



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 ácido 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 diseñó 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 recalcar 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. INTRODUCCI3N | 1 |
| 2. OBJETIVO GENERAL | 4 |
| 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 4 |
| 4. ANTECEDENTES | 5 |
| 5. METODOLOGÍA DE TRABAJO..... | 14 |
| 6. RESULTADOS | 43 |
| 7. ANÁLISIS Y DISCUSI3N 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. Presentaci3n inicial del proyecto efectuada al Fondo de Investigaci3n 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 ingl3s. | |
| 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 n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Vibrio ordalii* entre los a3os 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos y de Ays3n.
- Figura 16.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxol3nico en *Vibrio ordalii* entre los a3os 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos y de Ays3n.
- Figura 17.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Vibrio ordalii* entre los a3os 2006 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos y de Ays3n.
- Figura 18.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Streptococcus phocae* entre los a3os 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos.
- Figura 19.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Eritromicina en *Streptococcus phocae* entre los a3os 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos.
- Figura 20.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Streptococcus phocae* entre los a3os 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos.
- Figura 21.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Streptococcus phocae* entre los a3os 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos.



- Figura 22.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxol3nico en *Streptococcus phocae* entre los a3os 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos.
- Figura 23.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Streptococcus phocae* entre los a3os 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras de la Regi3n de los Lagos.
- Figura 24.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Amoxicilina en *Aeromonas salmonicida* en los a3os 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Regi3n de Los Lagos y Ays3n.
- Figura 25.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Florfenicol en *Aeromonas salmonicida* en los a3os 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Regi3n de Los Lagos y Ays3n.
- Figura 26.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Oxitetraciclina en *Aeromonas salmonicida* en los a3os y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Regi3n de Los Lagos y Ays3n.
- Figura 27.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Acido Oxol3nico en *Aeromonas salmonicida* en los a3os y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Regi3n de Los Lagos y Ays3n.
- Figura 28.** Resultado del n3mero de cepas aisladas con perfil de resistencia para Flumequina en *Aeromonas salmonicida* en los a3os y 2007 y 2009 en agrupaciones de concesiones salmoneras y centros de agua dulce de la Regi3n de Los Lagos y Ays3n.



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, ácido 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 salmónes 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 salmónes.
- 3.3** Establecer las bases para instaurar en forma permanente un programa de monitoreo sistemático y oficial de la resistencia bacteriana patógena de salmónes 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 Pública, 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; Sørum *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 diseminaci3n en el sistema de cultivo en particular y el medio natural en general (Roberts, 1994). Adem3s, algunos estudios han demostrado la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina en bacterias ictiopat3genas (Sφrum *et al.*, 1992; Zhao & Aoki, 1992; Andersen & Sandaa, 1994).

Es necesario considerar que el reservorio de la mayor3a de las bacterias pat3genas para salmones a3n 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 ictiopat3genas como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella 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 pa3ses y organizaciones relacionadas con la salud animal y humana, han estado trabajando en los mecanismos de prevenci3n y control de la resistencia bacteriana. As3, la FAO, en conjunto con la Organizaci3n Mundial de la Salud (OMS) y la Organizaci3n Mundial para la Sanidad Animal (OIE), han formado desde 2003 un grupo de trabajo relacionado con el manejo, riesgo e implementaci3n de programas de monitoreo de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria. Este grupo ha hecho 3nfasis especial en la evaluaci3n del riesgo, buenas pr3cticas veterinarias y planes de monitoreo (FAO/WHO/OIE, 2003; FAO/WHO/OIE, 2004). Adem3s, el Comit3 Internacional Veterinario para la Armonizaci3n (VICH), entidad que re3ne a expertos de la Uni3n 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, adopci3n de pol3ticas para el uso apropiado de drogas, mejoramiento del diagn3stico de enfermedades, plan de disminuci3n de transmisi3n de infecciones, investigaci3n y desarrollo (personal e infraestructura), entre otros (CDC, 2001).

Sin embargo, en Chile la situaci3n es algo diferente, no existiendo una entidad preocupada y focalizada en la problem3tica de la resistencia bacteriana, aun cuando existen estudios cient3ficos que se3alan que esta problem3tica existe en la acuicultura de la Regi3n 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 tecnolog3as modernas, r3pidas y confiables. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se utilizan para definir el agente antimicrobiano deber3 seleccionarse para el tratamiento de una enfermedad bacteriana pat3gena espec3fica, como tambi3n 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 metodolog3as como las pruebas de difusi3n en placa, que si bien entregan datos relativamente r3pidos (24-48 h) no cuantifican la magnitud de la resistencia y se realizan a temperaturas apropiadas para organismos terrestres y no acu3ticos. Por esta raz3n es que instituciones internacionales, espec3ficamente el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI/NCCLS), instituci3n encargada de recomendar internacionalmente las metodolog3as de laboratorio, en el a3o 2005 puso a disposici3n documentos est3ndares para la determinaci3n de resistencia bacteriana espec3ficas en peces, como por ejemplo temperaturas, medios de cultivo semis3lidos, medios de cultivos suplementados, entre otros (NCCLS, 2005; CLSI, 2005). Estas metodolog3as a3n no se implementan en



muchos pa3ses, entre ellos Chile. Adem3s, existen otras alternativas para cuantificar la resistencia bacteriana, como por ejemplo la identificaci3n de genes de resistencia a trav3s de PCR/RT-PCR, pruebas inmunol3gicas, entre otros (Schmidt *et al.*, 2001; Furushita *et al.*, 2003). Estas t3cnicas son de especial utilidad en presencia de bacterias multiresistentes a antibi3ticos, o bien a bacterias que no pueden ser aisladas y cultivadas por m3todos tradicionales.

En virtud de los antecedentes entregados y en consideraci3n de contar con informaci3n objetiva sobre los aspectos sanitarios y ambientales relacionados con la acuicultura, el Instituto de Fomento Pesquero ejecut3 el presente proyecto, que permiti3 generar las bases cient3ficas y t3cnicas necesarias para desarrollar las disposiciones aplicables a la acuicultura para prevenir y/o controlar el fen3meno de la resistencia bacteriana en cepas ictiopat3genas presentes en los centros de cultivo, informaci3n 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 líderes 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 salmoniculoras 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 salmoniculora 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 8° 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 m², 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 4°C, 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 diagnóstico 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 diagnóstico 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 Müller-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 diluido) 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 determinaci3n del nivel de resistencia a antibi3ticos, se determinaron las Concentraciones M3nimas Inhibitorias (CMI) de los antibacterianos florfenicol (Schering-Plough^{MR}), oxitetraciclina (Sigma^{MR}), flumequina (Sigma^{MR}) y 3cido oxol3nico (Sigma^{MR}), incorporado posteriormente al proyecto, para las cepas pat3genas Gram negativas, y las CMI de amoxicilina (Sigma^{MR}) y eritromicina (Sigma^{MR}) de las cepas pat3genas Gram positivas, por un m3todo de diluci3n en agar, seg3n las indicaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) CLSI (2006a), y Alderman y Smith (2001). De esta manera, se prepar3 un patr3n de diluciones seriadas de cada antibacteriano para su adici3n en el medio de agar espec3fico para cada especie pat3gena, para la obtenci3n de concentraciones duplicadas finales de 0,125 a 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En los casos de las especies pat3genas 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 in3culo, e incubadas por 48 h a 22°C. Las placas de *F. psychrophilum* se incubaron por 4 d3as a 15°C de acuerdo a lo sugerido por Schmidt *et al.* (2000). La CMI es definida como la menor concentraci3n del antibacteriano que produce una ausencia de crecimiento en al menos 2 de las 3 placas correspondientes a una misma concentraci3n del antibi3tico. La cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, se utiliz3 como control para la verificaci3n de los rangos de CMI en las placas con agar Mueller-Hinton.

c) Determinaci3n de residuos de antimicrobianos en m3sculo de peces.

Para efectos de la determinaci3n de residuos de antibi3ticos, parte de las muestras (5) recolectadas desde cada centro de cultivo muestreado, fueron enviadas al laboratorio BIOVAC, que efectu3 la determinaci3n de residuos de las sustancias antimicrobianas de inter3s en m3sculo 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 50°C, 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 μ m, 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 μ m 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 μ m 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 utiliz3 el mismo equipo HPLC y detector utilizado para oxitetraciclina. Se utiliz3 una columna fenilo de 250 mm x 4,6 mm de 0,5 μ m para la separaci3n, la fase m3vil fue en base a agua, acetonitrilo y metanol con 0,1 % TFA (3cido trifluoroac3tico).

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 d3as diferentes. En la realizaci3n de 3stos se incluyeron dos muestras de fortificados para cada analito en cuesti3n, comprobando que la realizaci3n de los ensayos estuvo correctamente realizado y los resultados obtenidos son v3lidos.

e) Determinaci3n de materia org3nica en sedimentos.

El contenido de materia org3nica (e inorg3nica), tanto relativo como absoluto, de las mismas muestras de sedimento previamente descritas, se realiz3 de acuerdo a Logue *et al.* (2004), por medio de la cuantificaci3n de humedad por secado en estufa a 95° C (AOAC, 2000, Official Method 934.01 - 4.1.03), y por la cuantificaci3n de cenizas en horno mufla a 500° C (AOAC, 2000, Official Method 942.05 - 4.1.10).

Este par3metro es particularmente importante de determinar debido a que existen varios antecedentes que indican que niveles altos de materia org3nica est3n 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 asignó 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.

M3s all3 de las recomendaciones y gu3as que se consideran aplicables a la realidad nacional, luego de revisados estos documentos, y que se detallan en la secci3n de resultados, el establecimiento de un Monitoreo Oficial de la Resistencia Bacteriana, y los acuerdos para validar dicho programa, ser3n el componente principal de cualquier plan de restauraci3n a presentar, y que debe estar consensuado y contar con el apoyo de las autoridades sectoriales pertinentes.

5.2.3. Confecci3n de un Manual de Buenas Pr3cticas de Uso Racional de Antimicrobianos en la salmonicultura

Sobre la base de los resultados y an3lisis previos, se elabor3 una Gu3a T3cnica que permite sustentar buenas pr3cticas y un uso racional de antimicrobianos, as3 como el consecuente manejo de la resistencia bacteriana, entregando los lineamientos para una buena utilizaci3n (pertinencia y uso) de los agentes antimicrobianos en la salmonicultura, y con el objetivo de disminuir la presi3n de selecci3n de resistencia en bacteria pat3genas de peces.

Este documento entrega una serie de recomendaciones e informaci3n t3cnica 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 f3rmacos en la industria, de forma de evitar el surgimiento de resistencia bacteriana, como a su vez, guiar respecto del manejo del fen3meno, una vez que 3ste 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 pa3ses o entidades y expertos nacionales e internacionales, se ha elaborado una propuesta base para instaurar un sistema de monitoreo/vigilancia de la resistencia bacteriana pat3gena de peces salmon3deos. Dentro de este sistema de monitoreo se han considerado las zonas representativas de cada nivel antes categorizado en cuanto al nivel de contaminaci3n y resistencia bacteriana.

Es importante se3alar que los resultados obtenidos en las metodolog3as de muestreo, determinaci3n de residuos, identificaci3n de pat3genos y metodolog3as de evaluaci3n de la resistencia bacteriana especifica en peces, fueron la base t3cnica y metodol3gica 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 an3lisis de muestras
- Una propuesta de an3lisis de resultados y de apoyo a la autoridad
- Base de datos georreferenciada por zona definida: Esta explicita la informaci3n del estado de la resistencia para cada pat3geno por diferentes niveles de referencia (ej: Agrupaci3n de Concesi3n de Salmonera, o por regi3n geopol3tica, o por tipo de agua, etc.), siendo este una base de datos din3mica que puede responder a las necesidades del consultor.
- Sistema de informaci3n geogr3fica (S.I.G.): Se confeccion3 e implement3 un S.I.G. con informaci3n cartogr3fica base e informaci3n de car3cter acu3cola, la cual fue levantada y procesada con diversos softwares, siendo ArcGIS ArcEditor 9.3 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 éstas 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 presentaci3n de metodologías

Al inicio de la ejecuci3n del proyecto, y tal como estaba comprometido, se realiz3 el taller de presentaci3n de metodologías en dependencias del Fondo de Investigaci3n Pesquera (FIP), en la ciudad de Valparaíso. En la oportunidad, se present3 el proyecto y se entreg3 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 reuni3n 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 secci3n de resultados.

5.5.3. Taller de entrega resultados

De acuerdo a lo comprometido, se llev3 a cabo el taller para presentar los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente iniciativa. Se consider3 la participaci3n 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 secci3n resultados.

5.5.4. Elaboraci3n de manuscrito en ingles

Tal como estaba comprometido, se elabor3 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 difusi3n 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 salmonicultra.



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 salm3nes presentes en las regiones de Los Lagos y Ays3n y cuya última campaña finaliz3 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 Regi3n de Los Lagos. Las ACS muestreados en esta regi3n fueron 12. En la misma regi3n 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 regi3n de Ays3n, los muestreos se realizaron en 35 centros de cultivo los cuales están repartidos en 12 ACS.

El detalle de la informaci3n referente al número de centros de cultivo muestreados, por regi3n 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 determinado 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 muestral, 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, ácido 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 19, 6 y 5 cepas aisladas, respectivamente. Adicionalmente, para el caso del ácido 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 ácido 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 ácido 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 ácido oxolínico y el 5% presentaron resistencia a flumequina, y en lo que respecta al ácido 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 ácido 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 ácido 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, ácido 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 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la mayoría de las cepas aisladas durante el año 2010 presentaron valores de CMI de 1-2 $\mu\text{g/mL}$ (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 ($\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$). 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 $\mu\text{g/mL}$ y 0,0312-2 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando valores moderados. De manera similar las cepas analizadas evidenciaron valores CMI de oxitetraciclina de 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$, 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 $\mu\text{g/mL}$ y 0,0625-0,5 $\mu\text{g/mL}$ 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 estimó 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 estimó 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



terap3utico, siendo estimada esta 3ltima con un valor medio de 154 Ton, e intervalos de confianza al 90% de entre 9 y 514 toneladas.

Estimaci3n del riesgo

Las toneladas de salm3nidos perdidas debido a los brotes con pat3genos resistentes a flumequina y 3cido oxol3nico y el fracaso terap3utico 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 terap3uticos frente a los tratamientos con flumequina estimados para la ACS 12a, se pierden al a±o un promedio de 182 toneladas de biomasa de salm3nidos. 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 p3rdida anual promedio de 115 y 45 toneladas de biomasa.

B. An3lisis 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 Chilo3, 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. Adem3s, se presentan los resultados de la regi3n de Los Lagos continental, la que incluye a los 3ltimos 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 estimó 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 estimó 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 prescripci3n de todos los antimicrobianos que se utilizan en la industria, poniendo 3nfasis en las 3reas con mayores niveles de resistencia de acuerdo a los resultados obtenidos del programa de vigilancia.
 - Disponer de evaluaciones de seguridad y eficacia de los f3rmacos utilizados, de lo contrario, interrumpir o reducir paulatinamente la administraci3n del mismo.
 - Fortalecer el sistema nacional de vigilancia de administraci3n de antimicrobianos a los animales de producci3n.
 - La evaluaci3n de perfiles y niveles de susceptibilidad de los f3rmacos 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 administraci3n excesiva e indebida de antimicrobianos a los animales destinados al consumo humano.
 - La autorizaci3n de nuevos productos antimicrobianos veterinarios debe garantizar que las dosis recomendadas son 3ptimas para el tratamiento, teniendo en cuenta la farmacocin3tica, eficacia cl3nica, con el fin de minimizar el desarrollo de la resistencia.
 - Los productos existentes ya autorizados tambi3n deben revisarse por parte de las autoridades regulatorias para garantizar que la dosis recomendada y la duraci3n del uso son consistentes con el conocimiento actual de la eficacia, resistencia a los antimicrobianos, farmacocin3tica y farmacodinamia.
 - Aplicar un programa de revisi3n y eventual actualizaci3n de las dosis recomendadas y duraci3n 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 médico 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 fen3meno de la resistencia bacteriana en el sector salmonicultor nacional.

De lo anteriormente mencionado y con la experiencia de la ejecuci3n del presente proyecto, la informaci3n y resultados obtenidos, y la revisi3n de gu3as, recomendaciones y experiencias a nivel internacional, se elabor3 una propuesta de sistema de monitoreo oficial de la resistencia bacteriana pat3gena de peces salmon3deos.

Descripci3n de la propuesta de Sistema de Monitoreo

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

a) Obtenci3n de las muestras y campa3as de muestreo.

Considerando que de acuerdo a la reglamentaci3n oficial emanada de los programas de vigilancia sanitarios del Reglamento Sanitario para la Acuicultura (RESA), y en los que de manera sistem3tica se deben efectuar muestreos obligatorios de ejemplares de peces, y con mayor raz3n con las nuevas modificaciones normativas, en que se hace obligatorio el generar antibiogramas previo o inmediatamente despu3s 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 an3lisis del programa oficial de vigilancia de la resistencia bacteriana. Sin perjuicio de lo anterior, el tama3o muestral para el programa oficial podr3 variar dependiendo de los resultados obtenidos durante su puesta en marcha, principalmente de la frecuencia de la presentaci3n de cepas resistentes para los distintos pat3genos 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 8°C.

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 efectuarán 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 específico 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 está 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 30 segundos de arco (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 Subsecretaría 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 generó 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 específico 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 los 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 f3sicos no obstante, ante eventos de alerta temprana, se efectuar3an reportes extraordinarios por otras v3as instant3neas. Asimismo, la Autoridad podr3 acceder a revisar la informaci3n en l3nea, a trav3s de usuarios sin restricciones. Tanto el costo de generaci3n de informes por parte de IFOP, como la revisi3n 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 secci3n. 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 implementaci3n del Programa propuesto a trav3s de la t3cnica de costeo basado en las actividades o ABC (“Activity Based Costing”).

La t3cnica de costeo basado en las actividades o ABC (“Activity Based Costing”) comenz3 a recibir especial atenci3n en 1986, con la publicaci3n de estudios realizados por el Harvard Business School. Actualmente el t3rmino ABC es ampliamente usado debido a la implementaci3n del m3todo en empresas de todo el mundo.

En t3rminos generales, el m3todo considera que los productos no consumen costos sino que los productos involucran actividades exigidas para su fabricaci3n, 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 realizaci3n determina los productos finales de la producci3n.



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 afectarían 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.

Título 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 descartó 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 *Pseudomonas 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 muestrales 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, ácido 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 (ácido 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 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 ($\leq 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$). 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,0312-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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 salmoniculora, 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 fen3meno de resistencia obedece a una respuesta a la presi3n de selecci3n de bacterias a trav3s del uso continuo de antimicrobianos en una poblaci3n especifca de microorganismos, los que a su vez, por diferentes mecanismos, difunden esos genes a trav3s de diversos medios intra e inter especie.

En consecuencia, el tomar muestras aisladas en el tiempo de residuos antimicrobianos en m3sculo, no necesariamente explicar3 la emergencia del fen3meno de resistencia bacteriana, sin un monitoreo permanente del uso efectivo de sustancias antimicrobianas (en cantidad utilizada y a trav3s del tiempo), asociados a poblaciones de especies bacterianas, las que a su vez, requieren ser caracterizadas como tales.

Por otro lado, los an3lisis de los sedimentos provenientes de centros de cultivo evidenci3 la presencia de niveles moderados de bacterias heter3trofas, no observ3ndose 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 eutrofizaci3n 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 específicas 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 obligaciones 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 Ays3n) 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 oxol3nico. Por el contrario el 33,9 y 13,5% present3 resistencia a 3cido oxol3nico y flumequina, respectivamente, el 7% present3 resistencia a oxitetraciclina y el 3,9% a florfenicol.
- En el caso de *Piscirickettsia salmonis* el 98,7% de las cepas analizadas present3 sensibilidad a florfenicol, el 92,4% a amoxicilina, el 91,1% a flumequina, el 82,2% a 3cido oxol3nico y el 75,9% present3 sensibilidad a oxitetraciclina. El mayor nivel de resistencia se present3 para acido oxol3nico y flumequina con un 17,7 y 5%, respectivamente. El 24,1 % de las cepas present3 sensibilidad intermedia a oxitetraciclina.
- En el caso de los aislados de *Vibrio ordalii* analizados, es posible observar que el 100% de las cepas present3 sensibilidad al 3cido oxol3nico, 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 antibi3ticos amoxicilina y eritromicina, como resistencia a acido oxol3nico y flumequina. Para el antibi3tico oxitetraciclina, un total de 7 cepas presentaron sensibilidad intermedia y 1 cepa present3 resistencia al f3rmaco.



- Para la cepas analizadas de *Aeromonas salmonicida*, un 83,3% de las cepas present3 sensibilidad al florfenicol, seguido de la amoxicilina con un 66,6% de cepas sensibles. Para el 3cido oxol3nico, el 66% de las cepas presentaron resistencia a este antibi3tico, seguido de oxitetraciclina, flumequina y amoxicilina con un 33% de cepas resistentes para cada uno de los f3rmacos.

Para la cepas analizadas de *Yersinia ruckeri*, el 100% de las cepas present3 sensibilidad a los antibi3ticos amoxicilina, florfenicol, oxitetraciclina, 3cido oxol3nico y flumequina.

- Respecto a las Concentraciones M3nimas Inhibitorias (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 M3nimas Inhibitorias, CMI, para *Flavobacterium psychrophilum* de florfenicol, evidenciaron, en su mayor3a, cepas con valores de entre 0,25-0,5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que otro grupo, mayoritariamente de cepas aisladas durante el a3o 2010, evidenciaron niveles de CMI para este mismo antimicrobiano, superiores a 2 $\mu\text{g/mL}$.
- La determinaci3n de los valores de CMI de oxitetraciclina para este mismo pat3geno, evidenci3 una alta dispersi3n, en que la mayor3a de las cepas en estudio present3 niveles de susceptibilidad $\geq 4 \mu\text{g/mL}$. Asimismo, los valores de CMI de las quinolonas, 3cido oxol3nico y flumequina presentaron una amplia dispersi3n, detect3ndose un n3mero importante de cepas con valores de CMI mayores a 8 $\mu\text{g/mL}$ y 4 $\mu\text{g/mL}$, 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 diseñó 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.
- EMA. 2003. Committee for Veterinary Medicinal Products, Future Strategy on Antimicrobial Resistance. EMA/CVMP/558/03-FINAL.
- EMA. 2000. A risk management strategic plan for controlling antimicrobial resistance through the authorisation of veterinary medicines. EMA/CVMP/818/99-FINAL.



- Enger, O., Husevag, E. & J. Goksøy. 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 antimicrobial 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. Goksøy. 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, penicillin 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., Giesecker, 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 Analysis 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: pharmacokinetics, 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.



- Sørum, H., Poppe, T.T. & Ø. Olsvik. 1988. Plasmids in *Vibrio salmonicida* isolated from salmonids with hemorrhagic syndrome (Hitra disease). *J. Clin. Microbiol.* 26: 1679-1683.
- Sørum, 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.
- Sørum, 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., Hølleland, 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 occurring 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, 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., 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 *Edwardsiella 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. Goksøy. 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.