

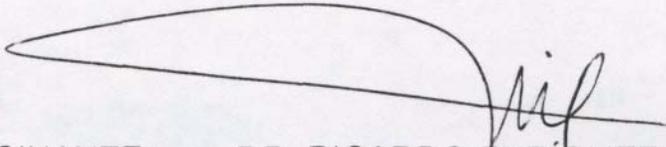


UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Patología Animal
Ictiopatología

**Respuesta de Aeromonas móviles y Pseudomonas sp. aisladas desde
merluza de cola (Macruronus magellanicus) a cuatro
antimicrobianos utilizados en la salmonicultura**

**Tesis de grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA**

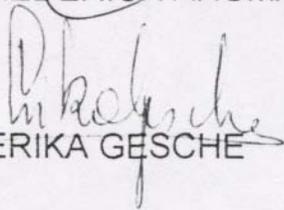
Sergio Segundo Silva Palma
Valdivia Chile 1997



PROFESOR PATROCINANTE: DR. RICARDO ENRIQUEZ



PROFESORES CALIFICADORES: DR. FREDERICK AHUMADA



DRA. ERIKA GESCHE

FECHA DE APROBACIÓN: 18 JUL 1997

**A MIS
PADRES**

INDICE

	pág
1.- Resumen.....	1
2.- Summary.....	2
3.- Introducción.....	3
4.- Material y Método.....	9
5.- Resultados.....	14
6.- Discusión.....	26
7.- Bibliografía.....	40

1.-RESUMEN

La terapia antibiótica es el arma más flexible y efectiva contra enfermedades bacterianas en peces. Sin embargo su uso puede provocar trastornos debido a la emergencia de cepas bacterianas resistentes, introducción de antibióticos al medio ambiente acuático, además de involucrar un riesgo para la salud pública.

El objetivo de esta tesis es determinar la respuesta a ácido oxolínico, flumequina, oxitetraciclina y sulfa-trimetoprim, por parte de *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp.* aisladas de intestino de Merluza de cola (*Macruronus magellanicus*), fauna acompañante a cultivos de salmonídeos en fase marina. Para lo cual se sometieron los cultivos bacterianos a antibiograma.

Se logró aislar 7 colonias pertenecientes al género *Aeromonas móviles*. Los resultados indican que la mayor proporción de *Aeromonas móviles* (5), fue resistente a oxitetraciclina; mientras que no se obtuvieron bacterias resistentes al ácido oxolínico y la sulfa-trimetoprim. Una colonia resultó resistente a flumequina, 4 medianamente sensibles y 2 sensibles.

Además se identificaron cepas de *Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas putida* confirmadas por sistema API 20-E. El antibiótico con menor respuesta de resistencia en este grupo, resultó ser el ácido oxolínico que actuó contra el 90,91% (n=44). Un 50% de las cepas fue resistente a flumequina, un 34,09% medianamente resistente y un 15,91% sensible. La mayoría de las cepas aisladas fueron resistentes a la sulfa-trimetoprim (70,37%), solo 1 cepa fue medianamente sensible (2,27%) y 12 (27,24%) fueron sensibles. Un 54,54% de las cepas fue sensible a oxitetraciclina, el 4,54% fue medianamente sensible y el resto, 40,92% fue resistente.

La cantidad de bacilos Gram negativos resistentes a los antimicrobianos probados, nos debe mover a reflexión en cuanto al uso correcto de los antimicrobianos en la salmonicultura nacional.

2.-SUMMARY

Antibiotic therapy is the most flexible and effective weapon against bacterial diseases in fish. However, its use could cause disorders due to the emergence of bacterial resistant strains and introduction of antibiotics to the aquatic environment, as well as involving a risk to public health.

The objective of this thesis is to determine the answer to oxolinic acid, flumequine, oxitetracycline and sulfa-trimetoprim, on the part of *Aeromonas motiles* and *Pseudomonas sp.* isolated from the *Macrurus magellanicus* intestine, accompanying the fauna to cultivations of salmonids in the marine phase. The isolated bacteria was tested for antibiogram.

It was possible to isolate 7 colonies of *Aeromonas motiles*. The results indicate that the majority of *Aeromonas motiles* organisms (5), were resistant to oxitetracycline, while none of the bacteria were resistant to oxolinic acid and sulfa-trimetoprim. One colony was resistant to flumequina, 4 being partially sensitive and 2 being sensitive.

Pseudomonas sp. strains were also identified and *Pseudomonas putida* were confirmed by the API 20-E system. The antibiotic with the lowest resistance response group turned out to be the oxolinic acid that acted against the 90.91% (n= 44). Fifty percent of the strains were resistant to flumequine, 34.09% were partially resistant, and 15.91% of those that were isolated were sensitive. Most of the isolated strains were resistant to the sulfa-trimetoprim (70.37%), only 1 strain was partially sensitive (2.27%) and 12 were sensitive (27.24%). Some 54.54% of the strains were sensitive to oxitetracycline, 4.54% were partially sensitive and the remaining 40.92% were resistant.

The amount of negative Gram resistant bacilluses to the tested antimicrobials should move us to reflect upon what may be the correct use of antimicrobials in national salmon-farming.

3.- INTRODUCCION

La salmonicultura en Chile se ha consolidado como una actividad de gran importancia económica. Las exportaciones chilenas de salmón y trucha durante 1996 totalizaron 135.000 toneladas netas de producto. Esta cifra es un 38.4% superior a las exportaciones realizadas el año 1995 con 97.700 toneladas. Las exportaciones valorizadas ascendieron a 538.3 millones de dólares, FOB Chile (Asociación de productores de Salmón y Trucha de Chile A.G., 1996)

En este tipo de producción intensiva de salmónidos son frecuentes los problemas con enfermedades (Samuelsen, 1992) siendo las de índole bacteriana responsables de grandes pérdidas en cultivos de peces (Dixon, 1991).

Se considera que estas últimas son secundarias a problemas propios de un sistema intensivo, tales como cambio de temperatura, manipulaciones diversas, mala calidad del agua, infestación por parásitos y tratamientos regulares con quimioterápicos. Cada uno de estos problemas generan un estrés más o menos constante, que interfiere con la respuesta inmune humoral, celular y la fagocitosis. El intento por minimizar este estrés va aparejado con el uso - y a menudo abuso - de la quimioterapia antibacteriana (Dixon, 1991).

La vacunación de peces ha reducido la ocurrencia de enfermedades, pero hasta ahora se dispone de un limitado número de vacunas, por lo que la terapia antimicrobiana es empleada más frecuentemente (Alderman y Michel, 1992; Samuelsen, 1992).

De este modo se ha considerado la terapia antibiótica como el arma más flexible y efectiva contra enfermedades infecciosas. Sin embargo los fármacos tienen limitaciones relativas a los grupos de patógenos contra los cuales son efectivos. Además la quimioterapia es un paliativo y no una solución final, estando su uso en el ambiente no exento de problemas prácticos (Alderman y Michel, 1992).

Los agentes antimicrobianos representan una parte muy significativa del total de fármacos utilizados en acuicultura. En el mundo, según Alderman y

Michel (1992) los más comúnmente utilizados han sido oxitetraciclina, cloramfenicol, sulfas potenciadas, nitrofuranos y quinolonas.

Los antimicrobianos utilizados más comúnmente en la salmonicultura chilena actualmente son flumequina, ácido oxolínico, oxitetraciclina y sulfatrimetoprim, los cuales fueron incluidos en la experiencia práctica de este estudio. El florfenicol y el sarafloxacino se han introducido últimamente sin alcanzar aún el nivel de uso que han obtenido los fármacos anteriormente mencionados (San Martín, 1996). Una mención especial merece la eritromicina utilizada como medida preventiva para la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD) previo al desove (Brown, 1993).

La oxitetraciclina fue examinada por su potencialidad como terapéutico en enfermedades de peces poco tiempo después de su uso médico. Snieszko y col. (1952), probaron un rango de nuevos fármacos antimicrobianos contra *Aeromonas salmonicida* in vitro y encontraron que su desempeño era inferior solamente al cloramfenicol. Resultados in vitro de sensibilidad de *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens* a oxitetraciclina demostraron que todas fueron sensibles (Muir y Roberts, 1988).

A finales de la década de los 70' fue introducida en Francia la flumequina siendo investigada por para su uso en peces, demostrándose que era eficaz contra furunculosis en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y café (*Salmo trutta*). Infecciones de laboratorio fueron controladas por terapia oral de 12 y 24 mg /kg de peso corporal por día durante seis días. Otros estudios de ácido oxolínico en UK, demostraron su eficacia en el tratamiento de Furunculosis y Yersiniosis (Muir y Roberts, 1988).

Las quinolonas son agentes de amplio espectro de actividad antibacteriana, en especial las fluoroquinolonas. En general, todas las quinolonas presentan una actividad elevada sobre bacilos Gram negativos, los cuales son causantes de la mayoría de las enfermedades bacterianas en peces. *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria sobre la cual las quinolonas ejercen menor acción. Las quinolonas no fluoradas son significativamente menos activas que las fluoradas. Por su parte las cepas de *Aeromonas hydrophila* presentan elevada susceptibilidad a los mencionados agentes antimicrobianos (Andriole, 1989)

Inicialmente, las sulfamidas fueron introducidas para su uso en USA por su eficacia contra bacterias Gram negativas tales como *A. salmonicida*. sulfamerazina administrada oralmente a *Salvelinus fontinalis* y Trucha café

(*Salmo trutta*) en dosis de 200 mg/kg de peso corporal por día fue efectiva en controlar Furunculosis (Snieszko y Bullock, 1957) sin una significativa toxicidad para el huésped. Se ha encontrado que la terapia con sulfamerazina era efectiva contra la Enfermedad Bacteriana del Riñón y que tenía menos efectos indeseables en *Salvelinus fontinalis* (Snieszko y Griffen, 1955). La sulfamerazina, sulfaguanidina y sulfadiazina, en diferentes combinaciones o solas a 250 mg/kg de peso corporal fueron igual de efectivas (Muir y Roberts, 1988).

Las principales complicaciones que acarrea el uso de antibióticos según Smith (1991) pueden ser englobadas en tres aspectos: emergencia de cepas bacterianas resistentes, introducción de antibióticos al medio ambiente acuático y riesgo para la salud pública.

Las investigaciones acerca de la resistencia bacteriana se han enfocado principalmente a patógenos de peces. Dichas bacterias patógenas constituyen sólo un pequeño porcentaje del total de la flora bacteriana ligada al cultivo de peces y aunque la resistencia a fármacos en ellas provoca graves pérdidas económicas, también cabe destacar que el desarrollo de resistencia a antibióticos en la población bacteriana total, puede difundirse con la circulación del agua y provocar serios trastornos (Spanggaard y col., 1993).

Los antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria han sido probados experimentalmente para tratar infecciones bacterianas de peces, sin embargo problemas tales como solubilidad, palatabilidad, toxicidad, costo, distribución y restricciones gubernamentales (en países del hemisferio norte) han limitado la disponibilidad de antibióticos a unos pocos compuestos apropiados (Dixon, 1991). Dicha limitada disponibilidad fomenta en los productores el acostumbrarse a tratamientos probados como exitosos. La filosofía práctica es "si esto funciona, no lo cambies", en lugar de rotar los fármacos disponibles en procura de evitar resistencia a antibióticos (Alderman y Michel, 1992). El incremento de resistencia bacteriana en patógenos de peces ha sido reportado en diversas áreas de la acuicultura tanto de aguas dulces, como marinas, cálidas y frías (Dixon, 1991). Actualmente está suficientemente confirmado que el desarrollo de dicha resistencia se correlaciona con el uso intensivo de terapias repetitivas (Alderman y Michel, 1992).

La mayor causa de resistencia bacteriana en acuicultura son los plasmidios, los cuales actúan en los casos de trimetoprim, sulfas y tetraciclinas como la causal de mayor importancia. En contraste la resistencia a quinolonas

es no transferible y está determinada por mutación cromosómica (Lewin, 1992).

La acuicultura nacional no ha estado libre de una creciente preocupación en materia de impactos ambientales (Alvial, 1993). Durante los últimos años se ha desatado en el país gran controversia en torno a la acuicultura, acusándola de falta de compatibilidad ecológica. Específicamente ha sido objeto de ardiente polémica el cultivo de salmones en balsas jaula (Caro y col., 1995)

Basándose en los criterios sobre impacto ambiental propuestos por el grupo de expertos en aspectos científicos de polución marina GESAMP, dependiente de la FAO (1991), uno de los impactos sobre la calidad de los cuerpos de agua, es el ocasionado por la emisión de compuestos bioactivos. El incremento en el uso de antibióticos en acuicultura, ha llevado a la necesidad de un conocimiento claro sobre los efectos de estas sustancias en el ambiente acuático (Grave y col., 1990)

Debido a que los peces son destinados a consumo humano, el desarrollo de resistencia bacteriana plantea un riesgo para la salud del consumidor.

Este riesgo no está restringido a los patógenos de peces, sino que a una amplia gama de microorganismos expuesta a los fármacos utilizados. Bacterias patógenas para el hombre pueden hallarse en condiciones naturales en cultivos piscícolas y en el ambiente acuático (Spanggaard y col., 1993).

Las *Aeromonas móviles* son las bacterias más comunmente aisladas desde hábitats acuáticos a través del mundo. Están asociadas con severas enfermedades en peces de cultivo y silvestres. Dichas enfermedades se propagan dondequiera que se encuentren peces ya sean ornamentales, de pesca deportiva, de producción, de aguas cálidas o frías. La bacteria puede causar también enfermedad en peces silvestres y es común en la flora intestinal de peces aparentemente sanos (Trust y col., 1974). La bacteria es ubicuitaria; esta se presenta en la mayoría de los ambientes de aguas dulces, siendo posible encontrarlas en toda la columna de agua hasta los primeros centímetros del sedimento (Hazen, 1979). *Aeromonas hydrophila* se encuentra en ambientes con un amplio rango de conductividad, turbidez, pH, salinidad y temperatura (Hazen y col., 1978). La temperatura óptima para su desarrollo se extiende entre 25 a 35°C. Consecuentemente la mayoría de los brotes

epidémicos en el sur de los Estados Unidos se reportan en primavera y comienzo de verano (Meyer, 1970)

Organismos reconocidos como *A. hydrophila* también causan enfermedades en animales homeotermos. En huéspedes humanos inmunodeprimidos por ejemplo *A. hydrophila* en ocasiones causa artritis séptica, diarrea, úlcera corneal, infecciones en piel y heridas, meningitis y septicemias fulminantes (Davis y col., 1978).

Las representantes del género *Pseudomonas* habitan el suelo, además de los ambientes dulceacuícolas y marines donde cumplen funciones de remineralización de materia orgánica (Rheinheimer, 1987). Existen bacterias adscritas al género *Pseudomonas* potenciales patógenas para el hombre, animales y peces (Alvarado, 1990).

Las *Pseudomonas* son habitantes normales del tracto digestivo de los peces, considerándose patógenos oportunistas para ellos, cuando son afectados por situaciones de estrés. Las septicemias causadas por *Pseudomonas* en peces presentan básicamente la misma signología externa que las ocasionadas por el género *Aeromonas* (Alvarado, 1990).

Los antibióticos pueden ser administrados en forma de alimento o pellet medicado. Cuando el pez sufre enfermedades bacterianas usualmente presenta apetito reducido, por lo que parte del fármaco destinado a la terapia no es consumido y pasa a los sedimentos o a la columna de agua (Samuelsen, 1992; Lunestad, 1992).

Estudios realizados en cultivos piscícolas del hemisferio norte han comprobado que la fauna acompañante puede consumir fecas y alimeto eventualmente medicado, por lo cual se han detectado residuos antibióticos y cepas resistentes en intestino de peces silvestres a dichos antimicrobianos. Esto y las implicancias de los problemas que acarrea el uso de antibióticos motivó el desarrollo de la presente investigación que persigue como objetivo, determinar el grado de resistencia a diversos antimicrobianos utilizados en la salmonicultura chilena, en cepas de *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp.*, aisladas a partir de intestino de Merluza de cola (*Macruronus magellanicus*), fauna acompañante a cultivo de peces.

Por intermedio de este estudio preliminar se espera establecer un diagnóstico, de manera que con análisis posteriores más completos y que

cuenten con mayores recursos, se logren conclusiones que permitan un uso racional de los recursos farmacológicos actuales.

4.- MATERIAL Y METODO

4.1.- MATERIAL:

4.1.1.- Material biológico:

El material biológico estuvo constituido por 90 merluzas de cola (*Macruronus magellanicus*) capturadas en las inmediaciones de tres centros de cultivo de especies salmonídeas en su fase marina, ubicadas en el "Estero Compu", comuna de Quellon, Xª Región.

El tamaño muestral fue determinado mediante el sistema de muestreo de conveniencia, considerándose los recursos disponibles. El muestreo se llevó a cabo durante los meses de Julio y Agosto de 1995.

4.1.2.- Material de laboratorio:

Se utilizó para este estudio como medios de cultivo selectivo e indicador agar GSP (agar selectivo para *Pseudomonas-Aeromonas* seg. Kielwein, Merck m.r.)

Como base nutritiva se utilizan únicamente glutamato y almidón, que no pueden ser aprovechados por muchos de los gérmenes de acompañamiento. El almidón es degradado por las *Aeromonas*, con formación de ácido, pero no por las *Pseudomonas*. Para mejorar la selectividad, se añade penicilina al medio de cultivo.

El medio se compone de L(+)-glutamato sódico 10,0 g; almidón hidrosoluble 20,0 g; dihidrogenofosfato potásico 2,0 g; sulfato de magnesio 0,5 g; rojo fenol 0,36 g; agar-agar 12,0 g. Como aditivo requiere de 100.000 UI/l de penicilina G sódica.

Para el aislamiento y mantención de colonias se utilizó agar TSA/SAL 1%.

Los sensidiscos de antimicrobianos probados fueron oxitetraciclina, flumequina, sulfa-trimetoprim y ácido oxolínico (Difco m.r.)

Además se utilizaron materiales, medios y reactivos según estándares para identificación bacteriana, necesarios para realizar las pruebas indicadas en el punto 4.2.5.

4.2.- MÉTODO

4.2.1.- Captura de peces

Los ejemplares fueron capturados con carnada viva, masa y cebos artificiales. Estos se capturaron desde puntos ubicados estratégicamente en las inmediaciones de tres centros de cultivo.

4.2.2.- Sacrificio

El sacrificio de los peces se realizó mediante noqueo o por asfixia.

4.2.3.- Transporte

Los peces capturados entre las 22:00 hrs y las 06:00 hrs en las cercanías de centros de cultivos de salmónidos se transportaron en cajas térmicas refrigeradas para su procesamiento durante la mañana en un laboratorio de ictiopatología de la zona.

4.2.4.- Examen clínico y toma de muestras

Se procedió a determinar la especie, medir y pesar cada individuo, luego de lo cual se realizó una pequeña incisión con tijera estéril, a partir de la cual se prolongó un corte en dirección craneal siguiendo la línea media de la superficie ventral, hasta la altura de las aletas pectorales. Luego se realizó un corte desde la incisión anterior al ano, en dirección dorsocraneal formando una curva y continuando en forma paralela a la columna vertebral, levantando la pared hacia la cabeza, exponiendo las vísceras hacia el examinador. Posteriormente se extirpó una porción de unos 2 a 3 cm del intestino comenzando unos 2 cm delante del ano. La porción extirpada se vació de su contenido, la cual se depositó en frascos estériles con 5 ml de buffer fosfato

salino 1/15 molar a pH 7.6, lográndose una dilución aprox. de 1:10 la cual mantenida a una temperatura de 6-8°C puede mantenerse en perfectas condiciones de 2 a 3 días.

4.2.5.- Procesamiento de muestras

Desde el homogeneizado resultante del buffer fosfato salino más el contenido del trozo de intestino posterior se extrajo un volumen de 0.2 ml, el que fue vertido en placas de agar con el medio GSP el cual requiere una temperatura de incubación de 22°C por un tiempo variable de entre 2 y 5 días. El volumen del homogeneizado se distribuyó uniformemente con la ayuda de un rastrillo microbiológico.

Luego de obtenido un adecuado crecimiento de colonias se aislaron todas aquellas con características de *Aeromonas* (amarillas en agar GSP) y *Pseudomonas* (colonias púrpura en agar GSP) luego se realizó un repique en agar TSA/SAL 1% e incubó posteriormente a una temperatura de 22°C en placa durante 18 a 24 hrs para obtener cultivos puros. Luego de lograr el crecimiento y constatar mediante tinción Gram, pureza, morfología y reacción tintorial, oxidasa y catalasa se descartaron aquellas que no concuerdan con las características de los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Aquellas muestras que presentaban algún grado de contaminación se repicaron para separar y elegir colonias puras, las obtenidas por esta vía se sometieron a cultivo nuevamente en agar GSP, eliminándose aquellas que no lograran la coloración de la cepa de origen. Aquellas colonias que por su coloración natural amarilla fueron difíciles de caracterizar como degradadoras de almidón se incubaron en agar GSP inclinado, donde se descartaron las que no viraron el medio a amarillo.

A las cepas consideradas sospechosas de *Aeromonas móviles* se les realizaron las siguientes pruebas de laboratorio para identificación a nivel de género.

- Tinción de Gram.
- Morfología.
- Reacción de Oxidasa.
- Reacción de Catalasa.
- Oxidación / Fermentación de la Glucosa.

Para la tipificación de *Aeromonas móviles* se realizaron las siguientes pruebas.

- Motilidad en gota pendiente.
- Reducción de Nitratos.
- Hidrólisis de la Esculina.
- Utilización de Salicina.
- Producción de Hidrógeno Sulfurado.
- Utilización y producción de gas de la Glucosa.

A la batería anteriormente propuesta se agregaron las pruebas de sensibilidad al Vibriostático O/129 y Novobiocina.

Todas las pruebas en tubo, se incubaron a 25°C por 24 hrs. Las reacciones que merecían dudas se incubaron hasta completar las 48 hrs.

Las colonias de *Aeromonas sp.* y *Pseudomonas sp.* identificadas se almacenaron a temperatura de refrigeración en placa, por un máximo de 7 días, en espera de ser sometidas a una prueba de antibiograma por el método de difusión en TSA adicionado con 1% de NaCl, con el objeto de evaluar la respuesta frente a sensidiscos de los siguientes antimicrobianos utilizados en la salmonicultura chilena:

- Ácido oxolínico
- Oxitetraciclina
- Flumequina
- Sulfa-Trimetoprim

Para ello los antibiogramas se incubaron a 22°C por 18 a 24 hrs. leyéndose al cabo de ese tiempo como lo indica el siguiente cuadro.

Antimicrobiano **	Sensidiscos Concentración (ug)	* Halos de inhibición		
		R	1/2	S
Ac.oxolínico (O)	2	<10		>11
Sulfa-trimetoprim (S)	25	<15	15-16	>16
Flumequina (F)	30	<21	21-26	>26
Oxitetraciclina (Ox)	30	<14	15-18	>18

* Según lo indica el fabricante Difco m.r.

** Fecha de vencimiento Noviembre de 1996.

Donde R = resistencia, 1/2 = medianamente resistente, S = sensible

A aquellas cepas sospechosas de pertenecer al género *Pseudomonas* se les realizó como pruebas screening los tests de oxidasa, catalasa, motilidad en gota pendiente, fluorescencia en MFN (Agar Motilidad Fluorescencia Nitrato, Difco m.r.), test O/F (Oxidación/ fermentación de la glucosa) y tinción de Gram.

Dos cepas con resultado de resistencia a todos los antimicrobianos, una con resistencia a sulfa-trimetoprim, flumequina y oxitetraciclina, además de una con resistencia a flumequina y oxitetraciclina, fueron identificadas mediante sistema de batería bioquímica API 20-E.

5.- RESULTADOS

Los peces a la necropsia no presentaron lesiones que pudieran atribuirse a alguna patología de tipo viral o bacteriana.

Como otros hallazgos cabe destacar que solamente un ejemplar presento restos manifiestos de pienso para salmones en su contenido estomacal, siendo los principales ítems de alimentación, calamares, peces pequeños y pequeños crustáceos (Krill). El 100% de los peces capturados contenían pequeños crustáceos (Eufasidos) en el estómago, siendo este ítem por tanto el mayor componente de la dieta en la época de muestreo.

El 100% de la población presentó parasitosis interna por gusanos nemátodos a nivel de cavidad abdominal, los cuales fueron muestreados en su totalidad para estudios posteriores.

Un 13,3% (12) de los peces estaban parasitados en la cavidad bucal por organismos probablemente copépodos.

Los resultados de la batería bioquímica aplicada para la identificación de *Aeromonas móviles* se comparan con a continuación indicado en la literatura.

	A	B		C		
Característica		A.h	A.s	A.h	A.s	A.c
Bacilo	Gram (-)					
Motilidad	+	+	+	+	+	+
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Catalasa	+	+	X	+	+	+
Red.Nitratos	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Gas de glucosa	+	X	X	+	+	-
Esculina	-	+/-	+/-	+	-	+
Salicina	-	+/-	-	+	-	+
H ₂ S	-	-/+	+/-	+	+	-
O/129	-	-	-	-	-	-
Novobiocina	-	X	X	X	X	X

Donde : A = Resultados obtenidos
 B = Whitman y MacNair
 X = No se hace referencia
 A.h = *Aeromonas hydrophila*
 A.s = *Aeromonas sobria*
 A.c = *Aeromonas caviae*

Los resultados indican que el mayor parecido de las cepas de *Aeromonas móviles* detectadas es con la clave diagnóstica propuesta por Whitman y MacNair (1996), para *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas sobria*. Según Olavarría (1992) la clave diagnóstica obtenida tiene mayor parecido con *Aeromonas sobria*.

Los resultados de la batería bioquímica para *Pseudomonas sp.*, que se indican a continuación concuerdan con lo indicado por Alvarado y col. (1990).

Bacilo	Gram (-)
Aprovechamiento de L-Glutamato	+
Oxidasa	+
Catalasa	+
O/F	+/-
Motilidad	+

Las cepas sospechosas de pertenecer al género *Pseudomonas sp*, fueron confirmadas y las escogidas para el test API 20-E fueron identificadas como *Pseudomonas fluorescens/putida*, una prueba adicional en medio MFN, confirmó que se trataba de *Pseudomonas putida*.

A continuación las tablas 1, 2 y 3 contienen los datos relativos a peso y longitud de los ejemplares según sitio de captura y cantidad de cepas *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp*. Aisladas.

Tabla 1.- Longitud, peso y cantidad de *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp*, aisladas a partir de intestino de Merluza de cola. Sitio I.

Pez N°	Longitud (cm)	Peso (g)	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
1	45	312		2
2	47	323		
3	50	289		
4	49	320		
5	44	242		
6	47	251		
7	47	249		2
8	39	231		
9	47	306		
10	50	324		
11	50	307		1
12	47	282		1
13	44	268		1
14	43	283		
15	50	337		1
16	43	256		1
17	42	260		
18	46	248		
19	47	312		
20	51	326		
21	49	292		
22	48	253		1
23	47	290		
24	48	315		
25	46	289		
26	46	268		
27	45	295	2	
28	55	387		
29	48	287		
30	49	287		

Tabla 2.- Longitud, peso y cantidad de *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp*, aisladas a partir de intestino de Merluza de cola. Sitio II.

PezN°	Longitud (cm)	Peso (g)	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
1	52	371		
2	50	373	1	
3	48	301		
4	49	281		2
5	46	232		
6	50	358		1
7	48	325		
8	47	246		
9	49	263	1	
10	52	423		
11	50	304		1
12	45	242		2
13	44	271		
14	49	325	2	
15	48	328		2
16	48	354		
17	50	349		
18	50	316		
19	51	321	1	2
20	48	296		
21	51	325		1
22	47	348		
23	45	284		3
24	45	253		1
25	47	295		
26	48	326		
27	36	293		
28	52	449		
29	52	374		1
30	54	340		

Tabla 3.- Longitud, peso y cantidad de *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp*, aisladas a partir de intestino de Merluza de cola. Sitio III.

Pez N°	Longitud (cm)	Peso (g)	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
1	48	237		1
2	51	223		
3	45	310		4
4	46	265		1
5	49	281		1
6	47	225		
7	48	291		1
8	49	254		
9	45	294		
10	51	360		
11	46	331		
12	49	354		
13	46	292		
14	48	330		
15	47	276		
16	48	332		
17	49	342		3
18	47	312		2
19	47	272		
20	43	322		
21	48	344		
22	48	303		
23	49	314		
24	47	307		1
25	44	302		
26	46	288		
27	48	386		3
28	48	429		1
29	47	353		
30	47	362		

Las tablas 1, 2, y 3 indican que los registros de peso y longitud del stock de peces muestreados, ratifican que el estudio se realizó sobre un grupo de peces con un estadio de desarrollo bastante uniforme por lo cual se pueden descartar estados fisiológicos muy dispares. Esto puede tener importancia desde el punto de vista de farmacocinética y farmacodinamia de los antimicrobianos.

Las tablas 4, 5 y 6 nos indican la respuesta a los antimicrobianos de las cepas de los géneros *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp.* Donde se indican halos de inhibición en mm, y condición de sensibilidad (S), mediana sensibilidad (M) y resistencia (R).

Tabla 4.- Respuesta a antimicrobianos de *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp.* Sitio I.

PEZ N°	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	0	F	S	Ox
1		1	0(R)	11(R)	28(S)	9(R)
1		1	0(R)	11(R)	22(S)	0(R)
7		1	19(S)	19(R)	0(R)	22(S)
7		1	19(S)	20(R)	0(R)	25(S)
11		1	21 (S)	24(M)	0(R)	25(S)
12		1(a)	12(S)	18(R)	0(R)	0(R)
13		1	12(S)	18(R)	0(R)	0(R)
15		1	33(S)	34(S)	0(R)	33(S)
16		Ka)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)
22		1	12(S)	25(M)	28(S)	11(R)
27	1		17(S)	22(M)	25(S)	9(R)
27	1		18(S)	23(M)	26(S)	10(R)

Donde (a): Colonia identificada como *Pseudomonas putida*, sistema API

Tabla 5.- Respuesta a antimicrobianos de *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp.* Sitio II.

PEZ N°	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	O	F	S	Ox
2	1		11 (S)	20(R)	28(S)	11 (R)
4		1	33(S)	42(S)	30(S)	27(S)
4		1	23(S)	20(R)	0(S)	23(S)
6		1	22(S)	24(M)	0(R)	22(S)
9	1		12(S)	22(M)	30(R)	0(R)
11		1	27(S)	30(S)	35(S)	30(S)
12		1	17(S)	22(M)	19(S)	12(R)
12		1	24(S)	26(M)	29(S)	11(R)
14	1		18(S)	22(M)	30(S)	9(R)
14	1		23(S)	28(S)	36(S)	18(M)
15		1	16(S)	15(R)	0(S)	0(R)
15		1	17(S)	17(R)	0(R)	19(S)
19	1		40(S)	50(S)	37(S)	33(S)
19		1	18(S)	20(R)	0(R)	18(M)
19		1	18(S)	20(R)	0(R)	20(S)
21		1	24(S)	24(M)	16(S)	27(S)
23		1	18(S)	21 (R)	0(R)	21(S)
23		1	26(S)	29(S)	25(S)	23(S)
23		1	18(S)	18(R)	0(R)	17(M)
24		Ka)	19(S)	21 (R)	27(S)	8(R)
29		1	21(S)	19(R)	0(R)	22(S)

Tabla 6.- Respuesta a antimicrobianos de *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp.* Sitio III.

PEZ N°	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	O	F	S	Ox
1		1	14(S)	17(R)	0(R)	0(R)
3		1	24(S)	27(S)	12(M)	0(R)
3		1	20(S)	23(M)	0(R)	0(R)
3		1	22(S)	23(M)	0(R)	0(R)
3		1	21	22(M)	0(R)	0(R)
4		1	14(S)	17(R)	0(R)	0(R)
5		1	0(S)	0(R)	0(R)	0(R)
7		1	20(S)	22(M)	0(R)	21(R)
17		1	14(S)	17(R)	0(R)	0(R)
17		1	14(S)	19(R)	0(R)	0(R)
17		1	22(S)	23(M)	0(R)	0(R)
18		1	16(S)	30(S)	0(R)	8(R)
18		1	15(S)	26(M)	30(S)	0(R)
24		1	13(S)	16(R)	30(S)	0(R)
27		1	22(S)	26(M)	0(R)	23(S)
27		1	24(S)	28(S1)	0(R)	24(S)
27		1	21(S)	25(M)	0(R)	23(S)
28		1	18(S)	22(M)	0(R)	0(R)

A continuación las tablas 7 y 8 expresan la respuesta a los antimicrobianos probados, por parte de las cepas aisladas.

Tabla 7.- Resumen de la respuesta a antimicrobianos de aislados sospechosos de *Aeromonas móviles*.

Respuesta a antimicrobianos			
Antimicrobiano	Resistentes	1/2 Sensibles	Sensibles
Ácido oxolínico	0/7		111
Flumequina	1/7	4/7	2/7
Sulfa-Trimetoprim	0/7		7/7
Oxitetraciclina	5/7	1/7	1/7

Donde:

n = 7

X/X: N° de colonias correspondientes a la categoría indicada en la tabla/N° total de cepas

1/2: Medianamente

Tabla 8.- Resumen de la respuesta a antimicrobianos de aislados de *Pseudomonas sp.*

Respuesta a antimicrobianos						
Antimicrobiano	Resistentes		1/2 Sensibles		Sensibles	
	Numero	Porcentaje	Numero	Porcentaje	Numero	Porcentaje
Ácido oxolínico	4	9,09%			40	90,91%
Flumequina	22	50,00%	15	34,09%	7	15,91%
Sulfa-Trimetoprim	31	70,45%	1	2,27%	12	27,27%
Oxitetraciclina	24	54,54%	2	4,54%	18	40,90%

Donde: n = 44

Las siguiente tabla expresa las diferentes combinaciones de resistencia detectadas en *Aeromonas móviles*.

Tabla 9.- Resumen de combinaciones de resistencia a antimicrobianos en *Aeromonas móviles*.

Respuesta a antimicrobianos				
Bacterias aisladas	O	F	S	Ox
4	S	M	S	R
1	S	R	S	R
1	S	S	S	M
1	S	S	S	S

La tabla anterior muestra que un aislado de *Aeromonas móviles*, posee resistencia a flumequina y oxitetraciclina.

La tabla 10 expresa en forma porcentual las diferentes combinaciones de resistencia detectadas en los aislados de *Pseudomonas sp.*

Tabla 10.- Resumen de combinaciones de resistencia a antimicrobianos en *Pseudomonas sp.*

Respuesta a antimicrobianos					
N° de aisladas	Porcentaje	O	F	S	Ox
2	4,54	R	R	S	R
4	9,08	S	M	S	R
2(a)	4,54	R	R	R	R
7	15,89	S	R	R	S
6(a)	13,62	S	R	R	R
5	11,35	S	M	R	S
2	4,54	S	S	R	S
3	6,81	S	S	S	S
2	4,54	S	R	R	M
1	2,27	S	M	S	S
1(a)	2,27	S	R	S	R
5	11,35	S	M	R	R
2	4,54	S	R	R	R
1	2,27	S	S	M	R
1	2,27	S	S	S	R

De la tabla 10 se desprende que existen diferentes posibilidades de combinación de resistencia a antimicrobianos, se destacan 2 aislados resistentes a todos los antimicrobianos probados y 6 resistentes a flumequina, sulfa-trimetorpim y oxitetraciclina.

6.- DISCUSION

Los registros de peso y longitud de los peces si bien no sirven para hacer determinaciones alométricas que podrían ser de utilidad para otras investigaciones sobre esta especie, debido a que contemplan el peso del contenido digestivo postprandial, si son de utilidad para ratificar que el estudio se realizó sobre un stock de peces con un estadio de desarrollo bastante uniforme por lo cual se pueden descartar estados fisiológicos muy dispares y se ratifica que se sometían a similares condiciones ambientales y de alimentación. Esto puede tener importancia desde el punto de vista de farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos. (Tablas 1, 2 y 3)

Generalmente *A. hydrophila* no es considerada como bacteria marina, sin embargo estudios indican que se encuentra naturalmente en sistemas marinos y que puede encontrarse en todas las salinidades excepto la más extrema de 100% (Hazen y col., 1978). No obstante lo anterior, como se deduce de la presentación de resultados la probabilidad de aislar *Aeromonas móviles* a partir de intestino de *Macruronus magellanicus* en el ambiente acuático del Estero Compu, utilizando como medio selectivo agar GSP, es cuantitativamente menor que la de aislar bacterias del género *Pseudomonas*.

Los resultados de esta investigación indican de hecho, que un 5,5% de los peces evidenciaron crecimiento de colonias sospechosas de pertenecer al género *Aeromonas* en placas de agar GSP contra un 31,1% de individuos que evidenciaron crecimiento de colonias sospechosas de pertenecer al género *Pseudomonas* (Tablas 1, 2 y 3). Los representantes de este último género se han descrito como organismos aislados preferentemente del ambiente marino, mientras las *Aeromonas móviles* lo son del ambiente dulceacuícola (Davis y Sizemore, 1981).

Lo anterior se ratifica tomando en cuenta que la microbiología del intestino posterior de los peces es un reflejo de la microflora del ambiente en el cual viven, un ejemplo clásico es el cambio de microflora intestinal que sufren los peces anádromos al trasladarse del medio dulceacuícola al marino, donde la predominancia de *Aeromonas móviles* en intestino de los peces en agua dulce, cambia dando paso a una mayor proporción de *Pseudomonas*. Otro ejemplo son los resultados obtenidos en aislados a partir de carpa (*Cyprinus carpio*) desde el Río Cau-Cau, Valdivia, donde se aisló mayor proporción de

Aeromonas móviles que *Pseudomonas* sp. (Mihovilovich y Enríquez, 1984; Enríquez, 1984).

Es probable que también influyera la época de recolección de las muestras (Julio y Agosto) sobre el número de aislados de colonias sospechosas de *Aeromonas móviles*, debido a que la temperatura óptima para su desarrollo se extiende entre 25 a 35°C. Consecuentemente la mayoría de los brotes epidémicos en el sur de los Estados Unidos se reportan en primavera y comienzo de verano (Meyer, 1970).

La determinación etiológica de enfermedades asociadas con *Aeromonas móviles* es complicada por la heterogeneidad genética bioquímica y antigénica de los miembros de este grupo, de hecho en la actualidad aun se discute la clasificación taxonómica de las *Aeromonas móviles*. Su morfología se asemeja al género *Pseudomonas* y bioquímicamente se parecen a las *Enterobacterias*. No obstante la gran cantidad de estudios acerca de su clasificación no existe consenso con respecto a su clasificación (Rocco y col, 1984). En la actualidad se hace difícil clasificar las distintas especies de acuerdo a sus características bioquímicas, ya que habitualmente aparecen cepas que no concuerdan con las propiedades bioquímicas descritas en la 9ª edición del manual de Bergey.

Los resultados indican que el mayor parecido con las cepas detectadas es con la clave diagnóstica propuesta por Whitman y MacNair, para *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas sobria*. Se desprende también de este análisis que la batería mínima propuesta por Olavarría (1992), no satisface los requerimientos de las cepas canadienses, lo que podría ocurrir también con las bacterias colectadas en el Estero Compu.

En el medio nacional se ha adoptado la alternativa del agar GSP, para su uso en ictipatología. El hecho de que esté diseñado para la industria alimentaria, puede acotar su efectividad, considerando que en la industria elaboradora de alimentos (Kielwein, 1969) se restringe la posibilidad de variedad de géneros bacterianos, a diferencia del ambiente acuático marino donde la posibilidad de obtener adicionales representantes degradadores de almidón o degradadores de L-Glutamato, aumenta considerablemente. Es por esto que se eligió como test adicional el sistema API 20-E de reconocimiento mundial, para identificar bacterias del género *Pseudomonas*.

Si se considera el hecho de que los principales ítems de alimentación fueron, gusanos poliquetos, calamares, peces pequeños y pequeños crustáceos (Krill), encontrándose estos últimos presentes en el 100% de los

peces capturados, en teoría la exposición de estos ítems a antimicrobianos diluidos en la cadena alimenticia, o el simple hecho de que bacterias pueden haber sido expuestas a los fármacos en la columna de agua, previo a la entrada de los microorganismos al sistema digestivo del pez, son motivo suficiente como para sospechar que en intestino de la fauna acompañante a centros de cultivo, se encuentren cepas resistentes a los antimicrobianos probados.

Deben tomarse en cuenta las intrincadas relaciones tróficas de simbiosis, competencia, antibiosis, y otras, entre las bacterias heterótrofas entre si y con el fitoplancton y zooplancton. Existe un gran número de invertebrados, incluido el zooplancton, para los cuales el volumen de microorganismos que alcanza sus centros digestivos es considerable. Entre estos invertebrados se encuentran principalmente moluscos, tales como ostras, mitílidos, vermes y gusanos que habitan la arena o el fango. Junto a una variedad de larvas animales, tenemos formas permanentes, tales como krill, gusanos quetognatos, etc. En la mayoría de los bacteriófagos, la ingestión de bacterias y otros microorganismos sucede como consecuencia de la filtración del agua de mar, que contiene microorganismos en suspensión o partículas de materia orgánica. En general los moluscos pueden concentrar bacterias, cuyo recuento total viable puede ser de 10 a 100 veces mayor que el encontrado en la columna de agua (García-Tello, 1985).

En esta investigación la tendencia indica que la mayor proporción de *Aeromonas móviles*, no obstante el pequeño número de colonias aisladas, fue resistente a oxitetraciclina en 5 de 7 casos, mientras que el ácido oxolínico y la sulfa-trimetoprim resultaron ser los antimicrobianos con menor respuesta de resistencia, no obteniéndose bacterias resistentes. Por su parte una colonia resultó resistente a flumequina, 4 medianamente sensibles y 2 sensibles de 7 cepas aisladas (Tabla 7).

El ácido oxolínico fue el antimicrobiano contra el cual las cepas de *Pseudomonas sp.* presentaron mayor sensibilidad, siendo un 90,91% (40) de las cepas sensibles, y solo un 9,09% (4) de las cepas resistentes. Contra la flumequina un 50% de las cepas (22) fue resistente, fueron medianamente resistentes un 34,09% (15) y sensibles un 15,91% (7). La mayoría de las cepas aisladas fueron resistentes a la sulfa-trimetoprim (70,37%), solo 1 cepa fue medianamente sensible (2,27%) y 12 (27,24%) fueron sensibles. Contra la oxitetraciclina el 54,54% fue sensible, el 4,54% fue medianamente sensible y el 40,90% fue resistente (Tabla 8).

De los resultados expuestos se deduce que el uso de oxitetraciclina en *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp.* es cuestionable en el ambiente del Estero Compu, por los niveles de resistencia detectados en este estudio. Esto coincide con el echo de que este antibiótico ha sido ampliamente utilizado en la acuicultura nacional desde sus inicios y está siendo utilizado en la actualidad. Este antimicrobiano junto con la flumequina pese a que no existen datos oficiales son lo más utilizados actualmente, esta situación puede ser la causa del fenómeno de presión selectiva que genera la resistencia antibiótica (Tabla 7).

Por su parte la flumequina que debiera actuar contra los géneros estudiados, evidencia una tendencia hacia la mediana sensibilidad y resistencia, lo que permite deducir que hay una inclinación hacia la resistencia, fenómeno que puede explicarse por el nivel de uso que tiene este fármaco en la actualidad (Tabla 8).

Por su parte el ácido oxolínico resultó ser el más efectivo en la población de bacterias probada, actuando contra un 92.15% (47). Sin embargo existen evidencias recopiladas de estudios en otros países de que la reacción in vitro mediante sensidiscos que estima un halo de inhibición de <11 mm no se compadece con su acción en brotes de enfermedades en terreno, por lo cual la respuesta in vitro puede estar sobredimensionada, situación que requiere de estudios adicionales. Según el Finfish and shellfish bacteriology manual (Whitman y MacNair, 1996) los halos de inhibición considerados para patógenos de peces, del ácido oxolínico en sensidiscos de 2 ug, es de <14 mm para resistencia, entre 14-18 mm para mediana sensibilidad y >18 mm para sensibilidad. Si esto es efectivo los resultados expresados en el párrafo anterior varían de la siguiente forma, en un 72,54% de los casos las cepas fueron sensibles, en un 9,8% medianamente sensibles y un 17,64% de los casos fueron resistentes. Por lo expuesto cabe señalar la necesidad de realizar estudios que indiquen cuales son los halos de inhibición adecuados para las cepas nacionales, ya que la diferencia que se plantea adquiere gran importancia si se considera que de ello depende el fracaso o éxito de un tratamiento.

La utilización de agar GSP también nos indica que el 100% de las colonias aisladas son resistentes a penicilina G sódica, ya que este inhibidor es parte de la formulación del medio (Kielwein, 1969).

En cuanto a la resistencia múltiple es de importancia el hecho de que dos colonias aisladas (3,92%) fueron resistentes a todos los antimicrobianos

probados, como así también el hecho de que un 15,68 % (8) fueron resistentes a tres de los antimicrobianos. Por otra parte solo 4 colonias (7,84%) del total de colonias aisladas fueron sensibles a todos los antimicrobianos.

Cabe destacar el hecho de que del total de colonias aisladas 19 (37,95%), presentaron sensibilidad a ácido oxolínico y resistencia a flumequina lo que destaca el hecho de que a pesar de ser ambas quinolonas puede ocurrir que al ser efectivo in vitro el ácido oxolínico no lo sea la flumequina. Así también ocurrió que un 7.84% (4) de las colonias siendo resistentes a ácido oxolínico lo fueron a flumequina. Esto se contrapone a la percepción general del medio nacional donde se tiende a aseverar que el fracaso de un tratamiento por la utilización de un fármaco del tipo quinolona, nos señala inmediatamente la necesidad de cambiar a un antimicrobiano de otro grupo como la oxitetraciclina. Sin embargo esta percepción es comprensible si se considera que las patologías más importantes en el medio Síndrome Rickettsial Salmonídeo y Enfermedad Bacteriana del Riñón se tratan sin saber la respuesta que las cepas patógenas tienen, ya que el primero requiere de cultivos celulares mientras que el segundo es de difícil crecimiento, tardando a lo menos 15 días en crecer en medios de cultivo. Por lo anterior un cambio a otro grupo aumenta las posibilidades de evitar un nuevo fracaso. Esto se debe a lo indicado en la literatura que describe una probable resistencia cruzada para el grupo de quinolonas (Cullman y col., 1985).

En Chile no existen datos oficiales, pero una estimación aproximada revela que se podrían haber usado 13 ton en 1991 y 36 ton en 1993. Estas cifras se refieren a droga pura o principio activo, pero la cantidad bruta de antibióticos (producto comercial) utilizada es mucho mayor, y habría alcanzado a 90 ton dos años atrás (Caro y col., 1995). Aún en el caso de que estas cantidades adolezcan de un amplio margen de error, estas abultadas cifras deberían movernos a reflexión en el sentido de una mayor preocupación ambiental (Caro y col., 1995).

Un calculo teórico de la cantidad de antimicrobianos utilizados en el sector denominado "Estero Compu", no fue posible ya que los datos son de difícil acceso por los cuidados y hermetismo que respecto al tema deben guardar las empresas. Esfuerzos fueron desarrollados por la Asociación de Productores de Salmón y Trucha A.G. en el pasado por unificar criterios de control de enfermedades, ya que dicho sector engloba a lo menos 5 empresas diferentes con varios centros de cultivo cada una, en dicha oportunidad se trato de establecer registros del consumo de antimicrobianos y otros fármacos,

sin embargo dificultades en lograr acuerdo sobre formas de acción llevó al fracaso de este importante intento.

Los altos valores de consume de antimicrobianos deben llevarnos a reflexión acerca de la labor de los médicos veterinarios como entes reguladores, del uso de antibióticos en el medio nacional, quienes son los mas indicados para realizar terapias respaldadas no solo por antibiogramas, sino también con monitoreos de CMI (cantidad mínima inhibitoria) para los agentes mas importantes productores de enfermedad en el medio nacional como lo son *Piscirickettsia salmonis* y *Renibacterium salmoninarum*, los cuales requieren largos periodos para su crecimiento (*Renibacterium salmoninarum*) o cultivos celulares (*Piscirickettsia salmonis*).

No obstante lo antes señalado debe destacarse que la experiencia en otros países demuestra que la línea de investigación con mayor futuro es la del desarrollo de vacunas como una alternativa cierta de disminuir el uso de antimicrobianos (Bravo, 1993).

La transmisión de resistencia por intermedio de plasmidios es poco probable para el grupo de antimicrobianos conocido como quinolonas, siendo lo mas probable una mutación que otorgue resistencia, debido a una alta presión de selección. Como se indica en los resultados un 45,09% del total de colonias aisladas, resulto ser resistente a flumequina, lo que es motivo de preocupación si se toma en cuenta que las fluoroquinolonas han sido consideradas tradicionalmente como un arma de gran potencial incluso para el genero *Pseudomonas* (Andriole, 1989).

Cuando aparece un nuevo fármaco la industria tiende a utilizarlo como un capricho o moda, retrasando la aparición de otros. Esto conduce una vez mas a la consabida ruta de utilizar fármacos únicos, aparición de cepas resistentes y fracaso. Un ejemplo clásico fue el uso de cloramfenicol, que fue abandonado por los productores de peces (Alderman y Michel, 1992).

El uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento en alimentación de peces ha sido materia de debate. El nombre de promotores de crecimiento designa a ciertos compuestos que al agregarse al alimento permiten, en algunas especies animales, aumentar la productividad de las mismas ya fuera incrementando la tasa de crecimiento, reduciendo el consume de alimento o mejorando su utilización o una combinación de ambos factores. La contribución de los promotores de crecimiento a una mayor productividad animal es reconocida mundialmente. Sin embargo, en la

producción de especies acuícolas la evidencia experimental existente, en relación a las posibles ventajas productivas que podría significar su uso masivo, es muy limitada. Aunque algunos trabajos han demostrado efectos positivos de crecimiento con tetraciclinas, otros no lo han tenido. Por lo anterior es necesario realizar investigaciones sobre estas especies que den luces sobre aspectos básicos e incógnitas sobre su mecanismo de acción, eficacia al interactuar con otros factores y posibles efectos sobre la salud pública. En Chile se reportó resultados satisfactorios con un producto promotor de crecimiento a base de lincomicina, sin embargo este producto no tuvo éxito entre los productores nacionales (Barraza, 1992). Sin embargo en países como Taiwan se emplean antibióticos como promotores de crecimiento (Hsu y col., 1992). Lógicamente, una regular suplementación de la dieta con fármacos podrían conducir a problemas serios, particularmente si se usan compuestos como tetraciclinas (Alderman y Michel, 1992).

Austin y Al Zahrari (1988), estudiaron el efecto de antimicrobianos en la microflora gastrointestinal de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y determinaron bacterias de distintas taxas, las que fueron generalmente resistentes a los antibióticos en uso, especialmente a eritromicina y penicilina G, las cuales son usadas para tratar algunas enfermedades causadas por bacterias Gram-positivas.

Samuelsen y col. (1992), encontraron *Aeromonas salmonicida* en intestino de peces cultivados y silvestres concomitantemente con residuos de ácido oxolínico. Esto puede conducir al desarrollo y dispersión de bacterias resistentes.

El sedimento bajo un cultivo de peces contiene grandes cantidades de bacterias patógenas para ellos. La posibilidad de que las bacterias desarrollen resistencia a un fármaco puede aumentar si en el sedimento existen antibióticos presentes por un periodo prolongado luego de la medicación (Samuelsen y col, 1991; Nygaard y col., 1992). La resistencia bacteriana produce un cambio cualitativo y cuantitativo en la flora bacteriana, además de efectos tóxicos en la fauna silvestre (Nygaard y Col., 1992)

Por otra parte Kerry y col. (1994) al investigar el impacto de las terapias en la frecuencia de aparición de resistencia bacteriana en sedimentos bajo jaulas de cultivo, evidenciaron elevadas frecuencias de resistencia. Samuelsen (1992), detectó también un alto porcentaje de bacterias resistentes a oxitetraciclina en sedimento bajo balsas jaula con peces.

La oxitetraciclina, un antibiótico ampliamente utilizado en acuicultura es pobremente absorbido desde el tracto intestinal del pez, probablemente debido a que forma complejos con iones Ca^{++} y Mg^{++} (Lunestad y Goksoyr, 1990). Por consiguiente una gran proporción de la oxitetraciclina pasa a través del pez y llega al ambiente vía fecas. Así el fármaco contenido en restos de alimentos o fecas es accesible a la fauna silvestre, lo que se ha demostrado claramente en diversas publicaciones (Jacobensen y col., 1989; Samuelsen y col., 1991; Samuelsen y col., 1992; Bjorklund y col., 1990; Lunestad, 1992; Erviky col., 1994).

En algunos casos las sustancias inhibidoras bacterianas pueden transmitirse a lo largo de la cadena alimentaria marina. Por ejemplo, la reducida flora intestinal de los pingüinos y la actividad antibiótica del suero sanguíneo contra las bacterias Gram positivas, han sido atribuidas al ácido acrílico, el que se encuentra en un alga consumida por pequeños crustáceos, los cuales son a su vez dieta principal de las aves (Riley y Chester, 1989).

Los géneros estudiados forman parte de la microflora normal del intestino de peces, sin embargo pueden tornarse patógenos si el huésped se enfrenta a situaciones de estrés que conduzcan a su inmunosupresión. Entre los factores estresantes factibles de inmunodeprimir a un pez existen en Chile diversas patologías a saber, Síndrome Rickettsial Salmonídeo, Enfermedad Bacteriana del Riñón, Yersiniosis y recientemente Leucosis linfoblástica, cuando estos cuadros se desarrollan la septicemia puede llegar a ser mixta con patógenos oportunistas como *Aeromonas sp* y *Pseudomonas sp*, generalmente los brotes se tratan en base al antibiograma de cepas a partir de unos pocos peces como lo indica el manual de la FAO (1987) el que determine como adecuado para determinar una etiología 6 peces elegidos con signos evidentes de enfermedad. Se deduce de los resultados obtenidos que es posible aislar bacterias de un mismo o diferentes géneros bacterianos a partir de un individuo o población de peces, con diferente respuesta a antimicrobianos. Por lo tanto eventualmente un tratamiento puede fracasar o controlarse con un alto costo de mortalidad si el o los antibiogramas desarrollados no representan la amplia gama de patógenos acompañantes a un brote. Existe la tendencia a tratar enfermedades cuyos agentes no se pueden someter a antibiogramas como ocurre con SRS, BKD y Leucosis Linfoblástica con antibióticos de amplio espectro para atacar el agente causal, pero a menudo se descuida los patógenos oportunistas por lo poco representativas que pueden llegar a ser los antibiogramas de la realidad poblacional, o por lo engorroso que resulta tratar de lograr dicha representatividad.

La agresiva publicidad que ejerce el comercio nacional de los productos farmacológicos utilizados indica que son efectivos contra los géneros estudiados, sin embargo se demuestra que esto no es cierto, por lo cual la indicación de un antibiograma de las cepas consideradas como patógenas en una población de peces es de real importancia, como así también estudios de monitoreo de CMI en poblaciones para utilizar antimicrobianos con antecedentes adicionales en aquellos casos en que antibiogramas no son factibles (SRS y BKD).

Entre las bacterias pertenecientes al genero *Aeromonas móviles* una representante *A. hydrophila* es patógeno responsable de enfermedad de transmisión alimentaria, por lo que es de importancia recalcar la posibilidad de que una de las colonias aisladas lo sea ya que la adquisición de resistencia por ella sería un grave riesgo para la salud pública de llegar esta a entrar en un ciclo de selección por presión intrahospitalaria (Midtvedt y Lingaas, 1992). Conocidos son otros ejemplos, los cuales indican la posibilidad de transmisión de cepas resistentes a tratamientos antimicrobianos, por subterapias antibióticas realizadas en forma irresponsable con medicamentos de uso humano en animales (Midtvedt y Lingaas, 1992).

En el ambiente aéreo la dosificación de fármacos puede ser mejor controlada, lográndose una baja posibilidad de subterapias ya que un organismo vivo es hasta cierto punto independiente del resto, esto no ocurre en el ambiente acuático donde inexorablemente el tratamiento de una población de peces independiente de la vía de administración implica subterapias a la fauna acompañante y a la microflora del ambiente acuático (Alderman y Michel, 1992; Samuelsen, 1992; Nygaard y col., 1992).

De hecho el uso de quinolonas en medicina humana pese a su gran potencial se destina exclusivamente a problemas mayores como son los ocasionados por *Pseudomonas* en infecciones urinarias (Leigh y col., 1984) el cual es un genero estudiado en este trabajo que demostró ser resistente, de hecho cuatro cepas de *Pseudomonas putida* identificadas mediante sistema API 20-E demostraron respectivamente ser dos resistentes a los cuatro antimicrobianos probados, una resistente a flumequina, sulfatrimetoprim y oxitetraciclina, además de una tercera cepa resistente a flumequina y sulfatrimetoprim.

El hecho de que aparezcan cepas resistentes a quinolonas exige adicionales estudios que comparen la presión de selección de los

antimicrobianos utilizados en la salmonicultura chilena, comparando sitios afectados con sitios libres.

Es menester en cualquier trabajo de investigación hacer un análisis a propósito de la metodología utilizada en la investigación, de manera que en estudios posteriores la toma de decisiones acerca de su utilización tenga mayor respaldo. Por lo anterior cabe consignar que el intento de utilizar espineles para la captura de ejemplares atados a las balsas jaula tuvieron una muy baja eficiencia en comparación a la pesca con cebos artificiales para esta especie, siendo mas efectiva la pesca nocturna y de gran ayuda las luces para su atracción, como lo fueron en este caso las de la faena de cosecha como también las del muelle de Compu.

El traslado de ejemplares amerita el uso de hielo ya que la textura de la carne evidencia la rápida descomposición que sufre esta especie.

El medio de cultivo utilizado como indicador y selectivo, utilizado tiene el inconveniente de que debe ser constantemente revisado, desde el momento de la siembra, ya que el crecimiento de *Pseudomonas* cuando es mayor en cuantía que el de *Aeromonas* provoca que la subida de pH del medio haga tornar completamente la placa de color púrpura, perdiéndose la identificación de las colonias amarillas por lo que al momento de divisar pequeño crecimiento de colonias sospechosas de *Aeromonas* conviene remarcarlas.

Los mecanismos de transmisión por intermedio de plasmidios entre especies bacterianas diferentes es conocida para la oxitetraciclina y sulfas, por lo cual el hallazgo de cepas resistentes, independientemente de que su origen en cuanto a especie halla sido confiablemente identificado tan solo en 7 cepas, pone en evidencia la posibilidad de que en el sector denominado "Estero Compu", ocurra transmisión de plasmidios desde cepas resistentes a cepas sensibles de importancia en patologías de peces o aun lo que es más conflictivo a patógenos de importancia en salud pública, con la adición de terapias repetitivas como originarias de presión selectiva. Igual posibilidad enfrenta el uso de quinolonas por la vía de mutaciones.

Un ejemplo que preocupa al medio nacional hoy en día es *Listeria monocytogenes* como agente de patología de transmisión alimentaria, especialmente ahora que EE.UU. y clientes de Japón exigen tolerancia cero para esta bacteria en carne de salmonídeos, dicha exigencia se basa en que existen evidencias de su presencia en el ambiente acuático, de hecho *Listeria monocytogenes* es una bacteria ubicuitaria, que además tiene cierto grado de

resistencia al calor y que se desarrolla también a bajas temperaturas. Puede afectar a mujeres embarazadas y a sus fetos, ancianos e individuos inmunosuprimidos. Los síntomas de la enfermedad incluyen meningitis, infecciones del sistema nervioso central, abortos, partos prematuros y septicemias. En el pescado la bacteria se alberga en intestino y mucus del pescado, por lo cual una terapia antimicrobiana tiene serias posibilidades de afectar la bacteria. Si se considera que la forma de tratamiento de la patología en humanos es mediante uso de antibióticos, es una materia de alarma el consignar la posibilidad de que por la vía de tratamientos en cultivos piscícolas la bacteria adquiera resistencia. Por lo expuesto es necesario controlar el uso y a menudo abuso de terapias antimicrobianas considerando el peligro que involucra para la salud pública siendo *Listeria monocytogenes* solo uno de los ejemplos (Ronda y Thakor, 1992). El hecho de que se detecten bacterias Gram negativas resistentes a sulfa-trimetoprim y oxitetraciclina es de importancia y también aplicable al ejemplo citado ya que es probable la transferencia de resistencia entre especies filogenéticamente distantes y en particular entre Gram positivas y Gram negativas en ambientes naturales (Courvalin, 1994)

Es justificable asumir que los fármacos antimicrobianos, a los cuales han sido expuestos animales destinados a la producción de alimentos, proveen presión selectiva que puede conducir a la aparición y persistencia de cepas resistentes, las cuales subsecuentemente pueden causar enfermedad en humanos (Midtvedt y Lingaas, 1992). Estos ejemplos podrían extrapolarse a la producción intensiva de salmónidos.

Las implicancias de orden práctico que para el médico veterinario, como profesional encargado de la salud pública, poseen tanto el periodo de resguardo de fármacos utilizados en animales poiquilotermos, como los escapes de peces son múltiples y complejas.

Tomando en cuenta lo planteado por San Martín (1996) y Bustos (1996), además de considerar la experiencia de terreno adquirida en la parte práctica de esta tesis, con la finalidad de reducir los impactos que el uso de antimicrobianos provoca en salmonicultura se recomienda lo siguiente:

- 1.- No emplear tratamientos sin prescripción veterinaria ni enfermedad que justifique su uso y no avalados con antibiogramas, o estudios de monitoreo de CMI en cepas aisladas de terreno.

- 2.- Realizar tratamientos en dosis adecuadas, para lo cual se debe llevar un control muy acucioso de la cantidad y peso de los peces a tratar, dato que es difícil de asegurar sin adecuados controles de producción
- 3.- Realizar los tratamientos sin interrupciones producto de equívocos en despachos o administración de dietas.
- 4.- No realizar mezclas incompatibles entre antimicrobianos.
- 5.- Evitar el uso de promotores de crecimiento que no cumplan con las siguientes premisas: No usarse en forma terapéutica en humanos ni animales, no provocar resistencia cruzada con otros antimicrobianos, no transferir resistencia entre microorganismos, no debe ser absorbido del intestino, no debe ser mutagénico o carcinogénico.
- 6.- Asegurarse de que no existan errores en el calculo de las mezclas de antimicrobiano en el alimento, como también adicionar el producto en forma de premezcla del fármaco en excipientes que permitan su adecuada absorción por el alimento.
- 7.- Los compuestos a utilizar deben ser rápidamente transformados a compuestos no tóxicos.
- 8.- No deben dar origen a transferencia mediada por plasmidios.
- 9.- Debiera llevarse un control acucioso de la cantidad de antimicrobianos utilizados, restringiendo su uso dentro del marco expuesto en los puntos anteriores.
- 10.- Se debe estimular el uso y desarrollo de vacunas.
- 11.- Evitar el consumo de piensos para peces por parte de especies silvestres y plagas, en bodegas y centros de cultivo.
- 12.- No utilizar antimicrobianos que se han mantenido por demasiado tiempo y/o en condiciones inadecuadas, ya que es probable una disminución de su actividad.
- 13.- Asegurar procesos de producción de alimento pellet y extruido que aseguren una actividad adecuada a pesar de variables de tiempo y temperatura.

14.- Finalmente todo el sistema debiera estar normado dentro de un plan de aseguramiento de calidad que permitiera disminuir los errores y detectar a los responsables de aquellas acciones que involucren riesgo para la salud pública, la economía y el ecosistema nacional.

Lamentablemente ninguno de los productos incluidos en el estudio de esta tesis cumplen a cabalidad con lo antes expuesto, por una parte las quinolonas tienen mucho potencial en medicina humana y para oxitetraciclina y sulfa-trimetoprim es conocida la resistencia mediada por plasmidios.

El desarrollo de investigación y el gran interés de las autoridades de registrar el nivel de uso de antibióticos y la aparición de nuevos brotes de enfermedades, hacen ver con optimismo el futuro no solo del uso de antibióticos por sus implicancias ambientales, para la salud pública y resistencia bacteriana, sino que también como ventaja económica y de imagen corporativa frente al mundo.

Sin embargo es necesario realizar estudios adicionales aplicando tecnologías de punta, como HPLC para detección de residuos antibióticos y genética bacteriana para identificación de cepas difíciles de abordar mediante sistemas bioquímicos. En la actualidad existen pocos laboratorios con técnica para medición de residuos antibióticos montada por HPLC, y son aplicables a una escasa gama de antimicrobianos.

Es posible extraer las siguientes conclusiones de la experiencia práctica y del análisis bibliográfico de este trabajo:

-Las *Aeromonas móviles* y *Pseudomonas sp.* resultaron ser un grupo de especies bacterianas, difíciles de aislar e identificar desde el ambiente marino del Estero Compu, según la metodología de trabajo propuesta. Siendo cuantitativamente mayoritarias las cepas sospechosas de pertenecer al género *Pseudomonas*.

-Se obtuvo cepas de bacilos Gram negativos con diversos grados de resistencia múltiple para todos los antimicrobianos probados y que son utilizados actualmente en salmonicultura.

-Los grados de resistencia bacteriana cuantificados en este trabajo deben llevarnos a reflexionar sobre, el peligro que esto implica para la salud pública, el medio ambiente, además del rol del médico veterinario como ente

participativo y regulador del uso racional de los recursos farmacológicos actuales en acuicultura.

7.- BIBLIOGRAFÍA

-ALDERMAN D.J. y C.MICHEL. 1992. Chemotherapy today. En: Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Paris, France, pp.3-24.

-ALVARADO, V; W.SCHAFFER.; R.ENRIQUEZ; M.MONRAS. 1990. Enfermedades bacterianas en peces y sus técnicas diagnosticas. Curso de post-grado. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.

-ALVIAL, A. 1993. Manejo ambiental en acuicultura tiempo de soluciones. EN: Acuicultura y medio ambiente. Seminario Internacional Fundación Chile. Santiago, Chile, pp.1-16.

-ANDRIOLE, V. 1989. Las quinolonas. 1ª de. London academic press. England.

-BUSTOS, p. 1996. Manejo sanitario en la salmonicultura. Aquanoticias internacional. 31:41-47.

-ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES DE SALMÓN Y TRUCHA A.G. 1996. Análisis estadístico y de Mercado, Informe Mensual, Diciembre. pp. 1-10.

-AUSTIN, B. y A.M.AL-ZAHRANI. 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J.Fish Biol. 33(1): 1-14.

-BARRAZA, O. 1992. Efecto del promotor de crecimiento Lincomix m. r. (UPJOHN CIA) sobre el crecimiento del salmón del Atlántico (*Salmo salar* L). Tesis Ingeniero en Ejecución de Acuicultura. Universidad de Antofagasta, facultad de recursos del mar, Dpto de Acuicultura. Antofagasta. Chile.

-BRAVO, S. 1993. Uso de quimioterápicos en enfermedades de salmónidos. Chile Pesquero. (75): 57-59.

-BROWN, L.. 1993. Aquaculture for veterinarians. 1ª ed. Pergamon press. USA.

-CARO, H.; R.ZIMMERMANN; R.ENRIQUEZ. 1995. Problemática ambiental de los cultivos piscícolas. Implicaciones prácticas. Compendio acuícola de Chile (en prensa).

-FAO. 1987. Manual de métodos de diagnóstico en ictiopatología con especial referencia a los salmonidos. Brasilia, Brasil (Documento de campo 4 Es.)

-COURVALIN. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38(7): 1447-1451.

-CULLMAN, W; M.STIEHTZ; B.BAARS. 1985. Comparative evaluation of recently developed quinolone compound- with a note on the frequency of resistant mutants. *Chemotherapy*. 31: 19-28.

-DAVIS, J.W.; J.G.KANE; V.F.GARAGUSI. 1978. Human *Aeromonas* infections: a review of the literature and a case report of endocarditis. *J.Med.* 57(3): 267-277.

-DIXON, B.A. 1991. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. EN: Fish and crustacean larviculture symp, Gent, Belgium, pp. 27-30.

-ENRIQUEZ, R. 1984. Determinación de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en *Cyprinus carpio* Lineo, 1758. Valdivia, Chile. *Mems Asoc. Latinoam. Acuicult.* 5(3): 653-666.

-ERVIK, A.; B.THORSEN; V.ERIKSEN; B.T.LUNESTAD; O.B.SAMUELSEN. 1994. Impact of administering antibacterial agents on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farms. *Aquaculture*. 18: 45-51.

-FAO, GESAMP. 1991. Reducing environmental impacts of coastal aquaculture. United States. Reports and studies N°47.

-GARCIA-TELLO, O.P. 1985. Microbiología marina. 1ª ed., Oficina regional de ciencia y tecnología de la Unesco para América Latina y el Caribe. Chile.

-GRAVE, K.; M.ENGELSTAD; N.E.SOLI; T.HASTEIN. 1990. Utilization of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during 1980-1988. *Aquaculture*. 86: 347-358.

-HAZEN, T.C. 1979. Ecology of *Aeromonas hydrophila* in South Carolina cooling reservoir. Microb.Ecol. 5(3): 179-195.

-HAZEN, T.C.; C.B.FLIERMANS; R.P.HIRSCH; G.W.ESCH. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the USA. J.Appl.Environ.Microbiol. 36(5): 731-738.

-HSU, CH.; S.HWANG; J.LIU. 1992. Succession of bacterial drug resistance as an indicator of antibiotic application in aquaculture. J.Fish.Soc.Taiwan. 19(1): 55-64.

-JACOBENSEN, M.D. 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. Journal of Fish Diseases. 12: 29-36.

-KIELWEIN, G. 1969. Ein Nährboden zur selektiven Zucht von Pseudomonaden und Aeromonaden. Arch.F.Lebensmittelhyg. 20: 131-133

-LEIGH, D.A. Y F.X.S.EMMANUEL. 1984. The treatment of *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections with that of ciprofloxacin. J.Antimicrob.Chemother. 15: 551-558.

-LEWIN, C. 1992. Mechanisms of resistance developed in aquatic microorganisms. EN: Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Symposium. Paris, France, pp. 280-301.

-LUNESTAD, B.T. 1992. Fate and effects of antibacterial agents in aquatic environments. EN: Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Symposium. Paris, France, pp.152-161.

-LUNESTAD, B.T.; J. GOKSOYR. 1990. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. Dis.aquat.Org. 9: 67-72.

-MEYER, F. 1970. Seasonal fluctuations in the incidence of disease on fish farms. EN: A Symposium on diseases of fishes and shellfishes. United, pp 21-29.

-MIDTVEDT, T. y E. LINGAAS. 1992. Putative public health risks of antibiotic resistance development in aquatic bacteria. EN: Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality. Symposium. Paris, France, pp. 302-314.

-MIHOVILOVICH, V; R. ENRIQUEZ 1984. Aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* en Carpas (*Cyprinus carpio*) del Río Cau-Cau, Valdivia, Chile. *Mems Asoc. Latinoam. Acuicult.* 5(3): 667-672.

-MUIR, F.J.; R.J. ROBERTS. 1988. *Recent advances in aquaculture*. 1ª ed., Groom Helm Ltda. London, England.

-NYGAARD.K.; B.T.LUNESTAD; H.HEKTOEN; J.A.BERGE; V.HORMAZABAL. 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*. 104: 31-36.

-OLAVARRIA,, J. 1992. Caracterización bioquímica y respuesta a antimicrobianos de cepas de *Aeromonas móviles*, procedentes de muestras de salmonídeos cultivados en el sur de Chile. Tesis, T.M. Universidad Austral de Chile, Escuela de Tecnología Médica. Valdivia, Chile.

-RHEiNHEifVIER, G. 1987. *Microbiología de las aguas*. r ed. Editorial Acribia. México.

-RILEY, J.P. y R.CHESTER. 1989. *Introducción a la química marina*. 1ª ed., A.G.T. Editor, S.A. México.

-ROCCO C.C.; G.L.BOLLOCK; S.W.PYLE. 1984. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas motile* septicemias of fish. *Fish Disease Leaflet* 68. United States Department of the Interior.

-RONDA M.D.; R.P. THAKOR. 1992. *Listeria* in seafoods: A Review. *Journal of Food Protection*. 55(12): 1009-1015.

-SAMUELSEN, O.B. 1992. The fate of antibiotics / chemoterapeutics in marine aquaculture sediments. EN: *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Symposium. Paris, France, pp. 162-173.

-SAMUELSEN, O.B.; B.T. LUNESTAD; B. HUSEVAG; T. HOLLELAND; A. ERVIK. 1991. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. *Dis.aquat.Org.* 12: 11-119.

-SAMUELSEN, O.B.; V. TORSVIK; A. ERVIK. 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracilcine in a fish farm sediment after medication. *Sci. Total Environ.* 114: 25-36.

-SAN MARTÍN, B. 1996. Conceptos generales en la selección de un antibiótico o sulfa en la terapia de salmonidos. Revista de extensión Tecno Vet. 2: 27-30.

-SNIESZKO, S.F. y G.L.BULLOCK. 1957. Treatment of sulfonamide resistant furunculosis in trout and determination of drug sensitivity. Fish. Bull.,US Fish and Wildlife Service. 57: 555-564.

-SNIESZKO, S.F.; S.B.FRIDDLE; P.J.GRIFFEN. 1952. Antibiotic treatment of ulcer disease and furunculosis in trout. EN: 17th American Wildlife conference. United States, pp. 197-213.

-SNIESZKO, S.F.; , P.J.GRIFFEN. 1955. Kidney disease in brook trout and its treatment. Prog.Fish-Culturist. 17: 3-13.

-SMITH, P. 1991. Antibiotics and the alternatives. EN: Aquaculture and the environment. United States, pp.223-224.

-SPANGGAARD,B.; F.JORGENSEN; LGRAM; H.H.HUSS. 1993. Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. Aquaculture. 115: 195-207.

-TRUST, T.J.; L.M.BULL; B.R.CURRIE. 1974. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J.Fish.Res.Board Can. 36(10): 1174-1179.

-WHITMAN, A.; N. MACNAIR. 1996. Finfish and shellfish bacteriology manual. 1^a ed. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island. Canada.