/15 días	600 grados días.
1595	Oxitetraciclina 80%		Polvo	Centrovet Ltda.	FAV S.A.	55-82 mg/KgPV/día/10 días	600 grados días.

En otros países, la dosis recomendada es de 75 mg/kg/día, lo que puede ser considerado pertinente para la fase marina. No obstante, ello representa una sobredosificación en el caso de agua dulce (estudios en trucha arcoiris, indican que la concentración tisular en el grupo mantenido en agua de mar, fue un 30% respecto del grupo en agua dulce).

El régimen de dosificación normalmente es de 10 días.

5.3. Florfenicol

Este principio activo, de amplio uso en la acuicultura nacional, corresponde a un análogo sintético de los fenicoles tiamfenicol y cloramfenicol, posee una acción bacteriana de amplio espectro y es de carácter bacteriostático, ejerciendo su acción sobre la síntesis de proteínas bacteriana, al unirse a la subunidad 50S del ribosoma. Entre sus características se destaca una eficiente y rápida distribución tisular a todo nivel y una rápida tasa de excreción, lo que ha generado que sea considerado de elección en la mayoría de las enfermedades bacterianas a nivel nacional.

Si bien se han reportado plásmidos que transmiten un gen de resistencia particular contra este fármaco (*floR*), su configuración fisicoquímica lo hace ser mucha más eficaz contra el fenómeno de resistencia bacteriana respecto de otros fármacos. Se ha descrito una eficacia mayor en bacterias Gram negativas.

Se ha reportado su uso en las siguientes enfermedades bacterianas de peces:

- Piscirickettsiosis (*P. salmonis*) en salmón del Atlántico, salmón del Pacífico, trucha arcoiris en fase marina.

- Furunculosis (*A. salmonicida*) en salmón del Atlántico en agua dulce.
- Síndrome del Alevín (RTFS) en trucha arcoiris en agua dulce.

Productos y dosis autorizados en el país

De acuerdo al Registro de Medicamentos de Productos veterinarios autorizados para el uso en Acuicultura del Servicio Agrícola y Ganadero, existen 5 productos comerciales disponibles para ser utilizados en la salmonicultura, asociados al principio activo florfenicol. Se entregan sus características y dosis del prospecto autorizadas (Ver Tabla N°9).

Tabla 9. Productos autorizados para uso en acuicultura, con florfenicol como principio activo.

Nº de registro SAG	Nombre Genérico	Nombre Comercial	Forma Farm.	Empresa Fabricante	Importador (Registrante)	Dosis prospecto	Periodo Resguardo
1193	Florfenicol 50%	Aquafen	Polvo	Schering Plough Animal Health	Intervet Chile Ltda.	10 mg/KgPV/día/10 días	200 grados días.
1537	Florfenicol 50%	Florfenox 50%	Polvo	Cipla Ltd.	Bayer S.A.	10 mg/KgPV/día/10 días	300 grados días.
1556	Florfenicol 50%	Veterin 50%	Polvo	Centrovet Ltda.	Centrovet Ltda.		300 grados días.
1598	Florfenicol 50%		Polvo	Drag Pharma Chile Invetec S.A.	FAV S.A.	10 mg/KgPV/día/10 días	300 grados días.
1769	Florfenicol 50%	Duflosan 50%	Polvo	Veterquímica S.A.	Veterquímica S.A.	10 mg/KgPV/día/10 días	300 grados días.

5.4. Ácido oxolínico

Perteneciente al grupo de las quinolonas, específicamente, a las denominadas 4-quinolonas, corresponden a sustancias sintéticas de tipo ácidos carboxílicos.

Dentro de sus características, destaca el ser una sustancia desarrollada en Japón, especialmente diseñada para ser utilizada en peces.

Son sustancias anfóteras, por lo que poseen buena solubilidad, incluso en soluciones de sales de sodio y presentan una actividad bactericida.

En general, las quinolonas, forman complejos con cationes bivalentes, particularmente Mg++. Este ión tiene un gran efecto en la eficacia de los tratamientos con ácido oxolínico, especialmente constatado a través de la Concentración Bactericida Mínima (CBM), entendida como la concentración más baja que mata el 99,9% de las bacterias.

La resistencia a este fármaco ocurre principalmente mediada por mutaciones en el cromosoma bacteriano, por lo que no es una transmisión mediada por plásmidos, aunque se han reportado casos de resistencia mediada por genes de resistencia a quinolonas (*qnr*), que pueden estar albergados en plásmidos transferibles. Asimismo, la resistencia cruzada puede expresarse con otras quinolonas de primera generación, pero no con las denominadas fluoroquinolonas (flumequina), cuando la resistencia se encuentra mediada por una mutación en la girasa bacteriana.

Productos y dosis autorizados en el país

De acuerdo al Registro de Medicamentos de Productos veterinarios autorizados para el uso en Acuicultura del Servicio Agrícola y Ganadero, existen 3 productos comerciales disponibles para ser utilizados en la salmonicultura, asociados al principio activo ácido oxolínico. Se entregan sus características y dosis del prospecto autorizadas (Ver Tabla N°10).

Tabla 10. Productos autorizados para uso en acuicultura, con ácido oxolínico como principio activo.

Nº de registro SAG	Nombre Genérico	Nombre Comercial	Forma Farm.	Empresa Fabricante	Importador (Registrante)	Dosis prospecto	Período de Resguardo
441	Acido Oxolínico 80%		Polvo	Centrovet Ltda.	FAV S.A.	20 mg/KgPV/día/10 días	450 grados días.
481	Acido Oxolínico 80%	Bandrol 80%	Polvo	Veterquímica S.A.	Veterquímica S.A.	10 mg/KgPV/día/10 días	450 grados días.
648	Acido Oxolínico 80%	Litoflox 80%	Polvo	Centrovet Ltda.	Centrovet Ltda.	10-30 mg/KgPV/día/10-15 días	450 grados días.

El rango de uso del ácido oxolínico a nivel internacional va entre 25 y 50 mg/kg/día, siendo mucho mayor que lo requerido para peces en agua dulce, con un valor alrededor de los 10 mg/kg/día y por efecto de la formación de los complejos descritos.

5.5. Flumequina

Este principio activo pertenece a las quinolonas de segunda generación, también denominadas fluoroquinolonas, siendo un fármaco de amplio espectro, con especial eficacia sobre bacterias Gram negativas. Este antimicrobiano presenta un radical fluor en la posición 6 del núcleo quinolona.

A nivel mundial, se privilegió su uso por sobre el ácido oxolínico por sus actividad a menores dosis, y consecuente mayor facilidad para su dispensación a través del alimento en la fase marina del cultivo.

Productos y dosis autorizados en el país

De acuerdo al Registro de Medicamentos de Productos veterinarios autorizados para el uso en Acuicultura del Servicio Agrícola y Ganadero, existen 6 productos comerciales disponibles para ser utilizados en la salmonicultura, asociados al principio activo flumequina. Se entregan sus características y dosis del prospecto autorizadas (Ver Tabla N°11).

Tabla 11. Productos autorizados para uso en acuicultura, con flumequina como principio activo.

Nº de registro SAG	Nombre Genérico	Nombre Comercial	Forma Farm.	Empresa Fabricante	Importador (Registrante)	Dosis prospecto	Periodo Resguardo
79	Flumequina 10 %	Flumepren 10%	Polvo	Centrovet Ltda.	Centrovet Ltda.	12-30 mg/KgPV/día/10-15 días	300 grados dias.
442	Flumequina 80%		Polvo	Centrovet Ltda.	FAV S.A.	20 mg/KgPV/día/10 días	300 grados días.
478	Flumequina 80%	Flox-Feed 80%	Polvo	Veterquímica S.A.	Veterquímica S.A.	10 mg/KgPV/día/10 días	300 grados dias
484	Flumequina 50%		Polvo	Centrovet Ltda.	FAV S.A.	12-25 mg/KgPV/día/10-12 días	300 grados días.
645	Flumequina 80%	Flumepren 80	Polvo	Centrovet Ltda.	Centrovet Ltda.	12-30 mg/KgPV/día/10-15 días	300 grados días.
646	Flumequina 50%		Polvo	Centrovet Ltda.	Centrovet Ltda.	12-30 mg/KgPV/día/10-15 días	300 grados días.

A nivel internacional, las dosis recomendadas en agua dulce son de 100 mg/kg/día por 5 a 8 días, produciendo concentraciones antibacterianas en la mayoría de los tejidos, en todo el intervalo entre las dosis, pero con una rápida caída, a las 24 a 48 horas posteriores.

Para el ambiente marino, se recomienda una dosis en un rango de entre 125-200 mg/kg/día.

5.6. Eritromicina

Sustancia perteneciente a la familia de los macrólidos, es utilizada ampliamente por años en acuicultura para combatir enfermedades causadas por agentes Gram positivos, especialmente BKD (Enfermedad Bacteriana del Riñón). Es importante destacar que tiene mejor acción en ambientes alcalinos, siendo más activa en el rango cercano del pH fisiológico de los peces salmónidos.

Se ha reportado su uso en las siguientes enfermedades bacterianas de peces:

- Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD) causada por *Renibacterium salmoninarum*
- Estreptococosis
- Piscirickettsiosis
- Clamidiosis

Productos y dosis autorizados en el país

De acuerdo al Registro de Medicamentos de Productos veterinarios autorizados para el uso en Acuicultura del Servicio Agrícola y Ganadero, existen 3 productos comerciales disponibles para ser utilizados en la salmonicultura, asociados al principio activo eritromicina. Se entregan sus características y dosis del prospecto autorizadas (Ver Tabla N°12).

Tabla 12. Productos autorizados para uso en acuicultura, con eritromicina como principio activo.

Nº de registro SAG	Nombre Genérico	Nombre Comercial	Forma Farmacéutica	Empresa Fabricante	Importador (Registrante)	Dosis prospecto	Periodo Resguardo
616	Eritromicina 80%	Eritrofeed 80%	Polvo	Veterquímica S.A.	Veterquímica S.A.	92,5 mg/KgPV/día/21 días	500 grados días
1402	Eritromicina 50%	Vetromic 50%	Polvo	Centrovet Ltda.	Centrovet Ltda.	75-100 mg/KgPV/día/14-21 días	500 grados días.
1803	Eritromicina 80%	Vetromic 80%, polvo oral	Polvo	Centrovet Ltda.	Centrovet Ltda.	75-100 mg/KgPV/día/14-21 días	500 grados dias

A nivel internacional, las dosis recomendadas son de 100 mg/kg/día por 21 días, y en ocasiones por 14 días, con intervalos para retomar por 7 días más.

5.7. Amoxicilina

Este antibiótico forma parte del grupo de los beta lactámicos, como todas las penicilinas, siendo una sustancia antibacteriana de amplio espectro, pero que no tiene buena capacidad para atravesar las membranas celulares, por lo que no tiene utilidad para tratar patógenos intracelulares.

En el alimento este principio activo tiene problemas para ser mezclado por su característica de ser higroscópica, por lo que bajo condiciones de cultivo reales, no forma una mezcla homogénea. Los procesos de mezclado térmicos pueden destruir la molécula, que es lábil al calor. En caso de ser impregnado externamente al *pellet*, puede haber pérdidas por fotodescomposición cercanas al 20% del principio activo.

Se recomienda su uso en las siguientes enfermedades:

- Furunculosis (*A. salmonicida*) en salmónidos.
- Estreptococosis en trucha arcoiris.

Productos y dosis autorizados en el país

De acuerdo al Registro de Medicamentos de Productos veterinarios autorizados para el uso en Acuicultura del Servicio Agrícola y Ganadero, existe sólo un producto comercial disponible para ser utilizado en la salmonicultura, asociado al principio activo amoxicilina. Se entregan sus características y dosis del prospecto autorizadas (Ver tabla N°13).

Tabla 13. Productos autorizados para uso en acuicultura, con amoxicilina como principio activo.

Nº de registro SAG	Nombre Genérico	Nombre Comercial	Forma Farm.	Empresa Fabricante	Importador (Registrante)	Dosis prospecto	Periodo Resguardo
121	Amoxicilina 50%	Amox-Feed 50%	Polvo	Veterquímica S.A.	Veterquímica S.A.	80 mg/KgPV/día/10 días	300 grados días.

Internacionalmente se recomiendan dosis de 40 a 80 mg/kg/día por 10 días, generalmente distribuidas en 2 dosis diarias con la alimentación, por efecto de su rápida excreción.

5.8. Otros principios activos de interés

Si bien los siguientes fármacos no están autorizados para su uso en acuicultura en Chile, se ha efectuado una revisión de los mismas dadas sus interesantes características, y ante una eventual aprobación para su utilización a futuro en la industria nacional.

Furazolidona

La furazolidona pertenece a una familia de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro denominados nitrofuranos, y junto con presentar actividad tanto sobre bacterias Gram positivas como Gram negativas, tiene acción sobre algunos organismos parásitos protozoarios. Normalmente son bacteriostáticos, pero en mayores dosis pueden ser bactericidas.

Respecto de su resistencia a antimicrobianos, no posee resistencia cruzada conocida con otros grupos de sustancias, pero si con otras de su mismo origen (ej.: nifurpirinol).

Ha sido probada exitosamente en dosis de 25-35 mg/kg/día por 20 días, en trucha arcoiris (con una tasa de medicación para la especie de 4,2 g por kg de alimento).

Sulfonamidas potenciadas

Las sulfonamidas potenciadas son una combinación de dos drogas antibacterianas, una sulfonamida y una pirimidina como potenciadora. Esta combinación es sinérgica, dado que la potencia antibacteriana de esta combinación es mucho mayor que la suma de la potencia de cada principio activo por separado.

Su mecanismo de acción es la inhibición de dos etapas sucesivas en la vía de síntesis del ácido fólico en las bacterias, por lo que se define como un antimetabolito.

Esta combinación genera que la presentación de resistencia bacteriana se vea retrasada respecto de otras drogas, por efecto de que debe haber una doble inactivación del mecanismo de acción de la droga de parte de la bacteria.

Algunas de las combinaciones más comúnmente utilizadas en veterinaria para tratamientos antibióticos son el trimetoprim con sulfadoxina (cotrimoxina), y el trimetoprim con sulfadiazina (cotrimazina), esta última, con pruebas exitosas de eficacia contra infecciones bacterianas en peces (furunculosis).

Las sulfonamidas potenciadas son eficaces contra una gran gama de infecciones bacterianas. Se ha reportado su eficacia en cuadros en peces para los siguientes patógenos: *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum, Vibrio salmonicida, Pasteurella piscicida, Yersinia ruckeri, Edwardsiella ictaluri y Edwardsiella tarda*. Sin embargo, han evidenciado malos resultados frente a agentes del género *Streptococcus* y ninguna actividad frente a *Pseudomonas* spp.

Las dosis recomendadas para cotrimazina (trimetoprim:sulfadiazina = 1:5), es de 30 mg/kg de principio activo, por 7-10 días.

VI. Mecanismos determinantes de resistencia bacteriana

La resistencia, como cualquier otra característica fenotípica, está determinada por el genoma bacteriano, y que puede producirse como consecuencia de mutaciones o por adquisición de nuevo material genético.

Dado que el fenómeno de multiresistencia a varios antibióticos no se plantea como un fenómeno derivado de la mutación del cromosoma bacteriano, sino más bien por la adquisición de nuevos genes que codifican para la resistencia de una variedad de mecanismos. Por ello, el estudio de la resistencia, en particular para las bacterias Gram-negativas, ha tenido un impacto sustancial en la comprensión de los genomas bacterianos y la forma en que evolucionan.

Las bacterias resistentes pueden transferir la resistencia a otras bacterias (incluso a las bacterias de diferentes géneros) que nunca han sido expuestos a antibióticos, fenómeno denominado como transferencia horizontal de genes.

La transferencia de la resistencia se produce a través del intercambio de una parte del ADN bacteriano (plásmidos) o porciones de su cromosoma que contienen los genes que codifican para la resistencia.

El nuevo material genético puede ser adquirido por tres mecanismos diferentes:

• Conjugación:

Este proceso se basa en el contacto físico entre las cepas dadora y receptora, lo que ocurre principalmente mediado por la acción del pili o F+, que posee la cepa dadora. Esto puede ocurrir entre miembros de una misma especie o entre bacterias de diferentes especies o familias. Por lo general, a través de este mecanismo se transfieren plásmidos que portan genes de resistencia a agentes antibacterianos y configuran el medio de transferencia más importante para la diseminación de la resistencia antibacteriana en el medio acuático.

La difusión de los genes que codifican la resistencia a los antibióticos se ve facilitada por elementos genéticos móviles llamados transposones, que pueden moverse a partir de plásmidos hacia el cromosoma bacteriano y en sentido inverso.

• Transformación:

Este mecanismo de adquisición de nuevo material genético, corresponde a la incorporación de ADN “desnudo” desde el ambiente externo.

• Transducción:

Este mecanismo se basa en que los determinantes de resistencia pueden ser adquiridos a partir de un bacteriófago que infectó previamente a una cepa que portaba estos genes de resistencia.

- **Otros mecanismos**

Los integrones son sistemas únicos muy eficientes para la captura y diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos, y ellos actúan como receptores de *cassettes* de resistencia a antimicrobianos. Estos genes puedes ser insertados tanto en el cromosoma como en los plásmidos mediante una recombinación sitio específica. Es así que se han descrito más de 50 cassettes identificados con genes que confieren resistencia a beta lactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, etc.

Estas unidades pueden contener solo un gen de resistencia a los antibióticos, y una familia de elementos receptores, integrones, que proporcionan tanto el sitio en el que se integran los "cassettes", como la enzima responsable de los movimientos del gen (integrasa). Esta enzima puede mover estos "cassettes" de resistencia dentro y fuera del integrón, de tal modo que aumenta substancialmente la movilidad horizontal de la resistencia a los antibióticos, adaptándola a los cambios en el medio ambiente (SANCO, 2002a).

Estos mecanismos previamente descritos pueden ocurrir en el tracto gastrointestinal de los animales, que no sólo sirve como el principal reservorio y sitio importante de la propagación de bacterias, sino también como un lugar para el intercambio de información genética (Wegener et al., 1999).

La diseminación de la resistencia a antimicrobianos, es consecuencia tanto del resultado de la diseminación de genes de resistencia, como de la propagación de las bacterias resistentes.

Hay dos factores principales que deben tenerse en cuenta en la transferencia de resistencia bacteriana: los antimicrobianos como agentes selectivos en un ambiente particular, y los genes de resistencia como vehículos de dicha resistencia. Estos dos elementos forman la ecuación de la resistencia bacteriana.

Los parámetros que afectan el equilibrio de dicha ecuación determinarán la presencia o ausencia de resistencia en el mediano y largo plazo. Si estos dos elementos se mantienen bajo control, la presencia de organismos resistentes a los antimicrobianos no necesariamente constituirá un problema sanitario en la salmonicultura.

En contraposición, si estos elementos no son controlados, el fenotipo resistente será seleccionado y multiplicado y en el medio ambiente se incrementará significativamente el nivel de microbiota resistente.

Las variables que afectan el lado de la ecuación de los antimicrobianos son la concentración de estos, el número de individuos en los que se utilizan y la extensión geográfica de influencia.

La alteración de la dinámica entre ellos puede alterar la ecología microbiana natural, por la presión selectiva sobre las cepas de bacterias susceptibles a un determinado antibiótico.

En la parte de la ecuación asociada a la genética, es el gen de resistencia y sus factores los que influyen en su transmisión.

Dado que estos elementos están continuamente interactuando en un contexto de intercambio continuo con microorganismos entre humanos y animales, la resistencia puede convertirse en un problema de salud pública.

Otra estrategia de los microorganismos para protegerse de la acción antimicrobiana es la formación de biopelículas, las que se forman en las capas en que se adhieren a diferentes superficies y que pueden protegerlas de la acción de varios antimicrobianos, así como de la actividad fagocitaria de los macrófagos del hospedador.

Algunos investigadores habían atribuido esta resistencia a la incapacidad de la droga para difundir en la capa de la película, no obstante, Zelver (2000) atribuyó la resistencia a la heterogeneidad fisiológica dentro de una biopelícula, que determinaba áreas de esta en que estos antimicrobianos no penetraban para ejercer su acción,. Por otra parte, Sauer *et al*.,(2001) descubrieron que las bacterias utilizan un estrategia de resistencia diferente, en que las células en el centro de la biopelícula eran menos susceptibles que los que crecen en el exterior por efecto de la disminución de oxígeno, lo que les impulsó a reducir el crecimiento, haciéndolas menos vulnerables a estos agentes. Esto implicaría que los antibióticos convencionales que destruyen las células en las capas externas de la biopelícula pueden no actuar sobre las células presentes en las capas internas, aun cuando lleguen a estas.

Por lo general, las biopelículas bacterianas formadas en los componentes de los sistemas de acuicultura incorporan a estos sistemas la microbiota presente en el agua. Microorganismos patógenos se encuentran en estos biopelículas que causan la exposición recurrente a la enfermedad y la presencia de portadores asintomáticos.

En un estudio llevado a cabo recientemente en los ambientes de la acuicultura, se han identificado algunas bacterias patógenas: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio* sp., *Yersinia* sp. y *Bacillus cereus*. Algunos de los microorganismos aislados son patógenos para los animales y los seres humanos, y pueden ser importantes en los alimentos elaborados. No está claro si la presencia de estos microorganismos en los biopelículas podría dar lugar a enfermedades transmitidas por alimentos, pero el potencial existe (King, 2000).

A continuación se describen los principales mecanismos de generación de pérdida de susceptibilidad a antimicrobianos, agrupados por cada tipo de agente terapéutico.

Oxitetraciclina

El grupo de las tetraciclinas, que considera a la propia tetraciclina, la doxiciclina, la minociclina, y la oxitetraciclina, entre otros, son antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano, a través de la detención de la síntesis de proteínas en éstas.

Ellas han sido ampliamente utilizadas en los últimos cuarenta años como agentes terapéuticos en medicina humana y veterinaria, así como promotores del crecimiento en producción animal. Asociado a ello, es que la consecuente surgencia de resistencia bacteriana a los antibióticos, ha generado limitantes a su utilización masiva y eficaz.

Se han identificado tres diferentes mecanismos específicos de resistencia a las tetraciclinas: el eflujo de tetraciclina, la protección del ribosoma y la modificación de la molécula de tetraciclina.

El eflujo de tetraciclina se logra a través de una proteína de exportación de la superfamilia de facilitadores principales (major facilitator superfamily - MFS). La proteína de exportación funciona como un sistema de antitransporte electroneutro que cataliza el intercambio del complejo tetraciclina-metal-catión bivalente por un protón. En bacterias Gram-negativas la exportación de proteínas contiene 12 TMS (fragmentos transmembrana), mientras que en las bacterias Gram-positivas muestra 14 TMS.

Por su parte, el mecanismo de protección ribosomal está mediado por una proteína soluble homologa con las GTPasas, que participan en la síntesis de proteínas, denominadas EF-Tu y EF-G.

El tercer mecanismo consiste en una proteína citoplasmática que modifica químicamente la tetraciclina. Esta reacción tiene lugar sólo en presencia de oxígeno y NADPH, y no funciona en el hospedador natural, que corresponde a una especie bacteriana anaerobia estricta, *Bacteroides* spp.

Los dos primeros mecanismos son los más extendidos y la mayoría de sus genes se adquieren a través de plásmidios transferibles y/o transposones. Estos dos mecanismos se observaron tanto en bacterias aeróbicas como anaeróbicas Gram-negativas o Gram-positivas, lo que demuestra su amplia distribución entre las bacterias.

Se han secuenciado más de sesenta genes de resistencia a las tetraciclinas, y se han identificado treinta y dos clases de genes tanto en especies productoras de agentes antimicrobianos (*Streptomyces spp.*), como no productoras.

Cada nueva clase se ha identificado por su incapacidad para hibridar con cualquiera de los genes *tet* conocidos bajo condiciones muy específicas (Levy *et al.* 1989). Los más frecuentes son los genes *tetA* de clase A (RP1, RP4 o derivados de Tn*1721*), *tetB* (derivados de Tn*10*), y *tetC* (pSC101 o derivados de pBR322), codificando un sistema de eflujo de tetraciclinas.

Estos genes son regulados por una proteína represora (TetR). Esta característica también ha sido utilizada para construir sistemas de expresión en mamíferos de alto nivel, mediante el uso de los elementos reguladores del operón Tn10 de tetraciclina (sistemas de expresión Tet-Off® y Tet-On® y variedades de células, Clontech®).

El gen *tetM* del transposón Tn916 que puede expresarse tanto en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, es también de uso frecuente. Varios vectores de transporte *Bacteroides*/*Escherichia* contienen el gen *tetQ*. Así, el *tetM* y el *tetQ* codifican una proteína soluble protegiendo a los ribosomas de los efectos de inhibición de la tetraciclina.

Florfenicol

La resistencia a florfenicol ha sido detectada en una alta diversidad bacteriana, que exhiben una variada gama de mecanismos de resistencia, habiendo sido descubiertos mediante el análisis de microorganismos que presentaban resistencia fenotípica a florfenicol o elevados valores de CMI. La mayoría de los mecanismos de resistencia a este antimicrobiano está mediada por el eflujo de la droga, ya sea por exportadores específicos o inespecíficos (Schwarz *et al*., 2004).

Un variado número de genes de resistencia asociados con la exportación del florfenicol ha sido descrito en una gran cantidad de especies bacterianas, siendo en su gran mayoría genes móviles que codifican para proteínas de eflujo específicas (Butaye *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2004). Es así que al menos 8 grupos diferentes de exportadores de fenicoles se han descrito, aunque solo 2 de ellos presentarían una actividad frente a cloramfenicol y florfenicol en forma simultánea, detectándose la participación de los genes *floR*, *pp-flo*, *cmlA* y *fexA*. Además, muy recientemente se ha descubierto otro gen, *pexA*, que codifica para una disminución en la susceptibilidad a cloramfenicol y florfenicol mediante la expresión de una bomba de eflujo (Lang *et al.*, 2010).

Es así que se ha observado que en ausencia de los genes *floR* o *cmlA*, existen cepas bacterianas que exhiben altos niveles de resistencia a florfenicol (> 256 µg/ml), sugiriendo que el florfenicol pudiera ser sustrato de la acción de transportadores multidroga, como los sistemas de eflujo AcrAB o AcrAB-TolC (Ghisalberti *et al.*, 2005).

El ribosoma bacteriano es el sitio de la síntesis proteica y el sitio blanco de una gran diversidad de agentes antimicrobianos. Los antimicrobianos actúan sobre importantes centros funcionales del ribosoma y frecuentemente se unen al rRNA. Recientemente, se pudo detectar un nuevo fenotipo de resistencia a fenicoles causado por una RNA metiltransferasa denominada Cfr (Kehrenberg *et al*., 2005; Long *et al*., 2006). Se ha descrito que Cfr adiciona un grupo metilo adicional en la posición A2503 del rRNA 23S. La metilación en la posición A2503 del rRNA 23S mediada por Cfr confiere resistencia a cloramfenicol y florfenicol (fenicoles) al interferir con el posicionamiento de estas drogas y también puede afectar la unión de otras drogas al centro peptidil transferasa del ribosoma (Long *et al*,. 2006).

Es muy importante resaltar que muchos determinantes de resistencia a florfenicol residen en elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones e integrones, los que frecuentemente se encuentran asociados a otros genes de resistencia, como tetraciclinas, por lo que la coselección y persistencia de genes de resistencia a esta droga pueden ocurrir incluso cuando no existe una presión selectiva directa impuesta por el uso de este agente antimicrobiano.

Quinolonas

La adquisición de resistencia a quinolonas está preferentemente asociada a mutaciones cromosomales, aunque también se ha descrito resistencia mediada por plásmidos. Las mutaciones cromosómicas pueden ser distribuidas en 2 grupos: (1) Mutaciones en los genes de las topoisomerasas (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*), y (2) Mutaciones que causan una reducción en la acumulación de la droga, ya sea por una disminución en la asimilación o por un aumento en el eflujo.

Se ha observado que mutaciones en zonas del gen *gyrA*, que codifica para la subunidad A de la DNA-girasa, situadas cerca de la zona donde la DNA girasa se une al DNA están claramente asociadas a la aparición de un fenotipo de resistencia a quinolonas. En contraposición, se ha descrito que mutaciones en los genes *gyrB* y *parE*, genes que codifican para la subunidad B de la DNA-girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente; no son importantes en la adquisición de resistencia a quinolonas en *Escherichia coli*.

También se ha observado que mutaciones en GyrA y/o ParC están asociadas a diferencias en la acumulación de esta droga, ya sea por una disminución en la permeabilidad de la membrana externa o un incremento en el eflujo del antimicrobiano fuera de la célula.

Además de las alteraciones en la DNA girasa y topoisomerasa IV, pueden ocurrir mutaciones en las proteínas de las membranas interna y externa de la bacteria. Las quinolonas deben pasar a través de las membranas celulares para acceder a sus blancos. Es así que la expresión alterada de los canales de la membrana celular externa (porinas) puede limitar la habilidad de estos agentes para permear las membranas de bacterias Gram-negativas.

Otros mecanismos de resistencia involucran el desarrollo y expresión de bombas de eflujo que transportan las quinolonas y otros antibióticos fuera de la célula. Una combinación de falta de permeabilidad intrínseca, alteraciones en la expresión de porinas, y mecanismos de eflujo están frecuentemente asociados a la resistencia de estos fármacos.

En relación a una resistencia a quinolonas mediada por plásmidos se ha descrito la ocurrencia del gen *qnr*, que codifica para una proteína que protege a la DNA girasa de la acción de las quinolonas (Rodríguez-Martínez, 2005).

Eritromicina

La modificación ribosomal mediante la metilación fue el primer mecanismo de resistencia a eritromicina descubierto. Ocurre en forma secundaria a la adquisición del gen *erm* (erythromycin ribosome methylase) usualmente ubicado en elementos de tipo transposón. Este gen codifica para una metilasa ribosomal, la que dimetila al rRNA 23S en un sitio único. Esta modificación reduce marcadamente la afinidad de la eritromicina por su blanco, probablemente mediante la prevención del acceso directo al blanco o por la modificación de la conformación del sitio de unión (Leclercq & Courvalin, 2002).

Por otra parte, bombas fisiológicas que confieren resistencia a eritromicina por eflujo han sido descritas para varios microorganismos Gram-positivos. Tal es el caso del gen responsable del efujo en *Streptococcus pneumoniae*, que se denomina gen *mef(A).*La bomba Mef(A) parece ser específica para eritromicina y sus derivados, incluyendo la azitromicina. Se ha observado que la resistencia es inducida con eritromicina y se expresa a niveles moderados (Leclercq & Courvalin, 2002).

Amoxicilina

Por lo general, la producción de enzimas de tipo β lactamasas es la principal estrategia de defensa contra los antibacterianos β lactámicos, como es el caso de la amoxicilina, especialmente en microorganismos Gram-negativos. En el caso de bacterias Gram-positivas, la alteración de las proteínas de unión a penicilinas (PBP) también contribuye significativamente a la resistencia a este grupo de drogas. Las β lactamasas se agrupan de acuerdo a su función o su estructura y a la fecha se conocen cientos de estas enzimas. Otras formas de resistencia a este grupo de antibacterianos son la disminución de la penetración hacia el sitio blanco y la modificación del blanco de la droga.

Las β lactamasas rompen el anillo β lactámico, eliminando las propiedades antibacterianas de la droga. En la actualidad se ha evidenciado una gran amenaza con la aparición de las β lactamasas de espectro extendido capaces de hidrolizar el anillo β lactámico de cefalosporinas de tercera generación, y que en muchas ocasiones han sido detectadas asociadas a plásmidos conjugativos.

VII. Situación de la resistencia bacteriana en la industria salmonicultora nacional

A través del trabajo desarrollado por el Instituto de Fomento Pesquero, en conjunto con la Universidad Católica del Norte desde el año 2007, se han logrado establecer una serie de investigaciones en el campo de la evaluación y seguimiento del fenómeno de la resistencia bacteriana a antimicrobianos presente en diversas especies bacterianas patógenas presentes en la salmonicultura nacional.

A continuación se hace una revisión de la situación actual del fenómeno de resistencia bacteriana, sobre la base de las campañas de muestreo realizadas, el aislamiento de los agentes patógenos y la determinación de su susceptibilidad a agentes antimicrobianos.

7.1. Campañas de muestreo y aislamientos

A través de la ejecución de campañas de muestreo georreferenciado en centros de cultivos de salmones localizados en mar y agua dulce, presentes en las regiones de Los Lagos y Aysén, se recolectaron muestras de 228 centros de cultivo localizados en ambas regiones. Para el caso de los centros de mar, corresponden a 24 de las 35 Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS) existentes.

De los 228 centros muestreados, 74 pertenecen a las ACS de la Región de Los Lagos. Las ACS muestreados en esta región fueron 12. En la misma región y correspondiente a los centros de Agua Dulce, los centros muestreados fueron 13, de los cuales 6 corresponden a centros emplazados en lago (centros de lago) y 7 a centros emplazados en tierra (pisciculturas). Para la región de Aysén, los muestreos se realizaron en 35 centros de cultivo los cuales están repartidos en 12 ACS.

Del total de centros muestreados (228) un 20,16% corresponde a la especie *Salmo salar* (Salmón del Atlántico), un 59,65% de *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoiris) y un 20.18% de *Oncorhynchus kisutch* (Salmón coho).

El estudio consideró el aislamiento de las siguientes especies patógenas, dada su importancia económica y su prevalencia en la industria salmonicultora nacional: *Flavobacterium psychrophilum, Piscirickettsia salmonis, Vibrio ordalii, Streptococcus phocae, Aeromonas salmonicida y Yersinia ruckeri.*

La totalidad de las cepas patogénicas obtenidas mediante su aislamiento desde las muestras recolectadas durante las campañas de muestreo se complementó con la adquisición de aislamientos realizados mediante la ejecución de servicios rutinarios en varios laboratorios de diagnóstico ictiopatológico que analizan muestras provenientes de ambas regiones, lográndose en definitiva un cepario compuesto por un total de 272 aislados de las especies patógenas bajo estudio.

Del total de aislados, una alta proporción de éstos corresponden a *Piscirickettsia salmonis y Flavobacterium psychrophilum,* los que en su conjunto alcanzaron cerca del 85,6% del total de cepas obtenidas. Esto demuestra que en la actualidad, *P. salmonis* y *F. psychrophilum* siguen correspondiendo a los patógenos bacterianos más prevalentes en los peces de cultivo, generando las mayores pérdidas en la producción, hecho que justifica a su vez, el mayor número de aislados adquiridos a partir de los servicios rutinarios de laboratorios.

7.2. Resultados generales de la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana

En relación a los resultados de la determinación de resistencia antimicrobiana de las cepas de patógenos de interés aisladas en la Región de Los Lagos y Aysén, de las 272 cepas aisladas, la totalidad se encuentran evaluadas en lo que respecta a su perfil de resistencia. De éstas, 155 (57%) corresponden a *Flavobacterium psychrophilum;* 79 (29%) a *Piscirickettsia salmonis*; 12 (4,4%) a *Vibrio ordalii;* 13 (4,8%) a *Streptococcus phocae;* 7 (2,6%) a *Yersinia ruckeri* y 6 (2,2%) a *Aeromonas salmonicida* (ver Figura 5).

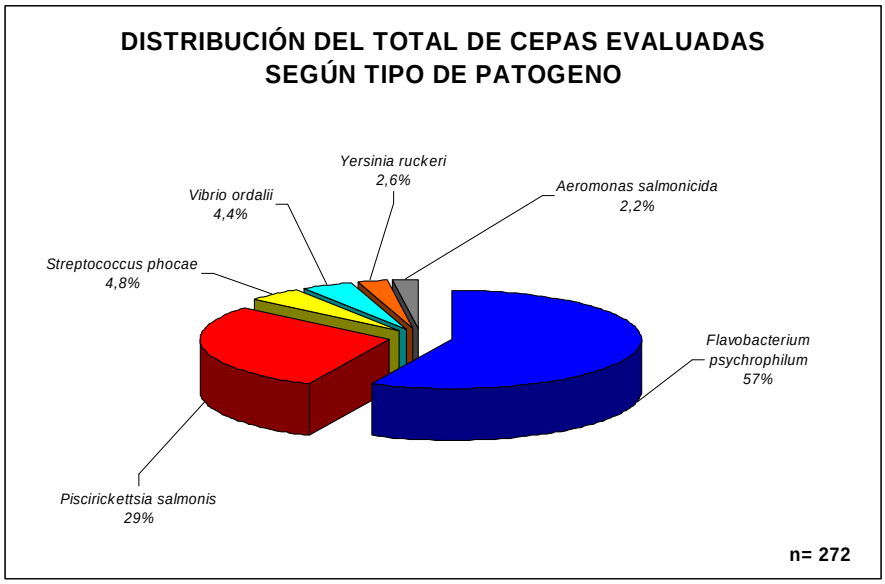


Figura 5. Distribución porcentual del total de 272 cepas patogénicas consideradas para la determinación de los perfiles de resistencia según patógeno de interés, obtenidas desde centros de cultivo de agua dulce y agua de mar en la Región de Los Lagos y Aysén.

Los agentes bacterianos aislados, fueron evaluados respecto de su susceptibilidad frente a los antimicrobianos oxitetraciclina, florfenicol, ácido oxolínico y flumequina.

Los resultados presentados, corresponden a evaluaciones efectuadas con la técnica de difusión en placa o antibiograma (ver Tablas 14 a la 17).

7.3.1. Resultados de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Flavobacterium psychrophilum*

En lo que respecta a *F. psychrophilum*, de la totalidad de los aislados obtenidos y analizados (n= 155), el 96,1% presenta sensibilidad a florfenicol, el 94,8% presenta sensibilidad a amoxicilina, el 85,9% presenta sensibilidad a oxitetraciclina, el 83,9% presenta sensibilidad a flumequina y el 66,03% es sensible a acido oxolínico.

Un 33,9% de las cepas exhibió resistencia a ácido oxolínico, un 13,5% presentó resistencia a la flumequina, un 7,0% presentó resistencia a oxitetraciclina y un 3,9% presentó resistencia a florfenicol. Para éste último antibiótico (florfenicol), es relevante hacer mención de la presencia de 6 cepas resistentes aisladas el año 2010 desde centros de cultivo de agua dulce de la Región de Los Lagos situados en la Isla de Chiloé (2), el Lago Llanquihue (2) y en la localidad de Puerto Montt y alrededores (2);

considerando que en la actualidad, es uno de los antibióticos más utilizados en la acuicultura.

Tabla 14. Resultados (%) de evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos para *F. psychrophilum* (n= 155).

Antimicrobiano	Resistente	Intermedia	Susceptible	Total
Florfenicol	3,87	0	96,13	100
Oxitetraciclina	7,1	7,1	85,81	100
Flumequina	13,55	2,58	83,87	100
Acido Oxolínico	34,19	0	65,81	100
Amoxicilina	1,94	3,23	94,84	100

7.3.2. Resultados de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Piscirickettsia salmonis.*

En lo que respecta a *P. salmonis*, de la totalidad de cepas obtenidas y evaluadas (n= 79), el 98,7% presenta sensibilidad a florfenicol, el 92,4% de las cepas presentan sensibilidad a amoxicilina, el 91,1% presenta sensibilidad a flumequina, el 82,2% presenta sensibilidad a acido oxolínico y el 75,9% presenta sensibilidad a Oxitetraciclina.

Un 17,7% presentó resistencia a acido oxolínico y un 5% presentaron resistencia a flumequina.

Es importante señalar la presencia de cepas con sensibilidad intermedia para los antibióticos Oxitetraciclina (n= 19; 24,1%) las que se distribuyen durante el período 2008 - 2010 en la mayoría de las agrupaciones de concesiones salmoneras, y para el antibiótico florfenicol (n= 1; 1,3%) el año 2009.

Uno de los resultados más relevantes, es que en la mayoría de las ACS señaladas con anterioridad, el 98,7% de los aislados de *P. salmonis* analizados fueron sensibles a florfenicol, siendo éste fármaco el principal tratamiento de elección frente a un cuadro clínico de Piscirickettsiosis, seguido del ácido oxolínico, otro importante antibiótico utilizado para el control de *P. salmonis,* pero que en este último tiempo debido a diversas restricciones, ha tendido a ser menos utilizado.

Tabla 15. Resultados (%) de evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos para *P. salmonis* (n= 79).

Antimicrobiano	Resistente	Intermedia	Susceptible	Total
Florfenicol	0	1,27	98,73	100
Oxitetraciclina	0	24,05	75,95	100
Flumequina	5,06	3,80	91,14	100
Acido Oxolínico	17,72	0	82,28	100
Amoxicilina	7,59	0	92,41	100

7.3.3. Resultados de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Vibrio ordalii.*

En el caso de *V. ordalii*, de la totalidad de los aislados del patógeno obtenidos y analizados (n= 12), el 100% presentó sensibilidad al ácido oxolínico, seguido de la flumequina y oxitetraciclina que presentaron un 91,7% de cepas sensibles, el florfenicol que presentó un 83,3% de cepas sensibles y finalmente amoxicilina que presentó un 75% cepas sensibles.

En lo que respecta a flumequina y oxitetraciclina, un 8,3% de las cepas presentaron sensibilidad intermedia para cada antibiótico.

En lo que respecta presencia de resistencia, solo en la amoxicilina y el florfenicol se observa la presencia de cepas del patógeno, resistentes a dichos antibióticos, con un 25 y 8,3% del total de cepas de *V. ordalii* analizadas, respectivamente.

Tabla 16. Resultados (%) de evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos para *V. ordalii* (n= 12).

Antimicrobiano	Resistente	Intermedia	Susceptible	Total
Florfenicol	8,33	8,33	83,33	100
Oxitetraciclina	0	8,33	91,67	100
Flumequina	0	8,33	91,67	100
Acido Oxolínico	0	0	100	100
Amoxicilina	25	0	75	100

7.3.4. Resultados de susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Streptococcus phocae.*

Para *S. phocae,* de la totalidad de cepas del patógeno obtenidas y analizadas (n= 13), el 100% de ellas presentó tanto sensibilidad a los antibióticos amoxicilina y eritromicina, como resistencia a acido oxolínico y flumequina. Para el caso del florfenicol, se presentó solo 1 aislado con sensibilidad intermedia.

La situación más compleja se presenta en el antibiótico oxitetraciclina, utilizado actualmente en acuicultura, donde del total de cepas del patógeno obtenidas, 7 cepas presentan sensibilidad intermedia. Por su parte, se presenta 1 cepa del patógeno que presenta resistencia a oxitetraciclina.

Para el resto de los agentes bacterianos, dado su baja representatividad, no se consideró pertinente hacer evaluaciones del estado de situación ni evolución del fenómeno.

Tabla 17. Resultados (%) de evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos para *S. phocae* (n= 13).

Antimicrobiano	Resistente	Intermedia	Susceptible	Total
Florfenicol	0	15,38	84,62	100
Oxitetraciclina	7,69	53,85	38,46	100
Flumequina	100	0	0	100
Acido Oxolínico	100	0	0	100
Amoxicilina	0	0	100	100

VIII. Técnicas de evaluación de la susceptibilidad bacteriana

La práctica médica humana y veterinaria ha utilizado hace mucho tiempo las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (o AST para su sigla en inglés), para los agentes patógenos bacterianos aislados desde cuadros clínicos, y que han debido enfrentar en la práctica profesional de rutina.

Las AST se comenzaron a utilizar a nivel mundial después de la introducción de la terapia antimicrobiana, impulsado por la necesidad de identificar a los antimicrobianos apropiados para cada uso clínico.

La necesidad de la reproducibilidad de los métodos de laboratorio se hizo necesaria para garantizar que los datos generados fuesen precisos y comparables. Ello requiere que los laboratorios adopten medidas de control de calidad y metodologías comunes para asegurar confianza y reproducibilidad de los resultados de susceptibilidad.

La prueba *in vitro* de AST se realiza para predecir cómo un patógeno bacteriano responderá *in vivo* al agente antimicrobiano. Una "cepa resistente", implica que la bacteria patógena no podrá ser controlada durante un tratamiento con este agente en particular. Una "cepa sensible", implica que el agente antimicrobiano resultará en un éxito terapéutico al cabo del tratamiento de la infección bacteriana. Una "cepa intermedia", implica que el agente antimicrobiano puede ser o no eficaz para erradicar una determinada bacteria, y ello dependerá de varios factores, en particular dependientes del hospedador y de las características farmacocinéticas de la droga administrada.

Es esencial que las bacterias sometidas a AST se hayan aislado desde un cultivo puro a partir de la muestra presentada. Los procedimientos de aislamiento e identificación tienen que ser estandarizados para asegurar que la bacteria es identificada correctamente a nivel de género o especie.

Una vez obtenido el aislado puro en el cultivo, es necesario que el inóculo a utilizar sea estandarizado, de forma de obtener resultados precisos de susceptibilidad.

La selección de la correspondiente metodología de AST, debe basarse en consideraciones que incluyen el rendimiento, flexibilidad, adaptabilidad a sistemas automatizados o semi-automatizados, los costos, la reproducibilidad, fiabilidad y precisión.

Existen tres métodos principales que cumplen dichos requisitos: dilución en caldo, dilución en agar y de difusión en disco.

Dilución en caldo

Para el método de dilución en caldo, una suspensión estandarizada de bacterias se prueba frente a diferentes concentraciones de un agente antimicrobiano en un medio líquido estándar.

El objetivo del método es determinar la concentración más baja del antimicrobiano ensayado capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria analizada y el resultado es definido como Concentración Mínima Inhibitoria o CMI y se expresa en microgramos por mililitro (µg / ml).

Este método se puede realizar en tubos (macrodilución) o en placas de microtitulación (microdilución). En este último caso, están disponibles comercialmente placas microtituladas que contienen los antibióticos prediluídos.

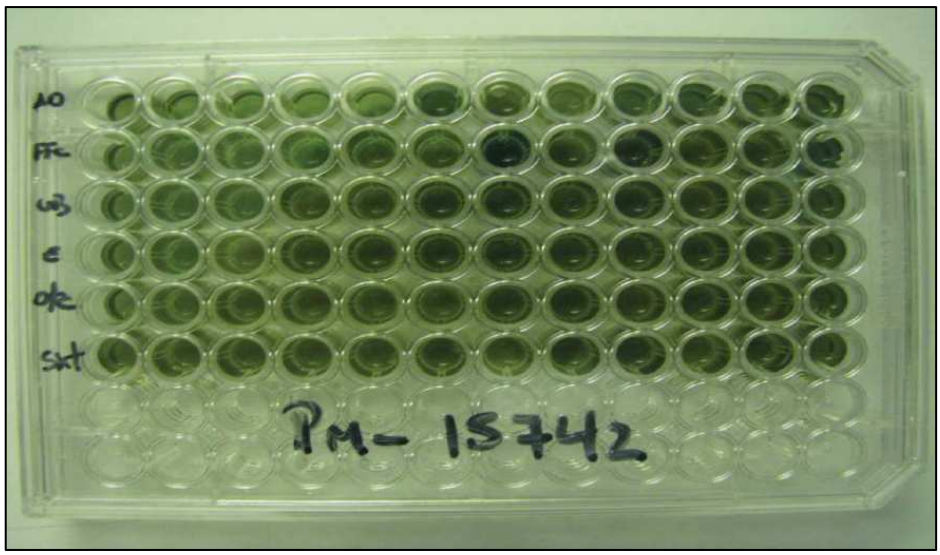


Figura 6. Microplaca con medio PS, utilizada para la determinación de CMI de *Piscirickettsia salmonis* mediante la técnica de microdilución en caldo.

Este procedimiento tiene la ventaja adicional de eliminar los posibles errores que puedan surgir debido a la preparación y dilución de los antimicrobianos en los laboratorios. Sin embargo, puede ser costoso y puede no ser la opción para los laboratorios con presupuestos más limitados.

Dilución en agar

Corresponde a la incorporación de un antimicrobiano en un medio sólido en agar, en una serie de concentraciones duplicadas en triplicado. El inóculo bacteriano se inocula mediante un replicador de Steers o similar en la superficie de la placa. Este procedimiento también puede hacerse semiautomatizado.

La dilución del agar se define generalmente, como de “dilución estándar” para las técnicas de evaluación de susceptibilidad. Sin embargo, la técnica es costosa, requiere de una labor intensa y personal bien capacitado.

Difusión en disco

Corresponde a la determinación de la respuesta de la cepa bacteriana frente a la acción de un agente antimicrobiano determinado, por lo que a diferencia de las técnicas descritas previamente, no mide niveles de susceptibilidad o resistencia sino que sólo asigna la categoría de resistente, intermedio o sensible a esta droga. En esta técnica se disemina la suspensión bacteriana en la superficie del agar y se depositan pequeños discos embebidos con el agente antimicrobiano en una concentración conocida. La difusión de los agentes antimicrobianos en la superficie del agar resulta en una gradiente del antimicrobiano, la que producirá zonas o halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del sensidisco, que tienen diámetros que se pueden correlacionar con las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) para esa combinación de bacteria y antimicrobiano en particular.

Este método es fácil de realizar, reproducible y no requiere de equipos costosos. Teniendo en cuenta sus múltiples ventajas, este podría ser el método de elección en cualquier laboratorio, no obstante, deben considerarse algunos aspectos de este método que requieren de estandarizaciones:

- El medio de cultivo a utilizar, que depende de la especie patogénica evaluada.
- La preparación de inóculo (densidad de cultivo)
- La concentración del antimicrobiano probado en el *carrier* utilizado (disco, tira, comprimido)
- Las condiciones de crecimiento e incubación (tiempo, temperatura, pH, O_2)
- La lectura de los halos de inhibición
- Los criterios de interpretación de los valores de los halos, lo que dependerá de la especie analizada.

Tradicionalmente, la mayoría de los laboratorios han utilizado métodos de difusión en disco. Los resultados reportados pueden ser cuantitativos si se registran los diámetros de inhibición, lo que resulta en una representación del respectivo CMI bacteriano, no obstante, a menudo se informan solo cualitativamente como sensibles, intermedias o resistentes.

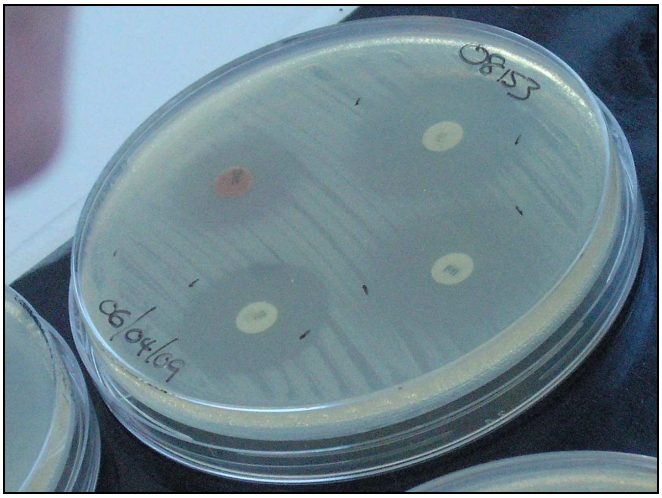


Figura 7. Evaluación de resultados de sensibilidad a antimicrobianos con método de difusión en placa (antibiograma) para el patógeno *Aeromonas salmonicida.*

Independientemente del método de evaluación de susceptibilidad utilizado, la utilización de microorganismos de referencia apropiados como controles de calidad, deben ser obligatorios cada vez que se desarrollen estas pruebas, de manera de asegurar la precisión y confiabilidad de los datos obtenidos (NCCLS, 1997, 1998, 1999).

Por lo general, los laboratorios se han limitado a la presentación de informes de datos de resistencia bacteriana indicándolos como susceptibles, intermedios o resistentes, y ellos responden a las necesidades inmediatas de los médicos veterinarios para tener lineamientos para la elección del antimicrobiano apropiado para la terapia.

Para efectos de programas de vigilancia, es necesaria la presentación de datos cuantitativos, ya que permite la detección de cambios en la sensibilidad a los antimicrobianos en cepas de bacterias, y para comparar esta información con otros programas de vigilancia.

Para obtener datos de susceptibilidad a antimicrobianos comparables entre diferentes laboratorios en el mismo país, o en diferentes países, las metodologías de laboratorio deben ser armonizadas y normalizadas.

Esto ha dado lugar a la normalización y la armonización de los métodos de AST entre laboratorios en otros países que han abordado la problemática, debiendo adherirse a estrictos estándares de AST y a supervisión del control calidad para asegurar la exactitud y la comparabilidad de los datos obtenidos.

Desafortunadamente, actualmente no existe un consenso mundial sobre los criterios de interpretación para las pruebas de sensibilidad, ni programas de vigilancia comparables, los que son necesarios para controlar los cambios en la susceptibilidad a los antibióticos en los patógenos bacterianos, especialmente en bacterias aisladas desde organismos acuáticos, como es el caso de los peces.

Dada la falta de estandarización y armonización de las metodologías utilizadas en diferentes países, es difícil comparar los datos de susceptibilidad entre éstos.

Para determinar si los resultados procedentes de diferentes sistemas de vigilancia a escala mundial son comparables, los resultados de las pruebas AST deben ser reportados cuantitativamente, incluyendo información sobre los métodos, microorganismos estándares utilizados como control de calidad, y los rangos de los antimicrobianos probados.

Los resultados debiesen ser expresados en valores de CMI o zonas de diámetro de inhibición, para permitir la determinación de los cambios en la sensibilidad a los antimicrobianos entre los patógenos bacterianos objetivo.

Como ejemplo, en Estados Unidos de América, todos los métodos utilizados para evaluar a los antimicrobianos susceptibilidad deben tener controles de calidad de microorganismos de referencia, y debe seguir de forma estricta los documentos publicados por el NCCLS (1997, 1998, 1999).

IX. Recomendaciones y medidas de control en el uso de antimicrobianos

A continuación, se presenta la revisión y selección de una serie de recomendaciones desde diversas entidades de referencia internacional, vinculadas al uso responsable de productos farmacéuticos en producción animal.

Asociados a profesionales y trabajadores en terreno [1]

1. Antes de aplicar cualquier tratamiento farmacológico, debe tenerse una mínima certeza del origen del problema sanitario (diagnóstico presuntivo).

2. Solicitar la ayuda de un profesional experto en este tema si no está seguro de cómo utilizar el producto farmacéutico,.

3. Leer la etiqueta del producto cuidadosamente.

4. Utilizar el producto sólo para las especies y las indicaciones que figuran en la etiqueta.

5. Utilizar la dosis y concentración adecuada para la especie, área y condición específica.

6. Utilizar los métodos y vías de administración de la droga correctos, que se definen en los protocolos de uso de la droga.

7. Calcular con precisión los tiempos de carencia, cuando corresponda.

8. Identificar la población o poblaciones tratadas adecuadamente, mediante marcas claras.

9. No usar medicamentos con fines profilácticos a menos que estén aprobados para este fin.

10. No sustituir el nombre comercial etiquetado de productos que están aprobados para acuicultura o animales acuáticos por productos sin etiquetar o genéricos.

11. Mantener los registros precisos de cada tratamiento efectuado, por unidad productiva.

12. Considerar el impacto ambiental de las descargas de aguas tratadas, incluyendo posibles efectos en organismos no tratados.

13. Adoptar un programa de aseguramiento de calidad o un programa de HACCP interno, que proporcione guías para evitar residuos en tejido, y para la producción de productos sanos de alta calidad para los consumidores.

14. Adoptar todas las medidas de seguridad personal y los procedimientos adecuados considerados en la preparación, manejo y administración de los antibióticos.

[1] Adecuación de las recomendaciones del USDA, United States Department of Agriculture

15. Considerar las consecuencias económicas posibles, por efecto del uso o no uso de sustancias farmacéuticas, y sus efectos tanto a corto como a largo plazo.

Recomendaciones generales de uso prudente de antimicrobianos en animales[2]

(i) Para promover una óptima prescripción de uso en animales, los veterinarios deberán:

• Fomentar la educación profesional relacionada con este tema.

• Fomentar la producción y la promulgación de directrices y códigos de prácticas para la prescripción, incluso a través de Asociaciones de Veterinarios, Colegios profesionales, Universidades, etc.

(ii) Para reducir el uso innecesario e inadecuado de los antimicrobianos para usos no terapéuticos en animales, los veterinarios deberán:

• Revisar el uso apropiado de los antimicrobianos, descartando su uso como promotores del crecimiento, de acuerdo a normas nacionales e internacionales (Unión Europea).

(iii) Utilizar el marco normativo para mejorar la óptima prescripción de antimicrobianos, interactuando con la autoridad respectiva en cuanto a:

• Efectuar una evaluación crítica de los productos existentes en el momento de la renovación de las autorizaciones de comercialización y garantizar que los datos y los resúmenes las características del producto son adecuados y coherentes (con las de otros productos que contienen el mismo principio activo antibacteriano).

• Durante el proceso de autorización de nuevos antimicrobianos, exigir el desarrollo de tasas de dosificación optimizadas, y estrategias basadas en los avances recientes de datos en farmacocinética y farmacodinámica.

• Si fuese necesario, exigir nuevas dosis y estrategias para los antimicrobianos actualmente autorizados, sobre la base de la disparidad en la eficacia respecto de la realidad de terreno.

[2] Adaptado de las recomendaciones del Departamento de Salud del Reino Unido (2000)

X. Bibliografía

Alderman, D.J., Hastings, T.S. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance—potential for consumer health risks. Int. J. Food Sci. Technol. 33, 139–155.

Alderman, D.J., Michel, C. 1992. Chemotherapy in aquaculture today. Pages 3-24. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Alderman, D.J., Smith, P. 2001. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. Aquaculture 196: 211–243.

Allen, D.A., Austin, B. et Colwell, R.R. 1983. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. Int. J. Syst. Bacteriol., 33 : 599-604.

Andersen, S. R., and R. A. Sandaa. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 60:908–912.

Angulo, F.J. 2000. Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on health. APUA Newsletter 18: 1–6.

Aoki, T., Kitao, T., Iemura, N., Mitoma, Y., Nomura, T. 1983. The susceptibility of *Aeromonas salmonicida* strains isolated in cultured and wild salmonids to various chemotherapeutics. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49, 17-22.

Aoki, T. 1992. Present and future problems concerning the development of resistance in aquaculture. Pages 254-262. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Austin, B. 1982. Taxonomy of bacteria isolated from a coastal, marine fish-rearing unit. *J. Appl. Bacteriol.* **53.** 253-268.

Austin, B. 1985b. Chemotherapy of bacterial fish diseases. *In*: Ellis, A. E. Fish and shellfish pathology. Academic Press, London. Pages 19-26.

Austin, B. & D.A. Austin. 1987. Gram negative pigmented rods. *In:* Bacterial fish pathogens. Academic Press, London. Pages 225-249.

Barnes, A.C., Hastings, T.S. & S.G.B. Amyes. 1995. Aquaculture antibacterials are antagonized by seawater cations. *J. Fish Dis.* **18:** 463-465.

Bast, L., Daly, J.G., deGrandis, S.A. & R.M.W. Stevenson. 1988. Evaluation of profiles of *Aeromonas salmonicida* as epidemiological markers of furunculosis infections in fish. *J. Fish Dis.* **11:** 133-145.

Bernoth, E.M. 1991. Possible hazards due to fish drugs. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*. **11:** 17-21.

Björklund, H. & G. Bylund. 1990. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture.* **84:** 363-372.

Björklund, H., Bondestam, J. & G. Bylund. 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture.* **86:** 359-367.

Björklund, H., Raberg, C.M.I. & G. Bylund. 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture.* **97:** 85-96.

Björklund, H., Eriksson, A. & G. Bylund. 1992. Temperature-related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture.* **102:** 17-27.

Branson E. 2001. Clinical relevance of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs). Aquaculture. Volume 196, Issues 3-4, Pages 289-296.

Brunn, M.S., Schmidt, A.S., Madsen, L. & I. Dalsgaard. 2000. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture.* **187:** 201-212.

Butaye, P., Cloeckaert, A., Schwartz, S. 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram-negative bacteria. Int. _J. Antimicrob. Agents. 22, 205-210.

Bywater, R.; Silley, P.; Simjee, S. 2006. Antimicrobial breakpoints-definitions and conflicting requirements. Vet Microbiol, 118(1-2):158-9.

Capone, D.G., Weston, D.P., Miller, V. & C. Shoemaker. 1996. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture.* **145:** 55-75.

CDC. 2001. Interagency Task Force on Antimicrobial Resistance. A public health action to combat antimicrobial resistance. Part I: Domestic Issues. Documento disponible en http://www.cdc.gov/drugresistance/actionplan/index.htm (acceso noviembre de 2008).

Chang, J.W. & F.D. Pien. 1986. Marine acquired infections. Hazards of the ocean environment. *Mar. Infect.* **80**, pp. 30, 32, 37, 41.

Chopra, I., Roberts, M.R. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Molec. Revs. 65, 232-260.

Christofilogiannis, P. 2001. Current inoculation methods in MIC determination. Aquaculture, Volume 196, Issues 3-4, Pages 297-302.

CLSI. 2005. Method for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; proposed guideline. CLSI document M-49-P.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006a. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Approved guideline M-42-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006b. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Approved guideline M-49-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

Coyne, R., Hiney, M., O'Connor, B., Kerry, J., Cazabon, D. & P. Smith. 1994. Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture.* **123:** 31-42.

Coyne, R., Hiney, M. & P. Smith. 1997. Transient presence of oxytetracycline in blue mussels (*Mytilus edulis*) following its therapeutic use at a marine Atlantic salmon farm. *Aquaculture.* **149:** 175-181.

Cravedi, J.P., Choubert, G. & G. Delous. 1987. Digestability of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestability. *Aquaculture.* **60:** 133-141.

DeGrandis, S.A. & R.M.W. Stevenson. 1985. Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrob. Ags. Chemother.* **27:** 938-942.

DePaola, A. 1995. Tetracycline resistance by bacteria in response to oxytetracycline-contaminated catfish feed. *J. Aquat. Anim. Health*. **7:** 155-160.

DePaola, A., Flynn, P.A., McPhearson, R.M. & S.B. Levy. 1988. Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline- and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54:** 1861-1863.

Douglas, I.; Ruane, N. M.; Geary, M.; Carroll, C.; Fleming, G.T.A.; McMurray, J.; Smith, P. 2007. The advantages of the use of discs containing single agents in disc diffusion testing of the susceptibility of *Aeromonas salmonicida* to potentiated sulphonamides. Aquaculture, Volume 272, Issues 1-4, Pages 118-125.

EMEA. 2003. Committee for Veterinary Medicinal Products, Future Strategy on Antimicrobial Resistance. EMEA/CVMP/558/03-FINAL.

Enger, O., Husevag, E. & J. Goksøyr. 1989. Presence of the fish pathogen *Vibrio salmonicida* in fish farm sediments. *Appl. Environ. Microbiol*. **55:** 2815-2818.

FAO. 2005. Fisheries Technical Paper. Responsible use of antibiotics in aquaculture. 469, Rome 2005.

FAO/WHO/OIE. 2003. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific assessment, Geneva, December 1-5, 2003.

FAO/WHO/OIE. 2004. Second Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Management options, 15-18 March 2004, Oslo, Norway.

Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T., Ohta, M. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolated. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5336-5342.

Ghisalberti, D., Masi, M., Pages, J.M., Chevalier, J. 2005. Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in Enterobacter aerogenes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 328, 1113-1118.

Giles, J.S., Hariharan, H. & S.B. Heaney. 1995. The plasmid profiles of fish pathogenic isolates of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio ordalii* from the Atlantic and Pacific coasts of Canada. *Can. J. Microbiol.* **41:** 209-216.

Goldberg, R.J., Elliot, M., Taylor, R. 2001. Marine aquaculture in the United States: Environmental impacts and policy options. Pew Oceans Commission. pp. 1-33.

Goldstein, F., Soussy, C.-J. and Thabaut, A. 1996. Definition of the Clinical Antibacterial Spectrum of Activity. Clinical Microbiology and Infection, 2: S40–S45.

Gratzek, J.B. 1983. Control and therapy of fish diseases. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **27:** 297-324.

Griffiths, S.G. & W.H. Lynch. 1989. Characterization of *Aeromonas salmonicida* mutants with low level resistance to multiple antibiotics. *Antimicrob. Ags. Chemother*. **33:** 19-26.

Hansen, P.K., Lunestad, B.T. & O.B. Samuelsen. 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Pages 174-178. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Hansen, P.K., Lunestad, B.T. & O.B. Samuelsen. 1993a. Effects of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Can. J. Microbiol*. **39:** 1307-1312.

Haug, T. & P.A. Hals. 2000. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*) in freshwater at low temperature. *Aquaculture.* **186:** 175-191.

Hedges, R.W., Smith, P. & Brazil, G. 1985. Resistance plasmids of Aeromonas. Journal of General Microbiology, 131, 209 1-2095.

Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V. & M. Yndestad. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture.* **133:** 175-184.

Hoff, K.A. 1989. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities. *Appl. Environ. Microbiol.* **55:** 1775-1786.

Hustvedt, S.O., Salte, R., Kvendset, O. & V. Vassvik. 1991. Bioavailability of oxolinic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) from medicated feed. *Aquaculture*. **97:** 305-310.

Inglis, V., Yimer, E., Bacon, E.J. & S. Ferguson. 1993. Plasmid-mediated antibiotic resistance in *Aeromonas salmonicida* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *J. Fish Dis.* **16:** 593-599.

Ishida, N. 1992. Tissue-levels of oxolinic acid after oral or intravascular administration to freshwater and seawater rainbow trout. Aquaculture 102, 9-15.

Jacobsen, M.D. 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimethoprim. *J. Fish Dis.***12:** 29-36.

Jacobsen, P. & L. Berglind. 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture.* **70:** 365-370.

Kehrenberg, C., Schwarz, S., Jacobsen, L., Hansen, L.H., Vester, B. 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. Mol. Microbiol. 57, 1064–1073.

Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Cazabon, D., NicGabhainn, S. & Smith, P. 1994. Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in microorganisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. Aquaculture, 123: 43-54.

King, R.K. 2000. Identification of pathogenic bacteria in biofilms of recirculating aquaculture systems. Abstract presented in the 2000 Institute of Food Technologists Annual Meeting.

Klein, B.U. & K.H. Boehm. 1994. Examinations about transferable antibiotic resistance on obligate and facultative fish pathogenic bacteria. *Internat. Symp. Aquat. Anim. Health.* Univ. Calif. Davis. p. P-41 (Abstract).

Kupka-Hansen, P., Lunestad, B.T. & O.B. Samuelsen. 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming. Pages 174-178. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Lang, K.S., Anderson, J.M., Schwarz, S., Williamson, L., Haldelsman, J., Singer, R.S. 2010. Novel florfenicol and chloramphenicol resistance gene discovered in Alaskan soil by using functional metagenomics. Appl Environ. Microbiol. 76, 5321-5326.

Leclercq, R., Courvalin, P. 2002. Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Ags. Chemother. 46, 2727–2734.

Levy, S. B.; McMurry, L. M.; Burdett, V.; Courvalin, P.; Hillen, W.; Roberts, M. C.; Taylor, D.E. 1989. Antimicrob Agents Chemother; 33(8): 1373-1374.

Lewin, C.S. 1992. Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms. Pages 288-301. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizootics, Paris.

Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Vester, B. 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2500–2505.

Lunestad, B.T. & J. Goksøyr. 1990. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Dis. Aquat. Org.* **9:** 67-72.

Lunestad, B.T. 1992. Fate and effects of antimicrobial agents in aquatic environments. Pages 152-161 *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Lunestad, B.T. & Samuelsen O.B. 2001. Effects of sea water on the activity of antimicrobial agents used in aquaculture; implications for MIC testing. Aquaculture Volume 196, Issues 3-4, Pages 319-323.

MacGowan, P. & Wise, R. 2001. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. Oxford Journals, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume48, Issue suppl. 1, Pages 17-28.

Martinsen, B., Myhr, E., Reed, E. & T. Hastein. 1991. *In vitro* antimicrobial activity of sarafloxacin against clinical isolates of bacteria pathogenic to fish. *J. Aquat. Anim. Health.* **3:** 235-241.

Martinsen, B. & T.E. Horsberg. 1995. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolonic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10℃. *Antimicrob. Ags. Chemother.* **39.** 1059-1064.

Midtvedt, T. & E. Lingaas. 1992. Putative public health risks of antibiotic resistance development in aquatic bacteria. *In*: C. Michel & D. Alderman (Eds.), Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizooties, Paris, pp. 302-314.

Miller, R.A., Walker, R.D., Baya, A., Clemens, K., Coles, M., Hawke, J.P., Henricson, B.E., Hsu, H.M., Mathers, J.J., Oaks, J.L., Papapetropoulou, M., Reimschuessel, R. 2003. Antimicrobial susceptibility testing of aquatic bacteria: quality control disk diffusion ranges for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 at 22 and 28℃. J. Clin. Microbiol. 66, 24–26.

Miller, R., Walter, R., Carson, J., Coles, M., Coyne, R., Dalsgaard, I., Gieseker, C., Hsu, H., Mathers, J., Papapetropoulou, M., Petty, B., Teitzel, C., Reimschuessel, R. 2005. Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. Dis. Aquat. Org. 64, 211-222.

Miranda, C.D. & R. Rojas. 2007a**.** Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. Aquaculture. 266: 39-46.

Miranda, C.D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., Roberts, M.C. 2003. Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria From Chilean Salmon Farms. Antimicrob. Ags. Chemother. 47, 883-888.

Miranda, C.D., Rojas, R., Hurtado, L. 2005. Role of salmon farm sediments as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria in Chilean salmon farming. Proceedings 45st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy ICAAC 2005 December 21-26, 2005 Washington, United States.

Monnet, D. L., Sørensen, T. L. 1999**.** Interpreting the effectiveness of a national antibiotic policy and comparing antimicrobial use between countries. The Journal of hospital infection 1999;43(3):239-42.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1997. Approved standard M7-A4: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Villanova, Pennsylvania, USA.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1998. Approved standard M100-S8: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, Pennsylvania, USA.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1999. Approved standard M100-S9: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, Pennsylvania, USA.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standard M31-A2. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2005. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; a report. NCCLS document M42-R.

Nygaard, K., Lunestad, B.T., Hektoen, H., Berge, J.A. & V. Hormazabal. 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture.* **104:** 31-36.

OIE. 2010. Terrestrial Animal Health Code. Paris, France.

Petersen, A., Andersen, J.S., Kaewmak, T., Somsiri, T., Dalsgaard, A. 2002. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in pond environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6036-6042.

Pursell, L., Samuelsen, O.B. & P. Smith. 1995. Reduction in the *in vitro* activity of flumequine against *Aeromonas salmonicida* in the presence of the concentrations of divalent cations found in sea water. *Aquaculture.* **135:** 245-255.

Rasmussen, F. 1988. Therapeutics used in fish production: pharmokinetics, residues and withdrawal periods, EIFAC/XV/88Inf. 13, 22p. FAO, Rome.

Roberts, M.C. 1994. Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends in Microbiol.* **2:** 353-357.

Rodríguez-Martínez, J.M. 2005. Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 23, 25-31.

Rogstad, A., Hormazabal, V., Ellingsen, O.F. & K.E. Rasmussen. 1991. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish: 1. Absorption, distribution and accumulation in Rainbow trout in fresh water. *Aquaculture.* **96:** 219-226.

Saitanu, K., Chongthaleong, A., Endo, M., Umeda, T., Takami, K., Aoki, T. & T. Kitao. 1994. Antimicrobial susceptibilities and detection of transferable R-plasmids from *Aeromonas hydrophila* in Thailand. *Asian Fish. Sci.* **7:** 41-46.

Saito, K., Egusa, S., Arai, T. & T. Aoki. 1977. Drug resistant bacteria and their conjugative R plasmids isolated from materials related with fish culture in USA. *Fish Pathol*. **12:** 77-86.

Samuelsen, O.B. 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture.* **83:** 7-16.

Samuelsen, O.B. 1992. The fate of antibiotics/chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. Pages 162-173. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors).

Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T., Husevag, B., Hφlleland, T. & A. Ervik. 1992a. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. *Dis. Aquat. Org.* **12:** 111-119.

Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T., Ervik, A. & S. Fjelde. 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture.* **126:** 283-290.

SANCO. 2002a. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General.2002. Directorate Food Safety: production and distribution chain Annex I. Report for 2000 on the results of residue monitoring in food of animal origin in the Member States, 17 July 2002 (SANCO/592/2002) final.

Sandaa, R.A. & O. Enger. 1994. Transfer in marine sediments of the naturally ocurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **60:** 4234-4238.

Sauer, K., Stewart, P. & Givskov, M. 2001. New ways to battle bugs in biofilm bunkers. *In:* BioMedNet Conference Reporter, ASM 2001.

Schlotfeldt, H.J. 1992. Current practices of chemotherapy in fish culture. Pages 25-38. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Office International des Epizootics, Paris.

Schlotfeldt, H.J., Neumann, W., Fuhrman, H., Pfortmueller, K. & H. Boehm. 1985. Bacterial remarks on increasing resistance of fish pathogenic and facultative fish pathogenic bacteria in lower Saxony (FRG). *Fish Pathol.* **20:** 85-91.

Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L. 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish Rainbow trout farms. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4908-4915.

Schmidt, A., Bruun, M., Dalsgaard, I., Larsen, J.L. 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl. Environ. Microbiol*. **67**: 5675-5682.

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol. Rev. 28, 519-542.

Sirot, J.; Courvalin, P.; Soussy, C-J. 1996. Definition and determination of in vitro antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria. Clinical Microbiology and Infection, Volume 2, Issue Supplement s1, pages S5–S10.

Smith, P., Hiney, M.P. & O.B. Samuelsen. 1994a. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. *Ann. Rev.Fish Dis.* **4:** 273-313.

Smith, P. 1996. Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture.* **146:** 157-269.

Smith, P. 2006. Breakpoints for disc diffusion susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases: A review of current practice. Aquaculture Volume 261, Issue 4, Pages 1113-1121.

Sϕrum, H., Poppe, T.T. & ∅. Olsvik. 1988. Plasmids in *Vibrio salmonicida* isolated from salmonids with hemorrhagic syndrome (Hitra disease). *J. Clin. Microbiol*. **26:** 1679-1683.

Sϕrum, H., Roberts, M.C. & J.H. Crosa. 1990. Isolation and characterization of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida,* pp. 45-48. *In* O. Olsvik & G. Bukholm (ed.). Application of molecular biology in diagnosis of infectious diseases. Norwegian College of Veterinary Medicine. Oslo, Norway.

Sϕrum, H., Roberts, M.C. & J.H. Crosa. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrob. Ags. Chemother.* **36:** 611-615.

Starliper, C.E., Cooper, R.K., Shotts, E.B. & P.W. Taylor. 1993. Plasmid-mediated Romet resistance of *Edwarsiella ictaluri. J. Aquat. Anim. Health.* **5:** 1-8.

Toranzo, A.E., Barja, J.L., Colwell, R.R. & F.M. Hetrick. 1983. Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infect. Immun.* **48:** 184-192.

Toranzo, A.E., Combarro, P., Lemos, M.L. & J.L. Barja. 1984. Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout. *Appl. Environ. Microbiol.* **48:** 872-877.

Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Bandín, Y, Santos, Y. & J.L. Barja. 1992. Evaluation of the sensibility of bacterial fish pathogens to different antimicrobial compounds. Pages 315-325. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizootics, Paris.

Torsvik, V.L., Sorheim, R. & J. Goksφyr. 1988. Antibiotic resistance of bacteria from fish farm sediments. ICES Report, C. M. 1 988/F:10.

Treves-Brown, K.M. 2000. *In:* Appied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers.

Turnidge, J. & Paterson, D. 2007. Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 20, No. 3, p. 391-408,

Van der Heijden, M.H.T., van Muiswinkel, W.B., Grondel, J.L. & J.H. Boon. 1992. Immunomodulating effects of antibiotics. Pages 219-230. *In*: C. Michel and D. Alderman (Editors). Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office International des Epizootics, Paris.

Van der Heijden, M.H.T., Keukens, H.J., van den Nieuwboer, W.H.F.X., Mengelers, M.J.B. & J.H. Boon. 1994. Plasma disposition of flumequine in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758), african catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) and european eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) after a single peroral administration. *Aquaculture.* **123:** 21-30.

Vaughan, S., Coyne, R. & P. Smith. 1996. The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a freshwater fish farm. *Aquaculture.* **139:** 47-54.

VICH. 2003. Guidance on pre-approval information for registration of new veterinary medicinal products for food producing animals with respect to antimicrobial resistance. Guidance VICH 27, December 2003, Final.

Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Gerner-Smidt, P. & Bager, F. 1999. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta Veterinaria Scandinava,* **92** (Suppl.): 51–57.

Young, H. K. 1993. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. J. Antimicrob. Chemother. 31:627-635.

Zelver, N. 2000. Control and analysis of biofilm development in relation to food processing equipment and muscle food. Abstract. Presented in the 2000 Institute of Food Technologists Annual Meeting.

Zhao, J., and T. Aoki. 1992. Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. Microbiol. Immunol. 36:1051–1060.

XI. Acrónimos más utilizados

AAM: Agentes antimicrobianos.

AST: Del ingles antimicrobial susceptibility testing, pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

ATCC: Del inglés American Type Culture Collection. Entidad de referencia de microorganismos.

CDC: Centres for Disease Control and Prevention, EE.UU.

CMI (MIC): Concentración Mínima Inhibitoria.

CLSI: Del inglés Clinical and Laboratory Standards Institute, Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Corresponde a la unidad de referencia internacional en estas materias. Antiguamente, el NCCLS.

EMEA: European Medicines Agency.

FAO: Food and Agriculture Organization, de Naciones Unidas.

FDA: Food and Drug Administration, EE.UU.

NARMS: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, EE.UU.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards, actual CLSI.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

SANCO: Commission Européenne, Direction générale santé et protection des Consommateurs.

USDA: Departamento de Agricultura, EE.UU.

VICH: Veterinary International Committee for Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals.

XII. Glosario

Antibiótico: Droga de origen natural que tiene la capacidad para inhibir el crecimiento o matar a algunos microorganismos a concentraciones muy bajas.

Antimicrobiano: Droga que mata o inhibe la multiplicación de los microorganismos que es de origen natural, sintético o semisintético.

***Biofilm*:** Células microbianas insertas en una unidad de adhesión, por lo general un polisacárido, y unidas a una superficie.

Breakpoints (puntos de quiebre): Son concentraciones discriminatorias de cada antimicrobiano utilizado en la interpretación de los resultados de los ensayos de susceptibilidad, para definir a las cepas bacterianas de una especie determinada como susceptible, intermedio o resistente al fármaco ensayado.

Conjugación: En células procariontes, la transferencia de información genética desde una célula donante a una célula receptora, por contacto célula-célula.

Cut-offs: Corresponden a valores de corte epidemiológicos, que definen si un microorganismo es definido como silvestre (wild-type, WT) y carece de mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos, y se presenta como WT < X mg/L.

Droga: Cualquier sustancia destinada a ser utilizada en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o la prevención de una enfermedad en el hombre u otros animales; cualquier sustancia (diferente de alimentos) destinada a afectar la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre u otros animales.

Extra-etiqueta: El uso actual o futuro de un fármaco animal aprobado, de forma discordante con las instrucciones aprobadas que se encuentran descritas en la etiqueta.

Gen: Es una secuencia ordenada de nucleótidos ubicados en una posición (locus) en un cromosoma particular, que codifica un producto funcional específico (el producto del gen, es decir, una proteína o una molécula de ARN). Incluye las regiones implicadas en la regulación de la expresión, y las regiones que codifican para un producto funcional específico.

***Cassette* genético:** Corresponde a un elemento móvil, que está regulado por la *integrasa*, que interactúa con los sitios de recombinación en el sitio *attI* situado en la posición 5' de los integrones. El movimiento de un *cassette* se produce a través de un mecanismo de recombinación conservado sitio-especifico, en los que las proteínas de unión del ADN desempeñan un papel principal.

Gram (tinción de): Tinción diferencial que divide las bacterias en dos grupos, Gram-positivas y Gram-negativas, sobre la base de la capacidad de retener el cristal violeta cuando son decoloradas en un solvente orgánico como etanol. La pared celular de las bacterias Gram-positivas se compone fundamentalmente de peptidoglicano y carece de la membrana externa de tipo lipoproteica, como ocurre con las células Gram-negativas.

Integrón: Unidad genética, que incluye los genes de un sistema de recombinación sitio-específica, capaz de capturar y movilizar genes contenidos en elementos móviles denominados *cassettes* de genes, que habitualmente codifican para determinantes de resistencia a antimicrobianos y metales pesados.

***In vitro*:** Literalmente "en vidrio", que describe lo que ocurre en un tubo de ensayo o en otro tipo recipiente, como opuesto a lo *in viv*o. Cuando un estudio se realiza fuera de un organismo vivo.

***In vivo*:** En el cuerpo, en un organismo vivo, como opuesto a lo *in vitro*. Cuando un estudio o un experimento se realiza en un organismo vivo.

Mutación: variación de la secuencia del genoma bacteriano, que puede ocurrir como consecuencia de procesos de deleciones, inserciones o substituciones y que pueden o no expresarse en variaciones en el fenotipo bacteriano.

Operón: Región del genoma bacteriano que contiene los genes estructurales, que codifican para proteínas junto con las zonas genómicas que regulan la expresión de estos genes, tales como las zonas operadoras y promotoras, reconocidas por los represores y las RNA polimerasa, respectivamente.

Plásmido: Corresponde a una estructura circular de ADN doble hebra covalentemente cerrado localizado extracromosomalmente y que no es esencial para la viabilidad bacteriana. Un plásmido conjugativo es un plásmido auto-transferible, que contiene los genes requeridos para codificar todas las funciones necesarias para su propia transferencia por conjugación.

Recombinación: Proceso por el cual los elementos genéticos en dos genomas separados, son llevados juntos a una sola unidad.

Replicación: La conversión de una molécula de doble cadena de ADN, a dos moléculas de doble cadena de ADN idénticas.

Transposón: Elemento transponible (elemento genético que puede moverse desde un sitio del cromosoma a otro), que además de los genes implicados en la transposición, lleva a otros genes, lo que a menudo genera fenotipos seleccionables, como la resistencia a antibióticos.

XIII. Sitios de interés en la web

- DANMAP - Danish Integrated Antimicrobial resistance Monitoring and Research Programme. En:

http://www.danmap.org/

- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias aisladas desde organismos acuáticos. En:

http://www.clsi.org/source/orders/SearchResults.cfm?section=Antimicrobial_Susceptibility_Testing&task=1&continue=1&

- National Antimicrobial Resistance Monitoring System, USA. En:

http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/default.htm

- Organización Mundial de la Salud. Estrategia Mundial para contener la resistencia a los antimicrobianos. En:

http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf

- Organización Mundial de Sanidad Animal. Código Sanitario para los Animales Acuáticos *on line*. En:

http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea/

- SAG. Servicio Agrícola y Ganadero. Medicamentos autorizados para uso veterinario. En:

http://www.sag.gob.cl/OpenDocs/asp/pagDefault.asp?boton=Doc56&argInstanciaId=56&argCarpetaId=578&argTreeNodosAbiertos=(578)(56)&argTreeNodoActual=578&argTreeNodoSel=568

XIV. Agradecimientos

Los autores del presente trabajo quieren expresar su agradecimiento a las empresas productoras de salmón, Marine Farm (GMT S.A.), Salmones Multiexport S.A., Ventisqueros S.A., Trusal S.A., Pesquera Pacific Star S.A., AquaChile S.A., Compañía Pesquera Camanchaca S.A., Pesquera El Golfo S.A., Salmones Antártica S.A., Salmones Friosur S.A., Invertec Seafood S.A. y Salmones Itata S.A., cuyo apoyo fue determinante en lograr desarrollar el trabajo del proyecto que enmarca la elaboración del presente documento.

Por otro lado, la valiosa cooperación de los profesionales y técnicos del Departamento de Salud Hidrobiológica del Instituto de Fomento Pesquero, con especial énfasis en los investigadores Sres. Juan Carlos Quintanilla y Tadaishi Yatabe, quienes hicieron importantes aportes en la elaboración de diferentes secciones de la presente Guía.

Asimismo, agradecer la revisión y aportes al presente trabajo, efectuados por el Dr. Leonardo Guzmán, Jefe de la División de Investigación en Acuicultura del Instituto de Fomento Pesquero.

A N E X O 5

Propuesta monitoreo oficial de la resistencia bacteriana

Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura

Antecedentes y propuesta para el establecimiento de un Programa Oficial de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana

Documento preparado por el Departamento de Salud Hidrobiológica del Instituto de Fomento Pesquero

Marzo de 2011

Zonificación de las áreas de cultivo de salmónidos según resultados de análisis de riesgo de la resistencia bacteriana

A partir de la información disponible de los perfiles de resistencia a antimicrobianos de los patógenos de peces de la industria salmonicultora nacional, obtenidos a través de las campañas de muestreo y análisis efectuados por IFOP a través de los últimos 3 años; de los registros de uso de fármacos entregados por el Servicio Nacional de Pesca; y la opinión de expertos en la materia, se ha implementado un modelo de análisis de riesgo del fenómeno de la resistencia bacteriana, a partir del cual se ha planteado una zonificación que permitirá optimizar el programa de vigilancia de dicho fenómeno, como el propuesto.

a) Diseño del modelo de análisis de riesgo:

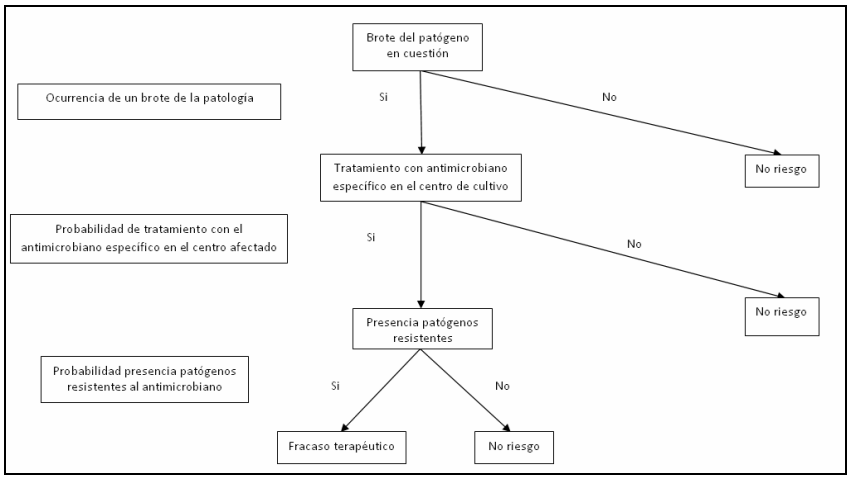
A partir de la literatura y referencias internacionales, como las de la OIE, se diseñó un modelo de análisis de riesgo cuyo punto de partida es la infección con un patógeno específico por parte de los peces, y el consecuente brote de una determinada enfermedad causado por éste, a nivel de centro de cultivo.

El presente análisis se enfocó a los principales patógenos que afectan hoy en día a la industria, *Piscirickettsia salmonis* en los centros ubicados en agua de mar, y *Flavobacterium psychrophilum* en las pisciculturas y centros de lago. La figura Nº 1 muestra el flujo de procesos de este modelo, el que comienza con el brote del patógeno específico, que puede ser tratado o no con el antibiótico en evaluación, siendo la respuesta a este tratamiento el éxito o fracaso terapéutico, dependiendo del perfil de resistencia del agente infeccioso. Las consecuencias del fracaso terapéutico fueron cuantificadas en términos de la cantidad de producto perdido (toneladas de salmónidos), para los centros de cultivo ubicados en mar, o del número de juveniles (alevines/smolts) para las pisciculturas o centros de cultivo de lago.

b) Recopilación de información necesaria para el desarrollo del modelo de análisis de riesgo:

Para esta etapa se consideró la información recopilada y analizada en el marco del estudio, relativa a los perfiles de resistencia de los aislados obtenidos en siete campañas de muestreo. Se incluyó también en el análisis, la información aportada por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca), relativa a los tratamientos antimicrobianos administrados durante el periodo de estudio.

Figura Nº 1. Diagrama de flujo de la conceptualización del análisis de riesgo de la resistencia bacteriana.



De esta manera, la información con la que se contó para el desarrollo del estudio incluyó:

• Identificación y ubicación espacial de las áreas de muestreo

• Perfiles de resistencia de los aislados bacterianos patógenos de peces

• Registros de uso de fármacos durante el periodo de estudio, especificando el principio activo utilizado, diagnóstico frente al cual se realizó tratamiento, fecha de inicio y término, y la agrupación de concesiones salmoneras (ACS) donde se realizó el mismo.

c) Desarrollo del modelo de análisis de riesgo

Siguiendo la metodología de OIE (2010), la estructura del Análisis de Riesgo incluyó las siguientes etapas:

Identificación del peligro

En base a la revisión de la literatura existente relativa al análisis de riesgo de la resistencia bacteriana, se definieron los siguientes peligros:

• Presencia de microorganismos patógenos que hayan adquirido resistencia a partir del uso de antimicrobianos en salmónidos.

• Presencia de microorganismos patógenos que hayan obtenido determinantes de resistencia desde otros microorganismos, los que adquirieron resistencia a partir del uso de antimicrobianos

en salmónidos.

Para efectos de este estudio, se consideró que ambos peligros se encuentran representados en los perfiles de resistencia de los patógenos aislados en las campañas de muestreo, debido a que el origen de la resistencia expresada por estos involucraría ambos mecanismos.

Evaluación del riesgo

• Evaluación de la difusión

Considerando que las rutas biológicas que llevan a la liberación de microorganismos resistentes o determinantes de resistencia no se encuentran plenamente caracterizadas en peces y que la probabilidad de ocurrencia de este proceso es desconocida, además del hecho de que se cuenta con la información de los perfiles de resistencia de las cepas aisladas desde peces afectados por bacterias patógenas desde las campañas de muestreo y la frecuencia de ocurrencia de eventos de enfermedad a partir de la información aportada por Sernapesca, se decidió no considerar la etapa de la difusión de los agentes al medio, y comenzar el análisis de riesgo directamente en la evaluación de la exposición.

• Evaluación de la exposición:

La probabilidad de exposición de un grupo de salmónidos a microorganismos resistentes se encuentra dada por la probabilidad de ocurrencia de un evento de infección con el agente específico, y por la probabilidad de que este agente sea resistente. De esta forma, el número de brotes al año causado por cepas resistentes del agente específico viene dado por:

N° casos anuales X probabilidad de resistencia del agente

El número de casos anuales a nivel de agrupación de concesiones salmoneras (ACS) o sector de agua dulce, tanto para los casos de piscirickettsiosis como los de flavobacteriosis, respectivamente, se estimó a partir del registro de uso de fármacos de Sernapesca, específicamente de la información relativa al diagnóstico frente al cual se realizó el tratamiento. Para ingresar este valor dentro del modelo se utilizó la distribución de Poisson, que permite estimar el número de eventos que ocurren en un periodo de tiempo definido (en este caso un año).

En cuanto a la probabilidad de resistencia del agente, esta se estimó a partir de los resultados de los perfiles de resistencia obtenidos de los aislados de las campañas de muestreo. Para esto se utilizó una distribución beta, la que permite estimar la probabilidad de ocurrencia de un evento (en este caso el que la cepa sea resistente).

• Evaluación de las consecuencias

Las consecuencias derivadas de la resistencia bacteriana evaluadas en este estudio fueron el de la pérdida de producto (toneladas de salmónidos) en centros ubicados en mar o bien el número de juveniles perdidos en los centros de agua dulce (piscicultura o lago). La estimación de estos valores a nivel de ACS o sector de agua dulce viene dada por el número de fracasos terapéuticos que se presentan en el área y la pérdida de producto o juveniles que esto determina.

El número de fracasos terapéuticos al año fue estimado a partir del número de brotes anuales causados por cepas resistentes del agente específico estimado en la etapa anterior, y la probabilidad de utilizar el principio activo específico frente al cual el agente es resistente. Lo anterior viene dado por:

N° brotes resistentes X Probabilidad uso antimicrobiano específico

Para estimar la probabilidad de uso del antimicrobiano frente al patógeno específico se utilizó la información disponible en el registro de uso de fármacos de Sernapesca, en específico la relativa a los diagnósticos y principios activos utilizados frente a ellos. De esta forma se utilizó una distribución beta para estimar esta probabilidad.

La estimación de la pérdida de producto en agua de mar y la pérdida de individuos en agua dulce debido a brotes de piscirickettsiosis y flavobacteriosis, respectivamente, se realizó a partir de la información entregada por expertos en salud de peces, lo que permitió estimar esta consecuencia a nivel de centro de cultivo en mar, piscicultura o lago.

• Estimación del riesgo

Integrando todas las etapas anteriores se estimó el número anual de fracasos terapéuticos por ACS o sector de agua dulce para cada principio activo evaluado, y la cantidad de producto o

individuos juveniles perdidos.

Zonificación de las áreas estudiadas

Debido a que las consecuencias en términos de la cantidad de producto o individuos juveniles perdidos por efecto de la presencia de resistencia bacteriana en una determinada área, varían dependiendo de las prácticas de uso de fármacos a nivel local, y éstas pueden cambiar dependiendo de nuevas condiciones regulatorias impuestas por la autoridad oficial o auto-impuestas por la industria, las nuevas condiciones de mercado o la incorporación de nuevos fármacos, la zonificación en base a esta estimación no parece la más adecuada.

Por esto se propone una zonificación en base a la estimación de la cantidad de brotes causados por patógenos resistentes, la que presenta una serie de ventajas

a) Considera la situación sanitaria de las diferentes áreas y los centros de cultivo que las componen.
b) Incorpora los patrones de resistencia existentes en el área.
c) Los principios activos utilizados en las distintas áreas no hacen variar esta zonificación.

Por los motivos anteriormente expuestos, la zonificación que se propone, se basa en la cantidad estimada de brotes causados por patógenos resistentes a antibióticos en el área de estudio, la que sería aplicada de forma diferenciada para centros de cultivo en agua de mar y centros de cultivo en agua dulce.

Zonificación en mar

Dada la distribución de brotes resistentes en las ACS en estudio, la que va desde una media estimada de cero brotes resistentes hasta 60 brotes resistentes a antibióticos, se clasificaron ACS en tres niveles de riesgo de resistencia: zonas de riesgo bajo de resistencia, zonas de riesgo intermedio y zonas de riesgo alto.

a) Zonas de riesgo bajo: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes no superan los 15 brotes anuales.

b) Zonas de riesgo intermedio: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes se encuentran entre los 15 y los 35 brotes anuales.

c) Zonas de riesgo alto: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes se encuentran sobre los 35 brotes anuales.

Zonificación en agua dulce

Dada la distribución de brotes resistentes en los sectores en estudio, la que va desde una media estimada de 9 brotes resistentes en el lago Rupanco hasta 91 brotes resistentes a antibióticos en la en la provincia de Llanquihue, se clasificaron los sectores en estudio dos niveles de riesgo de resistencia: zonas de bajo riesgo de resistencia y zonas de alto riesgo.

a) Zonas de riesgo bajo: son aquellos sectores donde el número anual de brotes resistentes estimado fue de hasta 30 brotes.
b) Zonas de riesgo alto: son aquellos sectores donde el número anual de brotes resistentes estimado supera los 30 brotes.

La zonificación de las ACS en mar y los sectores en agua dulce en base al riesgo de presentar brotes resistentes según lo propuesto en este documento, debiera permitir focalizar de mejor manera los recursos para los planes de vigilancia y control de la resistencia que se diseñen e implementen en el futuro, así como de la toma de decisiones relativas a la producción y salud de peces.

Categorización de las áreas de cultivo de salmónidos según Score de resistencia

Para categorizar las zonas se creó un score de resistencia para cada aislado bacteriano, basado en su perfil de resistencia, en el que se asignó puntaje según la presentación o no de resistencia, susceptibilidad intermedia o susceptibilidad de las bacterias estudiadas frente a 5 de los 6 antimicrobianos analizados, vale decir, florfenicol, oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina y amoxicilina (se excluyó a la eritromicina debido a la resistencia natural de *P. salmonis* y *F. psychrophilum* frente a esta). En este sistema, por cada antibiótico al que el aislado fue resistente se le asigno un puntaje de 1, y por cada antibiótico al que presentó susceptibilidad intermedia se le dio un puntaje de 0,5 puntos. Los antibióticos a los que la bacteria fue susceptible no sumaron puntaje. De esta manera, a modo de ejemplo, un aislado que en su perfil de resistencia fue resistente a 3 antibióticos, presentó susceptibilidad intermedia a 1, y fue susceptible a 1 antimicrobiano obtendría un score de resistencia de 3,5 puntos. En consecuencia, el score puede adoptar valores de entre 5 (aislado resistente a todos los antibióticos evaluados) y 0 (aislado susceptible a todos los antibióticos evaluados).

Una vez estimado este score para cada aislado, se procedió a estimar el score para cada ACS o sector de agua dulce, en base al valor promedio de los scores de los aislados presentes en dicha zona. Posteriormente, se realizó la categorización de las zonas en base a los valores así obtenidos.

Los aislados considerados para realizar esta categorización fueron aquellos de *F. psychrophilum* en los sectores de agua dulce y *P. salmonis* en las ACS, aislados entre los años 2009-2010. Se consideró sólo a estos dos patógenos debido a que representan a la mayoría de los aislados obtenidos en terreno, y por ende, pueden entregar una mejor representación del fenómeno, además de ser los principales patógenos bacterianos del sector.

Categorización de zonas

En base a los valores de score observados se generaron tres categorías de ACS:

a) Zona de resistencia baja: son aquellas ACS con un score de resistencia de entre 0 y 1.
b) Zona de resistencia media: son aquellas ACS con un score de resistencia de entre 1 y 2.
c) Zona de resistencia alta: son aquellas ACS con un score de resistencia de entre de entre 2 y 5.

Propuesta de Sistema de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura

Las secciones que componen el sistema de vigilancia de la resistencia bacteriana, son las siguientes:

a) Obtención de las muestras y campañas de muestreo.

Considerando que de acuerdo a la reglamentación oficial emanada de los programas de vigilancia sanitarios del Reglamento Sanitario para la Acuicultura (RESA), y en los que de manera sistemática se deben efectuar muestreos obligatorios de ejemplares de peces, en que se hace obligatorio el generar antibiogramas previo o inmediatamente después de iniciar un tratamiento frente a un brote de enfermedades en un centro de cultivo, se propone que del 100% del total de dichos muestreos realizados al mes, el 25% debe ser destinado para análisis del programa oficial de vigilancia de la resistencia bacteriana.

Sin perjuicio de lo anterior, las muestras para efectos de cubrir los requerimientos del presente programa, no debiesen ser superiores a 100 unidades mensuales.

Además de la dinámica de muestras que genere esa fuente, se considera pertinente hacer un seguimiento especial de muestreos, en aquellas zonas en que se haya descrito niveles altos de resistencia en el tiempo. La profundidad y temporalidad de dichos seguimientos especiales, deberá definirse en su momento, considerando factibilidades técnicas y operativas.

Los muestreos deben ser ejecutados por personal capacitado en el área de salud de la empresa salmonera.

Todo muestreo contemplará la extracción de 15 unidades de pescado de la mortalidad fresca o moribundos (se descartan los peces de baja condición, inadaptados o deformes) como total del centro, y proveniente de una o varias jaulas consideradas en el momento del muestreo, como jaulas sospechosas o causantes de alguna alza de mortalidad asociada a un patógeno. Estas deben llegar al laboratorio debidamente rotuladas, en contenedores o cajas con algún medio que asegure que la muestra permanecerá bajo los 8ºC, y dentro de 24 horas desde el momento de toma de la muestra.

Una vez definido un muestreo por parte de la empresa dentro de un área considerada con alta

resistencia, debe dar aviso inmediato al laboratorio con el fin de preparar la recepción de la muestra.

Los muestreos generales, se deberán acordar respecto de asegurar que sean representativos de todas las zonas bajo vigilancia, de modo que en un periodo al menos tres meses, se hayan cubierto la totalidad de las zonas.

Por su parte, los muestreos dirigidos a las zonas de mayor resistencia se efectuaran de manera coordinada en plazos de 3 meses como máximo, de forma que en ese lapso, la totalidad de dichos muestreos se haya cubierto.

La entidad que ejecute el programa de vigilancia respectiva, deberá coordinarse con los laboratorios de servicios para obtener el porcentaje de muestras previamente descrito, y sobre la base de los análisis solicitados por las empresas productoras. Por su parte, los muestreos dirigidos para hacer seguimientos especiales, serán responsabilidad de la entidad ejecutora del programa.

b) Ejecución de los análisis de susceptibilidad antimicrobiana

Para efectos de llevar a cabo los análisis de susceptibilidad antimicrobiana, vale decir, definir los perfiles y niveles de resistencia bacteriana, a través de antibiogramas y CMI (Concentraciones Mínimas Inhibitorias), se considera prioritario que dicho trabajo sea efectuado por una unidad de verificación oficial y validada por la autoridad, con independencia en todo ámbito, y que no preste servicios comerciales de ese tipo a la industria. Adicionalmente, por el tipo de trabajo y procedimientos que deben aplicarse, dicha unidad no puede tener como prioridad el lucro, en razón de que estos análisis no representan un gran negocio desde el punto de vista de servicios.

De manera preliminar, y de acuerdo a definiciones que deben tomarse entre las partes involucradas, se propone a la Unidad de Referencia de Resistencia Bacteriana que está estableciendo IFOP en Puerto Montt, como dicho laboratorio de verificación.

c) Entrega de resultados y análisis

La entrega de resultados y análisis respectivos se entregaran de manera trimestral a la autoridad, no obstante, dado el Sistema de Información Geográfico, SIG, que está disponible a través del presente proyecto, es posible efectuar consultas particulares de manera

inmediata, por parte de quienes se considere pertinente que tengan acceso a dicho sistema.

d) Otros antecedentes

Se considera pertinente además, la creación de un Comité Consultivo especifico para estos efectos, que pueda generar lineamientos específicos sobre la base de los análisis de mediano largo plazo que se vayan generando, al menos con reuniones de carácter semestral. Dicho comité debiese ser compuesto por los representantes de la autoridad y expertos en la materia a definir y consensuar.

Dado que la dinámica del fenómeno de la resistencia bacteriana no es estática, no es factible a priori establecer las zonas de mayor interés, por lo que se propone el presente modelo de monitoreo adaptable, y de acuerdo a los cambios en los perfiles y niveles de categorías que vayan dándose en el tiempo, dentro de las zonas de estudio.

La forma en que los resultados y análisis se expresan a los usuarios del sistema implementado, se detallan a continuación:

- Base de datos georreferenciada por zona definida: esta contiene la información del estado de la resistencia para cada patógeno por diferentes niveles de referencia (ej: Agrupación de Concesiones de Salmonicultoras, o por región geopolítica, o por tipo de agua, etc.), siendo este una base de datos dinámica que puede responder a las necesidades del consultor.
- Sistema de información geográfica (S.I.G.): La compilación de toda la información cartográfica base permite contar con un Sistema de Información Geográfica actualizado, escalable, centralizado y multipropósito.
- Sistema de Alerta Temprana frente a la evolución de resistencia bacteriana patógena: Establece la relación entre las bases de información de cada zona generada en el sistema de información geográfica y un sistema de alerta temprana, con el fin de indicar eventuales cambios en la resistencia de los diferentes patógenos, e implementar medidas de control y prevención de la misma.

La información generada, sirve para obtener bases de datos que por su estructura pueden ser trabajadas por Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultoras, ACS (“Barrios”), por fechas de

muestreo, por áreas geográficas, especie de cultivo, empresa, tipo de agua, etc.

Para el caso especifico de los perfiles de resistencia, se creó una base de datos relacional "madre" que contiene toda la información histórica por barrios desde septiembre del 2006 a la fecha, la que en sus campos cuenta con la información del estado de la resistencia para cada patógeno analizado en este estudio.

A N E X O 6

Memoria de cálculo costeo de propuesta de programa de monitoreo oficial

Anexo 7: Memoria de cálculo costeo propuesta de monitoreo

Centro de actividad		HH				
		Unidad	Valor	Consumo	Costo	Detalle
Productores	Toma de muestra regular	$/hr	2.200	12	26.400	Considera valor HH de operario. Se consideran 4 personas trabajando 3 horas
	Empaque de muestra (4°C)	$/hr	5.938	0,5	2.969	Considera valor HH de profesional. Se consideran 1 personas trabajando 0.5 horas
	Envio de muestra	$/hr	5.938	1	5.938	Considera valor HH de profesional. Se consideran 1 personas trabajando 1 horas
	Analisis de información	$/hr	33.750	2	67.500	Considera valor HH de gerencia ($15.625) + jefe operaciones ($9.375) y jefe centro ($8.750). Se considera trabajo de 2 horas de este equipo
Laboratorios	Recepción de muestra	$/hr	3.500	0,5	1.750	Considera valor HH de técnico. Se consideran 1 personas trabajando 0.5 horas
	Preparación de aislamiento	$/hr	5.938	1,0	5.938	Considera valor HH de laboratorista. Se consideran 1 personas trabajando 1 horas
IFOP	Retiro de contramuestra a IFOP	$/hr	3.500	1	3.500	Considera valor HH de técnico. Se consideran 1 personas trabajando 1 horas
	Recibe contramuestra	$/hr	3.500	1	3.500	Considera valor HH de técnico. Se consideran 1 personas trabajando 1 horas
	Elaboración de antibiograma patógeno 1	$/análisis	23.205	1	23.205	Considera HH destinadas por análisis de un profesional. Dedicación exclusiva al análisis de 362 muestras
	Elaboración de antibiograma patógeno 2	$/análisis	23.205	1	23.205	Considera HH destinadas por análisis de un profesional. Dedicación exclusiva al análisis de 362 muestras
	Elaboración de antibiograma patógeno 3	$/análisis	23.205	1	23.205	Considera HH destinadas por análisis de un profesional. Dedicación exclusiva al análisis de 362 muestras
	Elaboración de antibiograma patógeno 4	$/análisis	23.205	1	23.205	Considera HH destinadas por análisis de un profesional. Dedicación exclusiva al análisis de 362 muestras
	Elaboración de antibiograma patógeno 5	$/análisis	23.205	1	23.205	Considera HH destinadas por análisis de un profesional. Dedicación exclusiva al análisis de 362 muestras
	Análisis de la información	$/hr	14.688	1	14.688	Considera valor HH jefe departamento ($8750) y profesional ($5.938) técnicos. Se considera trabajo de 1 hora de este equipo
	Incorporar información al SIG	$/hr	11.050	1	11.050	Considera valor HH de profesional. Se considera 1 persona trabajando 1 horas
	elaboración de informe trimestral	$/hr	26.564	0,56	14.876	Considera valor HH jefe departamento ($8750) y 3 profesional ($5.938) . Se considera el 1.4% del trabajo de 5 días por 8 horas
	Toma de muestra especial (lejano)	$/hr	3.500	32	112.000	Considera valor HH de técnico. Se consideran 1 personas trabajando 32 horas
	Toma de muestra especial (intermedio)	$/hr	3.500	8	28.000	Considera valor HH de técnico. Se consideran 1 personas trabajando 8 horas
	Toma de muestra especial (cercano)	$/hr	3.500	3	10.500	Considera valor HH de técnico. Se consideran 1 personas trabajando 3 horas
	Aislamiento de muestra	$/análisis	13.923	1	13.923	Se considera el 60% del costo de elaboración de un antibiograma
Sernapesca	Revision de la información	$/hr	5.938	1	5.938	Considera valor HH de profesional. Se consideran 1 personas trabajando 1 horas
	Análisis de información	$/hr	31.875	1	31.875	Considera valor HH jefe departamento ($11.250) y 3 profesional ($6875). Se considera trabajo de 1 hora de este equipo
	Toma de decisiones	$/hr	31.875	1	31.875	Considera valor HH jefe departamento ($11.250) y 3 profesional ($6875). Se considera trabajo de 1 hora de este equipo

Centro de actividad		Insumos				
		Unidad	Valor	Consumo	Costo	Detalle
Productores	Toma de muestra regular					
	Empaque de muestra (4°C)	unidad	4.300	1	4.301	Se considera caja de ailapol de 70 lb más 4 gelpack
	Envio de muestra					
	Analisis de información					
Laboratorios	Recepción de muestra					
	Preparación de aislamiento	$/unidad	3.000	1	3.000	materiales varios
IFOP	Retiro de contramuestra a IFOP	$/viaje	4.000	1	4.000	Combustible para 1 hora
	Recibe contramuestra					
	Elaboración de antibiograma patógeno 1	$/análisis	4.095	1	4.095	Materiales indicados por especialista para dicho análisis
	Elaboración de antibiograma patógeno 2	$/análisis	1.021	1	1.021	Materiales indicados por especialista para dicho análisis
	Elaboración de antibiograma patógeno 3	$/análisis	1.266	1	1.266	Materiales indicados por especialista para dicho análisis
	Elaboración de antibiograma patógeno 4	$/análisis	1.752	1	1.752	Materiales indicados por especialista para dicho análisis
	Elaboración de antibiograma patógeno 5	$/análisis	1.209	1	1.209	Materiales indicados por especialista para dicho análisis
	Análisis de la información					
	Incorporar información al SIG					
	elaboración de informe trimestral	$/informe	20.000	1,4%	278	1.4% del costo de materiales de 1 informe
	Toma de muestra especial (lejano)	$/viaje	100.000	1	100.000	60.000 combustible + 40.000 materiales
	Toma de muestra especial (intermedio)	$/viaje	82.000	1	82.000	60.000 combustible + 22.000 materiales
	Toma de muestra especial (cercano)	$/viaje	37.000	1	37.000	15.000 combustible + 22.000 materiales
	Aislamiento de muestra	$/análisis	1.121	1	1.121	60% del costo promedio de elaboración de antibiograma
Sernapesca	Revision de la información					
	Análisis de información					
	Toma de decisiones					

Centro de actividad		Uso equipos e infraesructura				
		Unidad	Valor	Consumo	Costo	Detalle
Productores	Toma de muestra regular					
	Empaque de muestra (4°C)					
	Envio de muestra	$/envio	6.569	2	13.138	1 hora de bote equipado ($2.168) con 2 operios ($2.200). Por 2 horas
	Analisis de información	$/hr-persona	129	8	1.030	Cálculo según detalle, 8 horas de uso
Laboratorios	Recepción de muestra	$/hr-persona	129	0,5	64	Cálculo según detalle, 0.5 horas de uso
	Preparación de aislamiento	$/hr-persona	515	1	515	Cálculo según detalle evaluado al 400%, 1 horas de uso
IFOP	Retiro de contramuestra a IFOP	$/hr	890	1	890	Uso camioneta calculado con $13.000.000 a 5 años de uso
	Recibe contramuestra	$/hr-persona	129	1	129	Cálculo según detalle, 1 horas de uso
	Elaboración de antibiograma patógeno 1	$/análisis	17.017	1	17.017	Cálculo según detalle para 362 análisis, más un 10%
	Elaboración de antibiograma patógeno 2	$/análisis	17.017	1	17.017	Cálculo según detalle para 362 análisis, más un 10%
	Elaboración de antibiograma patógeno 3	$/análisis	17.017	1	17.017	Cálculo según detalle para 362 análisis, más un 10%
	Elaboración de antibiograma patógeno 4	$/análisis	17.017	1	17.017	Cálculo según detalle para 362 análisis, más un 10%
	Elaboración de antibiograma patógeno 5	$/análisis	17.017	1	17.017	Cálculo según detalle para 362 análisis, más un 10%
	Análisis de la información	$/hr-persona	129	3	386	Cálculo según detalle, 3 horas de uso
	Incorporar información al SIG	$/análisis	5.617	1	5.617	Cálculo según detalle, 1 horas de uso
	elaboración de informe trimestral	$/hr-persona	129	0,56	72	Considera valor jefe departamento y 3 profesiona . Se considera el 1.4% del trabajo de 5 días por 8 horas
	Toma de muestra especial (lejano)	$/hr	890	32	28.493	Uso camioneta calculado con $13.000.000 a 5 años de uso
	Toma de muestra especial (intermedio)	$/hr	890	8	7.123	Uso camioneta calculado con $13.000.000 a 5 años de uso
	Toma de muestra especial (cercano)	$/hr	890	3	2.671	Uso camioneta calculado con $13.000.000 a 5 años de uso
	Aislamiento de muestra	$/análisis	10.210	1	10.210	60% del costo de elaboración de antibiograma
Sernapesca	Revision de la información	$/hr-persona	129	4	516	Cálculo según detalle, 1 horas de uso 4 personas
	Análisis de información	$/hr-persona	129	4	516	Cálculo según detalle, 1 horas de uso 4 personas
	Toma de decisiones	$/hr-persona	129	4	516	Cálculo según detalle, 1 horas de uso 4 personas

Centro de actividad		**Servicios**				
		Unidad	Valor	Consumo	Costo	Detalle
Productores	Toma de muestra regular					
	Empaque de muestra (4°C)					
	Envio de muestra					
	Analisis de información	$/hr-persona	323	8	2.584	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 8 horas
Laboratorios	Recepción de muestra	$/hr-persona	323	0,5	162	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 8 horas
	Preparación de aislamiento	$/hr-persona	323	1,00	323	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 8 horas
IFOP	Retiro de contramuestra a IFOP					
	Recibe contramuestra	$/hr-persona	323	1	323	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 8 horas
	Elaboración de antibiograma patógeno 1	$/análisis	1.714	1	1.714	Consumo de un laboratorio distribuído en 362 muestras
	Elaboración de antibiograma patógeno 2	$/análisis	1.714	1	1.714	Consumo de un laboratorio distribuído en 362 muestras
	Elaboración de antibiograma patógeno 3	$/análisis	1.714	1	1.714	Consumo de un laboratorio distribuído en 362 muestras
	Elaboración de antibiograma patógeno 4	$/análisis	1.714	1	1.714	Consumo de un laboratorio distribuído en 362 muestras
	Elaboración de antibiograma patógeno 5	$/análisis	1.714	1	1.714	Consumo de un laboratorio distribuído en 362 muestras
	Análisis de la información	$/hr-persona	323	3	969	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 3 horas
	Incorporar información al SIG	$/hr-persona	323	1	323	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 1 horas
	elaboración de informe trimestral	$/hr-persona	323	0,56	181	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo..56 horas
	Toma de muestra especial (lejano)	$/viaje	170.000	1	170.000	Pasaje aereo más transfer
	Toma de muestra especial (intermedio)	$/viaje	30.000	1	30.000	Transbordador Canal Chacao
	Toma de muestra especial (cercano)					
	Aislamiento de muestra	$/análisis	1.028	1	1.028	60% del costo de elaboración de antibiograma
Sernapesca	Revision de la información	$/hr-persona	323	4	1.292	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 4horas
	Análisis de información	$/hr-persona	323	4	1.292	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 4horas
	Toma de decisiones	$/hr-persona	323	4	1.292	Consumo promedio de servicios tomando como base una oficina tipo. 4horas

calculo costo infraestructura por persona

	cantidad	valor individual	Total	Vida útil (años)	costo uso hora
Equipos	1	400.000	400.000	3	46
Muebles	1	200.000	200.000	5	14
Infra (m2)	9	450.000	4.050.000	20	69
					129

Infraestructura laboratorio IFOP

	cantidad	valor individual	Total	Vida útil (años)	costo uso hora
Cámara	1	8.000.000	8.000.000	5	1.600.000
Incubadoras	3	3.000.000	9.000.000	5	1.800.000
Secador	1	2.000.000	2.000.000	5	400.000
Micros/lupa	1	7.000.000	7.000.000	5	1.400.000
Varios	1	2.000.000	2.000.000	5	400.000
				Total	5.600.000
				Por análisis	15.470
				más 10%	17.017

Laboratorio SIG

	cantidad	valor individual	Total	Vida útil (años)	costo uso hora
Hardware	1	1.000.000	1.000.000	3	333.333
software	1	10.850.000	10.850.000	3	3.616.667
plotter y otros	1	6.000.000	6.000.000	3	2.000.000
Otros	1	450.000	450.000	3	150.000
				Total	6.100.000
				33% del uso	2.033.333
				Por análisis	5.617

Resumen por centros de costo

		Generador de Costo															
Centro de actividad	Actividades	HH				Insumos				Uso equipos e Infraestructura				Servicios				Costo total
		Unidad	Valor	Consumo	Costo	Unidad	Valor	Consumo	Costo	Unidad	Valor	Consumo	Costo	Unidad	Valor	Consumo	Costo	
Productores	Toma de muestra regular	$/hr	2.200	12	26.400													26400
	Empaque de muestra (4°C)	$/hr	5.938	1	2.969	unidad	4.300	1	4.301									7.270
	Envio de muestra	$/hr	5.938	1	5.938					$/envio	6.569	2	13.138					19.076
	Analisis de información	$/hr	33.750	2	67.500					$/hr-persona	129	8	1.030	$/hr-persona	323	8	2.584	71.114
	Administrativos (15%)																	
	Costo Total																	-
Laboratorios	Recepción de muestra	$/hr	3.500	0,5	1.750					$/hr-persona	129	0,5	64	$/hr-persona	323	0,5	162	1.976
	Preparación de aislamiento	$/hr	5.938	1,0	5.938	$/unidad	3.000	1	3.000	$/hr-persona	515	1	515	$/hr-persona	323	1,00	323	9.776
	Administrativos (15%)																	
	Costo Total																	-
IFOP	Retiro de contramuestra a IFOP	$/hr	3.500	1	3.500	$/viaje	4.000	1	4.000	$/hr	890	1	890					8.390
	Recibe contramuestra	$/hr	3.500	1	3.500					$/hr-persona	129	1	129	$/hr-persona	323	1	323	3.952
	Elaboración de antibiograma patógeno 1	$/análisis	23.205	1	23.205	$/análisis	4.095	1	4.095	$/análisis	17.017	1	17.017	$/análisis	1.714	1	1.714	46.031
	Elaboración de antibiograma patógeno 2	$/análisis	23.205	1	23.205	$/análisis	1.021	1	1.021	$/análisis	17.017	1	17.017	$/análisis	1.714	1	1.714	42.957
	Elaboración de antibiograma patógeno 3	$/análisis	23.205	1	23.205	$/análisis	1.266	1	1.266	$/análisis	17.017	1	17.017	$/análisis	1.714	1	1.714	43.202
	Elaboración de antibiograma patógeno 4	$/análisis	23.205	1	23.205	$/análisis	1.752	1	1.752	$/análisis	17.017	1	17.017	$/análisis	1.714	1	1.714	43.688
	Elaboración de antibiograma patógeno 5	$/análisis	23.205	1	23.205	$/análisis	1.209	1	1.209	$/análisis	17.017	1	17.017	$/análisis	1.714	1	1.714	43.145
	Análisis de la información	$/hr	14.688	1	14.688					$/hr-persona	129	3	386	$/hr-persona	323	3	969	16.043
	Incorporar información al SIG	$/hr	11.050	1	5.938					$/análisis	16.667	1	16.667	$/hr-persona	323	1	323	16.990
	elaboración de informe trimestral	$/hr	26.564	0,56	14.876	$/informe	20.000	1,4%	278	$/hr-persona	129	0,56	72	$/hr-persona	323	0,56	181	15.407
	Toma de muestra especial (lejano)	$/hr	3.500	32	112.000	$/viaje	100.000	1	100.000	$/hr	890	32	28.493	$/viaje	170.000	1	170.000	410.493
	Toma de muestra especial (intermedio)	$/hr	3.500	8	28.000	$/viaje	82.000	1	82.000	$/hr	890	8	7.123	$/viaje	30.000	1	30.000	147.123
	Toma de muestra especial (cercano)	$/hr	3.500	3	10.500	$/viaje	37.000	1	37.000	$/hr	890	3	2.671					50.171
	Aislamiento de muestra	$/análisis	13.923	1	13.923	$/análisis	1.121	1	1.121	$/análisis	10.210	1	10.210	$/análisis	1.028	1	1.028	26.283
	admnitrativos (15%)																	
	Costo Total																	-
Sernapesca	Revision de la información	$/hr	5.938	1	5.938					$/hr-persona	129	4	516	$/hr-persona	323	4	1.292	7.746
	Análisis de información	$/hr	31.875	1	31.875					$/hr-persona	129	4	516	$/hr-persona	323	4	1.292	33.683
	Toma de decisiones	$/hr	31.875	1	31.875					$/hr-persona	129	4	516	$/hr-persona	323	4	1.292	33.683
	admnitrativos (15%)																	
	Costo Total																	-
																		1.124.599

		Asignación de los costos de las actividades a los productos										
Centro de actividad	Actividades	Brote					Muestreo dirigido					
		P-N	F-N	O-N	PN-N	S-N	P-E	F-E	O-E	PN-E	S-E	
Productores	Toma de muestra regular	26.400	26.400	26.400	26.400	26.400	26.400	26.400	26.400	26.400	26.400	
	Empaque de muestra (4°C)	7.270	7.270	7.270	7.270	7.270	7.270	7.270	7.270	7.270	7.270	
	Envio de muestra	19.076	19.076	19.076	19.076	19.076	19.076	19.076	19.076	19.076	19.076	
	Analisis de información	71.114	71.114	71.114	71.114	71.114	71.114	71.114	71.114	71.114	71.114	
	Administrativos (15%)	18.579	18.579	18.579	18.579	18.579	18.579	18.579	18.579	18.579	18.579	
	Costo Total	142.439	142.439	142.439	142.439	142.439	142.439	142.439	142.439	142.439	142.439	
Laboratorios	Recepción de muestra	1.976	1.976	1.976	1.976	1.976						
	Preparación de aislamiento	9.776	9.776	9.776	9.776	9.776						
	Administrativos (15%)	1.763	1.763	1.763	1.763	1.763						
	Costo Total	13.514	13.514	13.514	13.514	13.514	-	-	-	-	-	
IFOP	Retiro de contramuestra a IFOP	8.390	8.390	8.390	8.390	8.390	8.390	8.390	8.390	8.390	8.390	
	Recibe contramuestra	3.952	3.952	3.952	3.952	3.952	3.952	3.952	3.952	3.952	3.952	
	Elaboración de antibiograma patógeno 1	46.031					46.031					
	Elaboración de antibiograma patógeno 2		42.957					42.957				
	Elaboración de antibiograma patógeno 3			43.202					43.202			
	Elaboración de antibiograma patógeno 4				43.688					43.688		
	Elaboración de antibiograma patógeno 5					43.145					43.145	
	Análisis de la información	16.043	16.043	16.043	16.043	16.043	16.043	16.043	16.043	16.043	16.043	
	Incorporar información al SIG	16.990	16.990	16.990	16.990	16.990	16.990	16.990	16.990	16.990	16.990	
	elaboración de informe trimestral	15.407	15.407	15.407	15.407	15.407	15.407	15.407	15.407	15.407	15.407	
	Toma de muestra especial (lejano)											
	Toma de muestra especial (intermedio)						200.570	200.570	200.570	200.570	200.570	
	Toma de muestra especial (cercano)											
	Aislamiento de muestra						26.283	26.283	26.283	26.283	26.283	
	adminitrativos (15%)	16.022	15.561	15.598	15.670	15.589	50.050	49.589	49.626	49.698	49.617	
	Costo Total	122.835	119.300	119.582	120.140	119.516	383.716	380.180	380.462	381.021	380.397	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sernapesca	Revision de la información	7.746	7.746	7.746	7.746	7.746	7.746	7.746	7.746	7.746	7.746	
	Análisis de información	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	
	Toma de decisiones	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	33.683	
	adminitrativos (15%)	11.267	11.267	11.267	11.267	11.267	11.267	11.267	11.267	11.267	11.267	
	Costo Total	86.379	86.379	86.379	86.379	86.379	86.379	86.379	86.379	86.379	86.379	

												TOTAL
	Costo unitario por producto	365.167	361.632	361.913	362.472	361.848	612.533	608.998	609.279	609.838	609.214	
	N° evaluaciones	180	81	10	10	9	45	20	3	2	2	362
	Costo total del programa	65.730.007	29.292.160	3.619.134	3.624.723	3.256.630	27.563.978	12.179.955	1.827.838	1.219.677	1.218.428	149.532.529
	Costo a financiar del programa	37.658.473	16.659.970	2.059.604	2.065.193	1.853.054	21.154.245	9.331.185	1.400.523	934.800	933.551	94.050.596

A N E X O 7

Programa de presentaciones del taller final

TALLER FINAL PROYECTO:
VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA BACTERIANA EN LA SALMONICULTURA

26 de mayo 2011 – Salón Austral - Hotel Gran Pacífico - Puerto Montt

- **OBJETIVOS**

1. Conocer los resultados del proyecto y sus proyecciones.

2. Discutir y complementar dichos antecedentes, conociendo la posición de los representantes de la industria al respecto.

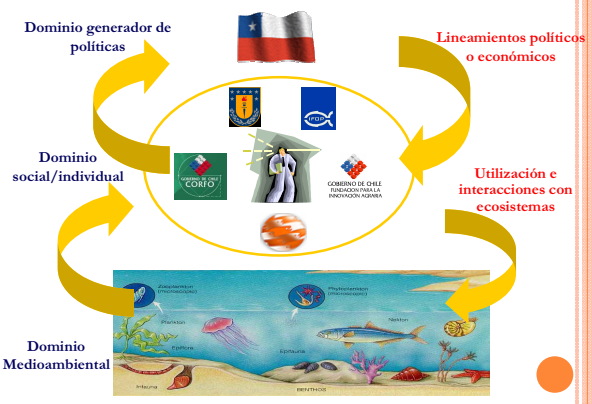
- **PROGRAMA**

HORARIO	TEMATICA	RELATOR
10:20 - 10:40	Bienvenida - Objetivos - Proyecto	Sergio Contreras
10:45 – 11:05	Metodología y resultados de campañas de muestreo y aislamiento	Juan Carlos Quintanilla
11:10 – 11:55	Resultados y análisis de perfiles y niveles de resistencia bacteriana	Sergio Contreras Claudio Miranda
12:00 – 12:20	Zonificación y caracterización de los resultados: Scores de resistencia bacteriana	Tadaishi Yatabe
12:25 – 12:45	Sistema de Información Geográfico (SIG) asociado al monitoreo de la Resistencia Bacteriana	Christian Espinoza
12:50 – 13:10	Propuesta de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura	Sergio Contreras
13:15	Cocktail de camaradería	

VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA BACTERIANA EN LA SALMONICULTURA

FIP 2008-65

Departamento de Salud Hidrobiológica

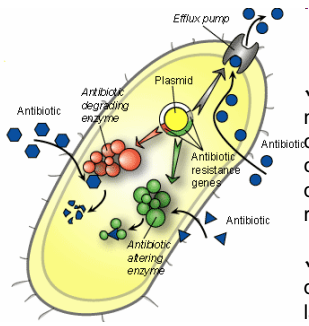


Características de la investigación de rol público

- Cautela el bien común
- Autónoma e independiente
- Sistemática y especializada
- Entrega el conocimiento e información para la administración del sector
- Generalmente con productos o resultados no apropiables

La investigación sanitaria en acuicultura

- Investigación sobre agentes patógenos, aspectos epidemiológicos, sus factores y dinámica.
- Investigación y generación de información relevante para la regulación del uso de fármacos, vacunas y otros compuestos químicos que eventualmente puedan ingresar al medio acuático.
- Investigación, monitoreos y diagnósticos en tópicos sanitarios para la generación y evaluación de normas, en apoyo a la toma de decisiones para la administración de la acuicultura.



Resistencia bacteriana

(Resistencia adquirida o extrínseca)

✓ Especies bacterianas, normalmente susceptibles a ciertos fármacos, expresan cambios a través de diferentes mecanismos, que revierten esa condición.

✓ Pérdida de la capacidad del fármaco de tratar o curar la enfermedad causada por dicho patógeno.

Fuente: Bacterial Resistance to Antibiotics. The Microbial World. Lectures in Microbiology by Kenneth Todar PhD. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology. © 2009 Kenneth Todar PhD

Fuente: http://www.offthemarkcartoons.com/cartoons/2000-08-24.gif

Proyectos IFOP en el ámbito de la resistencia bacteriana

- INNOVA - Implementación de un sistema de alerta temprana asociado al monitoreo de la resistencia bacteriana en la actividad salmonicultora de la Región de Los Lagos.
- FIP - Vigilancia de la resistencia bacteriana en la industria salmonicultora.
- INNOVA - Estandarización de metodologías para la determinación de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos de especies bacterianas patógenas presentes en el cultivo de salmones en Chile.

OBJETIVOS

- **General**

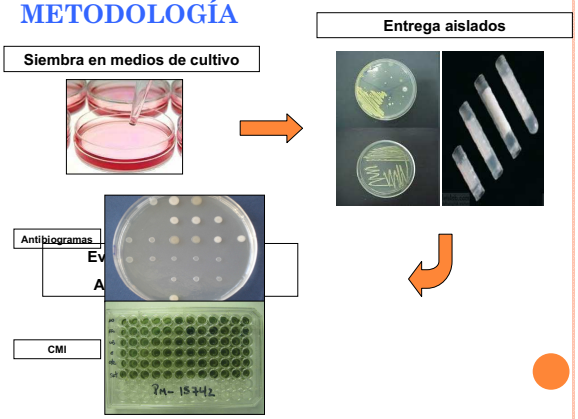
Optimizar la utilización de los antimicrobianos en la salmonicultura, mediante la evolución de resultados del monitoreo de la resistencia en bacterias patógenas para el salmón.

OBJETIVOS

- **Específicos**
  - Determinar la distribución y cuantificación de residuos de oxitetraciclina, florfenicol, eritromicina, amoxicilina y flumequina, así como la distribución y cuantificación de bacterias patógenas de salmones resistente a estas sustancias en zonas de cultivo.
  - Confeccionar un manual para médicos veterinarios (y administradores de centros de cultivo) de procedimientos estandarizados que tienda a reducir (o de las pautas para) el uso de antibióticos en la producción de salmones.
  - Establecer las bases para instaurar en forma permanente un programa de monitoreo sistemático y oficial de la resistencia bacteriana patógena de salmones que propenda a la disminución del uso de antibióticos.
  - Validar el sistema de monitoreo propuesto.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA



RESULTADOS GENERALES

- Durante el desarrollo del proyecto, efectuaron **siete campañas de muestreo** georreferenciado en centros de cultivos de salmones presentes en las regiones de Los Lagos y Aysén y cuya última campaña finalizó en noviembre de 2010.
- Se muestrearon **228** centros de cultivo, localizados en ambas regiones, y correspondiente a 24 de las 35 Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura (ACS) existentes.

RESULTADOS GENERALES

- El trabajo consideró el aislamiento de los siguientes patógenos: *Flavobacterium psychrophilum, Piscirickettsia salmonis, Vibrio ordalii, Streptococcus phocae, Aeromonas salmonicida y Yersinia ruckeri.*

- A partir de la totalidad de las muestras colectadas durante las campañas de muestreo como de aislamientos generados de servicios rutinarios en laboratorios, se ha logrado el aislamiento y la obtención del perfil de resistencia de un total de **272** aislados de los patógenos bajo estudio

APOYO

- Marine Farm
- Multiexport
- Ventisqueros
- Trusal
- Pacific Star
- AquaChile
- Camanchaca
- El Golfo
- Salmones Antártica
- Friosur
- Invertec
- Itata
- Cupquelan
- Intesal

¡¡ Gracias !!

PROYECTO FIP
2008-65

"Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura"

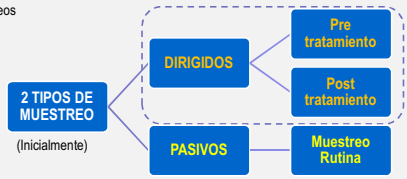
Metodología y resultados de las campañas de muestreo y aislamientos

Juan Carlos Quintanilla C., *M.V. - B.M.*
Investigador Departamento Salud Hidrobiológica, IFOP

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

a) Campañas y sitios de muestreo:

- ✓ Se realizaron 7 campañas de muestreo georreferenciados (3 meses c/u)
- ✓ 24 (ACS) + centros agua dulce: Región Los Lagos y Aysén
- ✓ Muestreos



- ✓ 2010: > prioridad ACS con mejor historial de aislamientos.

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

b) Muestreo de peces:

COORDINACIÓN
Empresa — IFOP
↓
MUESTREO (15 Ejemplares) * Placas
Moribundos — Mortalidad fresca
↓
TRANSPORTE (0 – 8° C)
Hielo escamas — Gelpack
↓
INGRESO LABORATORIO DIAGNÓSTICO - ADL
↓
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS

F. psychrophilum *P. salmonis* *V. ordalii* *Y. ruckeri* *A. salmonicida* *S. phocae*

ENSAYOS SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA (ADL - UCN)

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

b) Ingreso muestras laboratorio:

ADL Diagnostic Chile Ltda.

N° Caso: CA-3482

INFORME ENSAYOS DE LABORATORIO

Datos del Cliente:

Empresa	: IFOP	Nombre Centro	: C245
Dirección	: Blanco # 839 - Valparaíso	Código Centro	: NI
Contacto	: Mylena Menanteau	Ubicación	: NA
Programa	: Servicios Diagnósticos	Zona Semapesca	: Castro (Georeferenciados)

Datos de la Muestra:

N° Recepción	: 21059	Tipo Muestra	: Pez completo
Lugar Análisis	: CASTRO	Tipo Muestreo	: Dirigido
Estado Informe	: FINAL	N° Muestras	: 15
Especie	: Trucha	Fecha Muestreo	: 02/03/2011
Estadio	: Engorda	Fecha Recepción	: 02/03/2011
		Fecha Análisis	: 02/03/2011
Tipo Agua	: Agua Mar	Fecha Informe	: 19/03/2011
Lote	: NI		
Contenedor	: NI		

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

c) Toma de muestras para aislamiento:

OBTENCION DE MUESTRAS
Org. Internacionales (OIE) — INN – ISP - Sernapesca
↓
MUESTREO BACTERIOLOGICO EN PECES
Lesiones externas — órganos blanco (necropsia)
↓
ASAS ESTERILES (Técnica swabbing)
Medios específicos/patógeno — Ausencia de lesión: riñón
↓
INCUBACION DE PLACAS DE CULTIVO
↓
Desarrollo colonias, número
UFC, morfología, tamaño, bordes, pigmento, hemólisis, tinción de Gram, reacción oxidasa, catalasa y sensibilidad al agente Vibrioestático O-129

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

d) Órganos para muestreo bacteriológico y aislamiento:

Tejido / Medios Cultivo	Riñón	Hígado	Bazo	Aleta	Branquia	Cerebro	Lesión (si hay)	Observaciones
Peces Agua de Mar								
TSA	x	x	x					
TSA/S	x	x	x				x	
PSAgar	x	x	x			x	x	Lesión, SOLO si es interna
MAOA	x	x	x			x		SOLO ingresos recientes Estuario
Peces Agua dulce								
TSA	x						x	
MAOA	x		x	x	x		x	

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

e) Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana:

Amoxicicilina, Florfenicol, Oxitetraciclina, Flumequina y Acido oxolínico

Método de difusión de agar

- *Y. ruckeri*
- *S. phocae*
- *A. salmonicida*

- *F. psychrophilum* (diluido)
- *V. ordalii* (con 1,5% NaCl)
- *P. salmonis (ADL)*

Placas con agar Müeller-Hinton

Incubación de las placas a 22°C por 24-72 h (17°C)

CEPAS DE REFERENCIA

- *Escherichia coli (ATCC 25922)*
- *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)*
- *Staphylococcus aureus (ATCC)*
- *Enterococcus faecalis ATCC*
- *Aeromonas salmonicida subs. Salmonicida (ATCC 33658)*

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

e) Determinación niveles de susceptibilidad antimicrobiana:

Se determinaron niveles de resistencia (CMI) de los antibacterianos:
- **Gram (-):** Florfenicol, Oxitetraciclina; Flumequina, Acido Oxolínico
- **Gram (+):** Amoxicilina

Patrón de diluciones seriadas

Florfenicol	Oxitetraciclina	Flumequina	Acido Oxolínico	Amoxicilina
0,125 -256 µg/ml	0,125 -256 µg/ml	0,125 -256 µg/ml	0,125 -256 µg/ml	0,125 -256 µg/ml
MAE	MAE	MAE	MAE	MAE

Se inoculan placas en triplicado (10^4 UFC por inóculo) (-)

Incuban a 22℃ por 48 h

F. psychrophilum (4 días a 17℃) Schmidt *et al.*, 2000

CMI

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

f) Clasificación de los cuerpos de agua: a fin de agrupar cuerpos de agua

Cuerpos de agua (Los Lagos y Aysén)

Agua dulce

Agua de Mar

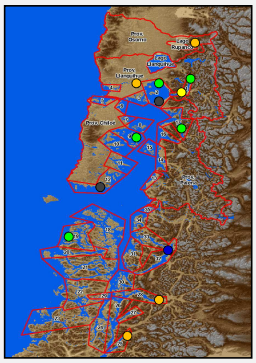
Chiloé | Continente | Lago Llanquihue | Lago Rupanco | ACS

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

✓ **Primera campaña de muestreo**
(Marzo – Mayo 2009)

Total: 34 aislados

- *F. psychrophilum:* 23,5%
- *P. salmonis:* 44,1%
- *V. ordalii:* 8,8%
- *S. phocae:* 17,6%
- *Y. ruckeri:* 5,9%

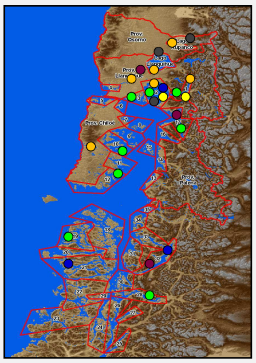


Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

✓ **Segunda campaña de muestreo**
(Junio – Agosto 2009)

Total: 54 aislados

- *F. psychrophilum:* 20,3%
- *P. salmonis:* 33,3%
- *V. ordalii:* 14,8%
- *S. phocae:* 13,0%
- *Y. ruckeri:* 9,3%
- *A. salmonicida:* 9,3%



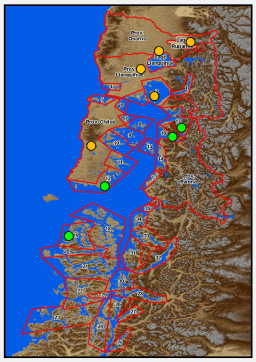
Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

✓ **Tercera campaña de muestreo**
(Septiembre – Noviembre 2009)

Total: 26 aislados

F. psychrophilum: 80,8%

P. salmonis: 19,2%



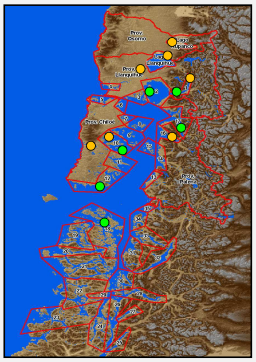
Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

✓ **Cuarta campaña de muestreo**
(Diciembre – Febrero 2010)

Total: 29 aislados

F. psychrophilum: 51,7%

P. salmonis: 48,3%



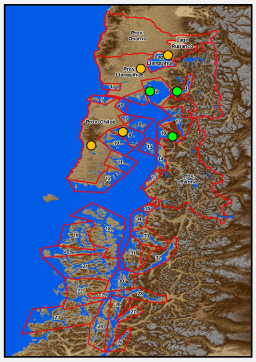
Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

✓ **Quinta campaña de muestreo**
(Marzo – Mayo 2010)

Total: 13 aislados

F. psychrophilum: 61,5%

P. salmonis: 38,5%



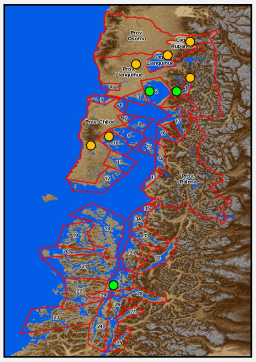
Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

✓ **Sexta campaña de muestreo**
(Junio – Agosto 2010)

Total: 49 aislados

F. psychrophilum: 79,6%

P. salmonis: 20,4%



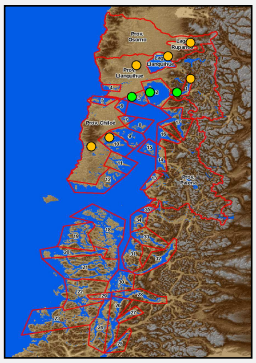
Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

✓ **Séptima campaña de muestreo**
(Septiembre – Noviembre 2010)

Total: 65 aislados

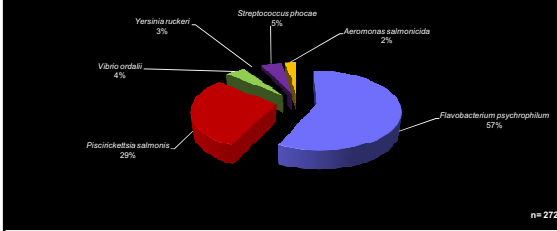
F. psychrophilum: 81,5%

P. salmonis: 18,5%



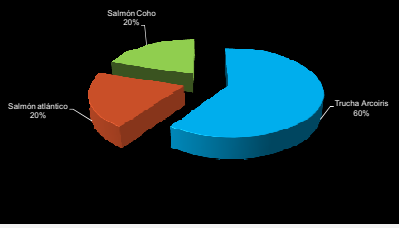
Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

Distribución del total de cepas aisladas según tipo de patógeno



Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

Distribución de centros muestreados según especie salmonídea



Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

Para ambas regiones (Los Lagos y Aysén), los resultados de aislamientos reflejan que la especie más prevalente y evaluada en agua de mar fue *Piscirickettsia salmonis (29%)*, mientras que para el caso de agua dulce fue *Flavobacterium psychrophilum (57%).*

PROYECTO FIP
2008-65

"Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura"

Metodología y resultados de las campañas de muestreo y aislamientos

Juan Carlos Quintanilla C., *M.V. - B.M.*
Investigador Departamento Salud Hidrobiológica, IFOP

Resultados y análisis de susceptibilidad a antimicrobianos de patógenos en la salmonicultura

Departamento de Salud Hidrobiológica
Instituto de Fomento Pesquero – IFOP

Laboratorio de Patobiología Acuática
Departamento de Acuicultura – Univ. Católica de Norte

Perfiles de Resistencia

Del total de 272 aislados a marzo de 2011:

155 (57%) *Flavobacterium psychrophilum*
79 (29%) *Piscirickettsia salmonis*
12 (4,4%) *Vibrio ordalii*
13 (4,8%) *Streptococcus phocae*
7 (2,6%) *Yersinia ruckeri*
6 (2,2%) *Aeromonas salmonicida*

Consideraciones

- Dados los diferentes *n* de aislados obtenidos a la fecha, tanto por patógeno, como por área, los únicos análisis relativamente respaldados que pueden efectuarse son los asociados a *P. salmonis y F. psychrophilum,* generalmente vinculados a los años 2009 y 2010.
- En consecuencia, toda conclusión que pueda derivarse de los siguientes resultados a presentar, debe considerar estos antecedentes.

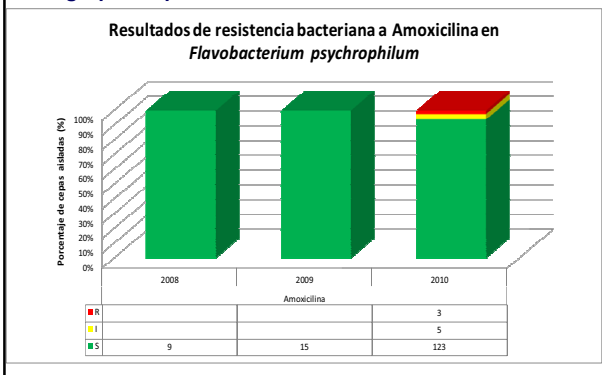
Perfiles de Resistencia

- *F. psychrophilum*:

- 33,9% presentó resistencia a ácido oxolínico
- 13,5% presentó resistencia a la flumequina
- 7,0% presentó resistencia a oxitetraciclina
- 3,9% presentó resistencia a florfenicol
- 1,9% presentó resistencia a amoxicilina

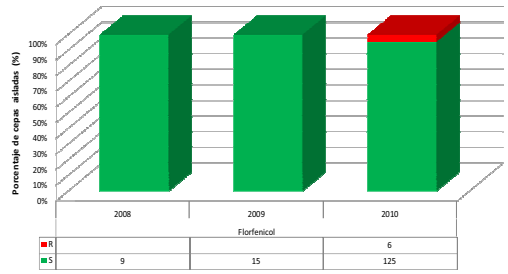
Resultados de perfiles de resistencia para *F. psychrophilum* agrupados por año

Agrupados por año



Agrupados por año

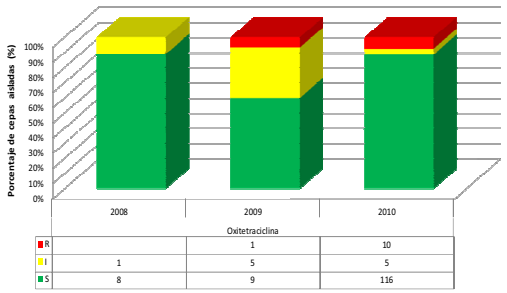
Resultados de resistencia bacteriana a Florfenicol en *Flavobacterium psychrophilum*



	2008	2009	2010
R			6
S	9	15	125

Agrupados por año

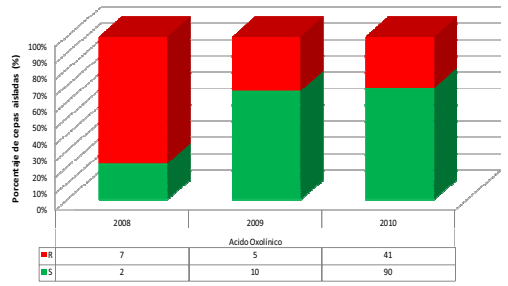
Resultados de resistencia bacteriana a Oxitetraciclina en *Flavobacterium psychrophilum*



	2008	2009	2010
R		1	10
I	1	5	5
S	8	9	116

Agrupados por año

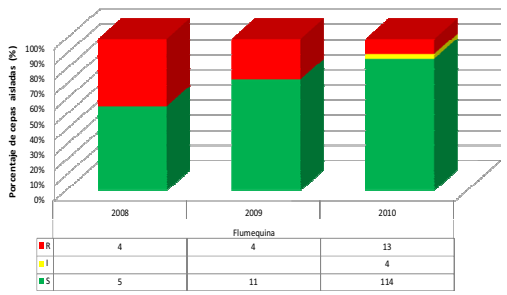
Resultados de resistencia bacteriana a Ácido Oxolínico en *Flavobacterium psychrophilum*



	2008	2009	2010
R	7	5	41
S	2	10	90

Agrupados por año

Resultados de resistencia bacteriana a Flumequina en *Flavobacterium psychrophilum*

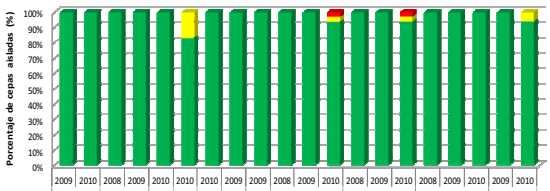


	2008	2009	2010
R	4	4	13
I			4
S	5	11	114

Resultados de perfiles de resistencia para *F. psychrophilum* según cuerpo de agua dulce

Agrupados por cuerpo de agua

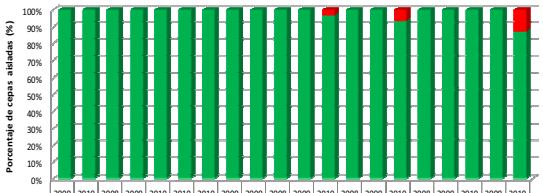
Resultados de resistencia bacteriana a Amoxicilina en *Flavobacterium psychrophilum*



	2009	2010	2008	2009	2010	2010	2010	2009	2009	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2009	2010
	ACS 1		ACS 2		ACS 10a	ACS 10b	ACS 16	ACS 25	ACS 28b	Agua dulce (Continente)			Agua dulce (L. Llanquihue)			Agua dulce (L. Rupanco)			Agua dulce (Chiloé)	
R												2			1					
I						1						2			1					1
S	1	5	1	1	2	5	1	2	1	6	6	57	1	2	29	1	1	9	1	15

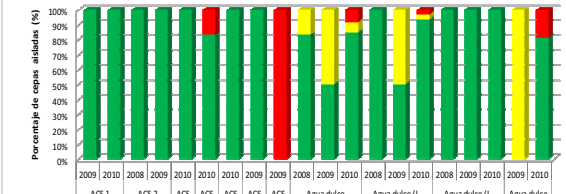
Agrupados por cuerpo de agua

Resultados de resistencia bacteriana a Florfenicol en *Flavobacterium psychrophilum*



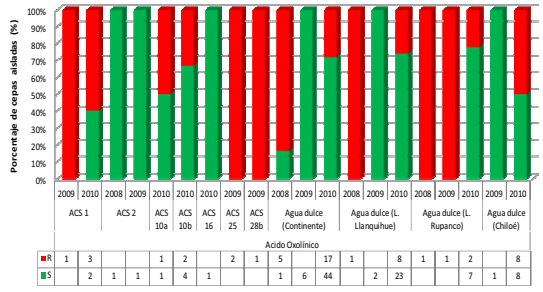
Agrupados por cuerpo de agua

Resultados de resistencia bacteriana a Oxitetraciclina en *Flavobacterium psychrophilum*



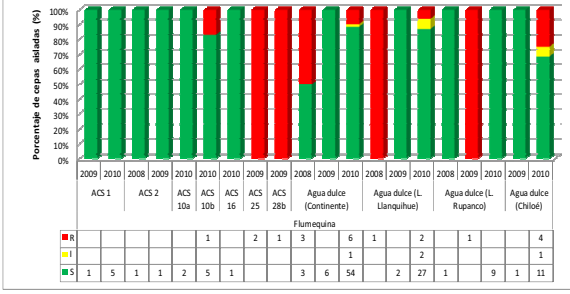
Agrupados por cuerpo de agua

Resultados de resistencia bacteriana a Ácido Oxolínico en *Flavobacterium psychrophilum*



Agrupados por cuerpo de agua

Resultados de resistencia bacteriana a Flumequina en *Flavobacterium psychrophilum*



Perfiles de Resistencia

- *Piscirickettsia salmonis:*

- 17,7% presentó resistencia a acido oxolínico (aumento en la resistencia en 5 ACS en el período 2009 – 2010).

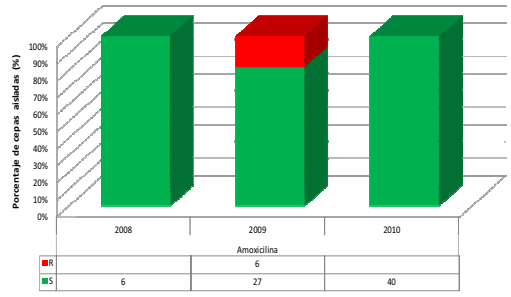
- 5% presentó resistencia a flumequina.

- Sensibilidad intermedia para los antibióticos Oxitetraciclina (n= 19; 24,1%) las que se distribuyen durante el período 2008 - 2010 en la mayoría de las ACS, y para el antibiótico florfenicol (n= 1; 1,3%) el año 2009 en la ACS 9b.

Resultados de perfiles de resistencia para *P. salmonis* agrupados por año

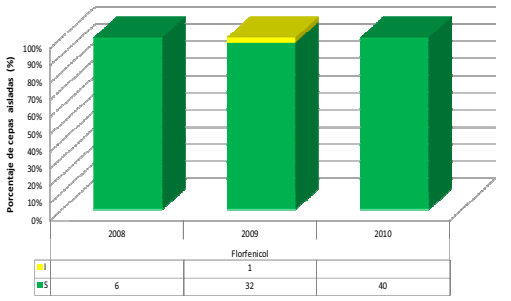
Agrupados por año

Resultados de resistencia bacteriana a Amoxicilina en *Piscirickettsia salmonis*



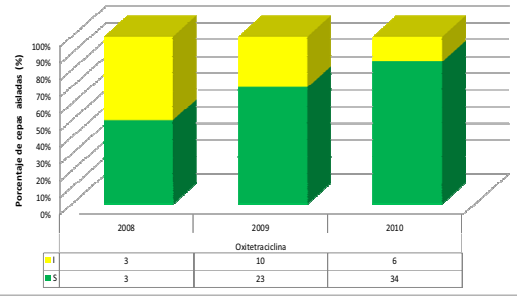
Agrupados por año

Resultados de resistencia bacteriana a Florfenicol en *Piscirickettsia salmonis*



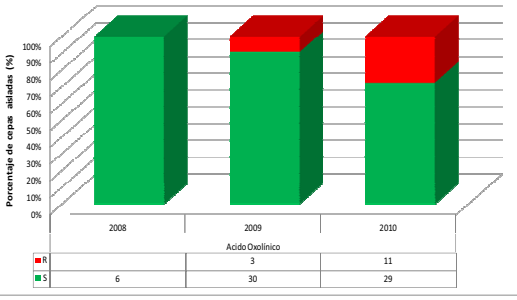
Agrupados por año

Resultados de resistencia bacteriana a Oxitetraciclina en *Piscirickettsia salmonis*



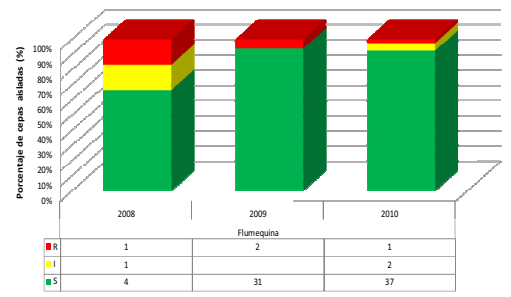
Agrupados por año

Resultados de resistencia bacteriana a Ácido Oxolínico en *Piscirickettsia salmonis*



Agrupados por año

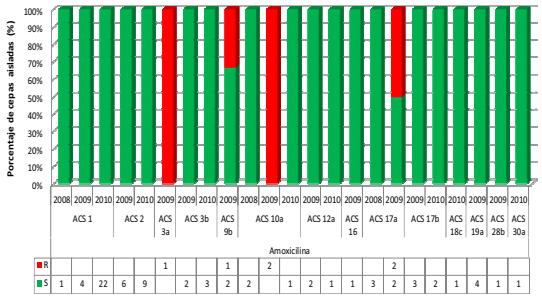
Resultados de resistencia bacteriana a Flumequina en *Piscirickettsia salmonis*



Resultados de perfiles de resistencia para *P. salmonis* según Agrupaciones de Concesiones de Salmonicultura

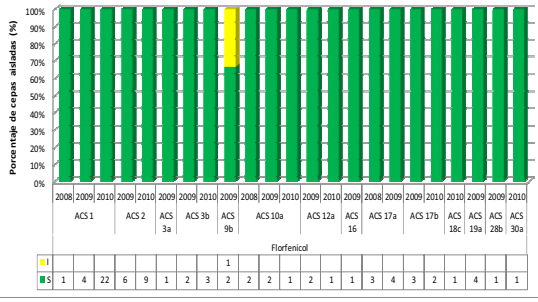
Agrupados por ACS

Resultados de resistencia bacteriana a Amoxicilina en *Piscirickettsia salmonis*



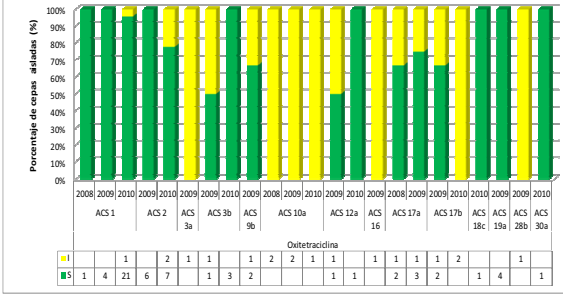
Agrupados por ACS

Resultados de resistencia bacteriana a Florfenicol en *Piscirickettsia salmonis*



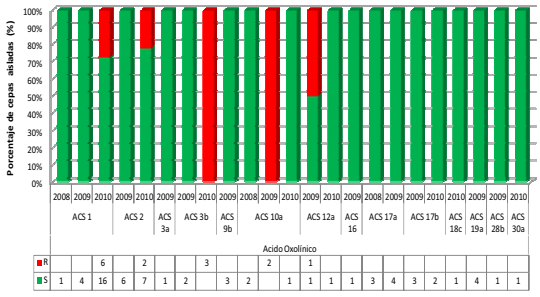
Agrupados por ACS

Resultados de resistencia bacteriana a Oxitetraciclina en *Piscirickettsia salmonis*



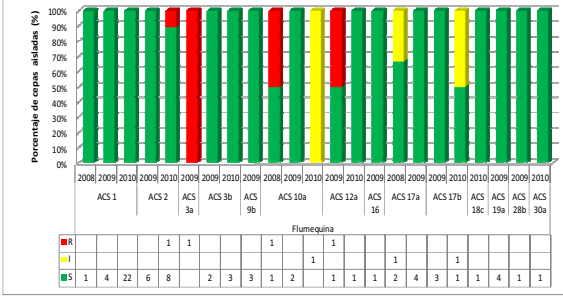
Agrupados por ACS

Resultados de resistencia bacteriana a Ácido Oxolínico en *Piscirickettsia salmonis*



Agrupados por ACS

Resultados de resistencia bacteriana a Flumequina en *Piscirickettsia salmonis*



Perfiles de Resistencia

- *V. ordalii:*

  Solo frente a amoxicilina y el florfenicol se observa la presencia de cepas resistentes, con un 25 y 8,3% del total de los aislados analizados respectivamente; registrándose para ambos casos en la ACS 32 en el año 2008.

- *Para el resto de los agentes, dado su baja representatividad, no se considera pertinente hacer evaluaciones del estado de situación ni evolución del fenómeno.*

Conclusiones

- Para ambas regiones (Los Lagos y Aysén) la especie mayormente aislada y evaluada en agua de mar fue *Piscirickettsia salmonis*, mientras que para el caso de agua dulce fue *Flavobacterium psychrophilum.*
- El 33,9 y 13,5% de las cepas de *Flavobacterium psychrophilum* presentó resistencia a ácido oxolínico y flumequina, respectivamente, el 7% presentó resistencia a oxitetraciclina y el 3,9% a florfenicol.
- En el caso de *Piscirickettsia salmonis* el mayor grado de resistencia se presentó para acido oxolínico y flumequina con un 17,7 y 5% de cepas resistentes, respectivamente. El 24,1 % de las cepas presentó sensibilidad intermedia a oxitetraciclina.

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo

Tadaishi Yatabe R.

Departamento de Salud Hidrobiológica - Instituto de Fomento Pesquero

Vigilancia en base al riesgo

- De manera intuitiva las problemáticas que presentan **un mayor nivel de riesgo ameritan una mayor prioridad** en la asignación de los recursos para vigilancia, debido a que estas inversiones generarán mayores retribuciones y por lo tanto una **mayor razón beneficio costo**
- Los sistemas de vigilancia basados en el riesgo se pueden definir como aquellos que aplican las metodologías de la **evaluación de riesgo** de manera integral durante el diseño del sistema de vigilancia, para la detección y manejo temprano de enfermedades y peligros
- Implica que cierto estrato de la población de interés tiene una **mayor probabilidad de ser muestreada**, debido a que la frecuencia esperada del evento es mayor
- La **eficacia** de estos sistemas debiera ser igual o superior a la de los sistemas tradicionales, sin embargo su **eficiencia debiera ser mayor.**

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo

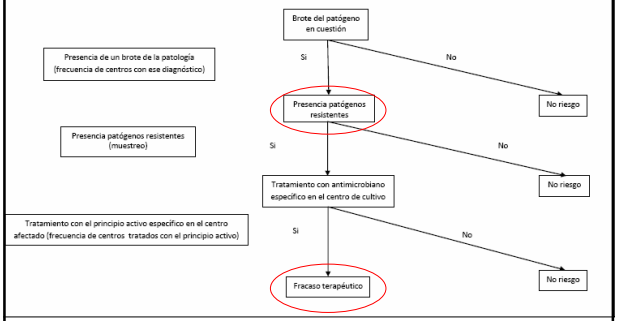
Zonificación de áreas de cultivo: modelo de AR

- **Perfiles de resistencia antimicrobiana**
- **Registros de uso de fármacos del Servicio Nacional de Pesca**
- **Opinión de expertos**

Estimación del número de brotes resistentes por área (frecuencia de eventos de resistencia)

Zonificación de las áreas en base al riesgo de presentar brotes con patógenos resistentes a antimicrobianos

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Modelo de análisis de riesgo



Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Modelo de análisis de riesgo

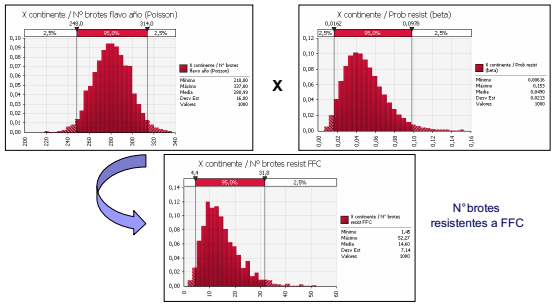
2 resultados de interés:

- **N° de brotes resistentes para los principales patóge nos: zonificación**
- **Pérdidas estimadas producto de la resistencia bacteriana: consecuencias**

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: N° de brotes resistentes

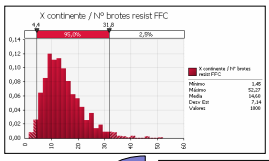
N° brotes flavobacteriosis

Probabilidad resistencia a FFC de *F. Psychrophilum*



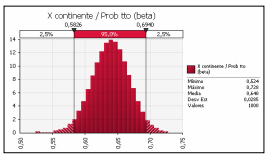
Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: N°de fracasos terapéuticos

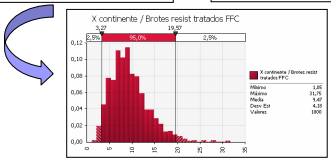
N°brotes resistentes a FFC



x

Probabilidad de tratamiento con FFC

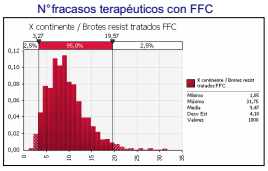




N°fracasos terapéuticos con FFC

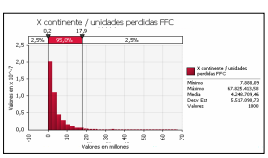
Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Pérdidas estimadas (N°de juveniles perdidos)

N°fracasos terapéuticos con FFC



x

Pérdidas atribuidas al fracaso terapéutico



Unidades perdidas atribuibles a fracaso terapéutico FFC

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Resultados

- Las consecuencias en términos de la cantidad de producto o individuos juveniles perdidos en una determinada área varían dependiendo de las prácticas de uso de fármacos a nivel local
- Estas pueden cambiar dependiendo de nuevas condiciones regulatorias impuestas por la autoridad oficial o autoimpuestas por la industria, nuevas condiciones de mercado o la incorporación de nuevos fármacos
- Además, debido a la existencia de áreas donde las estimaciones arrojan ausencia de pérdida de producto/individuos a pesar de que las mismas arrojan brotes con patógenos resistentes (producto del no uso circunstancial de los principios activos a los que los patógenos son resistentes), la zonificación en base a esta estimación no parece la más adecuada

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Resultados

Por otro lado, la zonificación en base a la cantidad de brotes causados por patógenos resistentes tiene una serie de ventajas:

- Considera la situación sanitaria de las diferentes áreas y los centros de cultivo que las componen
- Incorpora los patrones de resistencia existentes en el área
- Los principios activos utilizados en las distintas áreas no hacen variar esta zonificación

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Resultados

Zonificación en mar

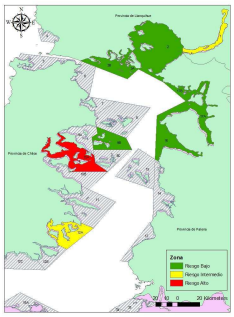
- Zonas de riesgo bajo: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes no superan los 17 brotes anuales
  - **ACS 2, 3a, 3b, 9b, 16, 17a, 17b, 18c, 19a, 28b y 30a**
- Zonas de riesgo intermedio: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes es mayor a 17 y menor o igual a 36 brotes anuales
  - **ACS 1 y 12a**
- Zonas de riesgo alto: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes es mayor a 36 brotes anuales
  - **ACS 10a**

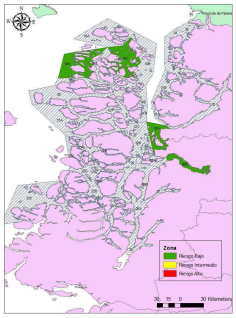
Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Resultados

N°estimado de brotes resistentes a antibióticos en mar

ACS	P 5%	Media	P 95%
1	11,1	25,2	42,7
2	3,8	11,1	21,1
3a	0,0	2,7	6,8
3b	3,5	8,5	14,6
9b	3,4	14,0	27,2
10a	33,5	60,0	89,7
12a	15,1	36,0	59,9
16	0,0	0,0	0,0
17a	5,9	17,0	29,5
17b	0,0	0,0	0,0
18c	0,0	0,0	0,0
19a	0,0	0,0	0,0
28b	0,0	0,0	0,0
30a	0,0	0,0	0,0

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Resultados





Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Resultados

Zonificación en agua dulce

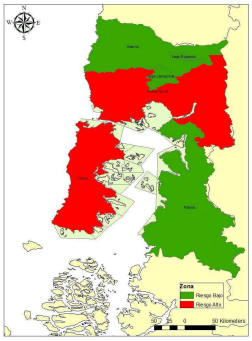
- Zonas de riesgo bajo: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes no superan los 27 brotes anuales
  - **Lago Llanquihue, Rupanco, Provincia de Osorno, Provincia de Palena**
- Zonas de riesgo alto: son aquellas cuyas estimaciones de número de brotes resistentes es mayor a 27 brotes anuales
  - **Sector de agua dulce de Chiloé y Provincia de Llanquihue**

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Resultados

N° estimado de brotes resistentes a antibióticos en agua dulce

Provincia / Lago	P 5%	Media	P 95%
Agua dulce de Chiloé	50,6	73,4	100,3
Lago Llanquihue	12,7	21,3	31,2
Lago Rupanco	2,6	9,0	17,6
Provincia Osorno	5,6	11,0	17,5
Provincia Llanquihue	60,2	90,6	125,2
Provincia Palena	12,9	27,0	44,9

Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo: Resultados



Zonificación de las áreas de cultivo en base al riesgo

Zonificación de las áreas en base al riesgo de presentar brotes con patógenos resistentes a antimicrobianos

Intensificar la vigilancia en aquellas áreas donde se espera una mayor frecuencia de ocurrencia del evento y, eventualmente, disminuir los muestreos en áreas de menor riesgo, con el objetivo de aumentar la eficiencia del sistema de vigilancia

Categorización de áreas de cultivo

Categorización de áreas de cultivo (intensidad de la resistencia)

- Score de resistencia para cada aislado
- Puntaje para cada aislado según perfil de resistencia (S = 0; I = 0,5; R = 1)
- Score de cada área: score promedio de los aislados del área
- 3 categorías:
  - Zona de resistencia baja
  - Zona de resistencia intermedia
  - Zona de resistencia alta

Categorización de áreas de cultivo

- **Zona de resistencia baja**: score de resistencia > 0 y ≤ 1. Predominancia de aislados susceptibles a todos o a la mayor parte de los antibióticos.

Ej. : ACS 2

AML	FFC	OT	OA	UB
S	S	S	S	S
S	S	S	S	S
S	S	S	S	S
S	S	S	S	S
S	S	S	S	S
S	S	I	S	S
S	S	S	S	S
S	S	I	S	R
S	S	S	R	S
S	S	S	S	S

Score: 0,3

Categorización de áreas de cultivo

- **Zona de resistencia media**: score de resistencia > 1 y ≤ 2. Mayor frecuencia de cepas resistentes a antimicrobianos o con susceptibilidad intermedia.

Ej.: Agua dulce de Chiloé

AML	FFC	OT	OA	UB
S	S	S	R	I
S	S	I	S	S
S	S	S	S	S
S	S	S	R	S
S	S	S	R	S
S	S	S	S	S
S	S	S	R	R
S	S	S	R	R
S	S	S	S	S
S	S	S	S	S
S	R	R	R	R
S	R	R	R	R
I	S	R	S	S
S	S	S	R	S
S	S	S	S	S
S	S	S	S	S
S	S	S	S	S

Score: 1,1

Categorización de áreas de cultivo

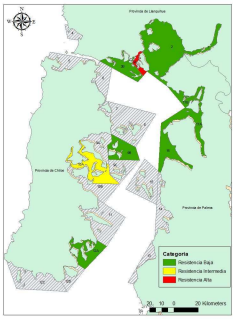
- **Zona de resistencia alta**: score de resistencia de entre de entre 2 y 5. Mayor frecuencia de aislados resistentes a más de un antibiótico.

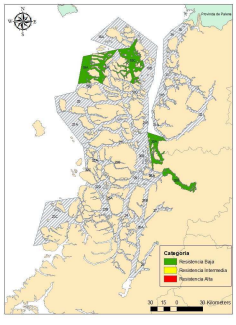
Categorización de áreas de cultivo: Resultados

Score de resistencia a antibióticos en mar

ACS	Score
1	0,3
2	0,3
3a	2,5
3b	0,7
9b	0,7
10a	2,0
12a	0,8
16	0,5
17a	0,6
17b	0,3
18c	0,0
19a	0,0
28b	0,5
30a	0,0

Categorización de áreas de cultivo: Resultados



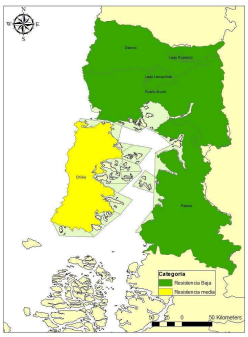


Categorización de áreas de cultivo: Resultados

Score de resistencia a antibióticos en agua dulce

Provincia/Lago	Score
Agua dulce de Chiloé	1,1
Lago Llanquihue	0,5
Lago Rupanco	0,4
Provincia de Osorno	0,7
Provincia de Llanquihue	0,5
Provincia de Palena	0,6

Categorización de áreas de cultivo: Resultados



Categorización de áreas de cultivo

- El objetivo de esta categorización es aplicar medidas de mitigación de la resistencia en las distintas áreas de forma diferenciada, de acuerdo a la intensidad con que esta se presenta, apoyando la toma de decisiones de los miembros de la industria y de la autoridad frente a esta problemática

Vigilancia de la resistencia bacteriana en la salmonicultura

A partir de los resultados de perfiles de resistencia obtenidos durante el desarrollo del proyecto, el análisis de riesgo y categorización de las áreas en base a los perfiles de resistencia, se estructura el sistema de vigilancia de la resistencia bacteriana que se entrega en la presente propuesta

Los resultados aquí expuestos buscan ejemplificar el fundamento del sistema de vigilancia, siendo el punto central de discusión el modelo en base al cual se estructura este sistema

Antecedentes y propuesta para el establecimiento de un Programa Oficial de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana

Documento preparado por el Departamento de Salud Hidrobiológica
del Instituto de Fomento Pesquero
Abril de 2011

Antecedentes generales

- Existe una creciente preocupación general de los consumidores por la inocuidad alimentaria a nivel mundial.
- Las entidades regulatorias, han elaborado recomendaciones y regulaciones específicas relativas al uso de antibióticos en la salud humana y la producción animal.
- A nivel internacional desde 2001, la OMS desarrolla una "Estrategia mundial para contener la resistencia a los antimicrobianos".

Antecedentes generales

- Por su parte, la OIE, en su Código Sanitario para los Animales Acuáticos, entrega las recomendaciones generales para los países miembros, respecto del manejo y monitoreo de la resistencia bacteriana causada por uso de antimicrobianos.
- A su vez, varios países han desarrollado planes de monitoreo de la resistencia bacteriana internos, en coordinación con otras naciones.

Otras experiencias

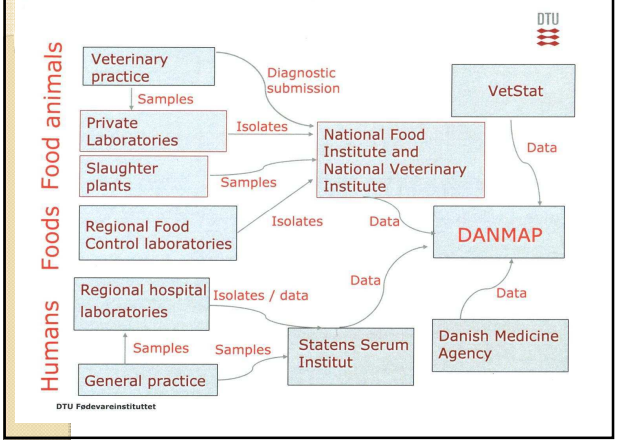
- DANMAP (Dinamarca):

Fue establecido por el Ministerio de Alimentación, Agricultura y Pesca, y el Ministerio de Salud en 1995.

Los objetivos del programa son los siguientes:

- Vigilar la aparición de resistencia a los antimicrobianos
- Controlar el consumo de agentes antimicrobianos
- Investigar la asociación entre el uso de agentes antimicrobianos en animales y humanos y la aparición de resistencia entre las bacterias de los animales, alimentos, y los seres humanos

DANMAP es un informe anual sobre la aparición de resistencia a los antimicrobianos en bacterias zoonóticas, indicadoras y patógenas, de animales, alimentos, y humanos en Dinamarca.



Otras experiencias

- NARMS (EE.UU.):

(National Antimicrobial Resistance Monitoring System)

Fue establecido por el FDA, el CDC, y el Departamento de Agricultura (USDA) en 1996.

Los objetivos del programa son los siguientes:

- Seguir las tendencias de la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias en humanos, alimentos y animales.
- Divulgar información oportuna sobre la resistencia bacteriana a los AAM en los EE.UU. y en el extranjero, para promover las intervenciones que reduzcan el fenómeno.
- Llevar a cabo investigaciones para comprender mejor la aparición, persistencia y propagación de la resistencia a los antimicrobianos.
- Proporcionar datos que ayuden a la FDA en la toma de decisiones relacionadas con la aprobación de medicamentos antimicrobianos seguros y eficaces para animales.

Chile?

- No existe una entidad ni programa transversal que vigile ni investigue el fenómeno de la resistencia bacteriana a AAM.
- A través de las modificaciones al Reglamento Sanitario para Acuicultura, RESA, toda prescripción medico veterinaria debe ser acompañada de una evaluación de susceptibilidad (antibiograma).
- No obstante lo anterior, hay una serie de problemáticas que deben ser resueltas antes de que esa exigencia cumpla con los objetivos que se propone.

Chile?

- A través de los proyectos desarrollados por IFOP y la UCN, las competencias profesionales, equipamiento y experiencias adquiridas, es posible generar un sistema de vigilancia, al menos para el sector acuicultor/salmonicultor.
- Dicho programa, será una apoyo para la toma de decisiones tanto a nivel de productores como a nivel de la autoridad sectorial.

Sistema de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura

Elaborado sobre la base de:

- Del 100% de antibiogramas "obligatorios", al menos un 25% de estos, se "duplique", para ser entregado al programa de vigilancia.
- Sobre la base del SIG actualizado y en marcha, se efectuaría un seguimiento especial de muestreos (con *n* muestreales mayores o más seguidos), en aquellas zonas en que se haya descrito niveles altos de resistencia en el tiempo.

Sistema de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura

a) Obtención de las muestras y campañas de muestreo

- Todo muestreo contemplará la extracción de 15 unidades de pescado de la mortalidad fresca o moribundos.
- Los muestreos generales, se deberán acordar respecto de asegurar que sean representativos de todas las zonas bajo vigilancia, de modo que en un periodo al menos tres meses, se hayan cubierto la totalidad de las zonas.

Sistema de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana en la Salmonicultura

b) Ejecución de los análisis de susceptibilidad antimicrobiana

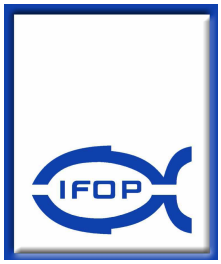
- Unidad de verificación oficial y validada por la autoridad (IFOP?)

c) Entrega de resultados y análisis

- SIG "tiempo real" + Informe mensual

d) Otras características

- **Base de datos georreferenciada**: esta contiene la información del estado de la resistencia para cada patógeno por diferentes niveles de referencia (ej: ACS).
- **Sistema de información geográfica (S.I.G.):** La compilación de toda la información cartográfica base permite contar con un Sistema de Información Geográfica actualizado, escalable, centralizado y multipropósito.
- **Sistema de Alerta Temprana:** Establece la relación entre las bases de información de cada zona generada en el sistema de información geográfica y un sistema de alerta temprana, con el fin de indicar eventuales cambios en la resistencia de los diferentes patógenos, e implementar medidas de control.



Agradecimientos

- Departamento de Salud Hidrobiológica - IFOP, especialmente a:

Mylena Menanteau
Paula Miranda
Juan Carlos Quintanilla
Tadaishi Yatabe
Catalina Becerra
Carolina Asencio
Mario Rivas
Dany Álvarez
Lino Cáceres

Agradecimientos

- Profesionales participantes exDepartamento de Salud Hidrobiológica - IFOP :

Maureen Alcayaga
Eugenio Zamorano
Evelyn Henríquez

- Profesionales del Laboratorio ADL Diagnostic:

Ma Isabel Olivares
Marco Rozas

- Profesionales del Laboratorio Patobiología, UCN

Rodrigo Rojas

A N E X O 8

Manuscrito en inglés

Research project

Antimicrobial Resistance Surveillance in the Salmon Industry

Funded by the Fisheries Research Fund – FIP (Grant code: 2008-65)

The main goal of this study was to gain information on the antimicrobial susceptibility patterns of salmonid pathogenic bacteria to develop guidelines for the rational use of antimicrobials in the Chilean salmon farming. The characterization and subsequent analysis of antimicrobial resistance phenomenon evolution in the domestic salmon industry, is necessary for generating a better understanding of the dynamics and modulation of the treatments against the bacterial diseases outbreaks.

Antimicrobial susceptibility patterns and levels of the salmonid fish pathogens *Piscirickettsia salmonis, Flavobacterium psychrophilum, Vibrio ordalii, Aeromonas salmonicida, Streptococcus phocae and Yersinia ruckeri*, isolated from various Chilean farms was determined. The antimicrobials considered in the study were those authorized to be used in Chilean salmon farming, including the most widely used in the industry, florfenicol and oxytetracycline, as well as flumequine, oxolinic acid, amoxicillin and erythromycin.

In order to achieve the project aims it was necessary a continued coordination with involved entities, generating a system to support sampling activities, pathogen isolation and finally the determination of their antimicrobial susceptibility, considering the vast geographical coverage of the initiative.

For the procedures implementation for bacterial pathogens isolation and culture as well as the determination of their antimicrobial susceptibilities it was considered the advice of world experts from Denmark, Ireland and the United Kingdom.

Until December 2010, seven geo-referenced sampling campaigns were done, including farms belonging to the salmon farming companies involved in the project, that were arranged in the respective Groupings of Salmoniculture Concessions (GSC) established by the authority.

The samples collection was carried out both by the team of the Instituto de Fomento Pesquero,

IFOP, and by the professional staff of the participating companies, in salmon farms located at the Los Lagos and Aysén regions. The isolation and identification of pathogenic bacteria were performed by the Fish Pathology Laboratory ADL Diagnostic Chile Ltd, including the antimicrobial susceptibility assays for *Piscirickettsia salmonis*. The assays to determine the antimicrobial resistance levels and profiles of all the other pathogens were developed in the Aquatic Pathobiology Laboratory of the Universidad Católica del Norte.

The sampling schedule, pathogen isolation, antimicrobial susceptibility profiles and levels of pathogenic strains, and drug residues in fish muscle, arranged by region considering the GSC from which they were collected are reported.

Sampling campaigns were performed in 228 salmon farms, included in 24 of the 35 GSCs, according to the new structure established by the authority for Los Lagos and Aysén regions.

During the study a number of 272 pathogenic bacterial isolates were recovered, and mainly belonged to the *Flavobacterium psychrophilum* (155 strains) and *Piscirickettsia salmonis* (79 strains) species, being highly consistent with the current sanitary status of this activity, considering that most outbreaks in freshwater and marine salmon farms are caused by *F. psychrophilum* and *P. salmonis*, respectively.

In relation to the antimicrobial susceptibility results, a high proportion of *F. psychrophilum* isolates exhibited a high sensitivity to florfenicol and oxytetracycline, whereas the 33.9% and 13.5% showed resistance to the antimicrobials oxolinic acid and flumequine, respectively. Accordingly, a high proportion of *P. salmonis* isolates showed sensitivity to florfenicol, and in a lesser degree to oxytetracycline, whereas the 17.7% and 5.0% of the strains showed resistance to oxolinic acid and flumequine, respectively.

Otherwise, a under-cage sediment sampling to detect pharmaceutical residues their total organic matter and total and antimicrobial culturable counts it was performed, as well as to isolate selected resistant strains to assess their susceptibility to the same agents assayed for bacterial pathogens.

Analysis of 205 samples for drug residues in fish muscle, belonging to 13 of 35 GSCs was performed. From these, only in 11 GSCs were detected the presence of at least one antimicrobial of interest for the project, being oxytetracycline, florfenicol, and flumequine the detected antimicrobials.

Given all the previously described background, a zoning, grouping GSC within each of both studied regions, which considered the results of the susceptibility evaluation to assayed antimicrobial agents, associated to a risk analysis of the emergence of the resistance phenomenon it was developed. In addition, a categorization area was made, defining control indicators, leading to the elaboration of a system based on a continuous monitoring of critical variables.

The zoning and their characterization was carried out using a risk analysis model, estimating the outbreaks number caused by antimicrobial-resistant strains of *P. salmonis* and *F. psychrophilum,* for marine and freshwater farms, respectively.

Freshwater and marine sampled sectors were divided into high and low risk areas, and using the resistance profiles of each isolate, a resistance score for each studied area was designed, generating three different categories: high, medium and low.

It should be noted that the sector categorization corresponded to a model for presenting project results and analysis, and should be mentioned that zone classifications are a results of a dynamic process that could change according to obtained results from new bacterial susceptibility to antimicrobial agents surveys and assessments.

The monitoring program was developed considering the almost four years of field sampling experience, analysis and interpretation of antimicrobial susceptibility results in the salmonid industry. At last, the progress and status of the monitoring program was presented to the authority to define the technical requirements necessary to pose the priorities of the State entities to manage this issue.

Finally, a technical document was elaborated, a Guidebook, to describe antimicrobial use good

practices in the aquaculture sector. It also contains scientific material to understand more properly concepts and processes associated with bacterial resistance, and to generate concrete support to the adequate control of this phenomenon, by the professionals in charge of health management in the salmonid farms.

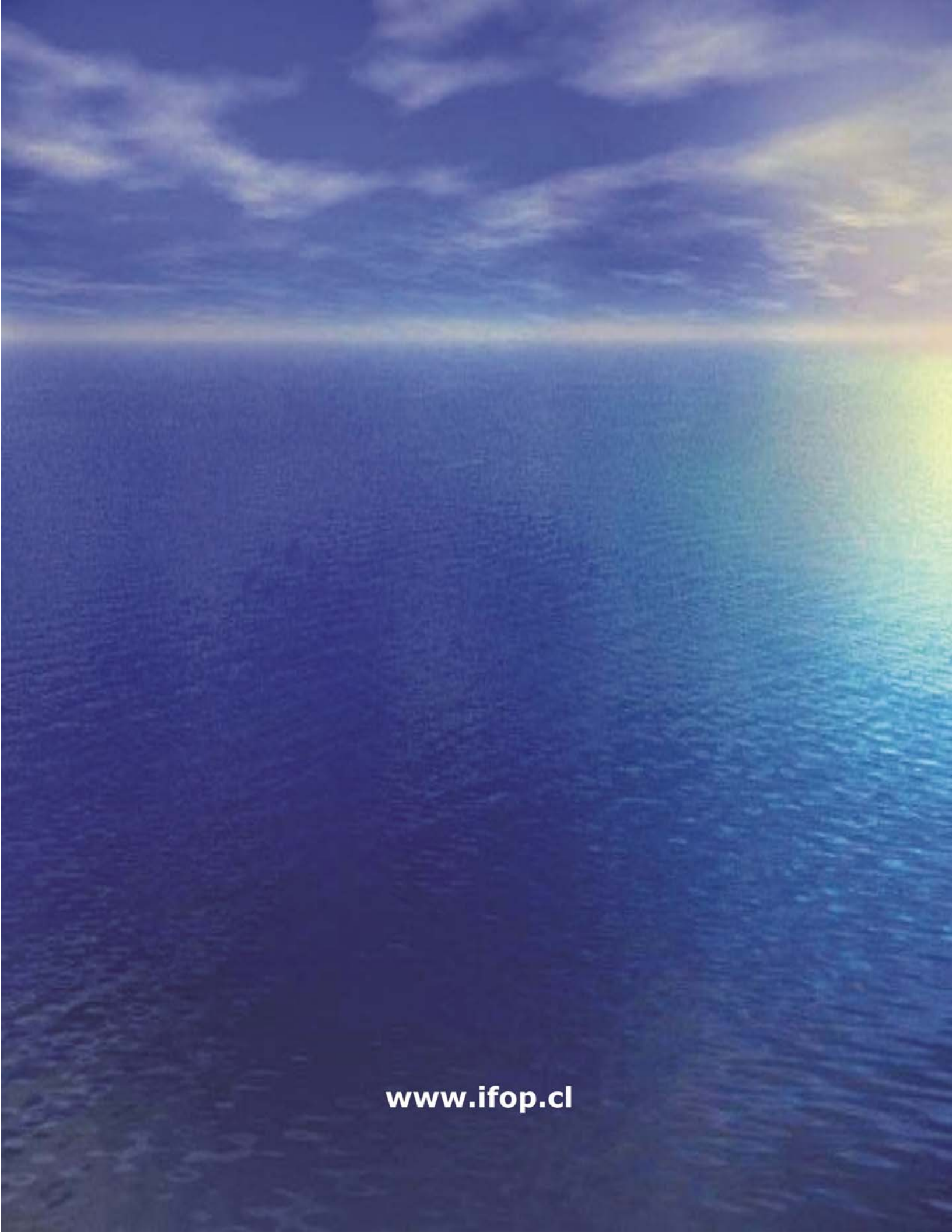
It should be emphasized that are highly valuable both the official monitoring program of bacterial resistance proposed, as well as the Guidebook designed to show the guidelines to develop a responsible use of antimicrobials and an adequate management of the antimicrobial resistance issue in the salmon industry, but the support of relevant authorities are required to their validation and application in the industrial sector.

A N E X O 9

Base de datos FIP N° 2008-65

IFOP
INFORME FINAL
FIP N° 2008-65
ANEXO 9
- BASE DE DATOS
Vigilancia de la resistencia
bacteriana en la salmonicultura
Octubre, 2011

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO
Sección Ediciones y Producción
Almte. Manuel Blanco Encalada 839
Fono 56-32-2151500
Valparaíso, Chile
www.ifop.cl


www.ifop.cl