



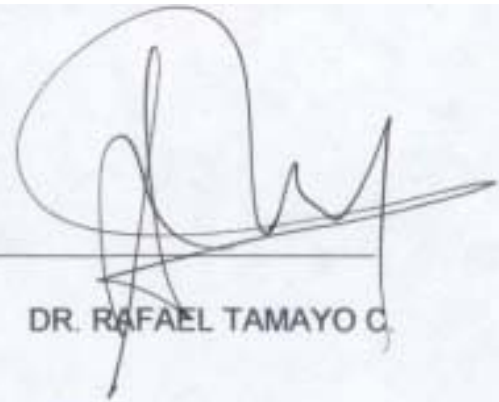
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria

Resistencia de cepas bacterianas aisladas de sedimento marino
de un ex-centro de cultivo de salmonideos frente a los
antibacterianos Flumequina y Acido Oxolinico

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

Angela Beatriz Montesinos Vera
Valdivia Chile 1999

PROFESOR PATROCINANTE :



DR. RAFAEL TAMAYO C.

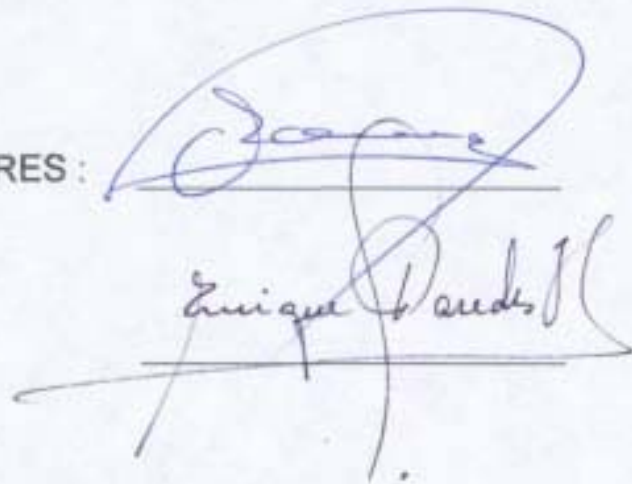
COLABORADORES :



MONICA SAEZ L. TEC. MED.

DR. ORLANDO GARRIDO.

PROFESORES CALIFICADORES :



Enrique Paredes J.

FECHA DE APROBACION:

A MIS PADRES Y FAMILIA,

CON AMOR...

GRACIAS!!!

INDICE

Página.

1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
4. MATERIAL Y METODOS.....	9
5. RESULTADOS.....	12
6. DISCUSION.....	18
7. BIBLIOGRAFIA.....	25
8. ANEXOS.....	30
AGRADECIMIENTOS.....	34

RESISTENCIA DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE SEDIMENTO MARINO DE UN EX-CENTRO DE CULTIVO DE SALMONIDEOS, FRENTE A LOS ANTIBACTERIANOS ACIDO OXOLINICO Y FLUMEQUINA

1. RESUMEN

Con el propósito de medir la respuesta de cepas bacterianas aisladas del sedimento marino acumulado bajo las balsas jaulas de un ex-centro de cultivo de salmones, frente a los antibacterianos ácido oxolínico y flumequina, se recolectaron cinco muestras, de la zona de Quildico Bajo, comuna de Castro, provincia de Chiloé, Décima Región.

Para ello se utilizaron dos medios de cultivo (TSA + 2% de NaCl y TSA solo), y diferentes grados de temperaturas de incubación (15°C, 25°C y 35°C). Se aislaron 108 cepas bacterianas, lográndose mayor desarrollo bacteriano en el medio TSA+2% de NaCl y a una temperatura de 25°C. Posteriormente estas cepas se sometieron a una prueba de sensibilidad frente a los antibacterianos flumequina y ácido oxolínico, resultando el 20,4% resistente y el 8,3% medianamente sensible al antibiótico flumequina, mientras que el 40,8% de las cepas aisladas fueron resistentes al ácido oxolínico.

Además, de 46 cepas resistentes o medianamente sensibles, el 48% (22 cepas) resultaron resistentes a ambos antibacterianos.

Los porcentajes de resistencia bacteriana obtenidos en este trabajo, deben hacer reflexionar, sobre el peligro que esto implica en salud pública y en el medio ambiente marino, siendo importante el papel del médico veterinario como ente regulador en el uso racional de los antibióticos en el cultivo de salmones.

Palabras claves: Resistencia Bacteriana, Quinolonas, Acido Oxolínico, Flumequina, Sedimento Marino, Cultivo de Salmones.

RESISTANCE TO FLUMEQUINE AND OXOLINIC ACID ANTIBACTERIALS OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM MARINE SEDIMENT OF AN ABANDONATED SALMON FARM

2. SUMMARY

The purpose to measure the resistance of bacterial strains to flumequine and oxolinic acid from marine sediments accumulated under the float cages from an abandoned salmon farm, five samples from Quildico Bajo, Castro, Chiloé , X^a Region were collected .

Two agar mediums were used (TSA + 2% of NaCl and only TSA), incubated at different temperature (15°C, 25°C and 35°C). One hundred and eight (108) bacterial strains were isolated reaching a higher bacterial development at TSA 2% of NaCl medium incubated at 25°C. Lately, these strains were submitted to susceptibility test to flumequine and oxolinic acid antibacterials, 20,4% were resistant and 8,3 % were partially sensitive to flumequine, however,40% were resistant to oxolinic acid.

Furthermore, forty six (46) bacterial strains resistant and partially sensitives , 48% (22 strains) of these, were resistant to both antibacterials.

The bacterial resistance percentage obtained in this research, let us think about of harmful over public health and marine enviromental, being so important the role medical veterinarian how to play as a regulator about use of antibiotics in salmon farming.

Key Words: Bacterial Resistance, Quinolones, Oxolinic Acid, Flumequine, Marine Sediment, Salmon Farming.

3. INTRODUCCION

Una de las principales preocupaciones de nuestro tiempo, ha sido el efecto que ha tenido, la actividad humana sobre la naturaleza. Esta relación se ha estrechado en forma directamente proporcional al desarrollo industrial y crecimiento demográfico.

El aumento poblacional ha acelerado la explotación de recursos naturales produciendo su degradación, siendo el recurso agua el más afectado, tanto aguas continentales como costeras (Campos, 1993).

Dado que los océanos cubren el 70 % de la superficie terrestre y que dos tercios de la población mundial vive a menos de 80 Km de la costa, la condición sanitaria de este recurso es de crítica importancia (PNUMA, 1989). Tomando en cuenta que Chile posee una zona costera de más de 4.200 Km. (CORFO/IFOP, 1986), es natural que uno de los recursos de mayor importancia económica, este compenetrado con el recurso agua, en particular las aguas marinas, siendo la acuicultura y particularmente el cultivo de salmonídeos, el que ha alcanzado mayor desarrollo (Dölz y Monras, 1992). En Chile, esta industria se inició a principios de 1980, obteniéndose tasas de crecimiento anual sobre el 45 % (Compendio Acuícola de Chile, 1993). En 1996 se superaron las 199.253 ton, generando US\$ 537 millones (FOB), en divisas, lo que significó un crecimiento de las exportaciones de salmonídeos de 37,4 % en volumen y 9,4 % en valor exportado respecto al año anterior (Compendio de la acuicultura de Chile, 1998). Alcanzando a producir en la temporada de enero a noviembre de 1998, un total de 164.159,5 ton. , generando un ingreso de US\$630 millones de dólares (Aquanoticias, 1999).

Chile basa su industria en el cultivo de 5 especies, de las cuales, cuatro son salmones del Pacífico: salmón rey (*Oncorhynchus tshawyscha*), salmón massou (*Oncorhynchus massou*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). La única especie del Atlántico es *Salmo salar* o Salmón del Atlántico, la cual se ha convertido en la principal especie del sector (Compendio de la acuicultura de Chile, 1998).

Actualmente existen en Chile unas 90 empresas dedicadas al cultivo de salmón, con más de 442 concesiones de cultivo autorizadas para el cultivo y sobre un centenar de resoluciones en trámite de aprobación. Además existen 185 pisciculturas autorizadas de las cuales operan aproximadamente 80. Este conjunto, que comprende el ciclo de agua dulce y de mar, cubre una superficie aproximada de 4.700 hectáreas, distribuidas mayoritariamente de la IX a la XII región (Compendio Acuícola de Chile, 1998).

Entre los factores que permiten explicar el acentuado desarrollo de la salmonicultura nacional, se encuentra las excelentes condiciones ambientales, los escasos o ausentes elementos contaminantes en la mayoría de los cursos de agua dulce y de mar, y la disponibilidad de alimentos baratos y de alta calidad. A lo anterior se suma el hecho que la producción llega al mercado internacional en épocas en que este producto es considerado una primicia (Dölz y Monras, 1992).

Dado el carácter intensivo del cultivo de salmones, el que involucra la mantención en confinamiento de altas densidades poblacionales, son frecuentes los problemas con enfermedades (Samuelsen, 1994; Smith, 1995); donde las patologías bacterianas representan una amenaza permanente para la industria, siendo responsables de enormes pérdidas en los cultivos de peces (Dixon, 1991; Smith, 1995).

Diversos estudios han comprobado que la manifestación de enfermedades bacterianas en peces, son secundarias a problemas propios de un sistema intensivo, tales como manipulaciones diversas, mala calidad de agua, tratamientos regulares con quimioterápicos, así como infestación por parásitos y cambios de temperatura del agua principalmente debidos a variaciones por cambios estacionales (De Figueiredo y Plumb, 1977; Dixon, 1991). Cada uno de estos factores genera problemas de estrés más o menos constante, que interfieren con la respuesta inmune humoral y celular del pez (Dixon, 1991).

En el intento por minimizar las pérdidas económicas producidas por las enfermedades bacterianas, se ha reaccionado con el uso y a veces abuso en la utilización de antibióticos para su control (Dixon, 1991; Alvial, 1993).

Si bien se ha considerado a la terapia antibiótica, como el arma más flexible y efectiva contra enfermedades infecciosas, estos fármacos tienen limitaciones relacionadas con 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).

Dentro de los antibióticos más utilizados en la salmonicultura se encuentran: la oxitetraciclina, el ácido oxolínico y la flumequina (Alderman y Michel, 1992 ; Saelzer y col, 1997). Estos dos últimos se encuentran dentro del grupo quinolonas; conjunto de productos quimioterapéuticos que durante estos últimos años ha intensificado notablemente su uso. Las quinolonas son compuestos bactericidas, de amplio espectro y de rápida acción, lo que sugiere una fácil penetración al interior de la célula bacteriana especialmente las Gram negativas (Zemelman, 1992).

Estos antibacterianos ejercen su acción primariamente sobre la actividad de la enzima DNAGirasa, la que tiene por función, producir un sobre enrollamiento del DNA bacteriano durante su replicación, por lo tanto la inhibición de ésta enzima conduce a la muerte de la bacteria; además, las elevadas concentraciones de quinolonas inhiben

la síntesis de RNA, con lo cual no pueden constituirse los núcleos en los cuales se establecen las zonas de enrollamiento de DNA (Gocke, 1991; Zemelman, 1992).

Dentro de las quinolonas existen varios grupos de antimicrobianos y uno de ellos es el de las quinolinas las que se dividen en subgrupos, los no fluorados, a los que pertenece el ácido oxolínico y los fluorados, también llamados fluoroquinolonas, donde se encuentra la flumequina (Zemelman, 1992).

Durante los últimos años la flumequina ha proveído de una excelente droga antibacteriana en el tratamiento de enfermedades de peces. La cual se puede administrar en forma oral o inyectable. Esta fue introducida a finales de la década de los 70', demostrándose su eficacia contra Furunculosis en trucha arcoiris (Muir y Roberts, 1988). En la actualidad se ha probado su efectividad además en el tratamiento contra Yersiniosis, Vibriosis y patologías producidas por Aeromonas (SYVA Laboratorios, 1998). Esta droga es rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal y metabolizada en el hígado, siendo eliminada por el riñón en forma activa, con un tiempo medio de eliminación de 6-7 hrs (Onneelema y col. , 1994). La dosis terapéutica indicada por la mayoría de los laboratorios fabricantes para este antibacteriano es de 15 - 20 mg/kg. de pez por 8 a 10 días (Laboratorio Chile, 1998).

En relación al ácido oxolínico su uso también esta orientado principalmente al tratamiento de bacterias Gram negativas, utilizándose por primera vez en 1989, en Finlandia y Noruega (Björklund y col. , 1991; Steffenak y col. , 1991). Este antimicrobiano posee las mismas características de metabolización y eliminación que la flumequina. Su dosis terapéutica indicada es de 10 - 20 mg/kg. de peso durante 8 a 10 días (Jacobsen, 1989; Björklund y col. ,1991; Pouliquen y col., 1994).

Sin embargo, al margen de la dosis terapéutica indicada por los laboratorios elaboradores de estos antibióticos, en la realidad los productores de peces acostumbran a realizar sus propios tratamientos, de acuerdo a su experiencia (Alderman y col.,1992).

A diferencia de los quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento de enfermedades de animales domésticos (caninos, felinos, bovinos, etc.) que pueden ser administrados en forma individual, en el caso de las enfermedades de peces en cultivos comerciales el antibiótico es incorporado al alimento peletizado, siendo comúnmente la opción más práctica de tratamiento, por ser fácil de manejar en relación al número y tamaño de los peces, evitando de esta manera, mayores problemas de estrés (Stoffregen y col. , 1996). Sin embargo, toda acción conlleva consecuencias, como es la acumulación y persistencia de estos antibióticos en el sedimento marino bajo las balsas de cultivo (Hektoen y Berge,1990).

El depósito de éstos antibióticos en el sedimento marino se produce por varias causas (Pouliquen y col, 1994; Samuelson, 1994):

- a) Fisiológicamente los peces al padecer una enfermedad, disminuyen la ingesta de los pellet medicamentados, generando la decantación de los mismos.
- b) Algunos antibióticos son de baja absorción intestinal pasando al ambiente.
- c) Desprendimiento del antibiótico del pellet.
- d) Manejo en las prácticas de administración del alimento.

El posible impacto que producen estos residuos de agentes antimicrobianos en el sedimento marino podrían englobarse en los siguientes puntos: emergencia de cepas bacterianas resistentes, alteraciones en la flora y fauna silvestre circundante y posibles riesgos para la salud pública (Nygaard y col. , 1992; Smith, 1995).

Si bien el uso de fármacos es indiscutiblemente necesario y vital en muchos casos debido a graves pérdidas económicas por la mortandad provocada en los cultivos de salmonídeos, existen múltiples ejemplos donde el uso irracional, la falta de criterio y la necesidad de actuar con rapidez, han generado problemas que limitan su uso específico a largo plazo (Aquanoticias Internacional, 1996). Este tema se ha investigado en países desarrollados, donde se ha prohibido el uso de varias sustancias bioactivas (de frecuente uso en el pasado) luego de conocerse sus efectos secundarios sobre el ambiente y sobre los propios cultivos, desarrollándose resistencia y transferencia de resistencia en comunidades bacterianas (Alvial, 1993).

Para una mejor comprensión de estos conceptos, se definirá resistencia como la incapacidad para inhibir una cepa bacteriana determinada, por la concentración mínima de un antibiótico en particular, que sí inhibe al resto de las cepas de esa misma especie. Llegando la bacteria de este modo a ser resistente, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico (Chopra, 1984; Lewin, 1992).

En general, existen 4 formas, que posibilitan, que la bacteria resista a determinados agentes antimicrobianos, los que se pueden expresar a través de varios mecanismos bioquímicos, como son, modificar al antibiótico a una forma inactiva; modificación de la permeabilidad celular al antibiótico; aumento de la producción de enzimas que son inhibidas por el antibiótico; y por último, modificación del sitio de acción del antibiótico (Lancini y Parenti, 1983; Chopra, 1984; Reynolds 1984; Lewin, 1992; Neu, 1992). Estos mecanismos de defensa bacteriana pueden producir cepas resistentes, ya sea por mutación cromosomal o por transferencia extracromosomal, mediada por plasmidios, siendo estos últimos, moléculas extracromosomales, las que pueden replicarse independientemente del cromosoma bacteriano y transferirse libremente entre bacterias, Incluso en algunas de diferentes especies, desarrollando resistencia tanto horizontal como vertical. Además, los plasmidios llevan un número de genes que confieren resistencia a más de un antibiótico, incluso la persistencia de estos, llevados por bacterias no esta siempre relacionado con el uso del antibiótico (Lewin, 1992; Dixon, 1994).

Para las quinolonas, la única vía por la cual la bacteria es capaz de ser resistente a estas drogas es a través de mutaciones cromosomales. La resistencia mediada por plasmidios hacia estos antibióticos no ha sido identificada. Existen dos tipos de estas mutaciones que se han asociado a las quinolonas:

1. -Alteraciones en la enzima DNA girasa que impiden la acción de las quinolonas sobre ella.

2. - Alteraciones en las proteínas de la membrana bacteriana externa que limitan la entrada de las quinolonas al interior de la bacteria (Lewin, 1992; Waters y Davies, 1997).

Para el uso racional de un determinado antibiótico, es importante determinar la resistencia de las diferentes cepas bacterianas frente al agente antimicrobiano, para ello, se realizan diferentes pruebas de sensibilidad. Sin embargo, los resultados de éstas no representan valores absolutos, debido a que están influenciados por la densidad del inóculo, constitución química del medio de cultivo y pH, requerimientos de oxígeno del microorganismo, tiempo de incubación, pureza de la cepa y grosor del agar de cultivo, entre otros (Lancini y Parenti, 1983; Goodman y col. , 1992).

Existen tres pruebas básicas para determinar la susceptibilidad antimicrobiana (Lancini y Parenti, 1983; Goodman y col. , 1992):

1. - Método de dilución en agar caldo.

En este método el organismo en estudio es sembrado en una serie de tubos de caldo Müller-Hinton que contienen diluciones progresivas del antibiótico. Después de un período de incubación se determina la menor concentración de antibiótico que es capaz de inhibir el desarrollo microbiano, estableciéndose de este modo la concentración inhibitoria mínima (CIM) para un determinado microorganismo, siendo éste por lo tanto, un método cuantitativo.

2. - Método de dilución en agar.

Este método se diferencia del anterior, al diluir al antibiótico en agar y no en caldo.

3. - Método de difusión en agar (antibiograma).

En este método el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa y es sometido a la acción de distintos antibióticos, los cuales difunden en el agar a partir de pequeños discos de papel filtro impregnado con antibióticos. Este test sirve para determinar cualitativamente si un germen es susceptible, medianamente resistente o resistente a la acción del antibiótico, según la medida del halo de inhibición .

Dado lo anterior se puede afirmar que el fenómeno de la resistencia bacteriana se basa principalmente en las consecuencias que provoca, como es la imposibilidad de seguir tratando con éxito las infecciones por agentes patógenos, con el antibiótico de elección y más aún la imposibilidad de hacerlo con otro antibiótico disponible (OMS, 1979; Cohén, 1992).

En el pasado se confiaba en que la capacidad de renovación del medio marino evitaba estos conflictos, sin embargo, estas condiciones de renovación no son reales ya que incluso en zonas con grandes diferenciales en mareas y fuertes corrientes, la duración de una renovación completa es, como mínimo de 12 hrs, no incluyendo esto la del sedimento marino. Además, las explotaciones acuícolas buscan aguas en calma: bahías, estanques marinos, etc., más o menos cubiertas lo que acentúa la problemática (Espinosa y Josa, 1996).

Durante los últimos 10 años, se ha intensificado el uso de antibióticos en los centros de cultivo de peces, especialmente aquellos fármacos que se encuentran dentro del grupo quinolonas, en especial, flumequina (fluoroquinolona) y ácido oxólinico (quinolona no fluorada). Siendo estos dos antibacterianos los más utilizados durante los últimos 4 años de funcionamiento, del ahora ex-centro de cultivo de Quildico, es necesario evaluar el posible impacto que estos antibióticos pudieron provocar sobre las cepas bacterianas residentes en el sedimento marino acumulado bajo las balsas de cultivo, después de un período de tiempo de 10 meses del retiro de estas.

Los objetivos de este trabajo fueron :

- 1.-Aislar cepas bacterianas aerobias, obtenidas del sedimento marino acumulado bajo las balsas jaula, de un ex-centro utilizado para el cultivo de salmones.
2. -Determinar la respuesta de las cepas aisladas del sedimento marino al uso de los antibióticos flumequina y ácido oxólinico.

4. MATERIAL Y METODO

4.1.-MATERIAL

4.1.1.-Lugar de recolección de la muestra

El estudio se realizó en un centro de cultivo no operativo localizado en la zona de Quildico Bajo, comuna de Castro, provincia de Chiloé, Décima Región, Chile.

Este sector fue utilizado para la engorda de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón del atlántico (*Salmo salar*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), por un período de 10 años, manteniéndose el sector libre de actividades de cultivo, desde marzo de 1997.

4.1.2.-Material de Laboratorio:

- Cinco "Box Corer" de 20 mi, para toma de muestras del sedimento marino.
- Material básico de laboratorio de microbiología.
- Medios de cultivo generales para aislamiento de bacterias predominantes en ambientes marinos (Hsu y col., 1981; Lallier e Higgins, 1988):
 - a.- TSA (agar tripticasa soya)^a
 - b.- TSA^a + 2% de NaCl
- Medio Müller Hinton^b para pruebas de sensibilidad bacteriana
- Discos antibióticos (sensidiscos):
 - a.- ácido, oxolínico (2 ug)^c
 - b.- flumequina (30 ug)^c
- Reactivos para realizar tinción de Gram.

^a Laboratorio BBL.

^b Laboratorio MERCK.

^c Laboratario ARLAB

4.2.- METODO

4.2.1.- Obtención de muestras

Se tomaron cinco muestras de sedimento marino, en forma dirigida, dentro de los vértices preestablecidos, a una profundidad de 14 metros en marea baja, el 9 de Enero de 1998.

4.2.2.- Procedimiento

Una vez recolectadas las muestras, se trasladaron en los Box Corer al laboratorio del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, en cajas isotérmicas a temperatura de refrigeración (4°C), en un tiempo de 8 h para proceder a su cultivo.

En el laboratorio, se pesaron 10 g de sedimento de cada muestra obtenida, realizándose ocho diluciones de cada una. Posteriormente, se tomaron 0,1 ml de cada dilución y se sembraron en placas de agar TSA y TSA + 2% de NaCl, y se incubaron por 4 a 7 días a temperaturas de 15°C, 25°C y 35°C. Las placas correspondientes a cada rango de temperatura se sembraron en duplicado. Escogiéndose aquellas que permitieron visualizar colonias bacterianas.

4.2.3.- Aislamiento de cepas puras

De las colonias bacterianas obtenidas, se repicaron 108 cepas puras.

4.2.4.- Pruebas de sensibilidad

Una vez aisladas estas cepas se sometieron a pruebas de sensibilidad frente a los antibióticos flumequina y ácido oxolínico, para lo cual se tomaron colonias y se sembraron en tubo de ensayo con 2 a 5 ml de caldo Tripticasa soya, el que se incubó por 2h y o a la temperatura utilizada para cada cepa, hasta aparecer una suspensión levemente turbia, diluyéndose el inóculo con agua destilada estéril, a una densidad equivalente en turbidez a 0,5 en la escala Mac Farland. Posteriormente se realizó la siembra del inóculo en placas con espesor de 4 mm de agar Müller Hinton.

Seguidamente se colocaron sensidiscos en la superficie inoculada de la placa a una distancia mínima de 5 cm entre sí, para evitar la superposición de zonas de inhibición. Luego las placas se incubaron invertidas por 18 a 22 h a la temperatura de crecimiento de la cepa evaluada. La lectura se realizó midiendo el diámetro del halo de inhibición, interpretándose según lo indica la siguiente tabla:

Tabla 1: Concentración de los sensidiscos e interpretación de los halos de inhibición de los antibacterianos ácido oxolínico y flumequina

ANTIBACTERIANOS	Sensidiscos concentración (ug)	Halos de inhibición (mm)*		
		R	M	S
flumequina	30	≤16	17 - 21	≥22
ácido, oxolínico	2	≤10	-	≥11

* Según lo indicado por el fabricante ARLAB®:

R= Resistencia

M= Mediana sensibilidad

S= Sensible

Posteriormente las cepas que resultaron resistentes y medianamente, sensibles, se sometieron a la prueba de tinción de Gram para su clasificación.

4.2.5.- Análisis de resultados

Los resultados se expresaron en porcentajes.

5. RESULTADOS

De la toma de 5 muestras obtenidas del sedimento marino, ubicado bajo las balsas jaula del ex-centro de cultivo de salmones, se aislaron 108 cepas bacterianas.

El gráfico 1 presenta la diferencia de crecimiento de las 108 cepas bacterianas aisladas del sedimento marino en relación al medio de cultivo utilizado (anexo 1).

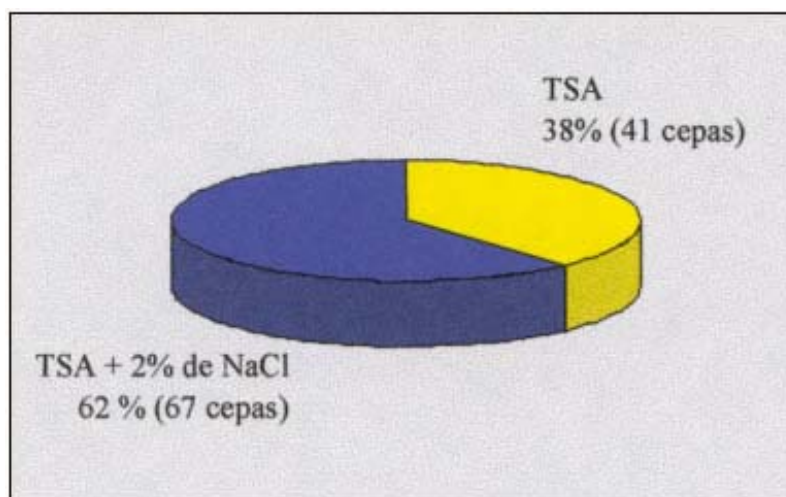


Gráfico 1: Desarrollo bacteriano en relación al medio de cultivo utilizado.

En el gráfico 1, se observa mayor crecimiento de cepas aisladas en el medio TSA enriquecido con 2% de NaCl (62%) con respecto al total, a diferencia del medio TSA no enriquecido (38%).

En las tablas 1 y 2 se observa el número de cepas aisladas en ambos medios de cultivo (TSA y TSA + 2% de NaCl), según las diferentes temperaturas de incubación.

Tabla1 : Desarrollo bacteriano en relación a la temperatura en medio TSA.

NUMERO y PORCENTAJE DE CEPAS (41) SEGÚN TEMPERATURA DE INCUBACION (°C), EN MEDIO DE CULTIVO TSA					
15°		25°		35°	
N	%	N	%	N	%
3	7,3	29	70,3	9	22,4

De la tabla 1, se desprende que el 70,3% de las cepas aisladas, se desarrolló a la temperatura de incubación de 25°C, seguido de un 22,4% a 35°C, y finalmente, el 7,3% a 15°C.

Tabla 2: Desarrollo bacteriano en relación a la temperatura en medio TSA + 2% de NaCl.

NUMERO y PORCENTAJE DE CEPAS (67) SEGÚN TEMPERATURA DE INCUBACIÓN (°C), EN MEDIO DE CULTIVO TSA + 2%NaCl					
15°		25°		35°	
N	%	N	%	N	%
5	7,5	39	58,2	23	34,3

En la tabla 2, se observa mayor crecimiento de las cepas bacterianas a temperatura de incubación de 25° C con un 58,2 %, seguido de un 34,3% de las cepas se desarrollaron a 35° C y por último el 7,5 % restante a 15° C.

El gráfico 2, muestra la respuesta de las 108 cepas bacterianas aisladas frente a los antibióticos, flumequina y ácido oxolínico (anexo 2).

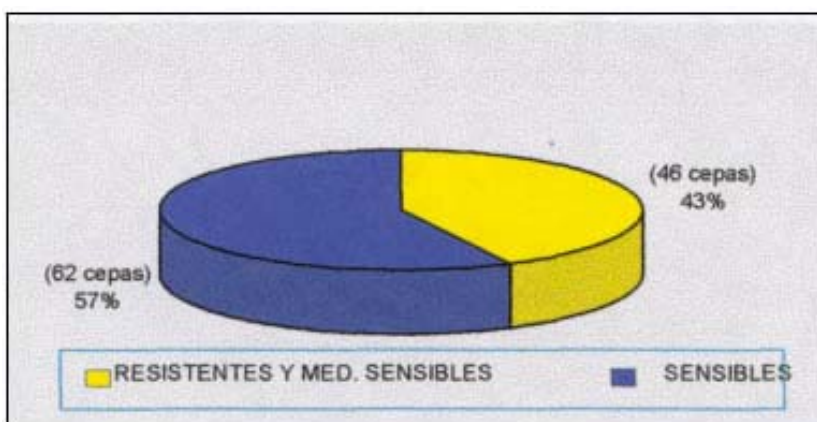


Gráfico 2. Respuesta a flumequina y ácido oxolínico de las cepas bacterianas aisladas.

El gráfico 2, muestra que el 57% de las cepas bacterianas aisladas, son sensibles a los antibacterianos probados, y un 43% de ellas presenta resistencia y o mediana sensibilidad.

Los gráficos 3 y 4 expresan en síntesis la respuesta a los antibacterianos flumequina y ácido oxolínico, por parte de las cepas bacterianas aisladas del sedimento marino (anexo 3).

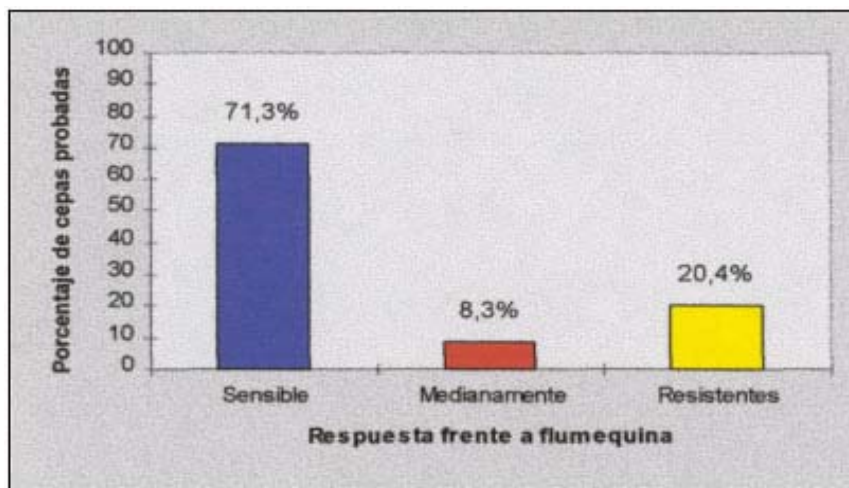


Gráfico 3: Distribución de la respuesta de las 108 cepas al antibacteriano flumequina.

El gráfico 3 indica que el 71,3% de las cepas bacterianas aisladas, son sensibles al antibiótico flumequina. Además, se observa que el 20,4% presentaron resistencia y 8,3 % resultaron medianamente sensibles.

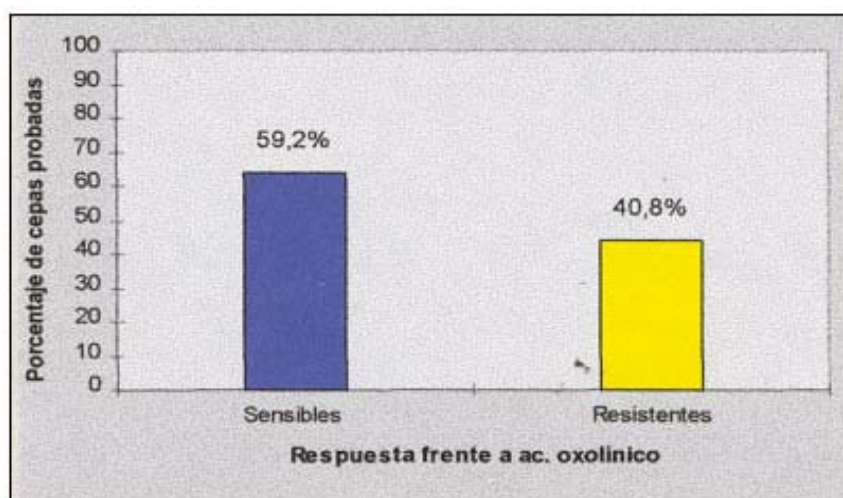


Gráfico 4. Distribución de la respuesta de las 108 cepas al antibacteriano ácido oxolínico.

El gráfico 4, muestra que el 59,2 % de las cepas bacterianas aisladas del sedimento marino son sensibles al ácido oxolínico y un 40,8% de ellas presentan resistencia.

En el gráfico 5, se observa la distribución de las cepas bacterianas aisladas reaccionantes a los antibacterianos probados, que resultaron resistentes y/o medianamente sensibles, tanto al antibiótico flumequina, como al ácido oxolínico (anexo 4).

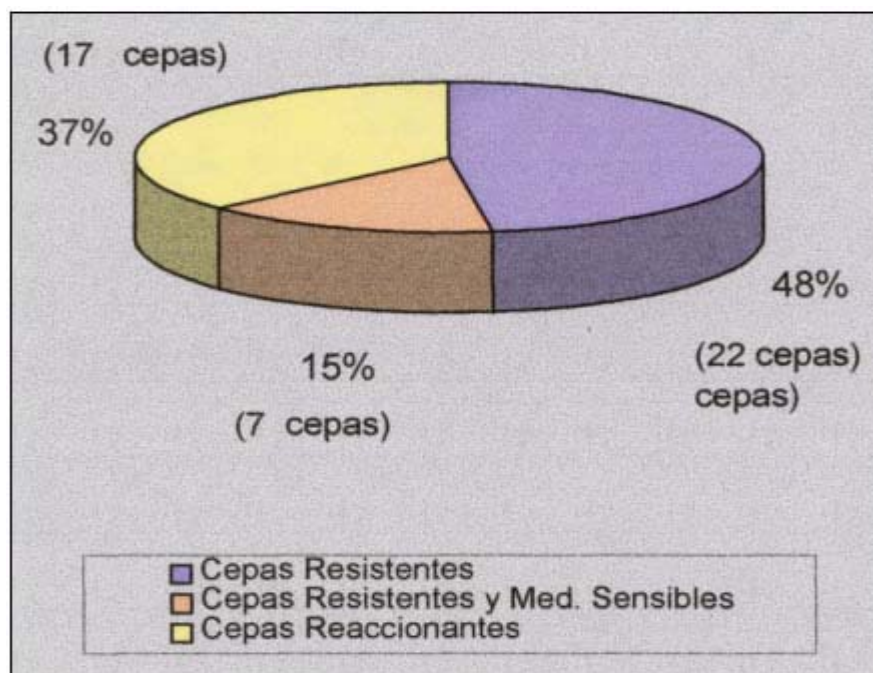


Gráfico 5. Distribución de las cepas reaccionantes a flumequina y ácido oxolínico.

Del gráfico 5 se desprende que, del total de cepas reaccionantes a ambos antibióticos, el 48% (22) de ellas, fue resistente a ambos antibióticos, un 15% (7) fue igualmente resistente a ácido oxolínico y medianamente sensible a flumequina. Mientras que el 37% (17) restante, reaccionó en forma independiente, a uno u otro antibiótico.

La tabla 3 muestra los resultados de la clasificación según tinción de Gram, de las 46 cepas bacterianas que resultaron resistentes o medianamente sensibles a los antibióticos probados.

Tabla 3. Número de cepas según su morfología y respuesta a tinción de Gram.

CLASIFICACION MORFOLOGICA Y TINTORIAL DE LAS 46 CEPAS RESISTENTES Y MEDIANAMENTE SENSIBLES						
	GRAM (+)			GRAM(-)		
	COCO	BACILO	TOTAL	COCO	BACILO	TOTAL
Número (N)	22	9	31	2	13	15
Porcentaje (%)	47,8	19,5	67,4	4,4	28,3	32,6

En la tabla 3 se desprende que el mayor número y porcentaje de cepas corresponde a Gram positivas con un 67,4% (31) y siendo mayoría dentro de ellas los cocos (47,8%)(22). Dentro de las cepas Gram negativas el mayor porcentaje lo obtuvieron los bacilos (28,3 %)(13).

En las tablas 4 y 5, se presentan las cepas que resultaron resistentes y medianamente sensibles a flumequina y ácido oxolínico, en relación a sus características según tinción de Gram.

Tabla 4. Clasificación según tinción de Gram de las cepas reaccionantes a flumequina.

CLASIFICACION DE CEPAS (31) RESISTENTES Y MEDIANAMENTE SENSIBLES A FLUMEQUINA, SEGÚN TINCIÓN DE GRAM												
	GRAM (+)						GRAM(-)					
	COCO		BACILO		TOTAL		COCO		BACILO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
R*	8	25,8	4	12,9	12	38,7	1	3,2	9	29	10	32,2
M**	2	6,5	3	9,7	5	16,1	0	0	4	12,9	4	12,9
Total	10	32,3	7	22,6	17	54,8	1	3,2	13	41,9	14	45,2

R*= Resistentes

M**= Medianamente sensibles

La tabla 4 muestra que de 31 cepas bacterianas resistentes y medianamente sensibles a flumequina, el 54,8%, de ellas (n=17) fueron cepas Gram positivas, correspondiendo un 32,3% (10) a cocos, con un 25,8% (8) resistentes y un 6,5% (2) medianamente sensibles al antibiótico, seguido de un 22,6% (7) de bacilos, con 12,9% (4) resistentes y un 9,7% (3) medianamente sensibles.

En relación a las cepas Gram negativas, estas correspondieron a un 45,2% (14) del total de cepas reaccionantes a flumequina, con 41,9% (12) de bacilos, con 29% (9) de resistentes y 12,9% (4) medianamente sensibles. El porcentaje restante de cepas Gram negativas, correspondió a un 3,2% (1) de cocos resistentes a flumequina.

Tabla 5. Clasificación según tinción de Gram de las cepas bacterianas reaccionantes a ácido, oxolínico.

CLASIFICACIÓN DE CEPAS(44) RESISTENTES A AC. OXOLÍNICO, SEGÚN TINCIÓN DE GRAM												
	GRAM (+)						GRAM (-)					
	COCO		BACILO		TOTAL		COCO		BACILO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
R*	22	50	8	18,2	30	68,2	2	4,5	12	27,3	14	31,8

R*= Resistentes

De la tabla 5 se desprende que del total de 44 cepas bacterianas resistentes a ácido oxolínico, el mayor porcentaje de ellas correspondió a Gram positivas con un 68,2% (30), obteniéndose 50% (22) de cocos y 18,2% (8) de bacilos. El 31,8% (14) resultó Gram negativa, con un 4,5% (2) de cocos y 27.3% (12) de bacilos.

6. DISCUSION

La salmonicultura intensiva además de ser una fuente generadora de ingresos para nuestro país, ha demostrado que ocasiona alteraciones en el medio ambiente marino (Belveride, 1991), ya sea por cambios orgánicos, genéticos, estéticos, bacteriológicos y químicos (Espinosa y Josa, 1996).

El uso de sustancias bioactivas, como los antibióticos utilizados para el control de enfermedades, puede ser uno de los factores que provoque mayor impacto en el medio por el escaso conocimiento sobre su efecto en la flora y fauna marina, además está el desarrollo de resistencia por parte de bacterias provenientes de columnas de agua y por sobre todo, sedimento del fondo marino, bajo o cercano a jaulas de cultivo (Grave y col. , 1990; Smith, 1995).

En relación a los resultados obtenidos en el presente estudio, la razón del número relativamente bajo de cepas aisladas (108), probablemente sea consecuencia de una serie de factores externos de tipo ambiental, ya que luego de la recolección de muestras, estas comienzan a sufrir un proceso de cambios siendo difícil evitar las alteraciones fisicoquímicas que sufren en los Box Corer, a pesar de su rápido traslado y posterior procesamiento en el laboratorio. En este caso, desempeña un papel importante el factor de adsorción del sustrato (sedimento) en las paredes de los recipientes, denominándose a esto "efecto de asociación de superficie" (solid surface effect). Por este motivo, tras la toma de muestra del sedimento se puede producir un rápido cambio en la población bacteriana, alterándose la diversidad de especies, disminuyendo en número, sin embargo, las sobrevivientes son capaces de multiplicarse, aumentando en el transcurso de 24 horas (Rheinheimer, 1987).

Otro factor, fue el utilizar tiempos de incubación de 4-7 días en su cultivo, los que se basaron en los tiempos de incubación empleados para el aislamiento de bacterias patógenas de peces, comprendidos en rangos de 24 a 36 hrs. Se utilizó este criterio, debido a que la flora bacteriana de los peces, es un reflejo del ambiente en que residen (Cahill, 1990).

En estudios realizados específicamente para la medición de resistencia en bacterias aisladas del sedimento marino de sitios abandonados por centros de cultivo, se han utilizado tiempos de incubación de 5 a 15 días, obteniéndose mayor cantidad de cepas aisladas (Rheinheimer, 1987; Husevag y col. , 1991; Nygaard y col., 1992).

En cuanto a los medios de cultivo utilizados, el mayor crecimiento bacteriano esperado se obtuvo con TSA enriquecido con 2% de NaCl (gráfico1, anexo1), debido a que las bacterias presentes en los ambientes marinos son halófilas, es decir, necesitan que el medio en que viven tenga una proporción de NaCl para mantener un equilibrio hidrosalino. Sin embargo, su concentración adecuada no está establecida,

recomendándose porcentajes que oscilan, desde un 25% a un 40%, en algunos estudios, a diferencia de otros, en los que la concentración salina utilizada para el aislamiento, va de un 1% a un 2% de NaCl, (Rheinheimer, 1987; Husevag y col. , 1991; Nygaard y col. , 1992).

El crecimiento en el medio TSA no enriquecido, está dado por la existencia en el sedimento marino de bacterias halotolerantes. Esto indica que estas pueden crecer tanto en presencia de NaCl, como en su ausencia, encontrándose preferentemente en las proximidades de la costa, sobre todo en sedimentos de bahías y estuarios, características propias de la bahía de Quildico. Por otra parte es importante mencionar que el lugar de muestreo se encuentra a menos de trescientos metros de la costa, por lo que la composición bacteriana puede estar influenciada por grupos humanos residentes en el lugar (Rheinheimer, 1987).

Con el fin de cubrir los diferentes rangos de temperatura que permiten el desarrollo de cepas bacterianas, que pudieran ser aisladas del sedimento marino, estas se incubaron a 15°C, 25°C, y 35°C. Para explicar este desarrollo, es importante tener en conocimiento, que una parte considerable de las bacterias marinas son psicrófilas facultativas, es decir, que se desarrollan bien a 0°C, aunque su temperatura óptima de crecimiento esté entre 18°C y 25°C (Rheinheimer, 1987). Esto explica el mayor desarrollo de las cepas bacterianas a 25°C, (tablas 1 y 2) tanto en el medio TSA sin NaCl, como en él con 2% de NaCl. Posiblemente el ligero crecimiento de cepas a 15°C, se deba, a que la temperatura óptima para estas, sea también de 25°C, y que por haber sido expuestas a una temperatura menor a sus requerimientos, se halla limitado su desarrollo. Rangos de temperaturas similares a las empleadas en este trabajo, fueron utilizadas para el cultivo de bacterias aisladas de sedimento marino, en estudios realizados en Noruega, lográndose un adecuado desarrollo bacteriano (Husevag y col., 1991; Nygaard y col. , 1992).

En relación al considerable desarrollo de cepas aisladas a 35 °C es probable que este se deba a la contaminación del sedimento por parte de bacterias terrestres, (Rheinheimer, 1987), ya que se ha descrito, que bacterias coliformes, presentes en el ambiente marino se ven limitadas en cuanto a su crecimiento y patogenicidad. Sin embargo al volver a situarlas en un medio hópito, como el del laboratorio, con temperatura adecuada, estas equilibran rápidamente su metabolismo retornando a la normalidad (Dawe y Penrose, 1978).

Con respecto a las 108 cepas bacterianas aisladas del sedimento marino en este estudio, el 57% de ellas resultó sensible a flumequina y ácido oxólinico y el 43% mostró resistencia o mediana sensibilidad a uno u otro antibiótico. Al analizar la respuesta individual de los antibióticos utilizados, frente a las cepas bacterianas aisladas, el mayor porcentaje de ellas (71,3 %)(gráfico 3), presentó sensibilidad al antibiótico flumequina. Como primer factor relacionado a esta respuesta, está en que este fármaco ha sido empleado en menor proporción, en relación al ácido oxólinico, por lo tanto, las cepas bacterianas del sedimento marino, tendrían una menor

exposición a éste antibiótico, demostrándose así que la relevancia de la resistencia bacteriana, está correlacionada en forma directa en la presión en el uso del antibiótico (Cohén, 1992).

Se ha descubierto, que las fluoroquinolonas, además de necesitar una mutación a nivel de la DNAGirasa de la bacteria, ésta debe presentar alteraciones en la topoisomerasa IV, enzima, que actúa también sobre el DNA cromosomal bacteriano, por lo que algunas cepas necesitan la presentación de estas dos mutaciones, para adquirir resistencia al fármaco. Sin embargo, la presentación de esta respuesta por parte de la bacteria, es de baja ocurrencia, permitiendo al antibiótico ejercer su acción, resultando de esta manera la bacteria sensible a él (Zhao, 1997).

Se ha demostrado que las bacterias, pueden ver alteradas las proteínas de tipo hidrofílico, denominadas porinas de su membrana externa, por la interacción con otros antibióticos, presentes en el sedimento marino, fenómeno que impide la acumulación de la fluoroquinolona, quedando así la bacteria resistente a ella. Esto podría explicar el 20,4% de cepas resistentes y 8,3 % (gráfico 3) de cepas medianamente sensible a flumequina (Zemelman, 1992).

Otro factor a considerar, es un mecanismo de resistencia natural, por parte de las cepas bacterianas frente a fluoroquinolonas en general, producido por una mutación adicional en los aminoácidos de la subunidad A de la DNAGirasa (Waters y Davies, 1997). La estructura química de la flumequina y también del ácido oxolínico, también juega un papel importante en los resultados y es que debido a su condición de ácidos, ambos fármacos son de lenta solubilidad en el ambiente marino (Andresen y col., 1990), de ahí el porqué del éxito en su utilización en salmones, al facilitar la vía oral, como forma de administración. Sin embargo, ésta característica permitiría una mayor persistencia de los residuos de ambos antibióticos en el sedimento, por extensos períodos de tiempo, permitiendo así una exposición constante de las bacterias a estos fármacos (Lewin, 1992; Pouliquen y Lebris, 1996). Esto explicaría el porcentaje de bacterias resistentes a ácido oxolínico, que alcanzaron un 40,8 % (gráfico 4) del total de cepas aisladas del sedimento marino.

Con el fin de caracterizar el impacto que el ácido oxolínico podría provocar en ambientes marinos, diferentes trabajos han demostrado que éste posee una vida media menor a 6 días en el medio ambiente marino. Sin embargo, sus concentraciones residuales persisten en el sedimento por meses. Esto ocurre debido a que el ácido oxolínico difunde a poca profundidad en el sedimento marino, evitando que se pierda en él, quedando prácticamente sin disolver en su superficie. Otros mecanismos que previenen que las moléculas de éste antibiótico sean disueltas y permanezcan en contacto con las cepas presentes en el sedimento, son la ocurrencia de procesos de cristalización y compactación (Björkhund, 1991; Samuelsen, 1992,1994).

Por otra parte, está la oportunidad de este antibiótico de ligarse a partículas del sedimento, aumentando la posibilidad de inducir resistencia. Además, como es natural, la bacteria continua su proceso de multiplicación, transmitiendo esta resistencia en forma vertical, a células hijas, aumentando así, por consiguiente el porcentaje de resistencia bacteriana a medida que transcurre el tiempo. Lo anterior es corroborado por un estudio realizado a través de monitoreos de los porcentajes de resistencia, en un centro de cultivo de salmones, abandonado por un período de 12 meses (Nygaard y col., 1992). En éste estudio se midió el porcentaje de resistencia cada 3 meses, obteniéndose cada vez incrementos en la resistencia de las cepas bacterias aisladas frente a ácido oxolínico.

Por último, frecuente y poco conocida, es la reacción de resistencia cruzada, que se obtendría al producirse una interacción entre el ácido oxolínico y la oxitetraciclina, antibiótico altamente utilizado en salmonicultura, en especial con anterioridad en el sector de Quildico, por un periodo extenso. Esta interacción entre antibióticos, produciría alteraciones en la membrana externa bacteriana, impidiendo o disminuyendo la acumulación del antibiótico en su interior, produciéndose la ocurrencia de resistencia cruzada (Barnes y col. ,1990; Lewin, 1992; Nygaard, 1992; Stoffregen y col, 1996). Este fenómeno, también podría dar explicación, a que del total de cepas reaccionantes a ambos antibióticos (43%)(gráfico 2), el 48% de ellas (gráfico 5), resultasen resistentes tanto a flumequina como ácido oxolínico, ya que no se ha descrito resistencia cruzada entre quinolonas (Stoffregen y col., 1996).

El desarrollo de esta resistencia cruzada al aplicar oxitetraciclina y ácido oxolínico en forma alternada, es altamente desfavorable, para la industria salmonera, más aún, cuando en condiciones de terreno, se hace necesario este tipo de manejo, por esto es de suma importancia, fortalecer investigaciones, sobre la habilidad de estos fármacos para incitar resistencia a otros antibióticos, así como la duración de estos efectos (Nygaard, 1992).

Un problema importante con relación a la interpretación de datos sobre la ocurrencia de resistencia en cepas aisladas del sedimento marino, es el limitado espectro, de los antibióticos en estudio, a pesar de lo indicado por los laboratorios, en especial el del ácido oxolínico. Por ejemplo, éste antibacteriano posee una pobre o pequeña acción sobre bacterias anaerobias, bacterias Gram negativas no fermentadoras y una limitada actividad sobre cepas Gram positivas, mostrando así un aparente aumento en la frecuencia de resistencia a ácido oxolínico (Smith y col., 1994). Esto podría dar explicación al elevado número de bacterias Gram positivas que resultaron resistentes al ácido oxolínico y resistentes o medianamente sensibles a flumequina (tablas 4 y 5). Igualmente, cambios en la calidad medioambiental alteran la relación entre cepas Gram negativas y Gram positivas en la microflora, favoreciéndose esta última

(Smith, 1994). Sin embargo, en el caso de estudios realizados sobre aislados bacterianos de sedimento marino ubicado bajo balsas jaula, la proporción entre bacterias Gram positivas y negativas resistentes a ácido oxolínico, resultó ser similar no encontrándose una diferencia significativa entre ellas (Spanggaard y col., 1993).

Por lo tanto, es difícil establecer parámetros rígidos de comparación, puesto que en general, el estudio del efecto de los antibióticos sobre cepas bacterianas del medio marino, tanto residentes en aguas, como en sedimentos, está aún en sus inicios, sólo el efecto de un par de antibióticos se encuentra caracterizado en forma más completa (Smith y col., 1994).

Distinto es el caso del grupo quinolonas, ácido oxolínico y en especial flumequina, donde el impacto que estos producen a la bacteria, no está bien determinado, pues los resultados de estudios realizados *in vitro* difieren, de aquellos obtenidos *in vivo*. Como factor primordial y desencadenante de este tipo de resultados, es la falta total de técnicas estandarizadas para la realización de estos estudios. Según una recopilación de datos sobre diversos trabajos relacionados con el desarrollo de resistencia en bacterias aisladas de sedimento marino, existe un verdadero caos metodológico, primero no sólo en la forma que el fenómeno de resistencia se define, si no la inexistencia de consenso alguno en como abordarlo. Es así como, de un total de 23 trabajos, 7 entregaron procedimientos incompletos, 10 de ellos utilizaron diferentes métodos, tanto en la forma del aislamiento de cepas bacterianas, como de la metodología para determinar resistencia y por último, los 6 restantes, no entregaron información alguna sobre la fase experimental (Smith y col., 1994).

Se ha comprobado que el impacto del fenómeno de resistencia bacteriana a quinolonas, no está limitado, sólo a las cepas resistentes que se desarrollan inicialmente en un área geográfica ya que éstas no permanecen siempre en el lugar, pudiendo movilizarse, localizándose a grandes distancias, a demás, estas no están asociadas sólo a una especie animal (Cohén, 1992). Lo anterior es corroborado por otros estudios, donde se han encontrado genes de resistencia bacteriana de distinta generación en habitantes de diferentes nichos ecológicos, lo que ilustra la complejidad de la diseminación de determinantes de resistencia entre microorganismos (Midtvedt, 1991).

En estudios realizados en 8 centros de cultivos de salmones en Noruega, se detectó un alto porcentaje de residuos de ácido oxolínico en peces capturados en la vecindad de estos centros, demostrándose que en algunos casos sustancias inhibitorias bacterianas, pueden transmitirse a lo largo de la cadena alimenticia marina, siendo relevante la presencia de estos residuos en bivalvos en la vecindad de estos centros de cultivo (Samuelson, 1991).

Con relación a los posibles riesgos en salud pública, y desarrollo de resistencia bacteriana ligada a genes, ésta no está limitada a los patógenos de peces presentes en el sedimento marino. En trabajos realizados se ha demostrado que, aproximadamente 20 grupos de microorganismos aislados de centros de cultivo de peces, han sido reconocidos como patógenos potenciales para humanos (Chang y Pien, 1986). Además, en otros estudios se aislaron varias especies bacterianas asociadas a infecciones humanas relacionadas a cultivos marinos (Austin y Austin, 1987). Las especies más comúnmente encontradas en ambas investigaciones, incluyen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *enterobacterias* y *Pseudomonas*, además se ha identificado a *Campylobacter jejuni*, del cual se reporta una desarrollada resistencia a quinolonas (Midtvedt y Lingaas, 1992). Debido a lo anterior es posible afirmar que las cepas bacterianas resistentes, obtenidas del sedimento marino, expuestas a flumequina y ácido oxolínico, pueden subsecuentemente causar la aparición de enfermedades de difícil tratamiento en humanos (Midtvedt y Lingaas, 1992).

Es responsabilidad y deber del Médico Veterinario a cargo de cualquier centro de cultivo de peces, tener la capacidad de visualizar la implicancia del uso de antibióticos, no solamente desde un punto de vista productivo y a corto plazo, si no enfocar el problema de forma globalizada, recordando que un sistema de cultivo de peces, no solo involucra al pez, sino al ambiente que lo rodea, y que éste, en un corto a mediano plazo puede volverse en su contra. Por ejemplo, se han descrito rebrotes de enfermedades a los pocos meses de haber sido tratados los peces, esto a causa de la formación de burbujas de metano con grandes cantidades de bacterias en su interior, posiblemente resistentes, provenientes del sedimento marino acumulado por años, bajo las balsas de cultivo (Lewin, 1992).

Para minimizar y racionalizar la utilización de antibióticos en los tratamientos para salmones, se debería tomar diferentes medidas de manejo, como :

- No realizar terapias antibióticas, con un mismo fármaco por períodos prolongados de tiempo, en forma consecutiva.
- Mejorar los sistemas de administración de alimentos medicamentados.
- Disminuir el uso de aquellos antibióticos que promuevan resistencia mediada por plasmidios.
- No emplear tratamientos sin prescripción veterinaria.
- Respetar las dosis indicadas para cada fármaco.
- Disminuir los tratamientos profilácticos.
- No utilizar antibióticos que al alternar tratamientos con otros, pudieran provocar resistencia cruzada.
- Por último, incentivar y promover el uso de vacunas (Aquanoticias, 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir lo siguiente:

- El mayor desarrollo, obtenido en el cultivo de las cepas bacterianas, aisladas de sedimento marino, en la Bahía de Quildico, ocurrió en el medio de cultivo TSA enriquecido con un 2% de NaCl, a una temperatura de incubación de 25°C.

- El 20,4% del total de cepas bacterianas aisladas resultó resistente y el 8,3% medianamente sensible a flumequina. Mientras que el 40,8% de las cepas fue resistente al antibiótico ácido oxolínico

- De las 46 cepas (43%) que reaccionaron a ambos antibióticos, el 47,8%(22) fue resistente tanto a flumequina, como al ácido oxolínico.

7. BIBLIOGRAFIA

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

ALVIAL, M. A. 1993. Una aproximación al impacto ambiental de la acuicultura. *Aquanoticias Internacional* 1:20-27.

ANDRESEN T. A., E. RASMUSSEN. 1990. Automated on-line dialysis on column-switching H.P.L.C. determination of flumequine and oxolinic acid. *Journal of Liq. Chromatogr* 13 : 4051-4065.

AQUANOTICIAS, 1999. Estadísticas. *Aquanoticias* 2 :64-65.

AQUANOTICIAS INTERNACIONAL. 1996. Actividades para ejecutar un adecuado programa de manejo sanitario en la salmonicultura. *Aquanoticias Internacional* 7: 41-47.

AUSTIN, B., D.A. AUSTIN. 1987. Bacterial fish pathogens. Diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood Ltd., Chischester.,England.

BARNES, A. C., C. S. LEWINJ. S. HASTING, S. G. AMYES.1990. Crossresistance between oxitetraciline and oxolinic acid in *Aeromonas Salmonicida* associated with alterations in outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 60 : 337-339.

BEVERIDE, M.C.M. 1991. Cage Aquaculture. Second edition. Blackwell Scientific Publications. Inc Cambridge. USA.

BJÖRKLUND, H.B., C.M. I. RABERGH, G. BYLUND. 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 97: 85-96.

CAHILL, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes : a review. *Microb. eco/.* 19 :21-41.

CAMPOS, H. 1993. Procesos de eutricación en lagos del sur de Chile. Estimación de los efectos de la acuicultura intensiva. En: Seminario en acuicultura y medio ambiente. Fundación Chile,Santiago.

CHANG, J.W., F.D. PIEN. 1986. Marine-acquired infections hazards of the ocean enviroment. *Marine Infect.* 80: 30-41.

CHOPRA, I. 1984. Antibiotic resistance resulting from decreased drug accumulation. *Br. Med. Bull.* 40: 11-17.

COHEN, M.L. 1992. Epidemiology of drug resistance: implication for a post-antimicrobial era. *Science* 257: 1050-1055.

COMPENDIO ACUICOLA DE CHILE. 1993. Antártica, Chile.

COMPENDIO DE LA ACUICULTURA DE CHILE. 1998. Technopress S. A. Chile.

CORFO/IFOP. 1986. Diagnóstico de la contaminación marina en Chile.

DAWE L, W.R. PENROSE. 1978. "Bacteridal" Property of sea water: Death or Debilitation ?. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 : 829-833.

DE FIGUEIREDO, J., J.A. PLUMB. 1977. En: OLAVARRIA, U. 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 Tec. Med., Universidad Austral de Chile, Facultad de Medicina, Valdivia, Chile.

DIXON, B.A. 1991. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. En: Fish and Crustacean Larviculture Symp. Gent, Belgium, pp 27-30.

DÖLZ, V. H., S. M. MONRAS. 1992. Estandarización de un método para la neutralización de "agua-sangre", proveniente del desangrado de salmonídeos, durante la cosecha. Instituto de Patología Animal. Universidad Austral de Chile. Valdivia

ESPINOSA, E., A. JOSA. 1996. Piscicultura y medio ambiente; contaminación del medio ambiente. *Arch. Reprod. Anim.* 1: 58-66.

GOCKE, E. 1991. Mechanism of quinolone mutagenicity in bacteria. *Mutat. Res.* 248 : 115-143.

GOODMAN, A., T. RALL, A. NIESS, P. TAYLOR. 1992. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8^a ed. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires.

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

HEKTOEN, H., J.A. BERGE. 1990. Degradation and leakage of antibiotics in marine sediment, and uptake of antibiotic residues in wild living organisms around fish farms. Nordisk Forskerseminar. Hauburg og Miljø. Nord 1991: Nordisk Ministerrand. Copenhagen.

HSU, T. C., W.D. WALTMAN, D. LEBLANC, E.B. SHOTTS. 1981. Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Rev. Biol. Standart.* 44: 101-111.

HUSEVAG, B., B.T. LUNESTAD, P.J. JOHANNSEN, O. ENGER, O. B. SAMULSEN. 1991. Simultaneous occurrence of *vibrio salmonicida* and antibiotic resistant bacteria in sediment at abandoned aquaculture sites. *J. Fish Dis.* 14: 631-640.

JACOBSEN, M.D. 1989. Withdrawal of fresh water rainbow trout, *Salmo gairdneri*, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetropim. *J. Fish Dis.* 12: 29-36.

LABORATORIO CHILE. 1998. Vademécum veterinario. Santiago, Chile.

LALLIER, R., R. HIGGINS. 1988. Biochemical and toxigenic characteristics of *Aeromonas spp.* isolated from diseased mammals, moribund and healthy fish. *Vet. Microbiol.* 18:63-71.

LANCINI, G., F. PARENTI. 1983. Antibiotics. An integrated view. M. P. STARR. California.

LEWIN, C. S. 1992. Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms: from theory to reality. Symposium. Paris, France. MIDVEDT T. 1991. Quinolones-ecological aspects. *J. Med. Norwegian Ass.* 221-224

MIDVEDT T., E. LINGAAS. 1992. Putative public health risk of antibiotic development in aquatic bacteria. *Chemotherapy in Aquaculture : from theory to reality.* Symp. Paris, France, pp.302-304.

MUIR, F.J., ROBERTS. 1988. Recent advances in aquaculture. Croom Helm Ltd. London, England.

NEU, H.C. 1992. The crisis in antibiotics resistance. *Science* 257: 1064-1073

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

OMS. 1979. Vigilancia para prevenir y combatir los riesgos sanitarios provocados por las enterobacterias patógenas a los antibióticos. *Crónica de la OMS.* 33: 205-211.

ONNEELEMA, M., K. ARNE HOFF, H. GJELSTROP KRISTENSEN. 1994. Multiple-dose pharmacokinetic study of flumequine in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 128 : 1-11.

- PNUMA. 1989. Limpiarlos mares. NAIROBI, PNUMA, CPNUMA. DossierAmbiental.
- POULIQUEN, H., L. PINAULT, H. LEBRIS. 1994. Determination of oxolinic acid in sea water, marine sediment, and japanese oyster (*Crossostrea gigas*) by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 17: 929-945
- POULIQUEN, H., H. LEBRIS. 1996. Sorption of oxolinic acid and oxitetraciline to marine sediment. *Chemosphere.* 33 : 801-815.
- REYNOLDS. P.E. 1984. Resistance of the antibiotic target site. *Br. Med. Bull.* 40: 3-10.
- RHEINHEIMER, G. 1987. Microbiología de las aguas. Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- SAELZER, R., M. VEGA , G. RIOS, M. HEPBURN, V.E. LANDSKRON. 1997. Control de residuos de ácido oxolínico en músculo de salmón. Comparación de una metódica microbiológica con cromatografía en una capa fina de alta eficiencia. *Agrociencia.* 13: 301-306.
- 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: 11-19.
- SAMUELSEN, O. B. 1992. The fate of antibiotics / Chemoterapeutics in aquaculture sediments. Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality Symposium, Paris, France. pp. 162-173
- SAMUELSEN, O.B. 1994. Enviromental impacts of antibacterial agents in Norweian Aquaculture. *Dis. Aquat. Org.* 10 :22-26.
- SMITH, P., M.P. HINEY, O.B. SAMUELSEN. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming : a critical evaluation of method and meaning. *Ann Rev Fish Dis.* 4 : 273-313.
- SMITH, P. 1995. Vacunación en acuicultura. *Tecno Vet.* 3: 6-7.
- SPANGGAARD, B., F. JOERGENSEN, L. GRAM, H.H. HUSS. 1993. Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms an unpolluted stream in Denmark. *Acuaculture.* 115 : 195-207.

STEFFENAK, I. , V. HORMAZABAL , M. YNDESTAD. 1991. Rapid assay for the simultaneous determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 14 : 61-70.

STOFFREGEN, D.A., P. BOWSER, J.G. BABISH. 1996. Antibacterial chemotherapeutans for finish aquaculture: A synopsis of iaboratory and fiield efficacy and safety studies. *J. Aquati.Anim. Health.* 8 : 181-203

SYVA LABORATORIOS. 1998. Flumesyva polvo. Catálogo Comercial. Santiago, Chile.

WATERS, B., J. DAVIES. 1997. Amino acid variation in the gyr A subunit of bacterial potentialiy associated with natural resistance to fiuroquinolone antibiotics. *Antimicrob Agent Chemother.* 2766-2769.

ZEMELMAN, R. 1992. Las quinolonas. Lab. Rhodia Merieux, Sección Científica.

ZHAO, X. , C. XU , J. DOMAGALA , K. DRLICA. 1997. DNA topoisomerase targets of fluoroquinolones; a strategy for avoiding bacterial resistance. *Microbiology.* 94 : 13991-13996.

8. ANEXOS

Anexo 1: Desarrollo bacteriano en relación al medio de cultivo (gráfico 1).

MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO	CEPAS AISLADAS	
	N	%
TSA	41	38
TSA + NaCl	67	62
Total de Cepas Aisladas	108	100

Anexo 2 : Respuesta a flumequina y ácido oxolínico de las cepas bacterianas aisladas (gráfico 2).

	CEPAS AISLADAS	
	N	%
Cepas resistentes y med. sensibles	46	43
Cepas sensibles	62	57
Total de Cepas Aisladas	108	100

Anexo 3: Distribución de la respuesta de las 108 cepas bacterianas aisladas a antibacterianos (gráficos 3 y 4).

ANTIBACTERIANO UTILIZADO	NUMERO DE CEPAS					
	Sensibles		Medianamente		Resistentes	
	N	%	N	%	N	%
Flumequina	77	71,3	9	8,3	22	20,4
Ac. Oxolínico	64	59,2	—	—	44	40,8

Anexo 4 : Distribución de cepas reaccionantes a flumequina y ácido oxolínico (gráfico 5).

	CEPAS AISLADAS	
	N	%
Cepas resistentes y med. sensibles	7	15
Cepas resistentes	22	48
Resto de cepas reaccionantes	17	37
Total de cepas reaccionantes	46	100

Anexo 5 : Respuesta a antibacterianos de cepas bacterianas aisladas

N° de Cepa	Medida de Halo de Inhibición Frente a Antibacterianos (mm)	
	ac. oxolínico	flumequina
1	25 (S)	34 (S)
2	23 (S)	24 (S)
3	20 (S)	25 (S)
4	22 (S)	24 (S)
5	20 (S)	34 (S)
6	20 (S)	27 (S)
7	10(R)	13(R)
8	8(R)	9(R)
9	7(R)	21 (M)
10	8(R)	12(R)
11	15(S)	26 (S)
12	6(R)	10(R)
13	8(R)	25 (S)
14	15 (S)	29 (S)
15	28 (S)	42 (S)
16	21 (S)	24 (S)
17	23 (S)	30 (S)
18	30(8)	36 (S)
19	24 (S)	30 (S)
20	18 (S)	26 (S)
21	8(R)	18(M)
22	18 (S)	26 (S)
23	8(R)	21 (M)
24	8(R)	24 (S)
25	14 (S)	25 (S)
26	18 (S)	34 (S)
27	14 (S)	26 (S)
28	10(R)	25 (S)
29	16(S)	18(M)
30	7(R)	11(R)
31	24 (R)	30 (S)
32	6(R)	8(R)
33	8(R)	14 (R)
34	7(R)	28 (S)
35	25 (S)	37 (S)
36	12 (S)	22 (S)
37	23 (S)	35 (S)

N° de Cepa	Medida de Halo de Inhibición Frente a Antibacterianos (mm)	
	ac. oxolínico	flumequina
38	19 (S)	25 (S)
39	7(R)	8(R)
40	20 (S)	26 (S)
41	23 (S)	30 (S)
42	10(R)	25 (S)
43	20 (S)	29 (S)
44	21 (S)	28 (S)
45	10(R)	22 (S)
46	18 (S)	24 (S)
47	21 (S)	28 (S)
48	21 (S)	30 (S)
49	9(R)	11(R)
50	10(R)	28 (S)
51	32 (S)	41 (S)
52	13(S)	25 (S)
53	10(R)	28 (S)
54	7(R)	10(R)
55	8(R)	11(R)
56	20 (S)	26 (S)
57	20 (S)	30 (S)
58	22 (S)	30 (S)
59	36 (S)	46 (S)
60	8(R)	30 (S)
61	7(R)	24 (S)
62	8(R)	10(R)
63	7(R)	12(R)
64	6(R)	11 (R)
65	17(S)	25 (S)
66	12 (S)	22 (S)
67	21 (S)	35 (S)
68	24 (S)	31 (S)
69	21 (S)	28 (S)
70	20 (S)	28 (S)
71	6(R)	9(R)
72	8(R)	24 (S)
73	8(R)	26 (S)
74	9(R)	20 (M)
75	6(R)	10(R)
76	20 (S)	30 (S)

N° de Cepa	Medida de Halo de Inhibición Frente a Antibacterianos (mm)	
	ac. oxolínico	flumequina
77	7(R)	23 (S)
78	7(R)	18 (M)
79	19 (S)	28 (S)
80	16 (S)	20 (M)
81	7(R)	18 (M)
82	23 (S)	30 (S)
83	10(R)	16 (R)
84	17(S)	26 (S)
85	6(R)	16 (R)
86	26 (S)	34 (S)
87	15(S)	25 (S)
88	22 (S)	40 (S)
89	24 (S)	34 (S)
90	33 (S)	42 (S)
91	6(R)	9(R)
92	7(R)	12 (R)
93	6(R)	6(R)
94	26 (S)	36 (S)
95	7(R)	10(R)
96	25 (S)	35 (S)
97	23 (S)	30 (S)
98	19 (S)	31 (S)
99	10(R)	24 (S)
100	8(R)	21 (M)
101	19(S)	35 (S)
102	12 (S)	27 (S)
103	18(S)	32 (S)
104	27 (S)	35 (S)
105	16 (S)	34 (S)
106	22 (S)	34 (S)
107	18 (S)	28 (S)
108	28 (S)	40 (S)

9.- AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente a las siguientes personas:

- Dr. Rafael Tamayo, profesor patrocinante por su colaboración en este trabajo.
- TM Srta. Mónica Sáez, por su colaboración y valiosa orientación en la realización teórico-práctica de este trabajo.
- Dr. Orlando Garrido, por su indispensable ayuda en la toma de muestras, muestras.
- Dr. Carlos Bertrán, por su colaboración al haber facilitado el material para la toma de
- TM Sra. Mónica Monras, Por sus consejos y ayuda en la parte práctica de este trabajo.
- A los Doctores y amigos, Jaime Gálvez, Daniel Suárez y Edgardo Ortiz, por su valiosa colaboración, orientación y amistad incondicional.
- Y a todas aquellas personas que con su más que indispensable ayuda, amistad y paciencia contribuyeron en la ejecución de esta Tesis.
- Al proyecto UNIR, por su patrocinio, el que hizo posible la realización de esta tesis.