



Informe Final Proyecto:

“Optimización de los esquemas terapéuticos de Oxitetraciclina y Florfenicol a través de los alimentos en los centros de cultivo de salmones en la etapa final del ciclo productivo en mar”

Financiamiento: Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura

Investigadora Responsable: Dra. Betty San Martín (M.V., Ph.D.)
Profesora Titular, Universidad de Chile
Directora de Laboratorio de Farmacología Veterinaria

EQUIPO INVESTIGADOR

Investigadora responsable: Dra. Betty San Martín

Investigadores colaboradores:

- Dra. Javiera Cornejo
- Dr. Hernán Rojas
- Dr. Marcos Godoy
- Dr. Arturo Anadón
- Dra. Lisette Lapierre

Coordinadora proyecto: Dra. Marcela Fresno

INDICE

Contenido	Página
Resumen ejecutivo	4
Executive summary	7
Introducción	10
Estado del arte	12
Objetivos	16
Material y Métodos	17
- Objetivo 1	17
- Objetivo 2	19
- Objetivo 3	21
- Objetivo 4	23
- Objetivo 5	27
Resultados	28
- Objetivo 1	28
- Objetivo 2	39
1. Determinación de la dosis más adecuada de florfenicol	39
2. Infección SRS y tratamiento con Florfenicol en condiciones controladas	45
3. Infección SRS y tratamiento con Oxitetraciclina en condiciones controladas	50
- Objetivo 3	57
- Objetivo 4	94
- Objetivo 5	135
✓ Para el sector privado	135
✓ Para el sector público	137
Mecanismos por los cuales se difundieron los resultados	139
Anexos Objetivo 2	140
- Anexo 1: Infección SRS y tratamiento con florfenicol	140
- Anexo 2: Infección SRS y tratamiento con oxitetraciclina	166
Anexos Objetivo 4	186
- Anexo 1: Figuras	186
- Anexo 2: Tablas	192
Anexos: Otros	213
- Anexo 1: Lista asistentes reunión inicial marzo 2018	213
- Anexo 2: Lista asistentes taller de trabajo de Farmacología	214
- Anexo 3: Lista asistentes taller de trabajo de Epidemiología	216
- Anexo 4: Invitación Seminario Internacional	218
- Anexo 5: Programa Seminario Internacional	219
- Anexo 6: Lista asistentes Seminario Internacional	220
- Anexo 7: Correo electrónico recepción manuscrito en Revista PLOS ONE	226

RESUMEN EJECUTIVO

Los alcances de esta propuesta de investigación son:

- En condiciones controladas, identificar mediante los Índices PK/PD las dosis óptimas de oxitetraciclina administrado con en el alimento en diferentes formas y pautas horarias
- Identificar en peces desafiados con *P. salmonis* los esquemas terapéuticos más adecuados de oxitetraciclina y florfenicol.
- Evaluar en condiciones de campo la eficacia a de los esquemas terapéuticos.
- Identificar y evaluar en condiciones de campo las variables ambientales, climáticas y sanitario- productivas que alteren los esquemas terapéuticos.

Las principales conclusiones de los resultados son:

- ✓ El aumento de la dosis de oxitetraciclina administrada a través del alimento, no mejora la biodisponibilidad debido a que es un antibiótico tiempo dependiente.
- ✓ Independiente de la dosis, la administración de oxitetraciclina vía alimento tiene una baja absorción a nivel intestinal, lográndose concentraciones plasmáticas muy cercanas al punto de corte epidemiológico y al punto de corte clínico.
- ✓ Las terapias con oxitetraciclina a través del alimento deberían realizarse solo frente a brotes cuyos aislados de *P. salmonis* tengan una CMI $\leq 0,5$ ug/mL.
- ✓ La forma y pauta horaria de administración del alimento medicado con oxitetraciclina, no afecta la biodisponibilidad de este antibiótico.
- ✓ Los resultados señalan que el éxito de una terapia oral con alimento medicado (evaluada por el porcentaje de mortalidad) es dependiente del consumo diario de alimento (SFR= alimento suministrado diariamente/biomasa actual) x 100 / días). En la medida que el consumo de alimento disminuye, los peces no ingieren la dosis necesaria de antibiótico existiendo mayores probabilidades de no lograr el éxito deseado.
- ✓ El inicio de una terapia debería realizarse antes de que se vea afectado el consumo diario de alimento.
- ✓ Los tratamientos realizados en campo contra Piscirickettsiosis fueron eficaces en disminuir la frecuencia de signos clínicos macroscópicos y hallazgos histopatológicos, en las tres especies en estudio, tratadas con florfenicol u oxitetraciclina.
- ✓ Los grupos de peces que alcanzaron y mantuvieron altas concentraciones plasmáticas de florfenicol (≥ 4 $\mu\text{g/ml}$) y oxitetraciclina ($\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$) presentaron tratamientos terapéuticos más eficaces en términos de mortalidad y disminución de signos clínicos. Mientras que bajas concentraciones plasmáticas de florfenicol (≤ 4 ug/ml) presentaron en general mayor mortalidad.

- ✓ Peces orillados o moribundos presentaron bajas concentraciones plasmáticas de antibiótico. Lo que indica un bajo consumo de alimento medicado y una condición sanitaria desmejorada asociado a la presencia de signos clínicos de Piscirickettsiosis.
- ✓ Los centros tratados de forma temprana contra cuadros de Piscirickettsiosis presentan menos mortalidad en comparación con centros que inician el tratamiento asociado a un aumento de mortalidad. Tratamientos contra Piscirickettsiosis en centros con baja mortalidad presentan en su evolución menor peak de mortalidad y menor mortalidad acumulada.
- ✓ La información recopilada de tratamientos terapéuticos realizados con oxitetraciclina contra Piscirickettsiosis es escasa, debido a su baja frecuencia de uso. Se debe considerar incrementar el tiempo de seguimiento en futuros estudios con la finalidad de incrementar el número de centros.
- ✓ La vía oral es la más empleada y el florfenicol es el principal principio activo, donde sus dosis han disminuido en el tiempo y el tratamiento es más eficaz mediante microraciones. La oxitetraciclina ha disminuido su uso entre el 2014-2018.
- ✓ Los tratamientos eficaces se asociaron a mortalidades bajas al inicio de del tratamiento, siendo el factor de mayor relevancia. También la eficacia se asoció a los tratamientos inyectables con oxitetraciclina, al uso de florfenicol oral en vez de oxitetraciclina y a dosis de 20 mg/kg.
- ✓ Los tratamientos no eficaces se asociaron a un mayor tiempo de duración y con la presencia de eventos que disminuyeron o pararon el consumo de alimento, principalmente los que ocurrieron al inicio del tratamiento, a peces de mayor peso y a la época de verano.
- ✓ Los tratamientos a centro completo se asociaron con una mayor reducción de la mortalidad por SRS y menos tratamientos contra piscirickettsiosis por ciclo.

Las principales recomendaciones elaboradas a partir de los resultados son:

- ✓ Frente a un diagnóstico empírico de *P. salmonis*, no debería utilizarse terapias con alimento medicado con oxitetraciclina.
- ✓ La probabilidad de éxito terapéutico con alimento medicado con oxitetraciclina a una dosis de 75 o 100 mg/kg p.v. es > al 90% solo cuando los aislados de un brote tienen una CMI \leq a 0,5 $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ En un tratamiento empírico con florfenicol frente a *P. salmonis*, la dosis más adecuada vía oral está en rangos de 15 y 20 mg/kg p.v.
- ✓ Iniciar la terapia frente a un diagnóstico precoz de *P. salmonis* con el fin de que no se vea afectada la ingesta diaria de alimento (SFR).
- ✓ Mantener un programa de vigilancia sanitaria que permita diagnosticar el cuadro clínico de Piscirickettsiosis de forma temprana por medio de necropsia y/o diagnóstico de laboratorio, el cual debe intensificarse en frecuencia durante periodos de mayor riesgo para la presentación de la enfermedad (primavera/verano).
- ✓ El diagnóstico clínico en peces de la mortalidad o moribundos orillados mediante necropsia es una herramienta simple y rápida de diagnóstico temprano.

- ✓ Considerar la aplicación de tratamientos terapéuticos tempranos contra Piscirickettsiosis en centros diagnosticados por medio de necropsia y/o diagnóstico de laboratorio, considerando:
 - Celeridad en la toma de decisiones, y
 - Favorecer la logística que permite disponer de forma temprana del alimento medicado.
- ✓ Considerar el raleo o extracción de peces moribundos orillados previo, durante y posterior al tratamiento terapéutico con la finalidad de eliminar peces con poca posibilidad de sobrevivir y/o respuesta terapéutica favorable.
- ✓ Preferir la vía inyectable en lo posible empleando oxitetraciclina en vez de florfenicol.
- ✓ Preferir tratar al centro completo y alimentar con microraciones cuando se emplea florfenicol en Salmón del atlántico.
- ✓ Definir una estrategia empresa con estructuras formales de decisión que incorpore el seguimiento y evaluación económica.
- ✓ Incorporar indicadores para la gestión de empresas y de Sernapesca, como el número de tratamientos por ciclo, índice de consumo de antibióticos y mortalidad acumulada.
- ✓ Consensuar una definición de “éxito o eficacia terapéutica” y mejorar la calidad y uso de la información.
- ✓ Evaluar el impacto de los incentivos (nuevas regulaciones y actual programa de control de piscirickettsiosis).
- ✓ Actualizar el Manual de Buenas Prácticas en el uso de Antimicrobianos y Antiparasitarios en Salmonicultura chilena, para que incluya los resultados de este y otros trabajos sobre el tema.

EXECUTIVE SUMMARY

The scopes of this research proposal are:

- Under controlled conditions, identify through the PK / PD Indexes the optimal doses of oxytetracycline administered with the food in different forms and time schedules.
- Identify in fish challenged with *P. salmonis* the most suitable therapeutic schemes of oxytetracycline and florfenicol.
- Evaluate in field conditions the effectiveness of the therapeutic schemes.
- Identify and evaluate in field conditions the environmental, climatic and health-productive variables that alter the therapeutic schemes.

The main conclusions of the results are:

- ✓ The form and time schedule of administration of the medicated food with oxytetracycline, does not affect the bioavailability of this antibiotic. The increase in the dose of oxytetracycline administered through food does not improve bioavailability, because it is a time-dependent antibiotic.
- ✓ Regardless of the dose, the administration of oxytetracycline through feed has a low absorption at the intestinal level, achieving plasma concentrations very close to the epidemiological cut-off point and the clinical cut-off point.
- ✓ The probability of therapeutic success with medicated feed with oxytetracycline at a dose of 75 or 100 mg / kg p.v. is > 90%, only when isolates from an outbreak have an MIC of $\leq 0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$.
- ✓ The results indicate that the success of an oral therapy with medicated food (evaluated by the percentage of mortality) is dependent on the daily food intake ($\text{SFR} = \text{Specific feeding rate} / \text{current biomass} \times 100 / \text{days}$). As the consumption of food decreases, the fish do not ingest the necessary dose of antibiotic and there is a greater probability of not achieving the desired success. Because of this, therapy should begin before the daily food consumption is affected.
- ✓ The beginning of a therapy should start before the daily food consumption is affected.
- ✓ The treatments carried out in the field against Piscirickettsiosis were effective in decreasing the frequency of macroscopic clinical signs and histopathological findings, in the three species under study, treated with florfenicol or oxytetracycline.
- ✓ The fish that reached and maintained high plasma concentrations of florfenicol ($\geq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$) and oxytetracycline ($\geq 0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$) had a more effective therapeutic treatment in terms of mortality and reduction of clinical signs. While low plasma concentrations of florfenicol ($\leq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$) generally showed higher mortality.

- ✓ Bordered or moribund fish presented low plasma concentrations of antibiotic. This indicates a low consumption of medicated feed and a deteriorated sanitary condition, associated with the presence of clinical signs of Piscirickettsiosis.
- ✓ The centers treated early against Piscirickettsiosis had less mortality compared to centers that initiate the treatment associated with an increase in mortality. Treatments against Piscirickettsiosis in centers with low mortality have a lower mortality peak and lower accumulated mortality.
- ✓ The information collected from therapeutic treatments performed with oxytetracycline against Piscirickettsiosis is scarce, due to its low frequency of use. It should be considered to increase the monitoring time in future studies in order to increase the number of centers.
- ✓ The most common administration route is the oral route and florfenicol is the main active principle, where its doses have decreased over time and the treatment is more effective through micro-rations. Oxytetracycline has decreased its use between 2014-2018.
- ✓ Effective treatments were associated with low mortalities at the beginning of treatment, being the most relevant factor. The efficacy was also associated with injectable treatments with oxytetracycline, the use of oral florfenicol instead of oxytetracycline, and at a dose of 20 mg / kg.
- ✓ Non-effective treatments were associated with a longer duration and with the presence of events that decreased or stopped the consumption of food, mainly those that occurred at the beginning of the treatment, to heavier fish and to the summer season.
- ✓ Full-center treatments were associated with a greater reduction in SRS mortality and fewer treatments against Piscirickettsiosis per cycle.

The main recommendations elaborated from the results are:

- ✓ Faced with an empirical diagnosis of *P. salmonis*, therapies with oxytetracycline-medicated feed should not be used.
- ✓ The probability of therapeutic success with medicated food with oxytetracycline at a dose of 75 or 100 mg / kg p.v. it's > 90%, only when isolates from an outbreak have a MIC of $\leq 0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$.
- ✓ In an empirical treatment with florfenicol against *P. salmonis*, the most adequate dose orally is 15 to 20 mg / kg p.v.
- ✓ Start therapy with an early diagnosis of *P. salmonis*, so that daily food intake is not affected.
- ✓ Maintain a health surveillance program to diagnose the clinical signs of Piscirickettsiosis early by means of necropsy and / or laboratory diagnosis, which should be intensified in frequency during periods of increased risk for the presentation of the disease (spring / summer).
- ✓ The clinical diagnosis in fish mortality or dying/bordered fish by necropsy is a simple and quick tool for early diagnosis.
- ✓ Consider the application of early therapeutic treatments against Piscirickettsiosis in centers diagnosed by means of necropsy and / or laboratory diagnosis, considering:
 - Celerity in decision making, and

- Favor the logistics that allow the medicated food to be available early
- ✓ Consider the removal of dying fish before, during and after the therapeutic treatment, in order to eliminate fish with little possibility of survival and/or favorable therapeutic response.
- ✓ Prefer injectable route as much as possible with oxytetracycline instead florfenicol.
- ✓ Prefer to treat the entire center and to feed with micro-rations, when florfenicol is used in Atlantic salmon.
- ✓ Define a company strategy with formal decision structures that incorporate economic monitoring and evaluation.
- ✓ Incorporate indicators for the management of companies and Sernapesca, as the number of treatments per cycle, index of antibiotic consumption and accumulated mortality.
- ✓ Agree on a definition of "therapeutic success or efficacy" and improve the quality and use of information.
- ✓ Evaluate the impact of incentives (new regulations and current Piscirickettsiosis control program).
- ✓ Update the Manual of Good Practices in the use of Antimicrobial and Antiparasitic in Chilean Salmoniculture, to include the results of this and other works on the subject.

INTRODUCCIÓN

En la última década el uso excesivo de antibióticos ha sido cuestionado en todos los sistemas de crianza intensiva de especies acuáticas y terrestres. Esto no solo ocurre por el riesgo de generar resistencia en los patógenos de los animales y que luego puedan ser transmitidos a la población humana, sino que además por el impacto negativo que pueden causar en el medio ambiente, ya que estos fármacos son eliminados a través de las orinas y heces. Dentro de este contexto, la OMS/FAO/OIE solicita a los diferentes países mejorar sus reglamentaciones y fomentar las Buenas Prácticas en relación al uso de estos fármacos.

En el caso particular de la industria salmonera en Chile, en los últimos años se ha observado la utilización de una elevada cantidad de antibióticos, infiriéndoles ser la principal causa del impacto negativo en el ecosistema marino. Esto, debido a que el alimento medicado que el pez no consume, permanece en el sedimento acuático y su biodegradación es muy lenta. Esta situación no solo ha afectado la imagen internacional de la industria, sino que además podría afectar su sustentabilidad en el tiempo.

Por otro lado, aun cuando el estado ha implementado diferentes reglamentaciones orientadas a controlar y regular el uso de los antibióticos, no se han logrado identificar las principales causas del nivel de utilización de estos fármacos y por lo tanto, no se ha podido dar una solución a la problemática.

Mediante esta propuesta de investigación y con los antecedentes de estudios previos realizadas por el Laboratorio FARMAVET, se dispondrá de los antecedentes necesarios para que Sernapesca pueda establecer las bases en el buen uso de los antibióticos y entregue recomendaciones prácticas para que los Médicos Veterinarios responsables de la sanidad de los peces en los centros de cultivo optimicen sus esquemas terapéuticos.

De acuerdo a los antecedentes dispuestos, existen diferentes factores que se consideran críticos y que han impedido avanzar en dar soluciones al aumento del uso de fármacos en la industria salmonera. Dentro de los más importantes, se consideran:

- 1.- La mayor cantidad de antibióticos utilizados hoy en la industria es frente a *P. salmonis*, causante de uno de los principales desafíos sanitarios en la etapa de mar, debido a sus altas mortalidades. Las vacunas existentes frente a este patógeno no han logrado la eficacia esperada, enfrentándose a la necesidad de utilizar terapias con antibióticos.
- 2.- Las pérdidas económicas asociadas a las mortalidades en la fase final del ciclo productivo en mar, son significativamente mayores a los costos asociados a una terapia con antibióticos.
- 3.- En las encuestas realizadas por el Laboratorio FARMAVET, una gran parte de los Médicos Veterinarios responsables de la sanidad de los salmones en los centros de cultivo, señalaron que la principal causa del aumento de la dosis y duración de las terapias podría ser un aumento en los

niveles de resistencia de *P. salmonis*, aun cuando no siempre realizan aislamiento bacteriano para realizar estudios de sensibilidad.

Por otra parte, en los estudios realizados por el Laboratorio FARMAVET, donde se han aislado cepas a partir de brotes de *P. salmonis*, no se ha determinado la presencia de resistencia bacteriana. Si bien, la resistencia a antibióticos es un fenómeno importante de considerar, de momento que se presente, las terapias no serían exitosas aun cuando se cambien los esquemas terapéuticos.

4.- El aumento de las dosis podría estar asociado a la forma o la pauta horaria de administración de los alimentos medicados, lo que no ha sido considerado por los Médicos Veterinarios y resultados previos indican que existen diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de los antibióticos al ser administrados bajo distintos esquemas terapéuticos.

5.- La duración de la terapia podría estar asociada a la forma en que se evalúa la eficacia clínica, que hoy es a través de la mortalidad, parámetro que por sí solo es insuficiente para evaluar el éxito de una terapia.

6.- El Registro de Medicamentos Veterinarios solicita a la industria farmacéutica, que en los estudios de evaluación de los índices PK/PD de un antibiótico a una dosis determinada, determine la composición del alimento (% PC, EE, FC, Ceniza) en el cual se vehiculizó la pre- mezcla de antibiótico. Estos estudios son adecuados para sistemas intensivos de especies terrestres, sin embargo, para el caso particular de los salmones, además se debería solicitar información de la forma y pauta horaria en que se administró la dosis recomendada en el alimento medicado, debiendo quedar señalado en las instrucciones del esquema terapéutico. Esto debido a que, en las especies acuáticas, por ser organismos poiquiloterms, la absorción de los fármacos y de los nutrientes está condicionada a los cambios diarios y estacionales de los ciclos de luz-oscuridad.

7.- Asimismo, es importante considerar como factores críticos que han impedido dar una solución al aumento del uso de antibióticos los siguientes puntos:

- ✓ No existen suficientes estaciones experimentales que reúnan las condiciones para realizar los estudios en condiciones controladas, lo que encarece las investigaciones
- ✓ Los estudios deben realizarse además en condiciones de campo, los que muchas veces se ven interrumpidos debido a las condiciones climáticas y las dificultades de mantener el monitoreo de variables críticas en el tiempo.
- ✓ Se requiere de un equipo de investigadores multidisciplinario para abordar las diferentes variables.

Por lo anteriormente mencionado, se identifica la necesidad de la industria de contar con la evidencia científica para hacer un correcto uso de los antibióticos en la salmonicultura, lo que permitirá reducir la morbilidad y la mortalidad de la población, reducir los costos asociados a tratamientos, reducir el impacto al medio ambiente y mejorar la imagen que el sector productivo proyecta en los mercados.

ESTADO DEL ARTE

Para mejorar las reglamentaciones oficiales y su aplicación por parte de las empresas, es necesario dar solución a las principales causas que han llevado a modificar la dosis y la duración de las terapias de oxitetraciclina y florfenicol, ya que en la medida que no existan otras alternativas terapéuticas para controlar *P. salmonis*, estos antibióticos deberán seguir utilizándose.

Los resultados obtenidos previamente por el Laboratorio FARMAVET descartan que la resistencia bacteriana sea una variable que esté afectando el aumento en el uso de antibióticos, ya que las cepas de *P. salmonis* aisladas desde peces enfermos no presentaron resistencia a oxitetraciclina y florfenicol. Así también, con los resultados de la calidad química, biológica y de homogeneidad obtenidos al analizar las pre-mezclas de antibióticos y los alimentos medicados, también se descartan que estos estén influyendo en esta situación de riesgo para la industria.

Por otro lado, es importante señalar que se concluyó que una de las principales causas que han influido en el aumento de la dosis de **florfenicol** es la forma y pauta horaria de administrar el alimento medicado. Con los resultados de los índices PK/PD se pudo demostrar que cuando el alimento medicado se administra en forma de micro-rationes y en dos pautas horarias, las concentraciones plasmáticas pueden ser significativamente mayores a las alcanzadas actualmente.

Para dar una solución completa al aumento de la dosis y duración de las terapias con antibióticos, en esta propuesta se determinarán las pautas y formas de administración para optimizar la dosis de **oxitetraciclina** (no abordado anteriormente). Posteriormente, se definirá la duración de las terapias de florfenicol y oxitetraciclina, en peces desafiados con *P. salmonis*. Por otro lado, a través de estudios de campo, se evaluarán las terapias que actualmente utilizan los Médicos Veterinarios y se analizarán las diferentes variables que determinan el uso de una terapia con antibióticos. Finalmente, en base a los resultados se realizarán recomendaciones prácticas, para el sector oficial y las empresas, que serán consensuadas con representantes de ambos sectores.

Para el desarrollo de los objetivos de la propuesta, se contará con tres empresas altamente especializadas en sus áreas de trabajo:

- Aquainnovo para realizar los estudios en condiciones controladas en peces desafiados y sin desafiar.
- CERES BCA empresa especializada en soluciones y servicios en el ámbito sanitario para servicios oficiales y empresas, que realizará los estudios epidemiológicos, árbol de decisiones y las recomendaciones prácticas para el sector público y privado.
- CIBA, empresa especializada en el diagnóstico de patologías de organismos acuáticos, que se encargará del monitoreo de los desafíos en campo.

Asimismo, se contará con la colaboración de a lo menos seis empresas para realizar los estudios de campo en los centros de cultivo.

Este proyecto de bien público que se genera desde una necesidad del sector público y privado, tiene como principal atributo diferenciador, que es el primero a nivel nacional que busca optimizar el uso de antibióticos sobre una base científica, con el fin de que el Estado no solo regule el uso de estos fármacos, sino que además entregue recomendaciones prácticas a la industria del salmón para reducir el uso de antibióticos. Debe tenerse presente, que estos fármacos se deben seguir utilizando mientras no existen otras alternativas terapéuticas.

El conocimiento generado en esta propuesta, junto a los resultados obtenidos anteriormente, permitirá que la industria del salmón mejore su productividad, sustentabilidad y valor agregado por dos razones fundamentales:

1.- La disminución del uso de antibióticos a corto plazo mejorará la imagen internacional de la industria del salmón, ya que esta se ha visto afectada por el uso excesivo de antibióticos. Por el contrario, si se sigue aumentando la cantidad de antibiótico, se puede afectar la sustentabilidad de la industria en el tiempo.

2.- *P. salmonis* causa pérdidas que oscilan entre los 500 y 700 millones de dólares anuales, lo que equivale aproximadamente a un 15% de todos los retornos que se obtienen por exportaciones. En el caso de los antibióticos, se estima un gasto anual como industria de más de US\$58 millones. Si se lograra disminuir a lo menos un 20% de la cantidad de antibiótico utilizado, la industria podría ahorrar alrededor de US\$15 millones, disminuyendo los costos de producción sin afectar las condiciones sanitarias de los centros de cultivo.

La industria del salmón en estos últimos años, ha sido uno de los sectores con mayor crecimiento a nivel nacional. Sin embargo, al ser una actividad de producción intensiva, inserta en un hábitat marino que actúa como vehículo diseminador de patógenos, no está exenta de adquirir enfermedades de origen bacteriano, en las cuales los antibióticos siguen siendo la principal herramienta terapéutica. Entre las principales bacterias patógenas que afectan a las diferentes especies salmonídeas en diferentes etapas del ciclo productivo se encuentran: *Renibacterium salmoninarum*, *Streptococcus phocae*, *Vibrio ordalii*, *Flavobacteria psychrophylum* y *Piscirickettsia salmonis* (1, 2, 3, 4, 5).

Piscirickettsiosis es la enfermedad causante del mayor uso de antibióticos en la industria del salmón, ya que las vacunas no han logrado la eficacia deseada. Está clasificada de alto riesgo y de declaración obligatoria por SERNAPESCA (6). Oxitetraciclina y florfenicol siguen siendo las principales herramientas terapéuticas, debido a que, por sus características fisicoquímicas, pueden penetrar al interior de las células de los tejidos afectados, que es donde se localiza *P. salmonis*.

Se debe considerar, además, que el no tratar esta enfermedad, significa grandes pérdidas económicas para el productor ya que es la principal causa de mortalidad en la etapa final del ciclo productivo en mar de la mayoría de las especies salmonídeas. Se estima que la industria por esta enfermedad tiene pérdidas que oscilan entre los 500 y 700 millones de dólares anuales, lo que

equivale aproximadamente a un 15% de todos los retornos que se obtienen por exportaciones. En el caso de los antibióticos, se estima un gasto anual de más de US\$58 millones (7).

Por otro lado, en estos últimos años se ha observado que la cantidad de antibióticos utilizados ha ido en aumento. En el año 2011 se utilizó una tonelada de antibiótico por 3000 toneladas de biomasa cosechada y en el año 2015 una tonelada por 1500 toneladas cosechadas. En el diagnóstico sobre el uso de antibióticos realizado por FARMAVET para SERNAPESCA, se concluyó que el aumento en la cantidad de antibiótico por biomasa cosechada, se debe principalmente a un aumento de las dosis y duración de las terapias realizadas con alimento medicado, en relación a lo recomendado por la industria farmacéutica en el registro de Medicamentos Veterinarios, ya que el número de terapias por ciclo productivo se ha mantenido constante.

En la primera etapa del proyecto I+D “Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura”, se planteó analizar diferentes variables que pudieran ser causantes del aumento de las dosis y de la duración de las terapias. Dentro de este contexto, se analizaron las pre-mezclas de antibióticos, los alimentos medicados y los niveles de resistencia en aislados de *P. salmonis* obtenidos de centros de cultivos de diferentes zonas geográficas. Además, se analizaron los Índices PK/PD de Florfenicol, predictores de la eficacia clínica de un antibiótico, administrado en diferentes formas y pautas horarias a través del alimento.

Antes de realizar los estudios PK/PD, en la primera etapa de este proyecto se tuvo que definir la CMI clínica de *P. salmonis* frente a oxitetraciclina y florfenicol ya que no existía un consenso a nivel nacional sobre este valor.

Con los resultados obtenidos se pudo concluir que las dosis de florfenicol pueden disminuirse cuando se administra con el alimento en forma de micro-rationes y en dos raciones diarias, ya que los Índices PK/PD en ambos casos, fueron significativamente mayores a los definidos para este antibiótico en diferentes especies animales. Estos resultados fueron presentados las VIII Jornadas de Investigación en Salmonicultura organizado por INTESAL, ya que son los primeros estudios realizados a nivel nacional, demostrando que las dosis pueden disminuirse al optimizar las formas de administrar el alimento medicado.

Los resultados obtenidos de la primera parte del proyecto, junto a los que se obtendrán en esta propuesta, permitirán a SERNAPESCA definir las líneas estrategias que apunten a la disminución del uso de antibióticos. Por otro lado, como el uso excesivo de antibióticos ha tenido un impacto negativo en las exportaciones del salmón, para la industria es imprescindible disminuir el uso de estos fármacos.

Referencias

1. Rhodes, L., Nguyen, O., Deinhard, R., White, T., Harrell, L., Roberts, M. 2008. Characterization of *Renibacterium salmoninarum* with reduced susceptibility to macrolide antibiotics by standardized antibiotic susceptibility test. *Dis Aquat Organ*, 173-180.
2. Romalde, Jesús., Ravelo, C., Valdés, I., Magariños, B., de la Fuente, E., San Martín, C., Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A. 2008. *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. *Vet Microbiol*, 130: 198-207.
3. Poblete-Morales, M., Irgang, R., Henríquez-Núñez, H., Toranzo, A., Kronvall, G., Avendaño-Herrera, R. 2013. *Vibrio ordalii* antimicrobial susceptibility testing-modified culture conditions required and laboratory-specific epidemiological cuff values. *Vet Microbiol*, 165: 434-442.
4. Clifford, E. 2011. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research*, 2: 97-108.
5. Bravo, S., Dölz, H., Silva, M., Lagos, C., Millanao, A., Urbina, M. 2005. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Informe final Proyecto N° 2003-28. Universidad Austral de Chile, Facultad de Pesquerías y Oceanografía, Instituto de Acuicultura. Puerto Montt, Chile. 256 pp.
6. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, Chile. Resolución Extenta N° 3174, Establece programa sanitario específico de vigilancia y control de piscirickettsiosis (Psevc-Piscirickettsiosis). Valparaíso, 28 de dic. 2012.
7. Aqua.cl. 2017. <http://www.aqua.cl/2017/06/23/dr-en-biologia-molecular-responde-ante-cuestionamientos-por-antibioticos-en-el-salmon/>

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El propósito que se espera lograr con los resultados de esta propuesta es identificar esquemas terapéuticos óptimos con los principales antibióticos utilizados frente a Piscirickettsiosis, así como los factores que determinan su eficacia y aplicación, de manera que puedan servir de fundamento para las empresas y la reglamentación que SERNAPESCA establezca para los sistemas productivos en agua de mar, contribuyendo así a la sustentabilidad de la industria salmonera, minimizando el riesgo de resistencia microbiana y el impacto al medio ambiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las dosis óptimas de oxitetraciclina para las diferentes formas de administración del alimento medicado a través de los índices PK/PD en peces clínicamente sanos.
2. Identificar los esquemas terapéuticos más adecuados de oxitetraciclina y florfenicol en peces desafiados con *P. salmonis* en condiciones controladas, evaluando la eficacia clínica a través del diagnóstico por PCR, % de la mortalidad y sintomatología clínica.
3. Evaluar en condiciones de campo la efectividad de los esquemas terapéuticos con antibióticos frente a Piscirickettsiosis, que actualmente se utilizan en Chile.
4. Identificar y evaluar en condiciones de campo las variables ambientales, climáticas y sanitario-productivas que determinen el esquema terapéutico instaurado por el Médico Veterinario.
5. Proponer recomendaciones prácticas para optimizar el uso de antibióticos contra Piscirickettsiosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los métodos analíticos que se señalan a continuación ya fueron validados y puestos a punto en la primera parte de este proyecto:

- Metodología analítica validada para determinar la concentración plasmática de florfenicol y oxitetraciclina en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
- Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Piscirickettsia salmonis* genotipificadas frente a oxitetraciclina y florfenicol.
- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Clínica de los aislados de *P. salmonis* frente a florfenicol y oxitetraciclina.

Objetivo 1.- Determinación en condiciones controladas de los índices farmacocinéticos y farmacodinámicos (índices PK/PD) de oxitetraciclina administrada en dosis diferentes a través del alimento

1.1.- Emplazamiento del estudio

La fase experimental se llevará a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación y Transferencia Acuícola (CITA), perteneciente a empresa Aquainnovo S.A., ubicado a 33 km de Puerto Montt, Carretera Austral sector Lenca, Chile. Los estanques tendrán agua de mar con una tasa de recambio de agua de 1.5/hora, una temperatura $13^{\circ}\text{C} \pm 1$; oxígeno 80-20 de saturación y pH 7-8. La densidad no debe superar los 30 kg/m^3 de biomasa durante el estudio.

Se utilizarán peces con un peso promedio de 600 a 700 g (Salmón del Atlántico) distribuidos en 6 estanques de 1m^3 , (3 estanques con 15 peces y 3 con 30 peces) aclimatados 7 días previo al tratamiento. Durante el proceso de aclimatación, se les administrará alimento comercial sin antibióticos, establecida para la especie y pesos de los peces

Criterios de inclusión de los peces: Que estén clínicamente sanos y que no hayan recibido tratamiento farmacológico o químico de ningún tipo, a lo menos 90 días antes del inicio de la prueba, que pudieran interferir posteriormente con el análisis del principio activo en las muestras de plasma. El Médico Veterinario de la estación, emitirá una constancia que indique que no se han administrado fármacos durante los últimos 90 días en el grupo de peces.

Criterio de exclusión de los animales: Se excluirá de este estudio, cualquier animal que muestre signos de enfermedad, incluyendo anorexia, letargia y nado errático, también los peces que presenten hongos en su superficie corporal o en aletas, lesiones de piel, deformidades, ausencia ocular, aletas roídas, entre otras, o cualquier alteración que, a juicio del Médico Veterinario responsable, pueda comprometer los resultados del estudio. Ante algún evento de exclusión y/o muerte antes de iniciado el ensayo, el animal será reemplazado por alguno que cumpla las mismas características requeridas en este.

Dosis seleccionadas: 80 y 100 mg/kg de peso vivo (p.v.) administrado a través del alimento, considerando un SFR de 1,2% (peso cuerpo). Los alimentos medicados serán fabricados en plantas productoras de alimento de tipo comercial.

Grupos experimentales: Para cada dosis se tendrán 3 grupos experimentales.

- *Grupo 1:* se les administrará una dosis única de 80mg/kg p.v. de oxitetraciclina a través del alimento administrado en micro-rationes
- *Grupo 2:* se les administrará una dosis única de 80mg/kg p.v. de oxitetraciclina a través del alimento administrado en dos pautas horarias (50% de la dosis en la mañana y 50% de la dosis en la tarde)
- *Grupo 3:* se les administrará 80mg/kg p.v. de oxitetraciclina a través del alimento administrado en una ración diaria
- *Grupo 4:* se les administrará una dosis única de 100mg/kg p.v. de oxitetraciclina a través del alimento administrado en micro-rationes
- *Grupo 5:* se les administrará una dosis única de 100mg/kg p.v. de oxitetraciclina a través del alimento administrado en dos pautas horarias (50% de la dosis en la mañana y 50% de la dosis en la tarde)
- *Grupo 6:* se les administrará 100mg/kg p.v. de oxitetraciclina a través del alimento administrado en una ración diaria

Toma de muestra: Todos los estanques se alimentarán en forma simultánea y luego se procederá a la toma de muestras según los tiempos definidos post tratamiento (0, 1, 3, 6, 8, 12, 18, 24, 36 y 48 horas). Una vez finalizada la administración, se sacrificarán 12 ejemplares por cada tiempo de muestreo mediante golpe en la cabeza. Se tomarán muestras de sangre mediante venipuntura caudal utilizando jeringas de 5-10 mL. Para los tiempos de 1, 3 y 6 horas los peces serán extraídos a partir de los 3 primeros estanques conformados (1 tiempo por estanque) para no interrumpir la alimentación, mientras que el tiempo 8 y 12 horas se extraerán del estanque 4, tiempo 18 y 24 horas del estanque 5 y finalmente el tiempo 36 y 48 del estanque 6.

Las muestras de sangre serán depositadas en tubos vacutainer (6 mL) con EDTA debidamente rotuladas con el tiempo de muestreo. Luego serán centrifugados y el plasma obtenido será recolectado en tubos eppendorf y congelados a -20°C a la espera de envío al Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile.

1.2. Determinación de los índices PK/PD

Las muestras de plasma de cada grupo experimental serán analizadas por LC/MS/MS en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Universidad de Chile. El método analítico fue previamente validado, de acuerdo a las Normas ISO 17025 of.2005 y se adjunta en el anexo A.

Para cada tiempo de muestreo se calculará el promedio y desviación estándar de las concentraciones plasmáticas. Con los resultados obtenidos para cada grupo experimental, se realizaron las curvas de concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) en función del tiempo. A partir de estas curvas, se determinarán los parámetros farmacocinéticos utilizando el programa computacional WinNonlin (Version 6.3; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

El índice PK/PD a evaluar oxitetraciclina, es $ABC_{0-24 \text{ h.}}/\text{CMI}$ y su valor debe ser > 25 . Se utilizará la CMI clínica = $2 \mu\text{g/mL}$ la cual fue definida en la primera etapa del proyecto (Anexo C)

Mediante un análisis de varianzas (ANOVA) se determinará para cada dosis si existen diferencias significativas de los índices PK/PD entre las diferentes formas de administrar el alimento medicado. Además, se determinará si existen diferencias significativas de los índices PK/PD entre las dosis para cada forma de administrar el alimento medicado.

Objetivo 2.- Determinación de la duración de la terapia de oxitetraciclina y florfenicol administrado a una dosis determinada a través del alimento en peces desafiados con *P. salmonis* en condiciones controladas.

2.1.- Emplazamiento del estudio

La fase experimental se llevará a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación y Transferencia Acuícola (CITA), perteneciente a empresa Aquainnovo S.A., ubicado a 33 km de Puerto Montt, Carretera Austral sector Lenca, Chile. Los estanques tendrán agua de mar con una tasa de recambio de agua de 1.5/hora, una temperatura $13^{\circ}\text{C} \pm 1$; oxígeno 80-20 de saturación y pH 7-8. La densidad no debe superar los 30 kg/m^3 de biomasa durante el estudio.

Se utilizarán peces que hayan sido vacunados con una vacuna polivalente. Al iniciar el período de aclimatación deben tener un peso promedio de 600 a 700 g (Salmón del Atlántico), los que se distribuirán en 6 estanques. Durante el proceso de aclimatación (7 días) se les administrará alimento comercial sin antibióticos, según la dieta establecida para la especie y pesos de los peces.

Criterios de inclusión de los peces: clínicamente sanos y que no hayan recibido tratamiento farmacológico o químico de ningún tipo, a lo menos 90 días antes del inicio de la prueba. El Médico Veterinario de la estación, emitirá una constancia que indique que no se han administrado fármacos durante los últimos 90 días en el grupo de peces.

Criterio de exclusión de los animales: Se excluirá de este estudio, cualquier animal que muestre signos de enfermedad, incluyendo anorexia, letargia y nado errático, también los peces que presenten hongos en su superficie corporal o en aletas, lesiones de piel, deformidades, ausencia ocular, aletas roídas, entre otras, o cualquier alteración que, a juicio del Médico Veterinario responsable, pueda comprometer los resultados del estudio. Ante algún evento de exclusión y/o muerte antes de

iniciado el ensayo, el animal será reemplazado por alguno que cumpla las mismas características requeridas en este.

Desafío de los peces con P. salmonis: Finalizados los 7 días de aclimatación, los peces se desafiarán con *P. salmonis* (LF89) por inyección intraperitoneal.

Dosis administrada de los antibióticos

- Florfenicol: 15 mg/kg p.v administrado en micro-rationes. Esta dosis y forma de alimentación fue la más adecuada, de acuerdo a los trabajos adelantados.
- Oxitetraciclina: se utilizará la dosis y forma de administrar el alimento medicado, que presente mejores resultados.

Los alimentos medicados serán fabricados en plantas productoras de alimento de tipo comercial y para la adaptación de las dosis se utilizará un SFR de 1.2% (peso cuerpo).

Inicio del tratamiento y evaluación de la duración de las terapias: Los tratamientos serán iniciados en los siguientes momentos:

- Diagnóstico de presencia del patógeno mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), sin sintomatología clínica (4 o 5 días después del desafío)
- Diagnóstico por mortalidad (cuando se detecten las primeras mortalidades)
- Diagnóstico por mortalidad (3 días después de detectadas las primeras mortalidades)

A todos los grupos se les administrará las dosis señaladas de cada antibiótico y la duración de la terapia se irá evaluando por recuperación de signos clínicos, ausencia del patógenos mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para *Piscirickettsia salmonis* y % de mortalidad.

Grupos experimentales:

- Grupo 1: se le administrará oxitetraciclina y el tratamiento se iniciará solo por diagnóstico de presencia del patógeno mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).
- Grupo 2: se le administrará oxitetraciclina y el tratamiento se iniciará cuando se detecten las primeras mortalidades.
- Grupo 3: se le administrará oxitetraciclina y el tratamiento se iniciará 3 días después de detectadas las primeras mortalidades.
- Grupo 4: se le administrará florfenicol y el tratamiento se iniciará solo por diagnóstico de presencia del patógeno mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

- Grupo 5: se le administrará florfenicol y el tratamiento se iniciará cuando se detecten las primeras mortalidades.
- Grupo 6: se le administrará florfenicol y el tratamiento se iniciará 3 días después de detectadas las primeras mortalidades.

Mediante un análisis de varianzas (ANOVA) se determinará si existen diferencias en la duración de las terapias, en relación a la forma y momento de realizar el diagnóstico.

Objetivo 3.- Evaluación en condiciones de campo, de la efectividad (eficacia) clínica de los tratamientos con antibióticos administrados a través del alimento, frente a la piscirickettsiosis en diferentes especies salmonídeas

3.1 Selección de centros de cultivos

Para el estudio de seguimiento se seleccionarán a lo menos 9 centros de cultivos de empresas productoras de salmón, provenientes de la región de Los Lagos y/o Región de Aysén, que presenten cuadros clínicos de Piscirickettsiosis, y que hayan sido confirmados positivos por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFAT), o por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para *Piscirickettsia salmonis*. La selección considerará centros de cultivos con diferentes especies salmonídeas: Salmon del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

3.2.-Administración del alimento medicado

La dosis del antibiótico y la duración del tratamiento serán realizadas en base a la prescripción Médico Veterinaria emitida por los Médicos Veterinarios responsables del centro de cultivo. El alimento medicado será administrado de acuerdo a lo establecido en el centro de cultivo, considerando que la ración del día corresponda a una cantidad similar al alimento proyectado a consumir por cada jaula.

Con la finalidad de evidenciar el consumo de alimento medicado en cada jaula se realizará un seguimiento de cumplimiento del consumo medicado por día y jaula, durante el periodo de tratamiento.

Los alimentos medicados serán fabricados en plantas productoras de alimento de tipo comercial.

3. .3.- Plan de muestreo

Para el seguimiento clínico de los grupos tratados se considerará muestrear 5 peces dirigidos y 5 peces aleatorios por jaula. Si se considera el monitoreo de a lo menos 4 jaulas en cada centro se muestrearán 2 jaulas cabecera y 2 jaulas centrales.

Las jaulas seleccionadas serán muestreadas previo al inicio del tratamiento medicado y durante el tratamiento los días 1, 3, 6, 9, 12, desde iniciada la aplicación del antimicrobiano. En 2 de las jaulas monitoreadas, los peces serán capturados previo al inicio de la administración del alimento medicado del día, mientras que las otras 2 jaulas serán monitoreadas al término de la administración del alimento medicado del día. Se considera además realizar muestreos de seguimiento después de finalizada la terapia cada 7 días durante 4 semanas en el mismo grupo de jaulas.

El muestreo será realizado por Médicos Veterinarios certificadores de la condición de sanitaria. Entre las actividades a desarrollar se considerará recopilación de los antecedentes durante la aplicación de los tratamientos medicados, muestreos de peces, necropsia de peces y toma de muestras para análisis de laboratorio.

3.4.- Necropsia de peces

Con la finalidad de describir los signos clínicos macroscópicos observados en los grupos de peces aleatorios y dirigidos, los peces serán dispuestos en una superficie limpia para realizar la necropsia, según lo descrito por Thoesen (1994), Noga (2010) y Woo (2011).

*3.5.- PCR *Piscirickettsia salmonis**

Con la finalidad de detectar la presencia del patógeno en los grupos de peces aleatorios y dirigidos, se considerará toma de muestras de hígado y cerebro en etanol al 70%, para análisis individual por pez, mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para *Piscirickettsia salmonis*. Las muestras serán analizadas en el Laboratorio CIBA según lo descrito por Corbeil *et al.* (2003).

3.6.- Aislamiento de *Piscirickettsia salmonis* para estudios de sensibilidad

Se realizará el aislamiento de *Piscirickettsia salmonis* con el fin de realizar los estudios de sensibilidad frente al antibiótico con el cual se realizó la terapia.

Para el cultivo microbiológico se procederá a mantener un asa de platino en la llama de un mechero hasta que se haya puesto al rojo vivo. Posteriormente, el asa será enfriada en el agar e insertada en los órganos a sembrar. Los tejidos a sembrar serán hígado y riñón. La muestra será inoculada mediante el método de estrías sobre la superficie de una placa de Agar *Piscirickettsia salmonis* (APS), para su posterior incubación a 16 °C durante 7 a 12 días.

Las cepas serán enviadas al Laboratorio de Inocuidad Alimentaria (LIA) de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde se realizarán los estudios de sensibilidad. Se utilizará el método de Macro dilución en caldo y los puntos de corte definidos en la primera parte de este proyecto, para determinar si los aislados son sensibles o resistentes (Anexo B).

3.7.- Determinación de la concentración de antibiótico en el plasma

Para la obtención del plasma los peces serán anestesiados con benzocaína al 20% en un recipiente con agua de mar. Una vez que los peces se encuentren sedados, se tomará la cantidad suficiente de

sangre desde la vena caudal, la cual será depositada en tubos eppendorf y almacenados en hielo. Posteriormente, las muestras serán centrifugadas en terreno a 2500 rpm durante 2 minutos.

El plasma obtenido se mantendrá en cadena de frío hasta el envío a laboratorio FARMAVET, donde se cuantificarán las concentraciones de los antibióticos.

Las muestras de plasma de cada grupo experimental serán analizadas por LC/MS/MS. Los métodos analíticos para oxitetraciclina y florfenicol fueron previamente validados de acuerdo a las Normas ISO 17025 of.2005 y se adjunta en el anexo B.

Las concentraciones plasmáticas obtenidas se relacionarán con la CMI clínica de oxitetraciclina o florfenicol según corresponda

Con los resultados obtenidos se evaluará si los esquemas terapéuticos seleccionados por los Médicos Veterinarios logran mantener concentraciones terapéuticamente efectivas durante la duración de la terapia.

Objetivo 4. Identificar y evaluar en condiciones de campo las variables ambientales, climáticas y sanitario - productivas que determinan el esquema terapéutico instaurado por el Médico Veterinario

4.1. Caracterización de los esquemas terapéuticos utilizados en brotes de piscirickettsiosis

Se construirá un marco conceptual y se caracterizarán a través de estadística descriptiva los esquemas terapéuticos utilizados en los brotes de piscirickettsiosis los últimos tres años (2015-2017), en base a la información del sistema SIFA de SERNAPESCA (Sistema de Fiscalización de Acuicultura) y de los resultados obtenidos anteriormente por el laboratorio FARMAVET en el estudio “Diagnóstico sobre el consumo de antimicrobianos en los centros de cultivo de salmones a nivel nacional”.

Se considerará la definición de brote de acuerdo al Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-Piscirickettsiosis) de SERNAPESCA y los tratamientos entregados a través de alimento medicado, la información que se obtendrá de los brotes será a nivel de centro y contemplará las siguientes variables:

- Fecha del brote
- Número de brote en el ciclo
- Especie afectada
- Población susceptible
- Mortalidad acumulada total y por SRS
- Fecha de inicio del tratamiento
- Hora del tratamiento
- Duración del tratamiento

- Antimicrobiano utilizado y dosis
- Jaulas tratadas
- Peso promedio de las jaulas al momento del brote
- Peso promedio de ingreso de las jaulas afectadas
- Promedio de Cáligus y aplicación de caliguicidas.
- Bloom de algas
- Temperatura, oxígeno y salinidad.
- Otras condiciones ambientales (ej. puerto cerrado)
- Vacunación de los peces contra SRS

4.2. *Identificación de los principales esquemas terapéuticos y las variables que determinan las diferencias entre ellos.*

A través de la técnica de análisis multivariante, tal como componentes principales (ACP) y en base a la información del punto anterior, se identificarán los esquemas terapéuticos que mayormente utilizan los centros y las variables que en forma agrupada se relacionan con los diferentes tipos de esquemas existentes.

Se evaluarán las variables que explican los esquemas terapéuticos, mediante regresión logística, cuyo indicador de riesgo es el OR (Odds ratio), considerando un p valor $\geq 0,05$.

4.3. *Construcción y validación de un árbol decisional para los principales esquemas terapéuticos y las variables que los determinan*

Para cumplir este objetivo, se construirá un panel de expertos conformado por gerentes de salud y producción de centros de las principales empresas, médicos veterinarios y jefes de centro.

Se desarrollará el marco conceptual que sustentará la construcción de un árbol o modelo decisional para la elección de un esquema terapéutico, con las variables identificadas en el punto anterior. El modelo será validado con un panel de expertos a través de metodologías de epidemiología participativa. Estas herramientas dan la oportunidad de incorporar la experiencia de los Equipos de Salud que trabajan en acuicultura, tomando sus experiencias individuales, para generar una aproximación colectiva (Mariner y Paskin, 2000). Las herramientas que se utilizarán incluyen el uso de entrevistas semi-estructuradas, donde los equipos de salud (de forma individual) deberán responder frente a escenarios hipotéticos de brotes de SRS, generados en base a la información de 4.2. Los resultados individuales serán presentados al panel de expertos completo, para validar y generar consenso en base a los esquemas terapéuticos.

La información generada se caracterizará a través de estadística descriptiva.

4.4. Jerarquización de las variables que determinan la elección de un tipo de esquema terapéutico.

Las variables validadas serán jerarquizadas de acuerdo a su importancia a la hora de tomar la decisión de escoger un esquema terapéutico, en base a un proceso de análisis jerárquico (AHP). Esta metodología utilizada para la decisión multicriterio, permitirá comparar entre sí las variables para darles un peso o ponderación y realizar un análisis de sensibilidad, utilizando el software EXPERT CHOICE.

4.5. Seguimiento y evaluación de las variables que determinan el esquema terapéutico en brotes de piscirickettsiosis

Las variables validadas de ser las que determinan un esquema terapéutico, se seguirán en centros de cultivo, a través de un estudio de cohortes. La unidad de estudio será la jaula con tratamiento para piscirickettsiosis.

4.5.1. Selección de los centros

Se invitará a empresas a participar del estudio, las cuales deberán cumplir como requisito el aplicar en los brotes algunos de los esquemas terapéuticos identificados en el objetivo 3. Se considerarán las tres especies y centros ubicados en la región de Los Lagos y Región de Aysén, que presenten brotes de Piscirickettsiosis de acuerdo a la definición de SERNAESCA.

Se definirá el n muestral considerando el número de variables a estudiar. Los centros elegidos deberán pertenecer a una zona geográfica homogénea climáticamente en cada región contemplada en el estudio, cumpliendo el requisito de que difieran en el tipo de esquema terapéutico utilizado. Los centros se seguirán a partir de su primer brote de SRS.

Las variables que se estudiarán serán las listadas en el objetivo 4, más las variables que determinan la elección de un esquema terapéutico identificadas en el objetivo 5.

Se considerarán además los centros del objetivo 3. En estos centros se evaluará además la efectividad de los diferentes esquemas terapéuticos, ya que de ellos se obtendrán variables de salida relacionadas a la enfermedad.

4.5.2. Desarrollo de encuesta de seguimiento

Se construirá una encuesta para el seguimiento de las variables que determinan la elección de un esquema terapéutico e información relacionada al esquema terapéutico. Asimismo, se desarrollará la matriz para la creación de la base de datos.

4.5.3. Capacitación de los veterinarios en la encuesta de seguimiento

Se realizarán reuniones con los veterinarios de las empresas participantes para capacitarlos en el llenado de la encuesta de seguimiento y el envío de la información del brote.

4.5.4. Aplicación de la encuesta de seguimiento

Los centros participantes en el estudio al comenzar el tratamiento deberán enviar la encuesta completada a un correo electrónico que se les entregará. A continuación, enviarán semanalmente variables ambientales, climáticas y sanitario-productivas (variables de exposición) durante el periodo de tratamiento y hasta 4 semanas post tratamiento en un formato que se les entregará.

Se trabajará en conjunto con un equipo en terreno, el cuál visitará en forma aleatoria al menos al 10% de los centros para monitorear el adecuado levantamiento de información, así como atender consultas sobre el monitoreo.

4.5.1. Generación de la base de datos

Con la información levantada en los centros en brote se irá desarrollando una base de datos. Se limpiarán los datos y se completará la información faltante.

4.5.1. Evaluación de las variables

Se realizarán análisis univariados, para determinar las asociaciones estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre las variables de exposición y aquellas relacionadas a los esquemas terapéuticos, tales como dosis, duración de la terapia y las variables relacionadas a la enfermedad del objetivo 3 (variables de salida).

Las variables que muestren asociación con un $p < 0,25$, se mantendrán en consideración para el análisis multivariado (Hosmer y Lemeshow, 2000). Finalmente, se considerarán como parte del modelo multivariado, aquellas variables que muestren asociación con un $p < 0,05$. Este modelo permitirá establecer una hipótesis de causalidad, analizando en forma conjunta las diferentes variables de exposición y estableciendo sus pesos relativos.

Tanto para el análisis univariado como para el multivariado, se emplearán modelos de regresión, estos serán definidos de acuerdo al tipo de variable de salida, dentro de estos de regresión logística y de Poisson cuyas medidas de riesgo son el Odds ratio (OR) y el Incidence Rate Ratio (IRR), respectivamente.

Objetivo 5: Proponer recomendaciones prácticas para optimizar el uso de antibióticos contra Piscirickettsiosis.

En base a los resultados obtenidos se realizarán recomendaciones del o los esquemas terapéuticos que deberían aplicarse en los centros en base a los resultados del estudio, para su aplicación en el corto-mediano plazo a dos niveles: para las empresas, o sector privado, y para el sector oficial, o sector público. Asimismo, se efectuarán consideraciones del control de determinadas variables que pudieran determinar su éxito.

A través del desarrollo de dos talleres y un seminario internacional, se presentarán a representantes claves del sector público/privado, los resultados parciales del estudio con la finalidad de seguir sus recomendaciones a la hora del análisis de resultados finales. Los representantes claves del ámbito público serán funcionarios de SERNAPESCA central y regional y del ámbito privado profesionales de los centros del estudio y de la asociación de la industria del salmón.

RESULTADOS

OBJETIVO 1: IDENTIFICAR LAS DOSIS ÓPTIMAS DE OXITETRACICLINA PARA LAS DIFERENTES FORMAS DE ADMINISTRACIÓN DEL ALIMENTO MEDICADO A TRAVÉS DE LOS ÍNDICES PK/PD EN PECES CLÍNICAMENTE SANOS.

En este objetivo se plantea identificar la dosis óptima de oxitetraciclina frente a un tratamiento empírico de *P. salmonis*. El tratamiento empírico es aquel que se inicia antes de disponer de información completa y/o definitiva sobre la infección que se desea tratar (aislamiento e identificación de la bacteria causal) y es por tanto, un tratamiento de probabilidad. Para realizar un tratamiento empírico, se necesita que el Médico Veterinario (a), realice un adecuado diagnóstico clínico.

Mediante la simulación de Montecarlo se analizó para cada dosis el índice de Eficacia ABC/CMI. Para determinar la dosis más adecuada en un tratamiento empírico con oxitetraciclina, la CMI seleccionada fue $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, correspondiente a una dilución más alta al *Punto de Corte Epidemiológico (ECOFF)* descrito en la literatura para oxitetraciclina frente a *P. salmonis*

En el proyecto denominado “Establecimiento de las bases para el buen uso de antibióticos en la salmonicultura”, financiado por el Fondo de Inversión Estratégica (FIE)- SERNAPESCA (2017), nuestro grupo de trabajo evaluó la sensibilidad en 84 aislados de *P. salmonis* frente a oxitetraciclina. Los valores de las CMI fueron de 0.06 – 0.125 – 0.25 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y el *Punto de Corte Epidemiológico (ECOFF)* de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Resultados similares fueron señalados por Contreras- Lynch y col. (2017) quienes describen valores de CMI de 0.064 – 0.125 – 0.25 – 0.5 y un *ECOFF* de 1 $\mu\text{g/mL}$.

De acuerdo a lo señalado se analizaron dos aspectos:

1. *La dosis más adecuada de oxitetraciclina administrada vía oral a través del alimento para un tratamiento empírico*
2. *Si las pautas horarias y formas de administrar el alimento medicado influyen en los índices PK/PD de oxitetraciclina*

Emplazamiento del estudio.

La fase experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación y Transferencia Acuícola (CITA), perteneciente a empresa Aquainnovo S.A., ubicado a 33 km de Puerto Montt, Carretera Austral sector Lenca, Chile.

Producto Veterinario: oxitetraciclina en polvo al 80%)

Animales de estudio.

Los estudios se realizaron en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con peso promedio general de 978 gramos al iniciar la aclimatación. No obstante, se dispuso de peces adicionales para apuntar a un

coeficiente de variación menor o igual al 15 % al administrar el tratamiento. Los peces fueron obtenidos de un stock que mantiene el centro experimental, con origen en el centro Aguas Buenas perteneciente a la empresa Aguas Claras, Lote S15AQ (E) 2IPSCAB.

Condición sanitaria de animales de estudio.

Antes de iniciar el estudio, la condición sanitaria de los animales fue aprobada por el Médico Veterinario responsable a través de la inspección visual de los ejemplares e historial sanitario del grupo. Además, se analizaron ejemplares mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa (RT-PCR) para la detección de para virus IPN, SRS y BKD. Finalmente, se realizaron análisis para descartar la presencia del fármaco en el plasma y músculo/piel previo al inicio de la administración del tratamiento.

Criterio de inclusión de animales de estudio.

El criterio de inclusión correspondió animales que cumplieran con un peso promedio de 900 gramos al iniciar la aclimatación, clínicamente sanos y que no hayan recibido tratamiento farmacológico o químico de ningún tipo, a lo menos 90 días antes del inicio de la prueba, que pudieran interferir posteriormente con el análisis del principio activo en las muestras de plasma. El Médico Veterinario de la estación, emitió una constancia de ello.

Criterio de exclusión de animales.

Se excluyeron de este estudio, animales que mostraban signos de enfermedad, incluyendo anorexia, letargia y nado errático, también los peces que presentaban hongos en su superficie corporal o en aletas, lesiones de piel, deformidades, ausencia ocular, aletas roídas, entre otras, o cualquier alteración que, a juicio del Médico Veterinario responsable, pudiera comprometer los resultados del estudio. Ante algún evento de exclusión y/o muerte antes de iniciado el ensayo, el animal fue reemplazado por alguno que cumpliera las mismas características requeridas en este.

Distribución y alojamiento de animales de estudio.

Se realizó un muestreo exploratorio para seleccionar y establecer el peso promedio de la población de peces destinados al ensayo. Al momento del muestreo, los peces fueron distribuidos en estanques de 1 m³, donde permanecieron por al menos 7 días en aclimatación, en sistema de recirculación y agua de mar. En la mantención se tuvo una tasa de recambio de agua de 1.0 a 1.5/hora, temperatura de 13°C (\pm 0.5°C), niveles de oxígeno disuelto en el agua en rango de 80-120% saturación, salinidad de (30 a 33 ppt) y los valores de pH (entre 7.3 y 8.0). Finalmente, la densidad no superó los 30 kg/m³ de biomasa al iniciar aclimatación. Durante toda la etapa de evaluación se midieron parámetros ambientales como salinidad [ppt], pH, temperatura y oxígeno (% saturación), de acuerdo a la rutina del centro experimental (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros ambientales durante el estudio.

ETAPA	CONDICIÓN DE CULTIVO
Etapa aclimatación	<p>Rango temperatura: 13+0,5 °C pH: 7,3 - 8 Salinidad: ± 30-33 ppt Oxígeno: 80 - 120% saturación Fotoperiodo: 12 O: 12 L Recambio de agua: 1-1,5 R/hora. Filtro UV: si Tipo Agua: Mar</p>
<p>Etapa experimental 1 y 2</p> <p>1: determinación de dosis</p> <p>2: Pauta horaria y forma de administrar el alimento medicado</p>	<p>Rango temperatura: 13+0,5 °C pH: 7,3 - 8 Salinidad: ± 30-33 ppt Oxígeno: 80 - 120% saturación Fotoperiodo: 12 O: 12 L Recambio de agua: 1-1,5 R/hora. Filtro UV: si Tipo Agua: Mar</p>

Alimentación.

Durante el período de aclimatación, los peces fueron alimentados con una dieta comercial (libre de medicación) para salmónidos, en calibre de pellet de 4 mm y a una tasa de 1.0 % PC / día. El alimento durante esta etapa fue suministrado de forma automática, entregando el 70% de la ración durante la mañana y el 30% en la tarde.

El alimento medicado necesario para llevar a cabo el estudio, fue producido por una planta de alimento bajo el mismo estándar o proceso utilizado en la fabricación del medicado utilizado por centros productivos. Se tomaron muestras que fueron derivadas al laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, para determinar la concentración lograda, la cual debió presentar como máximo un 10 % de variación en relación al nivel intentado (100 mg/Kg y 70 mg/kg). Las condiciones de la alimentación para cada etapa del ensayo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de alimentación según etapa de ensayo.

ETAPA	ALIMENTACIÓN
Etapa aclimatación	<p>Tasa Alimentación: 1% SFR mínimo.</p> <p>Recuperación de alimento: AM-PM.</p> <p>Tipo de alimentación: 70%AM - 30%PM automático.</p> <p>Alimento: Comercial sin medicar.</p> <p>Calibre: 4 mm.</p>
<p>Etapa experimental 1 y 2</p> <p>1: determinación de dosis</p> <p>2: Pauta horaria y forma de administrar el alimento medicado</p>	<p>Tasa Alimentación: 1% SFR.</p> <p>Recuperación de alimento: Al término de entrega de alimento.</p> <p>Tipo de alimentación:</p> <ul style="list-style-type: none"> • En el caso de pauta en micro-rationes alimentación continua entre las 9:00 y 16:00 hrs • En el caso de dos raciones 50% a.m.-50% p.m. • En el caso de 1 ración se entregó sólo a.m. <p>Alimento: Medicado oxitetraciclina 100% mg/kg. Medicado oxitetraciclina 75 mg/kg</p> <p>Calibre: 4 mm.</p>

Aplicación de tratamiento medicado.

Para ambas etapas experimentales, el alimento se entregó en forma automática, en base al consumo real que tuvieron los peces durante la etapa de aclimatación (1.0% SFR) y fue ajustado diariamente según crecimiento de los ejemplares. Durante la etapa de aclimatación y periodo de suministro de tratamiento oral, el alimento no consumido húmedo de cada estanque fue recolectado y aplicado un factor de corrección del alimento que permitió determinar el consumo real de alimento/día/estanque.

Para definir la dosis más adecuada para un tratamiento empírico, el alimento medicado se administró e micro-rationes

Mortalidad.

De existir mortalidad en cualquiera de las etapas del estudio, esta debió ser informada de inmediato por el monitor del estudio, explicando la causa de estas.

Plan de Muestreo.

Se realizó la toma de muestra de sangre mediante venipuntura caudal, utilizando jeringas de 5- 10 ml en los tiempos de muestreos señalados en la Tabla 3. Las muestras recolectadas fueron depositadas en tubos vacutainer (6 mL) con EDTA (tapa color lila), debidamente rotulados, con la fecha, tiempo de muestreo, N° de estanque, N° de pez y tipo de medicación (pauta horaria). Posterior a depositar la sangre en el tubo, este fue agitado suavemente para asegurar el contacto con el anticoagulante. Luego los tubos fueron centrifugados a 4500 rpm x 10 minutos para la obtención de plasma. El plasma fue separado y recolectado en microtubos de 2 mL marca Eppendorf® (muestra y contra muestra), previamente rotulados con el tiempo de muestreo, N° de pez, grupo, estanque y fecha de obtención de la muestra, verificando con la información del tubo vacutainer de origen.

El plasma se mantuvo congelado a -20 °C a la espera del envío programado al laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, Santiago.

Tabla 3.- Tiempos de muestreo y número de animales para cada estudio

Tiempo muestreo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Horas post tratamiento (h)	0	1	3	6	8	12	18	24	36	48
Nº animales/tiempo de muestreo	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pesaje final.

Inmediatamente después de la toma de muestras de sangre, se realizó el pesaje de cada pez, el cual fue registrado indicando el grupo, estanque y tiempo de muestreo. En el caso de los ejemplares sacrificados durante las primeras 12 horas de muestreo, adicionalmente se verificó el contenido de pellets en estómago.

Destino de los peces de estudio.

Una vez realizada la toma de muestras, los peces y sus restos fueron eliminados mediante el sistema de ensilaje que posee las instalaciones de ATC Patagonia.

Envío y transporte de muestras.

Finalizado el estudio, las muestras debidamente rotuladas, fueron separadas por tiempo de muestreo y depositadas en cajas rotuladas indicando el tiempo de muestreo, estanque y tipo de tratamiento (pauta horaria). Estas fueron enviadas desde ATC Patagonia, al Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile Santiago., bajo condiciones que permitan mantener la cadena de frío del total de las muestras. Se utilizaron recipientes isotérmicos, cerrados y mantenidos con gel-packs para evitar la pérdida de la temperatura de congelación durante el transporte. El despacho fue programado para el día lunes posterior al término de cada de tratamiento.

Buenas prácticas clínicas (BPC).

La metodología descrita en el presente protocolo, se rige bajo el marco de la directriz VICH GL9 de Buenas Prácticas Clínicas (VICH GL9, 2000), aplicando los principales procedimientos y prácticas mencionadas en la guía.

Determinación de las concentraciones plasmáticas en cada grupo experimental.

Las muestras de plasma de cada grupo experimental fueron analizadas por LC/MS/MS en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Universidad de Chile. El método analítico fue previamente validado considerando la suma oxitetraciclina y sus epímeros.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

1. Para cada tiempo de muestreo se calculó el promedio y desviación estándar de las concentraciones plasmáticas utilizando el software Prism v. 6.01 (GraphPad Software Inc., Londres, Reino Unido). Con los resultados de cada grupo experimental, se realizaron curvas de concentración plasmáticas ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en función del tiempo
2. Mediante un análisis de varianza (ANDEVA), se determinó si existen diferencias estadísticamente significativas entre:
 - a. Las curvas obtenidas a una dosis de 75mg/kg y 100mg/kg de oxitetraciclina
 - b. Las curvas obtenidas entre las diferentes pautas horarias y formas de administrar el alimento medicado
3. Para definir los parámetros farmacocinéticos ABC y Cmax se utilizó el software Phoenix WinNonlin (Versión 8.0; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA)
4. Para definir el índice de eficacia ABC/CMI para cada dosis, se consideraron diferentes valores de CMI
5. Para definir la dosis más adecuada de un tratamiento empírico se utilizó la simulación de Montecarlo, utilizando para el ajuste de las distribuciones de probabilidades y el número de iteraciones el software @ RISK Simulator, real Options Valuation, Inc. 2005-2012, contemplándose 10.0000 iteraciones
6. La dosis más adecuada de acuerdo a la simulación de Montecarlo, es aquella que tiene una probabilidad de éxito terapéutico (PTA) $\geq 90\%$ considerando un punto de corte clínico de una CMI $\leq 1\mu\text{g}/\text{mL}$.

RESULTADOS

1.- Determinación de la dosis más adecuada de oxitetraciclina administrada vía oral a través del alimento frente a un tratamiento empírico.

Al analizar las concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en función del tiempo, se pudo observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las dosis 75 y 100 mg kg/p.v. ($p>0.05$). (Tabla 4; Fig.1). Estos resultados son coincidentes con otras investigaciones que señalan que el aumentar la dosis de oxitetraciclina no aumenta la biodisponibilidad de este antibiótico (Cravedi y col., 1987; Abedini y col., 1998; Benavente. 2013).

En ambos tratamientos a partir de las 12 horas se logran concentraciones sobre 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a las 24 horas concentraciones máximas de 0.61 ± 0.24 y 0.66 ± 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas concentraciones plasmáticas son semejantes a las descritas por Benavente (2013).

Tabla 4: Concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) administrada en dosis diferentes (75 y 100 mg/kg

Tiempo muestreo (h)	Ensayo	
	Dosis 100 mg/Kg ($\bar{x} \pm \text{d.e. } \mu\text{g}/\text{mL}$)	Dosis 75 mg/K ($\bar{x} \pm \text{d.e. } \mu\text{g}/\text{mL}$)
0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
1	0.00 \pm 0.00	0.04 \pm 0.05
3	0.06 \pm 0.06	0.13 \pm 0.10
6	0.13 \pm 0.06	0.25 \pm 0.11
8	0.21 \pm 0.13	0.28 \pm 0.10
12	0.28 \pm 0.10	0.41 \pm 0.24
18	0.55 \pm 0.12	0.52 \pm 0.28
24	0.61 \pm 0.24	0.66 \pm 0.24
36	0.29 \pm 0.15	0.35 \pm 0.14
48	0.14 \pm 0.13	0.17 \pm 0.10

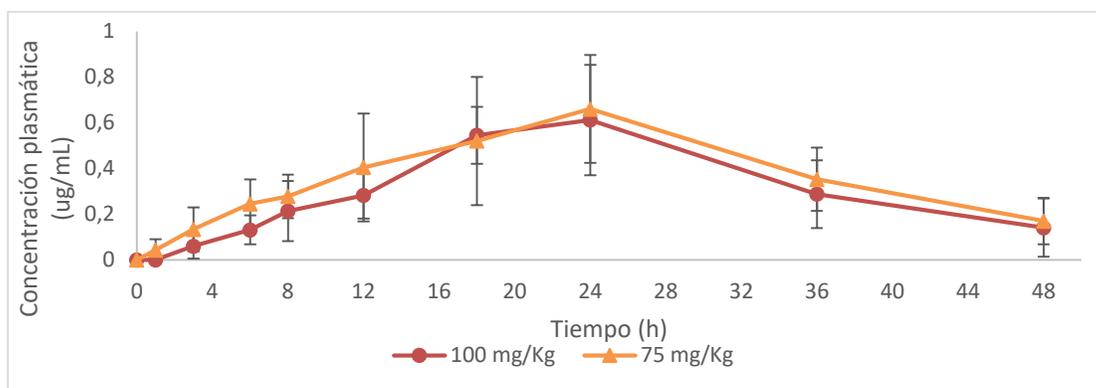


Figura 1: Curva de concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina en función del tiempo para las dosis de 100 mg/Kg y 75 mg/Kg.

Al analizar los resultados de la simulación de Montecarlo, se puede observar que en un tratamiento empírico de oxitetraciclina a una dosis de 75 o 100 mg/kg p.v, la probabilidad de éxito clínico es cercana al 50% considerando un punto de corte clínico de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En brotes cuyos aislados presenten una CMI de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la probabilidad disminuye a un 5%. Por el contrario, en brotes cuyos aislados tengan un CMI $\leq 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$, la probabilidad de éxito sería \geq al 90% (Tabla 5)

Tabla 5: Modelo de Montecarlo: evaluación del índice de eficacia AUC/MIC a diferentes dosis de oxitetraciclina

Dosis (mg/Kg)	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	AUC/MIC ($\bar{x} \pm \text{d. e.}$)	AUC/MIC > 15 p(x) (%)
75	0,06	276.68 \pm 100.29	100,00
	0,125	132.81 \pm 48.14	100,00
	0,25	66.40 \pm 24.07	99,96
	0,5	33.20 \pm 12.03	94,56
	1	16.60 \pm 6.02	52,68
	2	8.30 \pm 3.0	5,96
100	0,06	255.04 \pm 53.14	100,00
	0,125	122.41 \pm 25.50	100,00
	0,25	61.20 \pm 12.75	100,00
	0,5	30.60 \pm 6.37	99,96
	1	15.30 \pm 3.18	50,60
	2	7.65 \pm 1.59	0,04

Estos resultados nos están señalando que los centros de cultivo deberían tener una vigilancia permanente de la sensibilidad de *P. salmonis* frente a oxitetracilcina, ya que una terapia con alimento medicado con este antibiótico, debería realizarse solo frente a brotes cuyos aislados presenten una CMI $\leq 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$.

2.- Efecto de las pautas horarias y formas de administrar el alimento medicado sobre los índices PK/PD de oxitetraciclina

Al analizar las concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de oxitetraciclina en las diferentes formas y pautas horarias de administrar el alimento medicado, se pudo observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en función del tiempo (Fig.2).

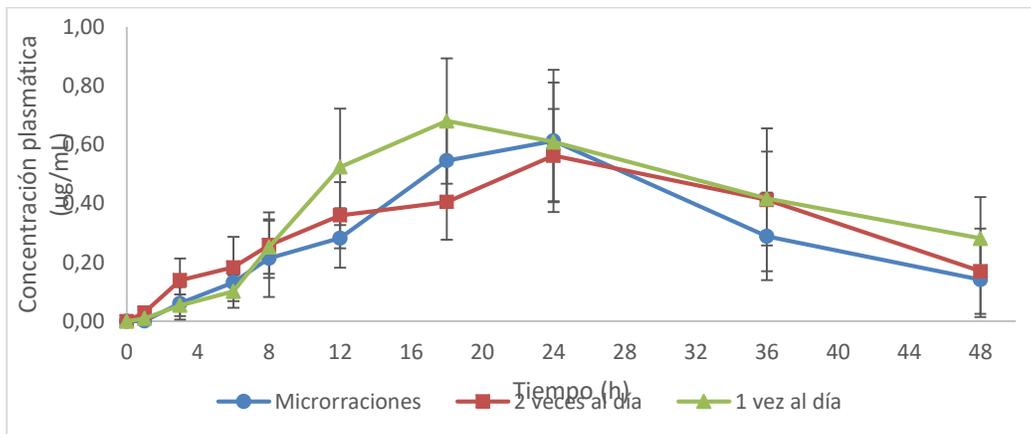


Figura 2: Concentraciones plasmáticas de oxitetraciclina administrada en diferentes formas y pautas horarias de alimentación.

Al analizar el Índice de eficacia ABC/CMI (PK/PD) de las diferentes formas y pautas de administrar oxitetraciclina vehiculizado en el alimento, mediante la simulación de Montecarlo (Tabla 6), se puede observar que la forma de administrar el alimento no afecta la biodisponibilidad de oxitetraciclina.

Tabla 6: Modelo de Montecarlo: evaluación del índice de eficacia AUC/CMI de diferentes formas y pautas horarias de administración de oxitetraciclina

Forma administración	CMI (mg/mL)	AUC/CMI ($\bar{x} \pm d.e$)	AUC/CMI > 15 p(x) (%)
1 vez al día	0,06	299.54±74.33	99,68
	0,125	143.78±35.68	99,52
	0,25	71.89±17.84	99,28
	0,5	35.94±8.92	97,32
	1	17.97±4.45	79,64
	2	8.98±2.22	0,00
2 veces al día	0,06	239.37±43.24	100,00
	0,125	114.89±20.76	100,00
	0,25	57.45±10.38	99,92
	0,5	28.72±5.19	98,48
	1	14.36±2.59	42,88
	2	7.18±1.29	0,08
Microrraciones	0,06	255.01±53.14	100,00
	0,125	122.41±25.51	100,00
	0,25	61.20±12.75	100,00
	0,5	30.60±6.38	99,96
	1	15.30±3.18	51,36
	2	7.65±1.59	0,00

AUC: Área bajo la curva.

CONCLUSIONES

1. El aumento de la dosis de oxitetraciclina administrada a través del alimento, no mejora la biodisponibilidad debido a que es un antibiótico tiempo dependiente.
2. Independiente de la dosis, la administración de oxitetraciclina vía alimento tiene una baja absorción a nivel intestinal, lográndose concentraciones plasmáticas muy cercanas al punto de corte epidemiológico y al punto de corte clínico
3. Las terapias con oxitetraciclina a través del alimento deberían realizarse solo frente a brotes cuyos aislados de *P.salmonis* tengan una $CMI \leq 0,5$ ug/ml
4. La forma y pauta horaria de administración del alimento medicado con oxitetraciclina, no afecta la biodisponibilidad de este antibiótico.

Recomendaciones

1. Deberían realizarse estudios que mejoren la biodisponibilidad de oxitetraciclina administrada a través del alimento. Al respecto, está demostrado que la absorción de la oxitetraciclina se ve disminuida si se da conjuntamente con alimentos ricos en cationes divalentes y trivalentes, sobre todo calcio, hierro, magnesio y cobre.
2. Los centros de cultivo deberían realizar una vigilancia permanente de la sensibilidad de *P. salmonis* frente a oxitetraciclina, ya que la probabilidad de éxito terapéutico a las dosis recomendadas, se ve disminuida cuando estos aislados presentan valores de CMI \geq a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
3. Considerando que en la actualidad existen solo dos antibióticos autorizados para el tratamiento de *P. salmonis* y la baja biodisponibilidad de oxitetraciclina administrada a través del alimento, debería fomentarse el uso de este antibiótico vía parenteral (inyectable).

OBJETIVO 2: IDENTIFICAR LOS ESQUEMAS TERAPÉUTICOS MÁS ADECUADOS DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL EN PECES DESAFIADOS CON *P. SALMONIS* EN CONDICIONES CONTROLADAS, EVALUANDO LA EFICACIA CLÍNICA A TRAVÉS DEL DIAGNÓSTICO POR PCR; % DE MORTALIDAD Y SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA.

En este objetivo se analizaron tres aspectos:

1. Determinar la dosis más adecuada de florfenicol frente a un tratamiento empírico de *P. salmonis*. (Este punto aun cuando no había sido considerado en el proyecto, fu necesario realizarlo).
2. Determinar el esquema terapéutico más adecuado de florfenicol en peces desafiados con *P. salmonis* en condiciones controladas.
3. Determinar el esquema terapéutico más adecuado de oxitetraciclina en peces desafiados con *P. salmonis* en condiciones controladas.

1.- Determinación de la dosis más adecuada de florfenicol

Se identificó la dosis óptima de florfenicol frente a un tratamiento empírico de *P. salmonis*. El tratamiento empírico es aquel que se inicia antes de disponer de información completa y/o definitiva sobre la infección que se desea tratar (aislamiento e identificación de la bacteria causal) y es, por tanto, un tratamiento de probabilidad. Se realiza después de un adecuado diagnóstico clínico.

Mediante la simulación de Montecarlo se analizó para cada dosis el índice de Eficacia ABC/CMI. Para determinar la dosis más adecuada en un tratamiento empírico con florfenicol, la CMI seleccionada fue $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$, correspondiente a una dilución más alta al *Punto de Corte Epidemiológico (ECOFF)* descrito en la literatura para oxitetraciclina frente a *P. salmonis*.

Animales

Para cada ensayo, se utilizaron 120 salmones del Atlántico (*Salmo salar*) con un peso promedio de 700-800 gramos al iniciar la aclimatación, no obstante, se dispuso de peces adicionales (n=30) para lograr un coeficiente de variación menor o igual al 10% al administrar el tratamiento. Los peces fueron examinados por un Médico Veterinario y se corroboró su condición sanitaria mediante RT-PCR para virus IPN, *Piscirickettsia salmonis* (SRS), *Renibacterium salmoninarum* (BKD) y *Vibrio ordalii*. Los peces no habían recibido tratamiento farmacológico ni químico de ningún tipo, por al menos 90 días antes del inicio del estudio. Se excluyeron peces que presentaran signos de enfermedad (letargia, anorexia, nado errático, lesiones, hongos, deformidades, entre otros).

Alimento medicado

Se utilizó FF en tres dosis: 10, 15 y 20 mg/Kg de peso vivo, administrado vía oral a través de alimento medicado. El alimento fue producido en una planta de alimento comercial, bajo el mismo estándar utilizado en la fabricación del medicado destinado a centros productivos. La formulación fue 5 Kg de FF (FF 50%) por tonelada de alimento y de calibre de 6 mm. El alimento formulado fue derivado al Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile para corroborar la concentración de FF.

Diseño experimental en salmones

La fase experimental se llevó a cabo en la empresa Aquainnovo S.A., Puerto Montt, Chile. Para cada ensayo se utilizaron 150 ejemplares de *Salmo salar*, los cuales fueron distribuidos y mantenidos en 10 estanques de 1 m³, para una aclimatación mínimo de 8 días en agua de mar con sistema de recirculación, donde recibieron una dieta comercial para salmónidos (libre de medicación), a una tasa del 1.0 a 1.4% peso cuerpo (PC), del 0.6 a 0.8% PC y de 0.4 a 0.6% PC para las dosis de 20, 15 y 10 mg/Kg respectivamente, mediante microrraciones entre las 9:00 y las 16.00 horas. Los estanques se conformaron con 15 ejemplares en cada uno, con peso promedio inicial en un rango de 700 a 800 gramos y un coeficiente de variación igual o menor al 10%.

Al término del periodo de aclimatación se administró el fármaco por vía oral, mediante alimento comercial con el medicamento, en las dosis descritas. La administración fue mediante microrraciones entre las 9:00 y 16:00 horas a razón de 0.8% SFR y por un día de alimentación. La ración de alimentación fue de 100% de alimento medicado, sin suplementación con alimento sin medicación.

Una vez iniciado el tratamiento, se sacrificaron aleatoriamente 12 peces por grupo de tratamiento (mediante golpe en la cabeza, sin anestesia), para la obtención de muestras de sangre (6 mL/pez) a las 0, 1, 3, 6, 8, 12, 18, 24, 36 y 48 horas desde iniciada la alimentación (Figura 1). Para la obtención de plasma, todas las muestras se depositaron en tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA) y luego centrifugadas por 10 minutos a 4500 rpm, donde finalmente se obtuvieron 3 mL de plasma, separados en dos tubos de microcentrifuga con tapa (Eppendorf®) como muestra y contramuestra. Las muestras fueron congeladas a -20 °C y posteriormente derivadas al laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, Santiago, para su análisis. La metodología utilizada se rige bajo el marco de la directriz VICH GL9 de *Good Clinical Practices* (CVMP, 2016).

Determinación de florfenicol + florfenicol amina

Las muestras de plasma de cada grupo experimental fueron analizadas por LC/MS/MS en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Universidad de Chile. El método analítico fue previamente validado considerando la suma oxitetraciclina y sus epímeros.

Análisis de los resultados:

1. Para cada tiempo de muestreo se calculó el promedio y desviación estándar de las concentraciones plasmáticas de florfenicol + florfenicol amina, utilizando el software Prism v. 6.01 (GraphPad Software Inc., Londres, Reino Unido). Con los resultados de cada grupo experimental, se realizaron curvas de concentración plasmáticas ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en función del tiempo
2. Mediante un análisis de varianza (ANDEVA), se determinó si existen diferencias estadísticamente significativas entre las curvas obtenidas a una dosis de 10, 15 y 20 mg/kg p.v.
3. Para definir los parámetros farmacocinéticos ABC y Cmax se utilizó el software Phoenix WinNonlin (Versión 8.0; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).
4. Para definir el índice de eficacia ABC/CMI para cada dosis, se consideraron diferentes valores de CMI.
5. Para definir la dosis más adecuada de un tratamiento empírico se utilizó la simulación de Montecarlo, utilizando para el ajuste de las distribuciones de probabilidades y el número de iteraciones el software @ RISK Simulator, real Options Valuation, Inc. 2005-2012, contemplándose 10.0000 iteraciones.
6. La dosis más adecuada de acuerdo a la simulación de Montecarlo, es aquella que tiene una probabilidad de éxito terapéutico (PTA) $\geq 90\%$ considerando un punto de corte clínico de una CMI $\leq 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$.

RESULTADOS

En la Tabla N°1 se puede observar las concentraciones plasmáticas de florfenicol + florfenicolamina ($\mu\text{g/mL}$) en función del tiempo para cada dosis ensayada (10, 15 y 20 mg/Kg p.v.).

Al analizar el comportamiento de la concentración plasmática, podemos observar que en los tres grupos la C_{max} se alcanza a las 12 horas post tratamiento, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre las C_{max} alcanzadas a las dosis de 10 y 15 mg/kg p.v. Por el contrario, la C_{max} alcanzada a una dosis de 20 mg/Kg p.v. es significativamente mayor ($18 \pm 3 \mu\text{g/mL}$), manteniéndose hasta las 24 horas post- tratamiento (Figura N°1).

Tabla N°1: Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/mL}$) promedio y su desviación estándar, según tiempos de muestreo.

Tiempo muestreo (h)	Ensayo		
	10 mg/Kg ($\bar{x} \pm \text{d.e. } \mu\text{g/mL}$)	15 mg/Kg ($\bar{x} \pm \text{d.e. } \mu\text{g/mL}$)	20 mg/Kg ($\bar{x} \pm \text{d.e. } \mu\text{g/mL}$)
0	0 \pm 0.00	0.05 \pm 0.16	0 \pm 0.00
1	0.05 \pm 0.06	0.57 \pm 0.94	0.17 \pm 0.29
3	1.39 \pm 1.3	4.65 \pm 1.77	1.64 \pm 1.05
6	2.86 \pm 1.41	6.66 \pm 2.43	8.7 \pm 1.56
8	5.4 \pm 2.73	10.05 \pm 2.72	6.99 \pm 1.05
12	8.96 \pm 5.16	10.28 \pm 4.59	18.31 \pm 3.38
16	6.87 \pm 3.57	4.62 \pm 2.18	17.92 \pm 2.59
24	3.37 \pm 2.51	4.93 \pm 4.45	17.53 \pm 1.88
36	1.69 \pm 1.50	1.64 \pm 0.966	10.71 \pm 1.05
48	0.77 \pm 0.30	0.62 \pm 0.47	0.01 \pm 0.02

\bar{x} : Promedio; d.e.: Desviación estándar.

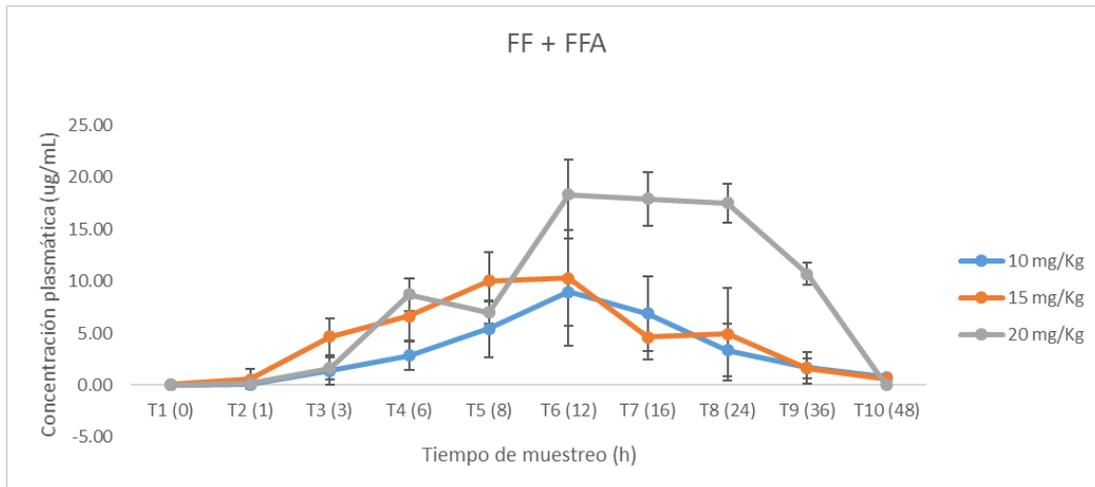


Figura N°1: Concentraciones plasmáticas promedio ($\mu\text{g}/\text{mL}$), de acuerdo a tiempo de muestreo (horas) según ensayo: a) Dosis 10 mg/mL, b) Dosis 15 mg/ML, c) Dosis 20 mg/mL y d) Comparación de dosis de FF.

Al analizar los Índices de eficacia ABC/CMI mediante el Modelo de Montecarlo (Tabla N°2), podemos observar que a una dosis de 15 mg/kg p.v. existe un 89.58% de probabilidad de éxito terapéutico considerando una CMI clínica (o farmacológica) de 1 mg/mL. Esta probabilidad sube a un 100% a una dosis de 20mg/kg p.v.

También podemos señalar que a una dosis de 20 mg/Kg p.v. de florfenicol, el Punto de Corte Clínico frente a *P. salmonis* es de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla N°2). Aislados con CMI $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ deberían considerarse resistentes.

Tabla N°2: Modelo de Montecarlo: evaluación del índice de eficacia AUC/CMI de diferentes dosis de florfenicol.

Dosis (mg/Kg)	CMI (mg/mL)	AUC _{0-24h} /CMI (promedio±DE)	AUC/CMI p(x) (%)
10	0.06	2331±738	99.70
	0.125	1119±354	99.09
	0.25	559±177	97.92
	1	139±44	67.57
	2	70±22	0.00
	4	35±11	0.00
15	0.06	2805±563	99.94
	0.125	1346±270	99.87
	0.25	673±135	99.68
	1	168±33	89.58
	2	84±17	0.00
	4	42±8	0.00
20	0.06	8580±823	100.00
	0.125	4118±395	100.00
	0.25	616±115	100.00
	1	514±49	100.00
	2	257±24	99.99
	4	128±12	68.30

AUC: Área bajo la curva.

CONCLUSIONES

1. En un tratamiento empírico con florfenicol frente a *P. salmonis*, la dosis más adecuada vía oral está en rangos de 15 y 20 mg/kg p.v.
2. El éxito de una terapia con florfenicol es dependiente de las concentraciones plasmáticas alcanzadas a una dosis determinada.
3. En un brote de Piscirickettsiosis, cuyos aislados tengan un valor de la CMI \geq a 4 $\mu\text{g/mL}$, no debería realizarse terapia con florfenicol.

RECOMENDACIONES

Los centros de cultivo deberían realizar una vigilancia permanente de la sensibilidad de *P. salmonis* frente a florfenicol, ya que la probabilidad de éxito terapéutico se ve disminuida cuando estos aislados presentan valores de CMI \geq a 4 $\mu\text{g/mL}$.

2.- Determinación del esquema terapéutico más adecuado de florfenicol en peces desafiados con *P. salmonis* en condiciones controladas

El bioensayo se realizó en las instalaciones de AQUAINNOVO y los detalles del diseño experimental y de los resultados se adjuntan en Anexos Objetivo 2: Anexo 1.

Se evaluaron dos estrategias de administración de florfenicol:

1. **Tratamiento temprano:** Peces con diagnóstico positivo a *P. salmonis* (mediante la técnica de RT-PCR), sin hallazgos de lesiones externas o internas atribuibles al patógeno y sin mortalidad.
2. **Tratamiento tardío:** Peces con diagnóstico positivo a *P. salmonis* (mediante la técnica de RT-PCR), con signos clínicos, disminución de apetencia y con inicio de mortalidad .

El tratamiento temprano comenzó el día 6 post-desafío con un 100% de prevalencia (PCR positivos). El tratamiento tardío comenzó el día 14 post-desafío, con la primera mortalidad observada.

Para ambos grupos se utilizó florfenicol al 50%, polvo oral correspondiente a un producto comercial utilizado habitualmente en la fabricación de alimento medicado para centros de cultivo.

Dosis utilizada: 20 mg/kg p.v.

Duración de la terapia: 15 días consecutivos de alimento medicado a razón de 1.25% de peso vivo (SFR), mediante alimentación automática y micro-rationes entre las 9:00 am y 15:00

Parámetros a evaluar: consumo de alimento, mortalidad diaria y acumulada, diagnóstico de la mortalidad. Estos parámetros fueron evaluados antes de iniciado el tratamiento, durante el tratamiento y hasta dos semanas de finalizado el tratamiento

Grupos experimentales:

- Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano.
- Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío.
- Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico (Control positivo).
- Grupo de peces no desafiados (Control negativo).

Cada grupo se hizo en duplicado y las evaluaciones se realizaron hasta dos semanas después de finalizado el tratamiento.

RESULTADOS

1.- Consumo de alimento medicado

1.1.- *Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano:* El consumo de alimento fue relativamente constante. Los peces mantuvieron un consumo promedio de 1.15% SFR durante los 15 días de tratamiento. La pérdida del medicado (no consumido), fue equivalente a un 8% respecto al calculado (1.25%) Posterior al tratamiento los peces registraron un aumento del consumo de alimento alcanzando un SFR de 1.42 a 1.48%. (Figura N°2).

1.2.- *Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío:* Los peces tuvieron un consumo de alimento muy por debajo del SFR establecido (1.25%) al igual que el grupo control positivo sin tratamiento con antibiótico (especialmente los primeros días de tratamiento). La pérdida total del alimento medicado fue del 28% al final del tratamiento (Figura N°3).

1.3.- *Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico (Control positivo):* registró un comportamiento similar al grupo con tratamiento tardío, con una baja en el consumo de alimento a partir del inicio de la mortalidad y durante el brote. Posteriormente se observó un aumento en el consumo con un SFR de 1.0 al 1.5% que fue coincidente con la estabilización de la mortalidad (Figura N°4).

1.4.- *Grupo de peces no desafiados (Control negativo):* mantuvo un consumo constante de alimentación a excepción de los primeros días del estudio con un consumo promedio de 1.36% SFR (Figura N°5).

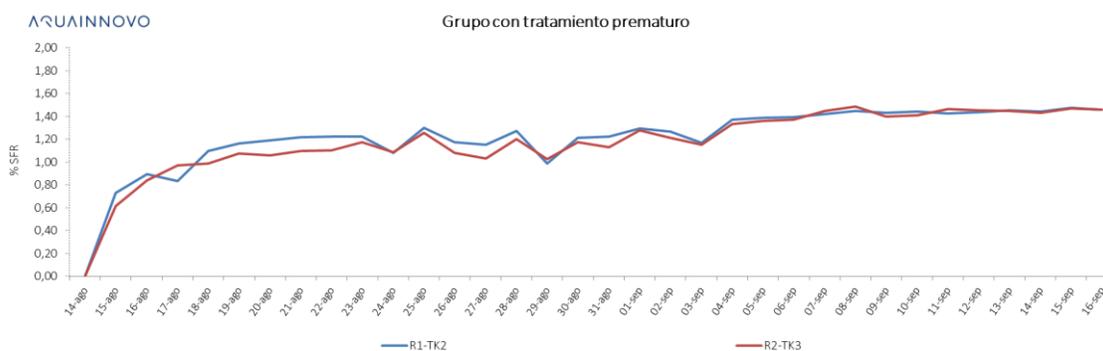


Figura N°2: Consumo de alimento en el Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano



Figura N°3: Consumo de alimento en el Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío



Figura N°4: Consumo de alimento en el Grupo de peces desafiados sin tratamiento (Control positivo).



Figura N°5: Consumo de alimento en el Grupo de peces no desafiados (Control negativo).

2.- Mortalidad diaria y acumulada

1.1. Mortalidad diaria

El Grupo de peces desafiados con tratamiento prematuro registró el menor porcentaje de mortalidad diaria respecto al Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío y al Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico. En este grupo entre el día 12 y 18 de iniciado el tratamiento se murieron 2 peces en cada estanque con una mortalidad acumulada del 7% por estanque

1.2. Mortalidad acumulada

Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico (Control positivo): Registró el mayor porcentaje de mortalidad acumulada en relación a los grupos tratados, siendo esta de un 63 y 64% en los estanques respectivos (Figura N°6)

Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano: Presentó bajo porcentaje de mortalidad (Fig. 7) respecto al Grupo Control positivo, durante el mismo período de tiempo. El % de mortalidad acumulada al término de la evaluación fue de un 7.14%.

Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío: Presentó mayor porcentaje de mortalidad respecto al observado en el grupo desafiado con tratamiento prematuro. El % de mortalidad acumulada al término de la evaluación fue de un 39 y 50% en los respectivos estanques (Figura N° 8)

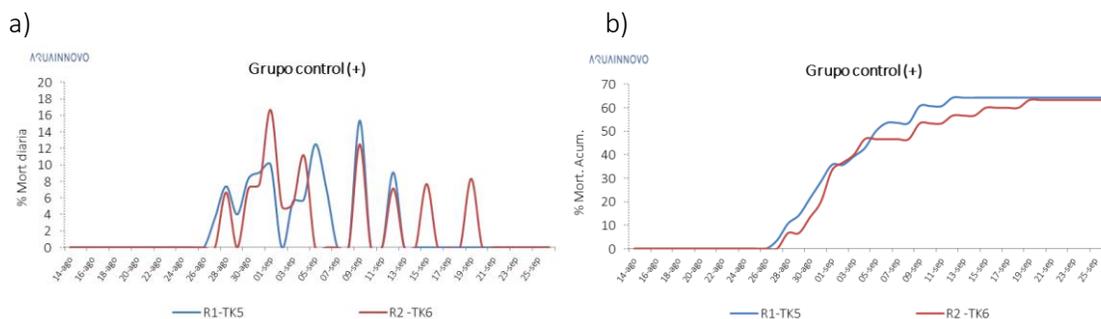


Figura N°6: Mortalidad diaria y acumulada Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico (Control positivo); a) Mortalidad diaria; b) Mortalidad acumulada.

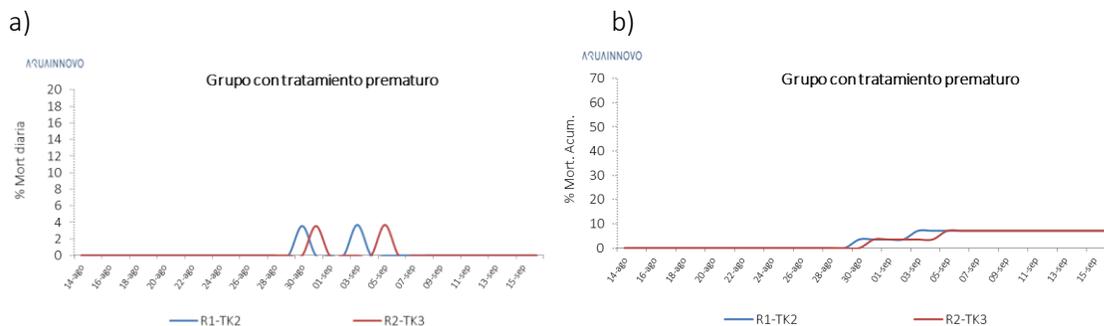


Figura N°7: Mortalidad diaria y acumulada Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano; a) Mortalidad diaria; b) Mortalidad acumulada.

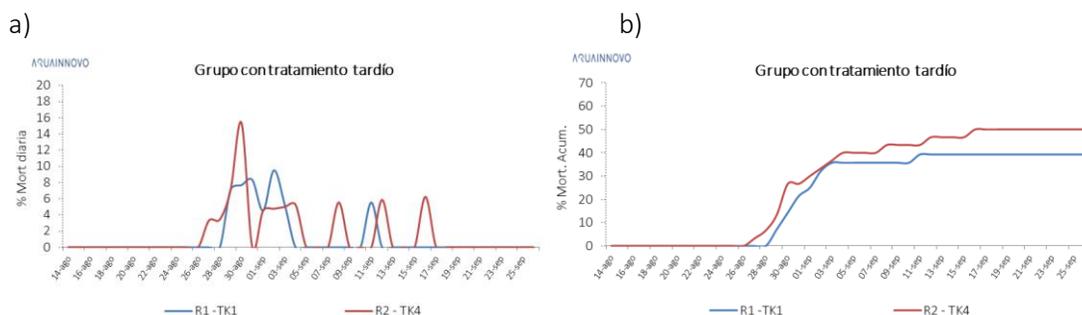


Figura N°8: Mortalidad diaria y acumulada Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío; a) Mortalidad diaria; b) Mortalidad acumulada.

3.- Diagnóstico de la mortalidad: a la necropsia se observó lesiones internas atribuibles a *P. salmonis*, siendo las más recurrentes hepatomegalia, esplenomegalia, hemorragia de tejido adiposo y ciegos pilóricos, cerebro congestivo. En el total de las muestras analizadas se detectó la presencia de *P. salmonis* con Ct de 16 a 27 (Tabla N°3).

Tabla N°3: Resultados RT-PCR para SRS previo al tratamiento con florfenicol.

TK	Día	N°Pez	SRS (+)	Ct	Prevalencia
2	3	1	2	25,19	100
		2		33,30	
3	3	1	1	No Ct	50
		2		27,89	
1	6	1	2	29,81	100
		2		28,75	
5	6	1	2	24,97	100
		2		32,41	

3.- Determinación del esquema terapéutico más adecuado de oxitetraciclina en peces desafiados con *P. salmonis* en condiciones controladas

El bioensayo se realizó en las instalaciones de AQUAINNOVO y los detalles del diseño experimental y de los resultados se adjuntan en Anexos Objetivo 2: Anexo 2.

Se evaluaron dos estrategias de administración de oxitetraciclina:

1. **Tratamiento temprano:** Peces con diagnóstico positivo a *P. salmonis* (mediante la técnica de RT-PCR), sin hallazgos de lesiones externas o internas atribuibles al patógeno y sin mortalidad.
2. **Tratamiento tardío:** Peces con diagnóstico positivo a *P. salmonis* (mediante la técnica de RT-PCR), con signos clínicos, disminución de apetencia y con inicio de mortalidad.

El tratamiento temprano comenzó el día 6 post- desafío con un 100% de prevalencia (PCR positivos). El tratamiento tardío comenzó el día 14 post- desafío, con la primera mortalidad observada.

Para ambos grupos se utilizó oxitetraciclina al 80%, polvo oral, correspondiente a un producto comercial utilizado habitualmente en la fabricación de alimento medicado para centros de cultivo.

Dosis utilizada: 100 mg/kg p.v.

Duración de la terapia: 15 días consecutivos de alimento medicado a razón de 1.25% de peso vivo (SFR), mediante alimentación automática y micro-rationes entre las 9:00 am y 15:00

Parámetros a evaluar: consumo de alimento (SFR), mortalidad diaria y acumulada y diagnóstico de la mortalidad. Estos parámetros fueron evaluados antes de iniciado el tratamiento, durante el tratamiento y hasta dos semanas de finalizado el tratamiento

Grupos experimentales:

- Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano.
- Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío.
- Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico (Control positivo).
- Grupo de peces no desafiados (Control negativo).

Cada grupo se hizo en duplicado y las evaluaciones se realizaron hasta dos semanas después de finalizado el tratamiento.

RESULTADOS

1. Consumo de alimento medicado

1.1.- Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano: Los peces mantuvieron un consumo similar entre réplicas de estanque y poco constantes durante los días de medicación, con un promedio de 0,78 SFR en los 15 días de tratamiento. La pérdida de alimento medicado fue equivalente a un 29,0 % respecto al calculado (1,10%). Posterior al tratamiento, los peces registraron un aumento en el consumo de alimento, alcanzando un SFR promedio de 0,89 a 1,06% (Figura N°9).

1.2.- Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío: Los peces tuvieron un consumo de alimento muy por debajo el SFR establecido (1.1%), especialmente los primeros días de alimentación, registrando una pérdida total al final de tratamiento del 42.7 % de alimento medicado. Posterior al tratamiento, se observó un aumento del consumo normal con una tasa promedio en estanques de 1.18 y 1.25% SFR (Figura N°10).

1.3.- Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico (Control positivo): registró un comportamiento irregular en la alimentación, con bajo consumo a partir del inicio de la mortalidad y durante el brote. En los días posteriores al pick de mortalidad se observó gran variedad del SFR, registrándose días con alto y bajo consumo (Figura N°11).

1.4.- Grupo de peces no desafiados (Control negativo): mantuvo un consumo constante de alimentación a excepción de los primeros días del estudio con un consumo promedio de 1.56% SFR (Figura N°12).



Figura N°9: Consumo de alimento en el Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano.



Figura N°10: Consumo de alimento en el Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío.

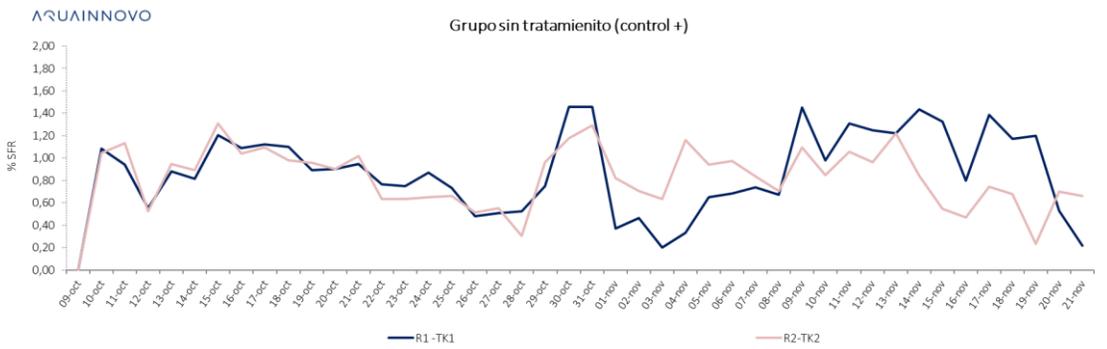


Figura N°11: Consumo de alimento en el Grupo de peces desafiados sin tratamiento (Control positivo).



Figura N°12: Consumo de alimento en el Grupo de peces no desafiados (Control negativo).

2. Mortalidad

2.1. Mortalidad diaria

En la Figuras N°13 a N°15 se observa el % de mortalidad diaria para cada grupo. EL grupo de peces desafiados con tratamiento temprano y el grupo de peces desafiados con tratamiento temprano, registraron menor porcentaje de mortalidad diaria respecto el grupo control positivo, con rangos de 2.1 – 8.3%. En el grupo control positivo la mortalidad diaria estuvo entre un 2% y 15% (Figura N°13).

2.2. Mortalidad acumulada

Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico (Control positivo): Registró el mayor porcentaje de mortalidad diaria y acumulada en relación a los grupos tratados, siendo esta de un 78.2 y 65.2 % en los estanques respectivos (Figura N°13).

Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano: Presentó menor mortalidad respecto al Grupo Control positivo, durante el mismo período de tiempo. El % de mortalidad acumulada al término de la evaluación entre un 29.1% y 20.8% (Figura N°14).

Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío: Presentó mayor porcentaje de mortalidad respecto al observado en el grupo desafiado con tratamiento prematuro. El % de mortalidad acumulada al término de la evaluación fue de un 34.7% y 43.4% en los respectivos estanques (Figura N°15).

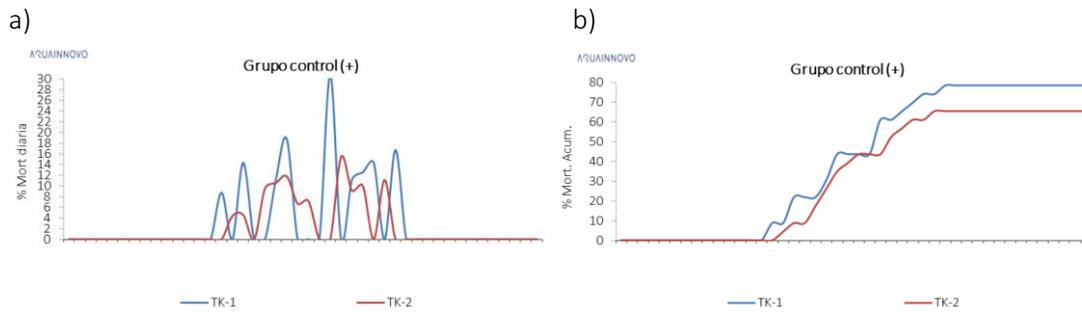


Figura N°13: Mortalidad diaria y acumulada Grupo de peces desafiados sin tratamiento con antibiótico (Control positivo); a) Mortalidad diaria; b) Mortalidad acumulada.

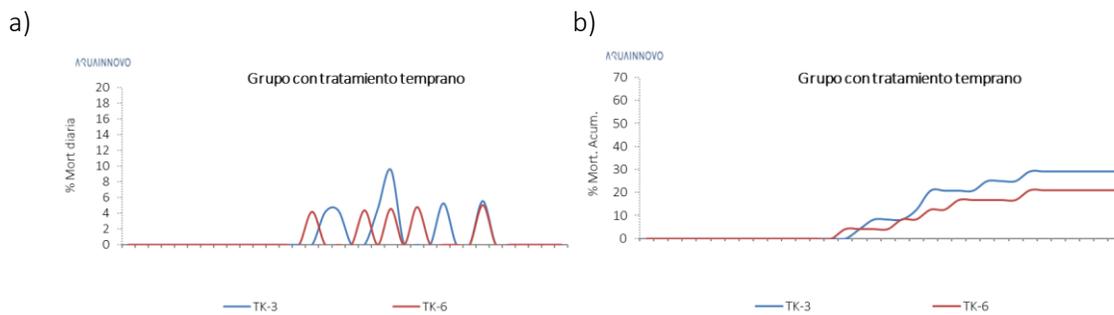


Figura N°14: Mortalidad diaria y acumulada Grupo de peces desafiados con tratamiento temprano; a) Mortalidad diaria; b) Mortalidad acumulada.

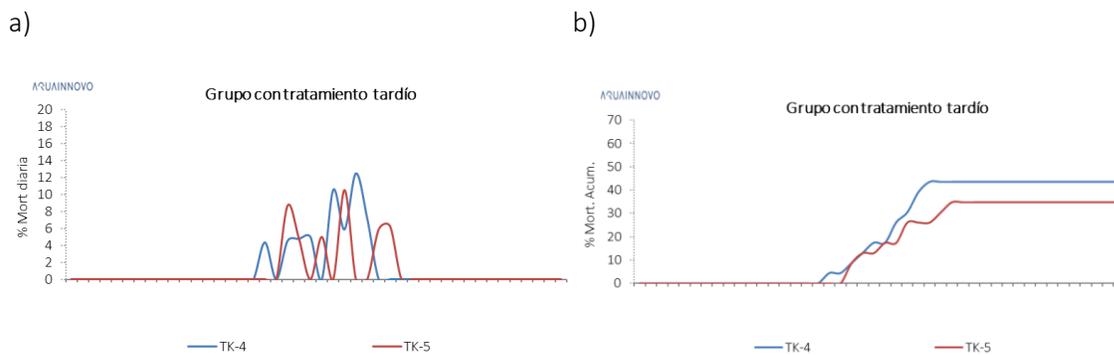


Figura N°15: Mortalidad diaria y acumulada Grupo de peces desafiados con tratamiento tardío; a) Mortalidad diaria; b) Mortalidad acumulada.

3. Diagnóstico de la mortalidad

A la necropsia se observó lesiones internas atribuibles a *P. salmonis*, siendo las más recurrentes hepatomegalia, esplenomegalia, hemorragia de tejido adiposo y ciegos pilóricos, cerebro congestivo. En el total de las muestras analizadas se detectó la presencia de *P. salmonis*, con un Ct de 11 a 18 (Tabla N°4).

Tabla N°4: Resultados RT-PCR para SRS previo al tratamiento con oxitetraciclina.

TK	Día	N° Pez	SRS (+)	Ct	% Prevalencia
1	3	1	6	25,84	66,6
2		2		No Ct.	
3		3		24,95	
4		4		24,47	
5		5		No Ct.	
6		6		37,76	
1	6	1	4	23,99	100,0
2		2		26,01	
4		3		29,24	
5		4		28,27	

CONCLUSIONES

1. Los resultados señalan que el éxito de una terapia oral con alimento medicado (evaluado por el porcentaje de mortalidad) es dependiente del consumo diario de alimento ($SFR = \frac{\text{alimento suministrado diariamente}}{\text{biomasa actual}} \times 100 / \text{días}$). En la medida que el consumo de alimento disminuye, los peces no ingieren la dosis necesaria de antibiótico existiendo mayores probabilidades de no lograr el éxito deseado
2. El inicio de una terapia debería realizarse antes de que se vea afectado el consumo diario de alimento

RECOMENDACIONES

1. Fomentar el diagnóstico precoz de *P. salmonis* a través de una vigilancia sanitaria permanente y preventiva de los centros de cultivo, que considere la revisión de los registros sanitarios y productivos, inspección de la jaula, necropsia de la mortalidad en caso de que exista, y toma de muestra para el envío al laboratorio.
2. Fomentar la terapia temprana frente a un diagnóstico precoz.
3. Definir el concepto de diagnóstico precoz, las cuales podrían ser:
 - Centro de cultivo con peces positivo a *P. salmonis* mediante la técnica de RT-PCR, sin signos clínicos y/o mortalidad.
 - Centro de cultivo con peces con sintomatología clínica y/o alteraciones a la necropsia correspondientes a *P. salmonis* y sin mortalidad.

OBJETIVO N°3: EVALUAR EN CONDICIONES DE CAMPO LA EFECTIVIDAD DE LOS ESQUEMAS TERAPÉUTICOS CON ANTIBIÓTICOS FRENTE A PISCIRICKETTSIOSIS QUE ACTUALMENTE SE UTILIZAN EN CHILE.

Se evaluó la terapia de oxitetraciclina y florfenicol en 9 centros de cultivo. En cada uno de ellos se realizó el seguimiento de 2 jaulas. Las dosis y duración de la terapia fueron definidas por el Médico Veterinario a cargo del centro. Entre los centros monitoreados se consideraron 2 centros de cultivo que utilizaron dosis de 20 mg/kg 4 centros que utilizaron 15 mg/kg y dos centros con dosis 16 mg/kg. En el caso de OTC solo se realizó monitoreo de dos centros que utilizaron la misma dosis (100 mg/kg).

METODOLOGÍA

1.1. Selección de peces

Para el seguimiento clínico de los grupos tratados se consideró muestrear 5 peces dirigidos y 5 peces aleatorios por jaula, incluyendo el monitoreo de 2 jaulas en cada centro. En los casos que no se observó peces con natación errática u orillados, se consideró completar el muestreo con peces aleatorios. Para la selección de las jaulas se consideró como parámetro de selección la mortalidad por jaula y el SFR, con la finalidad de seleccionar la jaula con mayor mortalidad y menor consumo de alimento, y la jaula de mayor mortalidad y mayor consumo de alimento.

Las jaulas seleccionadas fueron muestreadas previo al inicio del tratamiento medicado (tiempo 0) y posterior al inicio del tratamiento los días 1, 2, 4, 6, 9, 12 y 14 desde iniciada la aplicación del antimicrobiano. Adicionalmente, se consideró realizar muestreo de seguimiento a los 15 días posterior al término del tratamiento antimicrobiano en los grupos de peces dirigidos y aleatorios. Para cada tiempo, se consideró la toma de muestras de sangre de los peces capturados. Las jaulas fueron monitoreadas los días 1 y 2, posterior al inicio del tratamiento, 3 veces al día, con la finalidad de determinar la variación de los niveles de antimicrobiano en suero.

En el caso de los centros alimentados a saciedad, la toma de muestra de sangre fue realizada una vez terminada la primera alimentación (9:00 hrs), al medio día (12:00 hrs) y en la tarde (15:00 hrs). Para las muestras de sangre correspondientes a los días 4, 6, 9, 12, 14, y 15 días posterior al término del tratamiento antimicrobiano, la toma de muestra fue realizada en la tarde (15:00 hrs).

En caso de los centros alimentados por medio de microraciones, la toma de muestra de sangre fue realizada a primera hora de la mañana (9:00 hrs), al medio día (12:00 hrs) y en la tarde (15:00 hrs). Para las muestras de sangre correspondientes a los días 4, 6, 9, 12, 14, y 15 días posterior al término del tratamiento antimicrobiano, la toma de muestra fue realizada en la tarde (15:00 hrs).

Adicionalmente, las muestras para aislamiento, histología y biología molecular serán tomadas en la tarde (15:00 hrs).

1.2. Toma de muestras

La figura 1 muestra un esquema de la toma de muestras y los análisis realizados durante el programa de optimización de los esquemas terapéuticos de oxitetraciclina y florfenicol administrados en centros de cultivo en agua de mar. A continuación, se detalla la toma de muestras por análisis.

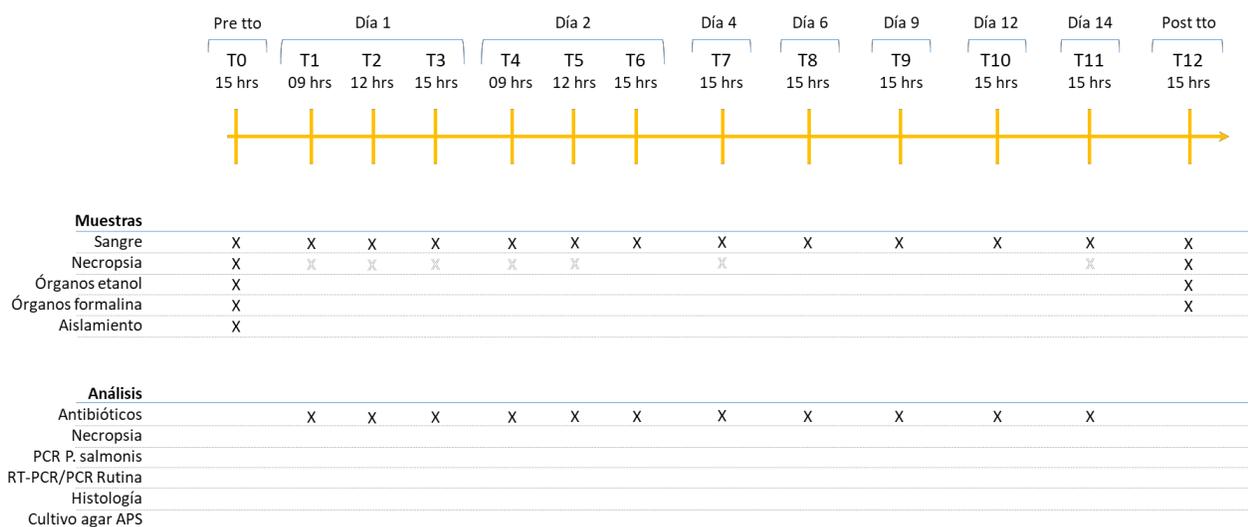


Figura 1: Esquema de la toma de muestras y los análisis realizados durante el programa de optimización de los esquemas terapéuticos de oxitetraciclina y florfenicol administrados en centros de cultivo en agua de mar.

1.2.1. Muestras de peces para necropsia

Con la finalidad de describir los signos clínicos macroscópicos observados en los grupos de peces aleatorios y dirigidos, se realizó necropsia de todos los peces muestreados. Los peces fueron dispuestos en una superficie limpia para la realización de necropsia, según lo descrito por Thoesen (1994), Noga (2010) y Woo (2011).

1.2.2. Muestras de órganos en formalina para histología

Con la finalidad de evidenciar alteraciones en los tejidos en grupos de peces dirigidos, se consideró la toma de muestras de órganos de 5 peces por jaula en formalina al 10% bufferizada previo al inicio del tratamiento y 15 días después de terminado el tratamiento antimicrobiano. Los tejidos considerados en la toma de muestras fueron cerebro, branquia, corazón, hígado, ciego pilórico, estómago, bazo, intestino, riñón, músculo y piel.

Las muestras fijadas fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio CIBA, donde fueron mantenidas 48 horas en formalina al 10% bufferizada, para posteriormente ser cortadas bajo campana de extracción de gases y dispuestas en cassette de inclusión Simport modelo M480. Una vez en cassette de inclusión las muestras fueron procesadas por un autotécnico con el fin de ser deshidratadas e impregnadas en parafina sólida, seccionadas mediante micrótopo entre 3 a 4 µm y

posteriormente teñidas con hematoxilina & eosina (H&E) de acuerdo a lo descrito por Prophet et al. (1994). Los tejidos fueron examinados utilizando un microscopio Leica DFC295® y fotografiados utilizando una cámara Leica DM2000 LED®. Los hallazgos morfológicos significativos fueron descritos y tabulados para determinar el diagnóstico específico en cada órgano.

1.2.3. Muestras de órganos para aislamiento

Con la finalidad de lograr el aislamiento de la cepa de *Piscirickettsia salmonis* en los grupos de peces dirigidos con signos clínicos, se consideró la siembra en órganos en Agar *Piscirickettsia salmonis* (APS).

Para el cultivo microbiológico se procedió a mantener un asa de platino en la llama de un mechero hasta alcanzar el rojo vivo. Posteriormente, el asa fue enfriada en el agar e insertada en los órganos a sembrar. Los tejidos a sembrar de cada pez fueron hígado y riñón. Las muestras fueron inoculadas mediante el método de estrías sobre la superficie de una placa de Agar *Piscirickettsia salmonis* (APS), para su posterior incubación a 16 °C durante 7 a 12 días.

1.2.4. Muestras de órganos en etanol para PCR

Para cada tiempo se consideró la toma de muestras de hígado y cerebro individual por pez, los cuales fueron depositados en un tubo eppendorf con etanol al 70%, siendo rotulados individualmente y almacenados en hielo durante la toma de muestras.

Las muestras de hígado y cerebro fueron analizadas en el Laboratorio CIBA por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para *Piscirickettsia salmonis*, según el procedimiento del Laboratorio CIBA basado en lo descrito por Corbeil et al. (2003).

Adicionalmente, en el tiempo 0 se consideró la toma de muestras de branquias, corazón, hígado y riñón individual por pez, los cuales fueron depositados en un tubo eppendorf con etanol al 70%, siendo rotulados individualmente y almacenados en hielo durante la toma de muestras.

Las muestras de branquias, corazón, hígado y riñón fueron analizadas en el Laboratorio CIBA por medio de la reacción de la polimerasa en cadena con o sin transcripción reversa (PCR/RT-PCR) para el virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAV) según el procedimiento del Laboratorio CIBA basado en lo descrito por Snow et al. (2005), virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) según el procedimiento del Laboratorio CIBA basado en lo descrito por Orpetveit et al. (2010), *Renibacterium salmoninarum* según el procedimiento del Laboratorio CIBA basado en lo descrito por Chase et al. (2006), *Nucleospora salmonis* según el procedimiento del Laboratorio CIBA basado en lo descrito por Badil et al. (2011), *Paramoeba perurans* según el procedimiento del Laboratorio CIBA basado en lo descrito por Fringuelli et al. (2012), y *Tenacibaculum maritimum* según el procedimiento del Laboratorio CIBA basado en lo descrito por Fringuelli et al. (2012).

1.2.5. Muestras de sangre para la determinación de la concentración antimicrobiana

Para cada tiempo se consideró la toma de muestras de sangre. Los peces muestreados fueron anestesiados con benzocaína al 20% en un recipiente con agua de mar. Una vez que los peces fueron sedados, se tomaron 2 o más mililitros (ml) de sangre de la vena caudal, la cual fue depositada en tubos eppendorf y almacenada en hielo o gel pack durante la toma de muestras. Posteriormente, las muestras de sangre fueron centrifugadas en terreno a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, con la finalidad de extraer el suero sobrenadante de las muestras centrifugadas, el cual fue depositado en un tubo eppendorf vacío rotulados individualmente y almacenados en hielo durante la toma de muestras.

Una vez en el laboratorio las muestras de suero fueron almacenadas congeladas a -20° Celsius y transportadas en condiciones de refrigeración al momento de su derivación a la Universidad de Chile para su análisis.

1.2.6. Recopilación de información

Durante las tomas de muestras se consideró la recopilación de los antecedentes productivos y sanitarios relacionados con la aplicación de los tratamientos medicados para su incorporación y análisis de los resultados.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra información general de los centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Tabla 1: Información general de los centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Empresa	Centro	Especie	Principio activo	Fechas de seguimiento
1	1	<i>Salmo salar</i>	Florfenicol	30 Ene - 16 Feb
2	2	<i>Salmo salar</i>	Florfenicol	03 Mar - 20 Mar
3	3	<i>Salmo salar</i>	Florfenicol	22 May - 05 Jun
4	4	<i>Salmo salar</i>	Oxitetraciclina	23 May - 08 Jun
5	5	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Florfenicol	13 Jun - 04 Jul
5	6	<i>Salmo salar</i>	Florfenicol	13 Jun - 26 Jun
6	7	<i>Salmo salar</i>	Florfenicol	05 Ago - 22 Ago
7	8	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Florfenicol	24 Ago - 10 Sep
8	9	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Florfenicol	25 Ago - 10 Sep

1.3. Mortalidad

La tabla 2 muestra un resumen con la evolución de la mortalidad diaria promedio pre tratamiento, durante el tratamiento y post tratamiento registrada en los centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos para cuadros de Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar.

Tabla 2: Resumen con la evolución de la mortalidad diaria promedio pre tratamiento, durante el tratamiento y post tratamiento registrada en los centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos para cuadros de Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar.

Centro	Principio activo	% de mortalidad diaria promedio			Tendencia
		Pre tratamiento	Durante el tratamiento	Post tratamiento	
1	Florfenicol	0,010%	0,012%	0,013%	Aumento
2	Florfenicol	0,009%	0,011%	0,007%	Disminución
3	Florfenicol	0,028%	0,074%	0,063%	Disminución
4	Oxitetraciclina	0,010%	0,014%	0,011%	Disminución
5	Florfenicol	0,007%	0,009%	0,004%	Disminución
6	Florfenicol	0,003%	0,003%	0,003%	Sin cambios
7	Florfenicol	0,011%	0,008%	0,008%	Sin cambios
8	Florfenicol	0,044%	0,042%	0,085%	Aumento
9	Florfenicol	0,014%	0,011%	0,038%	Aumento

La figura 2 muestra la evolución de la mortalidad diaria promedio pre tratamiento, durante el tratamiento y post tratamiento registrada en los centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos para cuadros de Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar.

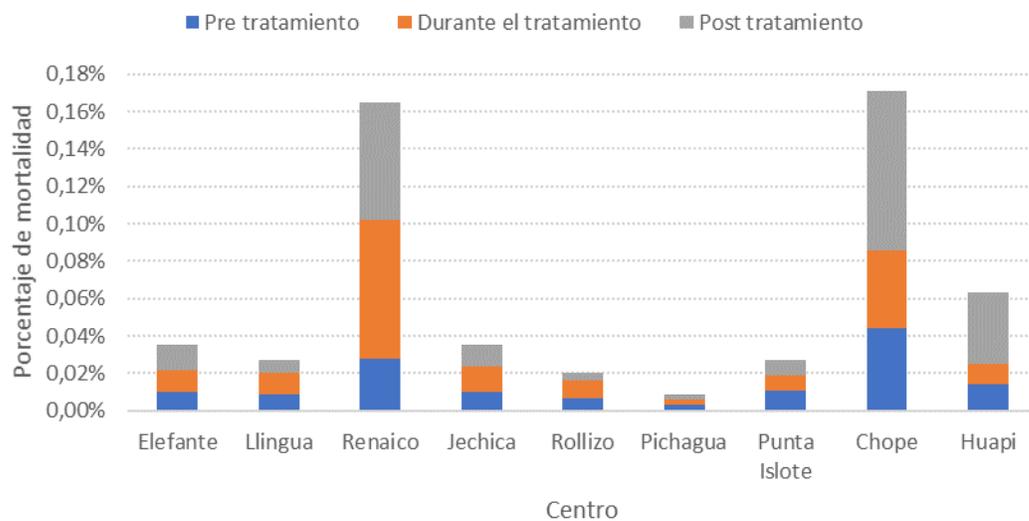


Figura 2: Evolución de la mortalidad diaria promedio pre tratamiento, durante el tratamiento y post tratamiento registrada en los centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos para cuadros de Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar.

1.4. Hallazgos de la necropsia

La tabla 3 muestra un resumen con la evolución de los hallazgos macroscópicos observados en los centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Tabla 3: Evolución de los hallazgos macroscópicos observados en los centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Centro	Principio activo	Frecuencia de los hallazgos macroscópicos						Tendencia
		Pre tratamiento			Post tratamiento			
		Nódulos hígado	Úlceras	Cavernas muscular	Nódulos hígado	Úlceras	Cavernas muscular	
1	Florfenicol	7/20 (35,0%)	11/20 (55,0%)	3/20 (15,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	Disminución
2	Florfenicol	1/20 (5,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	Disminución
3	Florfenicol	4/15 (26,6%)	8/15 (33,3%)	1/15 (6,6%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	Disminución
4	Oxitetraciclina	3/20 (15,0%)	1/20 (5,0%)	1/20 (5,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	Disminución
5	Florfenicol	1/10 (10%)	0/10 (0,0%)	0/10 (0,0%)	0/10 (0,0%)	1/10 (10%)	0/10 (0,0%)	Sin cambios
6	Florfenicol	0/20 (0,0%)	3/10 (15,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	Disminución
7	Florfenicol	7/20 (35,0%)	6/20 (30,0%)	3/20 (15,0%)	2/20 (10,0%)	3/20 (15,0%)	0/20 (0,0%)	Disminución
8	Florfenicol	0/20 (0,0%)	3/20 (15,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	Disminución
9	Florfenicol	0/10 (0,0%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	0/10 (0,0%)	0/10 (0,0%)	0/10 (0,0%)	Disminución

1.5. Histología de órganos

La tabla 4 muestra la frecuencia de granulomas en hígado observados en las muestras histopatológicas obtenidas en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Tabla 4: Frecuencia de granulomas en hígado observados en las muestras histopatológicas obtenidas en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Centro	Principio activo	Frecuencia de hallazgos histopatológicos		Tendencia
		Granulomas en hígado Pre tratamiento	Nódulo en hígado Post tratamiento	
1	Florfenicol	5/5 (100%)	1/5 (20%)	Disminución
2	Florfenicol	4/5 (80%)	1/5 (20%)	Disminución
3	Florfenicol	2/5 (40%)	2/5 (40%)	Sin cambios
4	Oxitetraciclina	1/5 (20%)	0/5 (0%)	Disminución
5	Florfenicol	1/5 (20%)	1/5 (20%)	Sin cambios
6	Florfenicol	2/5 (40%)	0/5 (0%)	Disminución
7	Florfenicol	1/5 (20%)	1/5 (20%)	Sin cambios
8	Florfenicol	0/5 (0%)	0/5 (0%)	Sin cambios
9	Florfenicol	1/5 (20%)	0/5 (0%)	Disminución

1.6. Reacción de la polimerasa en cadena para patógenos endémicos

La tabla 5 muestra los resultados de la reacción de la polimerasa en cadena con o sin transcripción reversa (RT-PCR/PCR) obtenidos en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Tabla 5: Resultados de la reacción de la polimerasa en cadena con o sin transcripción reversa (RT-PCR/PCR) obtenidos en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Centro	Principio activo	Frecuencia de patógenos endémicos por PCR					
		ISAV HPR0	IPNV	BKD	<i>Nucleospora salmonis</i>	<i>Paramoeba perurans</i>	<i>Tenacibaculum maritimum</i>
1	Florfenicol	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Florfenicol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Florfenicol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Oxitetraciclina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Florfenicol	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
6	Florfenicol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Florfenicol	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
8	Florfenicol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Florfenicol	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

1.7. Reacción de la polimerasa en cadena para *Piscirickettsia salmonis*

La tabla 6 muestra los resultados de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para *Piscirickettsia salmonis* obtenidos en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en aguade mar considerados en el estudio de seguimiento.

Tabla 6: Resultados de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para *Piscirickettsia salmonis* obtenidos en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en aguade mar considerados en el estudio de seguimiento.

Centro	Principio activo	Frecuencia de positivos por PCR				Tendencia
		Pre tratamiento		Post tratamiento		
		Dirigido	Aleatorio	Dirigido	Aleatorio	
1	Florfenicol	Positivo 7/10	Positivo 4/10	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Disminuye
2	Florfenicol	Positivo 6/10	Positivo 7/10	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Disminuye
3	Florfenicol	Positivo 4/5	Positivo 4/10	Positivo 3/6	Positivo 1/10	Disminuye
4	Oxitetraciclina	-	Positivo 1/10	-	Negativo 10/10	Disminuye
5	Florfenicol	-	Positivo 1/10	-	Negativo 20/20	Disminuye
6	Florfenicol	Positivo 1/10	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Disminuye
7	Florfenicol	Positivo 9/10	Positivo 5/10	Positivo 5/10	Positivo 2/10	Disminuye
8	Florfenicol	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Sin cambios
9	Florfenicol	Positivo 1/10	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Negativo 10/10	Disminuye

1.8. Cultivo bacteriológico en agar *Piscirickettsia salmonis*

La tabla 7 muestra los resultados de los cultivos bacteriológicos realizados en agar *Piscirickettsia salmonis* (APS) realizados en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra *Piscirickettsiosis* (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Tabla 7: Resultados de los cultivos bacteriológicos realizados en agar *Piscirickettsia salmonis* (APS) realizados en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra *Piscirickettsiosis* (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Centro	Aislamiento	Especie de Aislamiento	Año de Aislamiento	Órgano	Región	Tipo de Agua
1	Aislado	Salmon del Atlántico	2018	Hígado	XI, Aysén	Mar
2	No aislado	-	-	-	-	-
3	Aislado	Salmon del Atlántico	2018	Hígado	XI, Aysén	Mar
4	Aislado	Salmon del Atlántico	2018	Hígado	XI, Aysén	Mar
5	Aislado	Salmón Coho	2018	Riñón	X, Estuario Reloncavi	Mar
6	No Aislado	-	-	-	-	-
7	No Aislado	-	-	-	-	-
8	No Aislado	-	-	-	-	-
9	Aislado	Salmon del Atlántico	2018	Hígado	X, Calbuco	Mar

1.9. Consumo de alimento medicado

La tabla 8 muestra la frecuencia de cumplimiento diario de consumo de alimento medicado registrado en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Tabla 8: Frecuencia de cumplimiento diario de consumo de alimento medicado registrado en centros de cultivo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratados con antimicrobianos contra Piscirickettsiosis (SRS) en agua de mar considerados en el estudio de seguimiento.

Centro	Principio activo	Frecuencia de cumplimiento diario de consumo de alimento medicado			Observación
		< 75 %	>75 y <90 %	> 90%	
1	Florfenicol	91/287 (31,7%)	46/287 (16,0%)	150/287 (52,3%)	Bajo consumo
2	Florfenicol	14/154 (9,1%)	47/154 (30,5%)	93/154 (60,4%)	Bajo consumo
3	Florfenicol	-	-	165/165 (100%)	Consumo óptimo
4	Oxitetraciclina	-	33/402 (8,2%)	369/402 (91,8%)	Consumo óptimo
5	Florfenicol	21/220 (9,5%)	54/220 (24,5%)	145/220 (66,0%)	Bajo consumo
6	Florfenicol	-	-	126/126 (100%)	Consumo óptimo
7	Florfenicol	-	-	378/378 (100%)	Consumo óptimo
8	Florfenicol	-	-	270/270 (100%)	Consumo óptimo
9	Florfenicol	-	4/96 (4,2%)	90/96 (95,8%)	Consumo óptimo

1.10. Determinación de la concentración antimicrobiana

1.10.1. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 1

El gráfico 1 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 101 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 1.

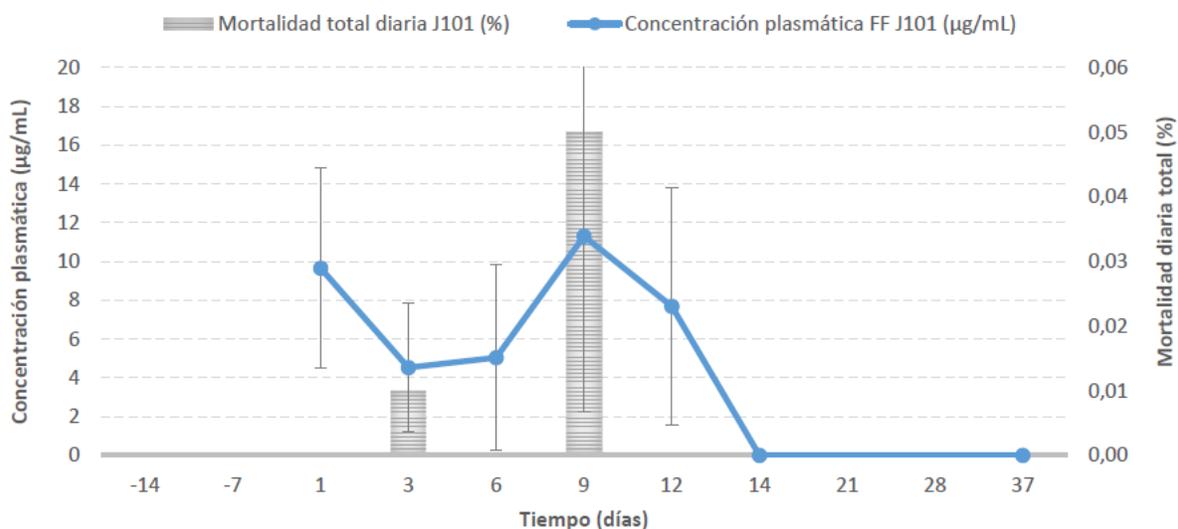


Gráfico 1: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 101 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 1.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	20 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Recalcine
Inicio tratamiento	30-01-2018
Término tratamiento	12-02-2018

El gráfico 2 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 109 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 1.

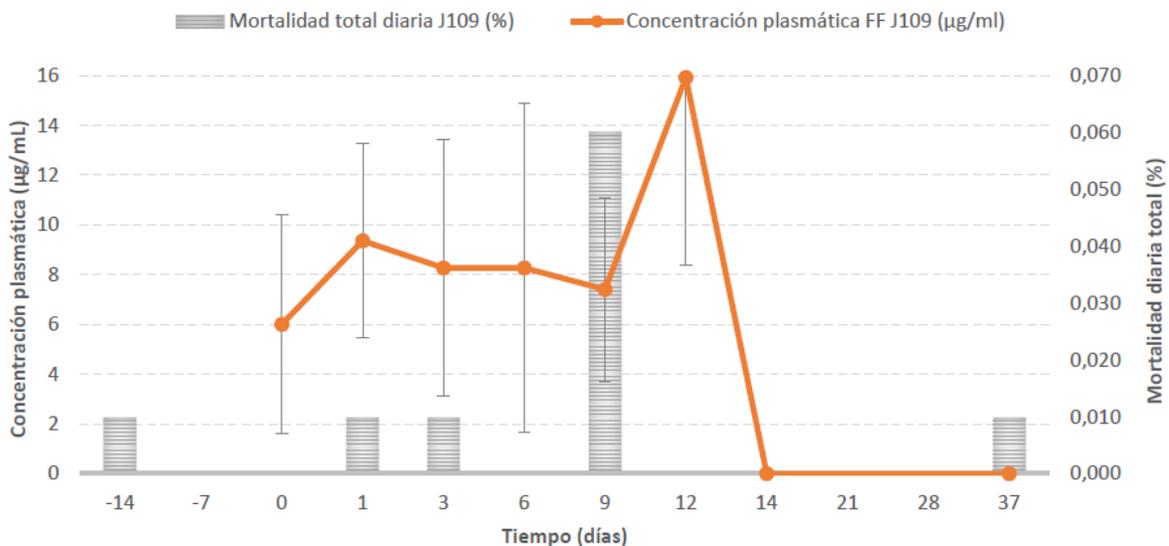


Gráfico 2: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 109 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 1.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	20 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Recalcine
Inicio tratamiento	30-01-2018
Término tratamiento	12-02-2018

1.10.2. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 2

El gráfico 3 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 101 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 2.

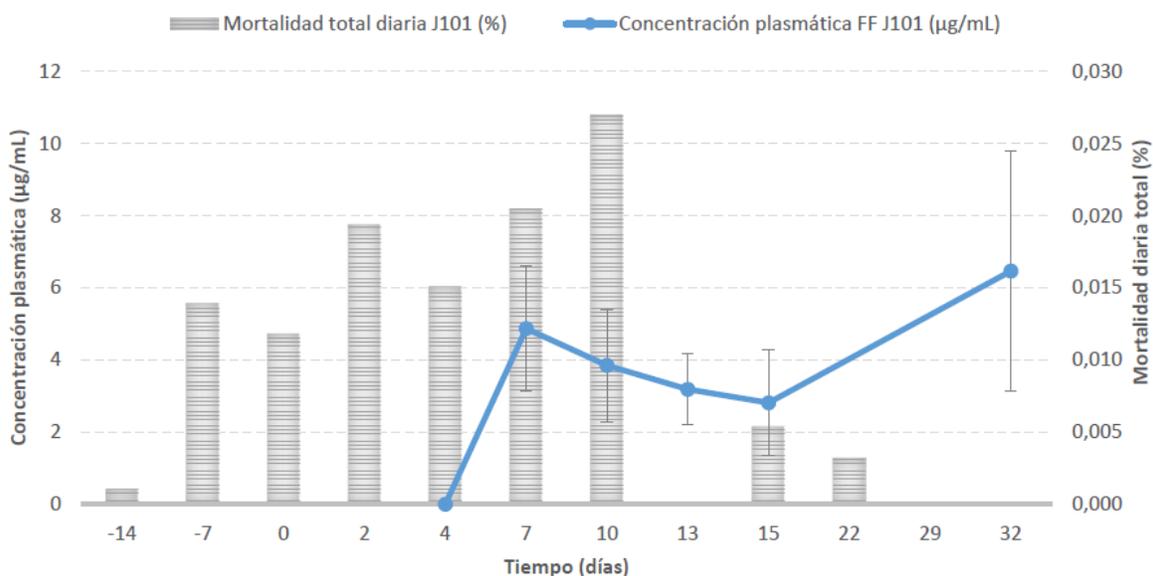


Gráfico 3: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 101 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 2.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	15 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Europharma
Inicio tratamiento	04-03-2018
Término tratamiento	17-03-2018

El gráfico 4 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 101 en grupos dirigidos durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 2.

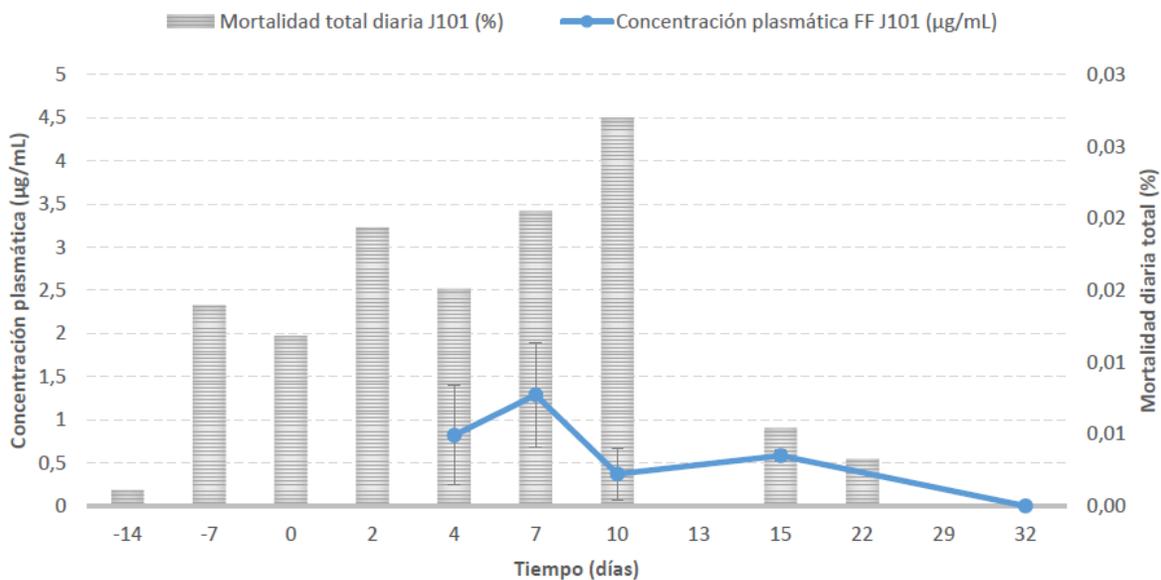


Gráfico 4: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 101 en grupos dirigidos durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 2.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	15 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Europharma
Inicio tratamiento	04-03-2018
Término tratamiento	17-03-2018

El gráfico 5 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 103 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 2.

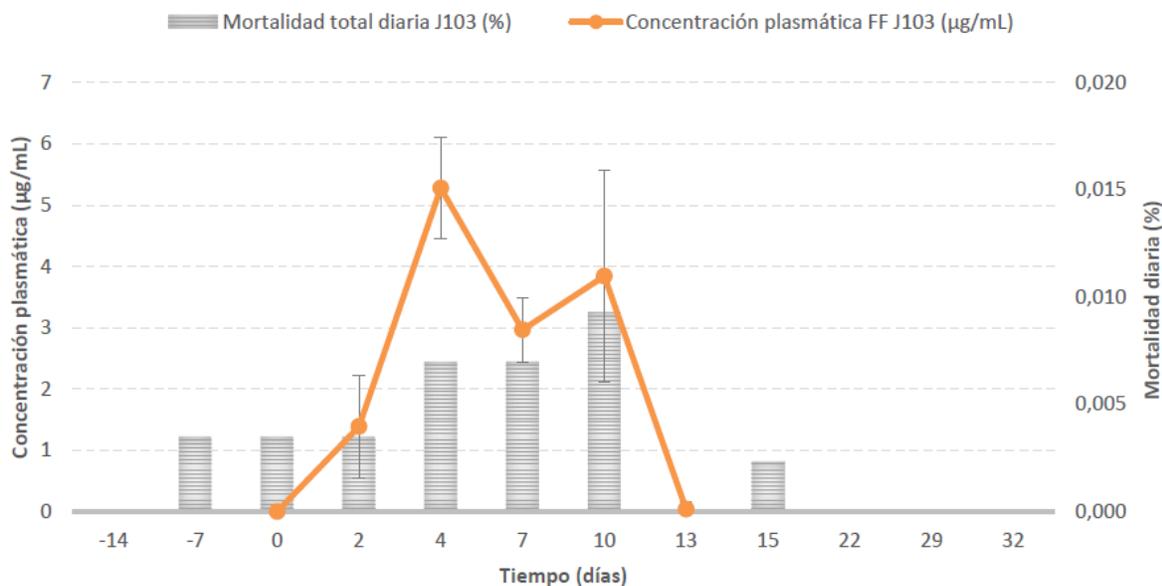


Gráfico 5: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 103 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 2.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	15 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Europharma
Inicio tratamiento	04-03-2018
Término tratamiento	17-03-2018

El gráfico 6 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 103 en grupos dirigidos durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 2.

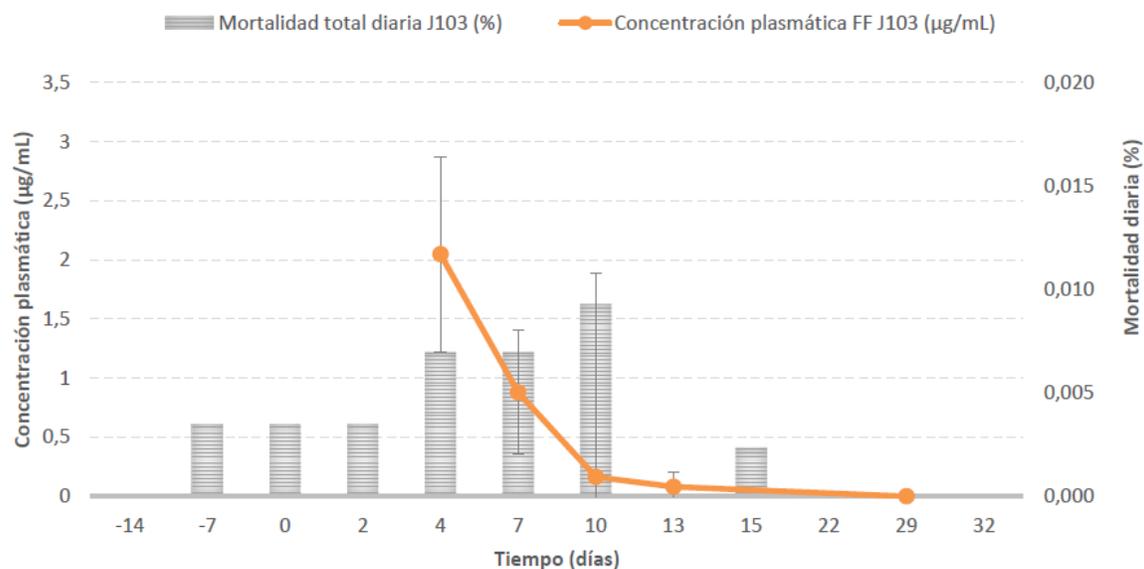


Gráfico 6: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 103 en grupos dirigidos durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 2.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	15 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Europharma
Inicio tratamiento	04-03-2018
Término tratamiento	17-03-2018

1.10.3. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 3

El gráfico 7 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 106 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 3.

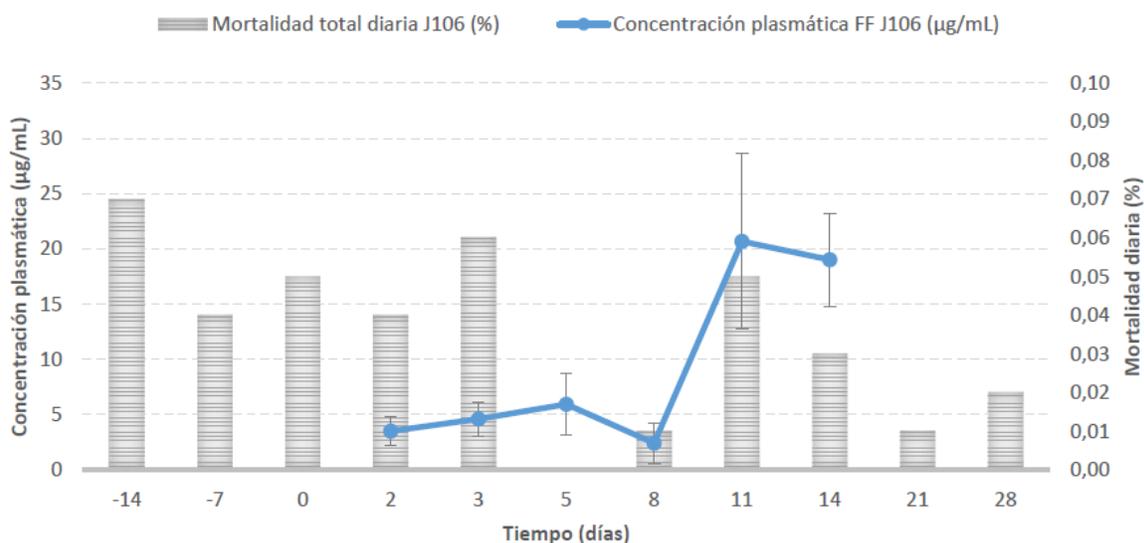


Gráfico 7: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 106 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 3.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	20 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Veterquímica
Inicio tratamiento	23-05-2018
Término tratamiento	04-06-2018

El gráfico 8 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 112 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 3.

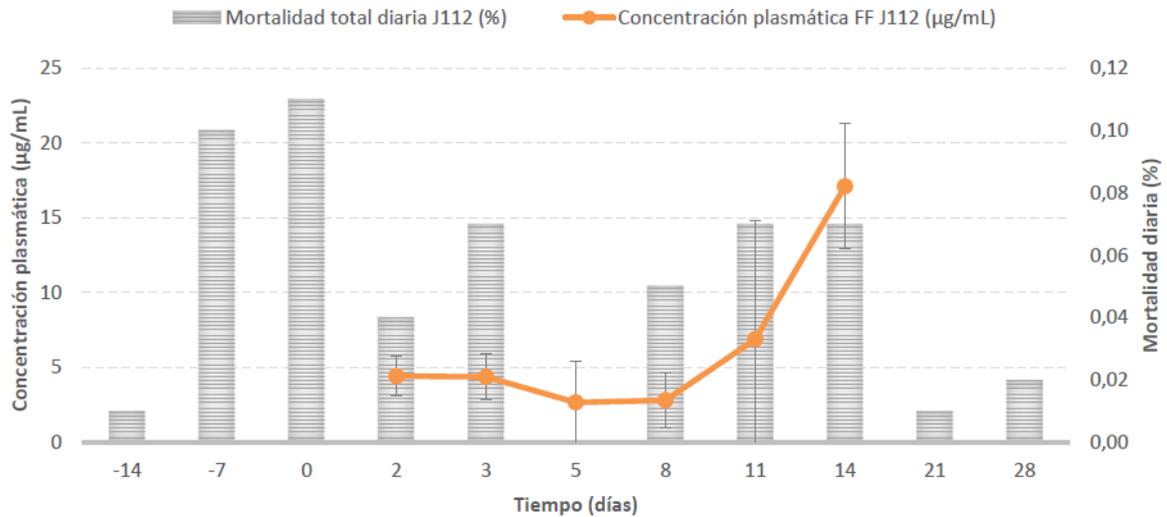


Gráfico 8: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 112 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 3.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	20 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Veterquímica
Inicio tratamiento	23-05-2018
Término tratamiento	04-06-2018

1.10.4. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 4

El gráfico 9 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Oxitetraciclina obtenidas en la jaula 1 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 4.

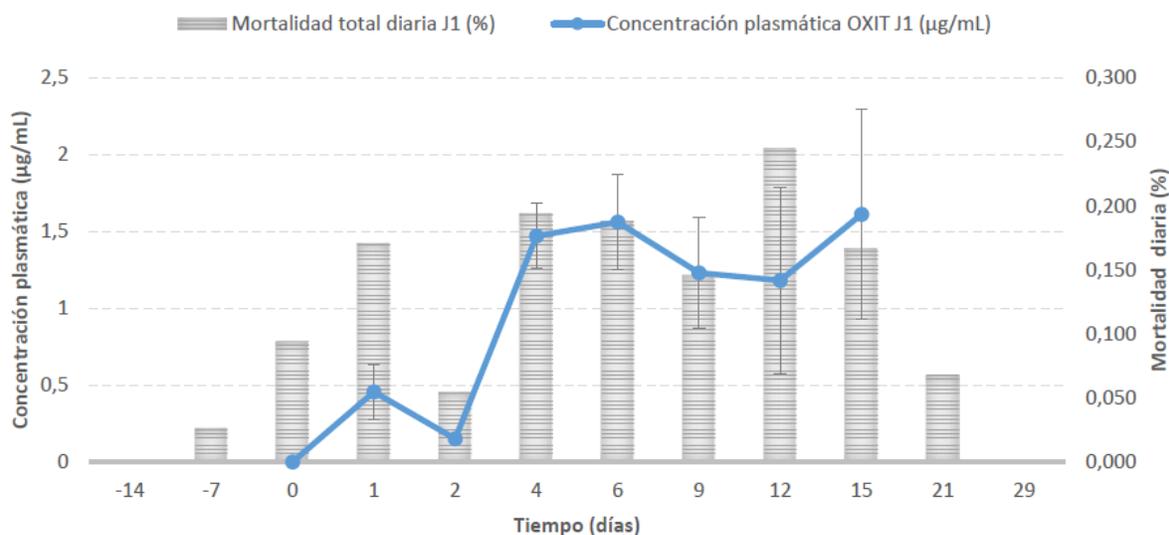


Gráfico 9: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Oxitetraciclina obtenidas en la jaula 1 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 4.

Principio activo	Oxitetraciclina
Vía	Oral
Dosis	100 mg/Kg
Producto	Oxitetraciclina 80%
Laboratorio	Veterquímica
Inicio tratamiento	23-05-2018
Término tratamiento	06-06-2018

El gráfico 10 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Oxitetraciclina obtenidas en la jaula 14 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 4.

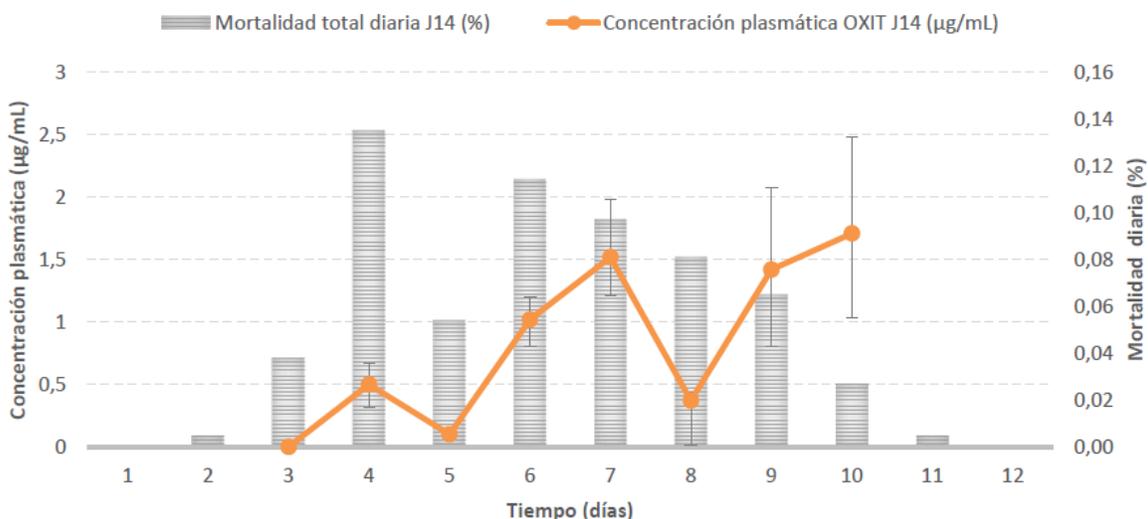


Gráfico 10: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Oxitetraciclina obtenidas en la jaula 14 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 4.

Principio activo	Oxitetraciclina
Vía	Oral
Dosis	100 mg/Kg
Producto	Oxitetraciclina 80%
Laboratorio	Veterquímica
Inicio tratamiento	23-05-2018
Término tratamiento	06-06-2018

1.10.5. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 5

El gráfico 11 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 301 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), en el centro 5.

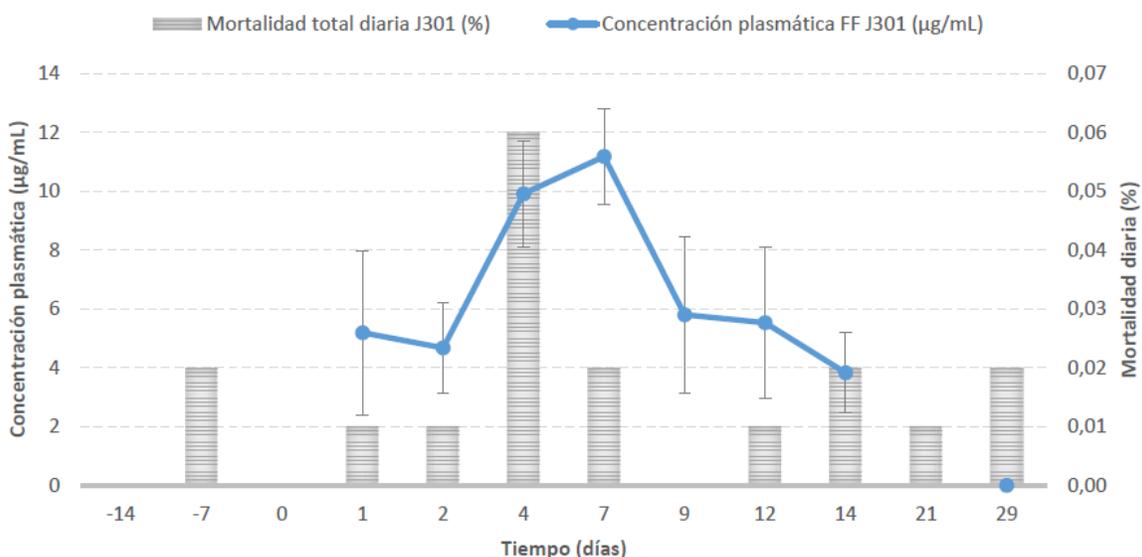


Gráfico 11: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 301 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), en el centro 5.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	20 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	FAV
Inicio tratamiento	14-06-2018
Término tratamiento	27-06-2018

El gráfico 12 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 306 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), en el centro 5.

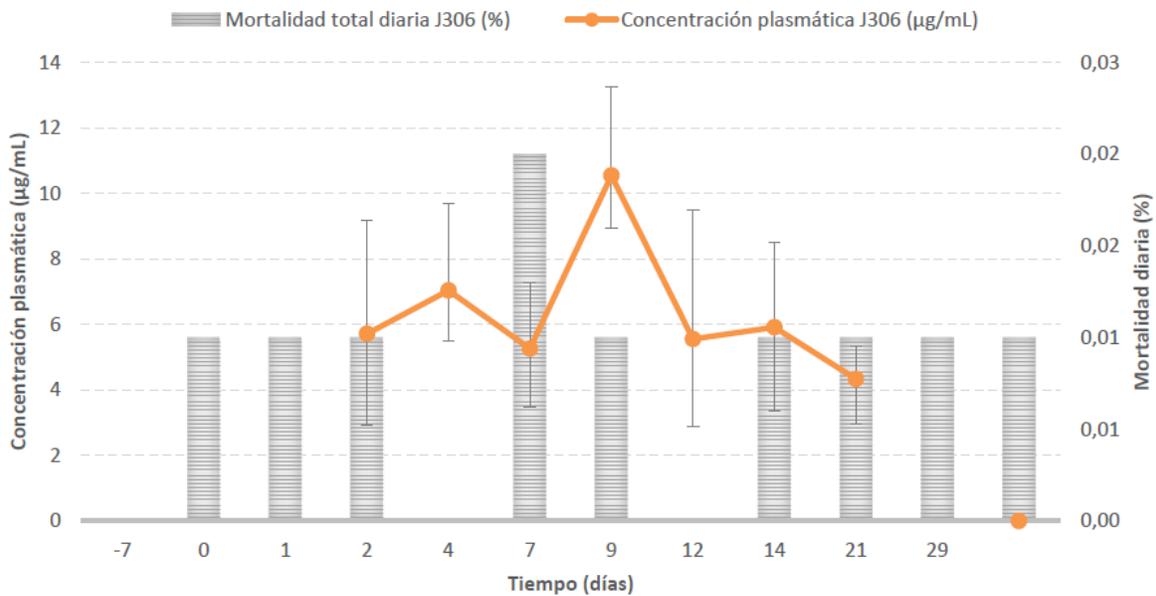


Gráfico 12: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 306 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), en el centro 5.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	20 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	FAV
Inicio tratamiento	14-06-2018
Término tratamiento	27-06-2018

1.10.6. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 6

El gráfico 13 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 3 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 6.

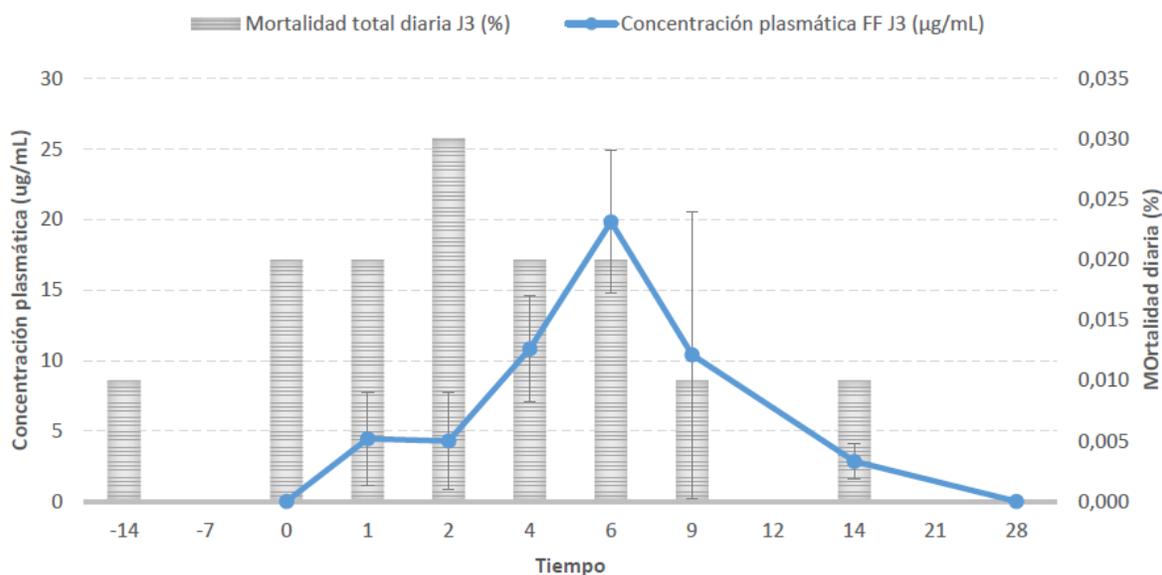


Gráfico 13: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 3 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 6.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	18 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Centrovét
Inicio tratamiento	13-06-2018
Término tratamiento	26-06-2018

El gráfico 14 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 6 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 6.

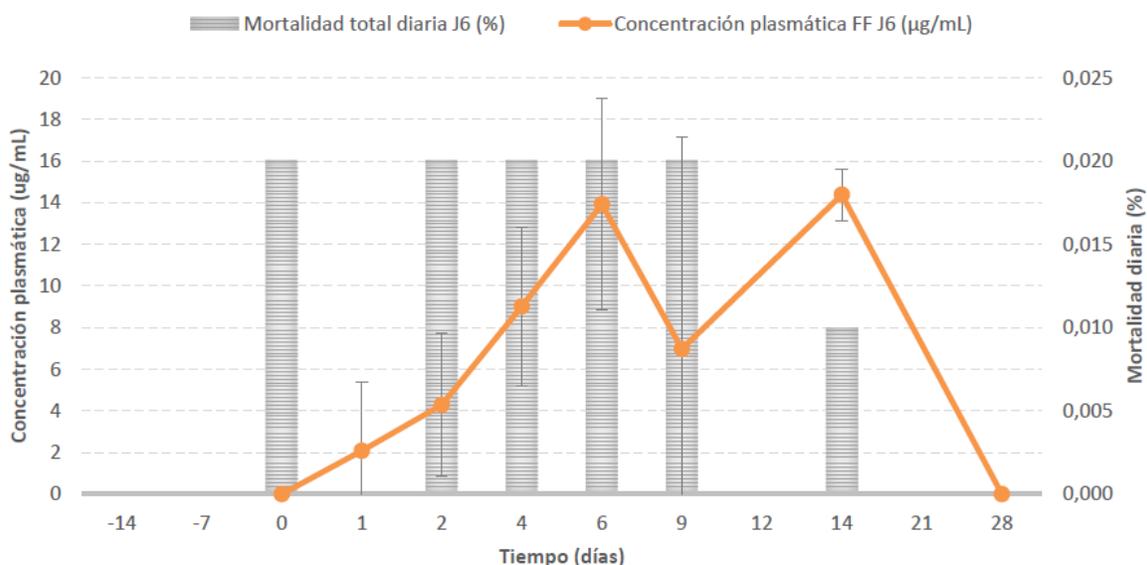


Gráfico 14: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 6 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 6.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	18 mg/Kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Centrovét
Inicio tratamiento	13-06-2018
Término tratamiento	26-06-2018

1.10.7. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 7

El gráfico 15 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 108 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 7.

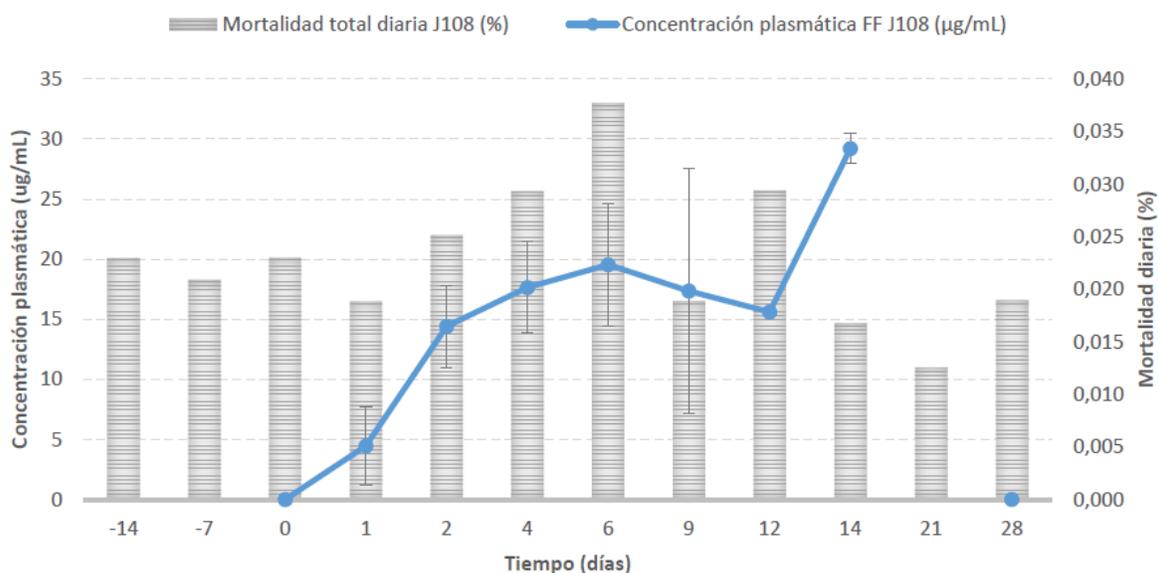


Gráfico 15: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 108 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 7.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	15 mg/kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Centrovvet
Inicio tratamiento	24-08-2018
Término tratamiento	10-09-2018

El gráfico 16 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 110 en grupos dirigidos durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 7.

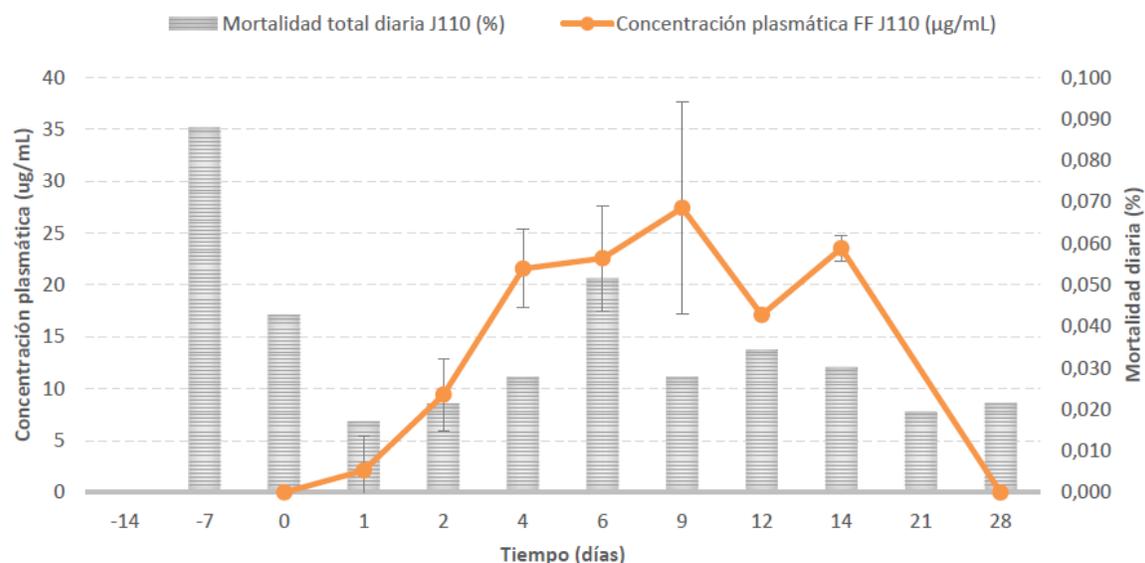


Gráfico 16: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 110 en grupos dirigidos durante el seguimiento realizado en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en el centro 7.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	15 mg/kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Centrovét
Inicio tratamiento	24-08-2018
Término tratamiento	10-09-2018

1.10.8. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 8

El gráfico 17 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 106 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), en el centro 8.

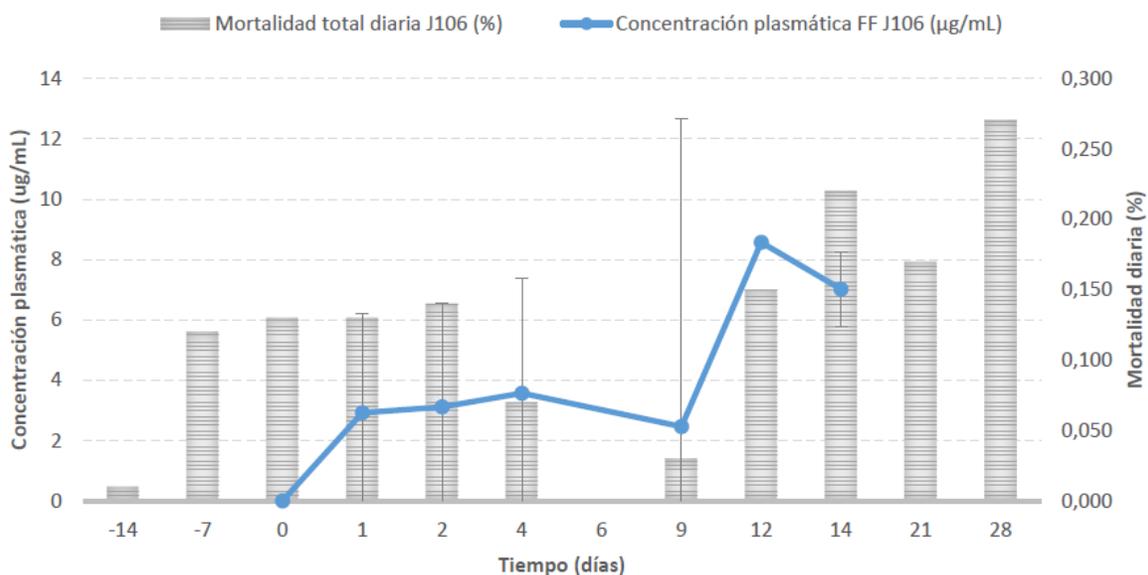


Gráfico 17: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 106 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), en el centro 8.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	16 mg/kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Centrovét
Inicio tratamiento	25-08-2018
Término tratamiento	05-09-2018

El gráfico 18 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 108 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), en el centro 8.

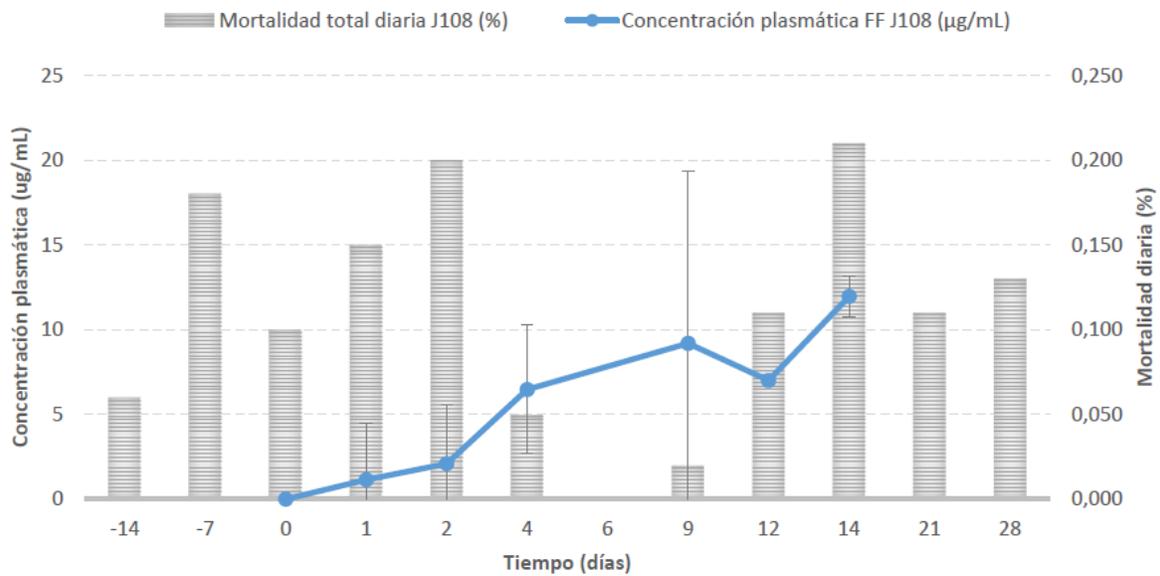


Gráfico 18: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 108 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), en el centro 8.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	16 mg/kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Centrovét
Inicio tratamiento	25-08-2018
Término tratamiento	05-09-2018

1.10.9. Determinación de la concentración antimicrobiana centro 9

El gráfico 19 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 101 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en el centro 9.

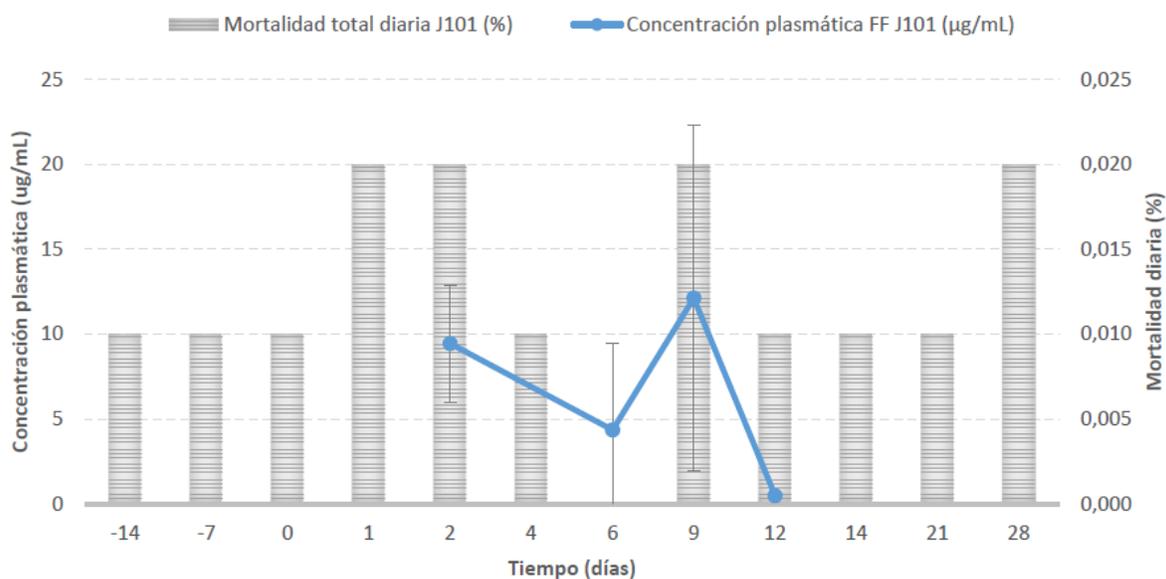


Gráfico 19: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 101 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en el centro 9.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	16 mg/kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Centrovét
Inicio tratamiento	25-08-2018
Término tratamiento	10-09-2018

El gráfico 20 muestra la correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 108 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en el centro 9.

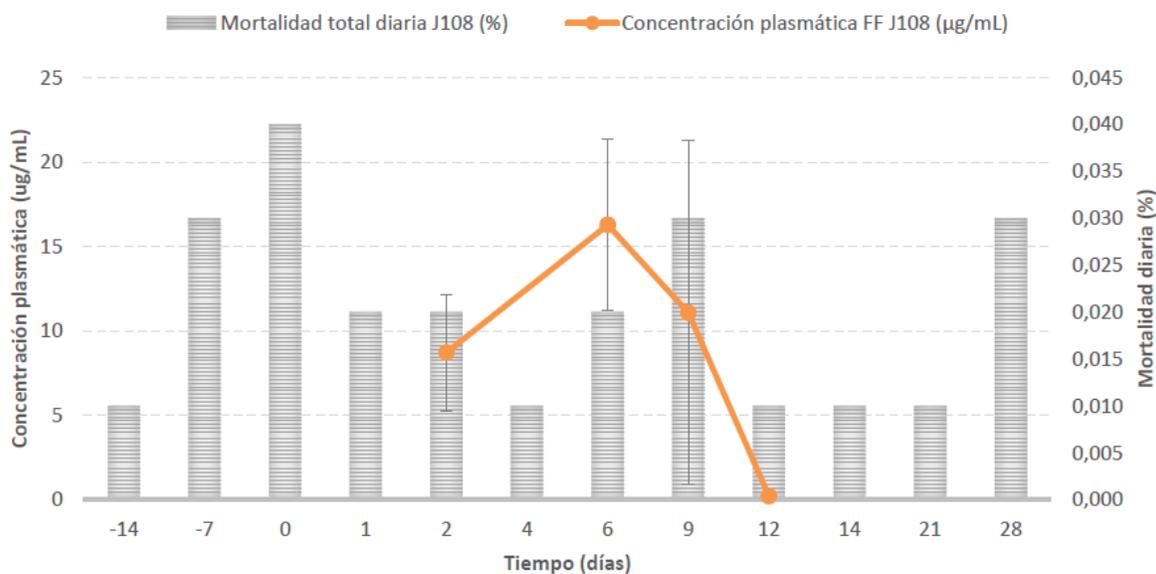


Gráfico 20: Correlación entre la mortalidad total y las concentraciones plasmáticas de Florfenicol obtenidas en la jaula 108 en grupos aleatorios durante el seguimiento realizado en peces Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en el centro 9.

Principio activo	Florfenicol
Vía	Oral
Dosis	16 mg/kg
Producto	Florfenicol 50%
Laboratorio	Centrovét
Inicio tratamiento	25-08-2018
Término tratamiento	10-09-2018

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los grupos de peces evaluados evidenciaron una disminución o ausencia de peces dirigidos orillados durante o posterior al tratamiento en los centros de cultivo, tratados con Florfenicol u Oxitetraciclina, en las tres especies muestreadas durante el estudio.

A la necropsia de los peces se observó una disminución de la signología clínica de Piscirickettsiosis en grupos de peces dirigidos y aleatorios, tratados con Florfenicol u Oxitetraciclina, en las tres especies muestreadas durante el estudio.

A la evaluación de la mortalidad se observó post tratamiento una disminución de la mortalidad en 4 de los 9 centros de cultivo (Centros 2, 3, 4, 5), un aumento de la mortalidad en 3 de 9 centros de cultivo (Centros 1, 8, 9), y no se observaron cambios de frecuencia en la mortalidad en 2 de 9 centros de cultivo (Centros 6, 7).

Entre los principales hallazgos histopatológicos se observó una disminución en la frecuencia de hepatitis granulomatosa, crónica, pos tratamiento en 5 de 9 centros de cultivos analizados (Centros 1, 2, 4, 6, 9). Adicionalmente, no se observan cambios en la frecuencia de este hallazgo histopatológico en 4 de 9 centros de cultivos analizados (Centros 3, 5, 7, 8). A esto último, cabe destacar que se observó una baja frecuencia de hallazgos histopatológicos durante el seguimiento en este grupo de centros. Los hallazgos histopatológicos se encuentran restringidos a centros que presentan signos clínicos macroscópicos. Aquellos en los cuales se realizó terapia temprana (solo con diagnóstico de laboratorio) en general no fue posible observar signos clínicos y/o hallazgos histopatológicos debido a que los tratamientos se realizaron con criterio de detección por PCR.

El levantamiento de patógenos endémicos en realizado en los centros de cultivo por medio de PCR/RT-PCR evidencia la presencia de *Renibacterium salmoninarum* agente causal de la Renibacteriosis en 3 de 9 centros de cultivo (Centros 1, 7, 9), *Nucleospora salmonis* agente causal de la Microsporidiosis en 1 de 9 centros de cultivo (Centro 5), *Paramoeba perurans* y *Tenacibaculum maritimum* agentes causales de Enfermedad amebiana de las branquias (AGD) y Tenacibaculosis en 1 de 9 centros de cultivo (Centro 7). Se debe considerar que es posible que la presencia de estos patógenos tenga un rol en el aumento o mantención de la mortalidad post tratamiento antimicrobiano. Debido a que el objetivo fue evaluar en condiciones de campo los esquemas terapéuticos, se recomienda en el futuro considerar y determinar la significancia de infecciones concomitantes como factor de riesgo.

El seguimiento de *Piscirickettsia salmonis* por medio de PCR realizado en los centros de cultivo evidencia una disminución de la frecuencia de positivos en grupos de peces dirigidos y aleatorios, tratados con Florfenicol u Oxitetraciclina, en las tres especies muestreadas durante el estudio.

Adicionalmente, los resultados positivos post tratamientos fueron asociados a bajas cargas bacterianas.

Se logró el aislamiento de *Piscirickettsia salmonis* en agar APS en 5 de 9 centros de cultivo (Centro 1, 3, 4, 5), mientras que los otros centros resultaron negativos principalmente asociado a la baja signología clínica observada en los peces muestreados durante el seguimiento (Centro 2, 6, 7, 8). Se debe considerar de forma complementaria que no es esperable una 100% correlación entre los resultados de PCR, signos clínicos, hallazgos histopatológicos y aislamientos, debido a variables de campo que influyen en los aislamientos como la temperatura, condiciones al momento de la toma de muestra, tiempo de transporte al laboratorio, etc.

El cumplimiento del consumo medicado evidencia un óptimo consumo en 6 de 9 centros de cultivo (Centros 3, 4, 6, 7, 8, 9). Mientras que en 3 de 9 centros de cultivo se observa un consumo deficiente en la administración del alimento medicado (Centros 1, 2, 5). Se recomienda considerar el consumo de alimento como una de las variables a considerar en futuras evaluaciones de campo, particularmente para antibióticos como la oxitetraciclina.

Las concentraciones plasmáticas observadas en 3 de 9 centros de cultivo alcanzaron los niveles establecidos en la prescripción original (Centros 3, 6, 7). Mientras que las concentraciones plasmáticas observadas en 6 de 9 centros de cultivo presentaron entre un 20% a un 50% aproximado bajo al target (Centros 1, 2, 4, 5, 8, 9). Adicionalmente, cabe destacar que las concentraciones plasmáticas alcanzadas por los centros 4 y 2 se encuentran sustancialmente más bajas. Particularmente en el centro 4, el cual corresponden a oxitetraciclina debido a su óptimo consumo de alimento medicado, y a pesar de su baja biodisponibilidad, se debe considerar complementar este hallazgo con los niveles de antibiótico alcanzados en el alimento medicado administrado.

Adicionalmente, el seguimiento realizado en el centro 2 evidencia una menor concentración plasmática de antimicrobiano en el grupo de peces dirigidos en comparación con el grupo de peces aleatorios, lo cual fue asociado a la baja en la actividad.

Las concentraciones plasmáticas registradas en 5 de 9 centros de cultivo fueron cercanas a los 15 ug/mL (3, 6, 7, 1, 9), mientras que en 2 de 9 centros se registraron concentraciones plasmáticas cercanas a los 10 ug/mL (5, 8). Por otro lado, cabe destacar que las concentraciones plasmáticas registradas en los centros 2 y 6 se encuentran sustancialmente más bajas en comparación con el resto de los centros. En función de esto, se debe considerar complementar este hallazgo con los niveles de antibiótico alcanzados en el alimento medicado administrado, así como con otras variables de importancia (consumo de alimento, biodisponibilidad del fármaco, absorción, entre otras).

Además, el seguimiento realizado en el centro 2 evidencia una menor concentración plasmática de antimicrobiano en el grupo de peces dirigidos en comparación con el grupo de peces aleatorios, lo cual fue asociado a la baja en la actividad asociada a la presencia de signos clínicos. La recolección de

peces dirigidos fue realizada solo en un centro debido a la ausencia de peces dirigidos en las jaulas o a la dificultad operativa y logística asociada a la recolección del grupo objetivo. Adicionalmente, con la finalidad de incentivar la participación de las empresas, se consideró eliminar la toma de muestras en grupos de peces dirigidos en tratamientos terapéuticos que fueran realizados en centros sobre 2 kilos de peso promedio.

Los resultados de campo son considerados un complemento a los resultados obtenidos en condiciones controladas y confirman las recomendaciones dadas en este estudio.

CONCLUSIONES

1. Los tratamientos realizados en campo contra Piscirickettsiosis fueron eficaces en disminuir la frecuencia de signos clínicos macroscópicos y hallazgos histopatológicos, en las tres especies en estudio, tratadas con florfenicol u oxitetraciclina.
2. Los grupos de peces que alcanzaron y mantuvieron altas concentraciones plasmáticas de florfenicol ($\geq 4 \mu\text{g/ml}$) y oxitetraciclina ($\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$) presentaron tratamientos terapéuticos más eficaces en términos de mortalidad y disminución de signos clínicos. Mientras que bajas concentraciones plasmáticas de florfenicol ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$) presentaron en general mayor mortalidad.
3. Peces orillados o moribundos presentaron bajas concentraciones plasmáticas de antibiótico. Lo que indica un bajo consumo de alimento medicado y una condición sanitaria desmejorada asociado a la presencia de signos clínicos de Piscirickettsiosis.
4. Los centros tratados de forma temprana contra cuadros de Piscirickettsiosis presentan menos mortalidad en comparación con centros que inician el tratamiento asociado a un aumento de mortalidad. Tratamientos contra Piscirickettsiosis en centros con baja mortalidad presentan en su evolución menor peak de mortalidad y menor mortalidad acumulada.
5. Se observa una alta correlación entre la aparición de signos clínicos y el diagnóstico de laboratorio para la detección de *Piscirickettsia salmonis*.
6. La información recopilada de tratamientos terapéuticos realizados con oxitetraciclina contra Piscirickettsiosis es escasa, debido a su baja frecuencia de uso. Se debe considerar incrementar el tiempo de seguimiento en futuros estudios con la finalidad de incrementar el número de centros.

RECOMENDACIONES

1. Mantener un programa de vigilancia sanitaria que permita diagnosticar el cuadro clínico de Piscirickettsiosis de forma temprana por medio de necropsia y/o diagnóstico de laboratorio, el cual debe intensificarse en frecuencia durante periodos de mayor riesgo para la presentación de la enfermedad (primavera/verano).
2. El diagnóstico clínico en peces de la mortalidad o moribundos orillados mediante necropsia es una herramienta simple y rápida de diagnóstico temprano.
3. Considerar la aplicación de tratamientos terapéuticos tempranos contra Piscirickettsiosis en centros diagnosticados por medio de necropsia y/o diagnóstico de laboratorio, considerando:
 - i) Celeridad en la toma de decisiones, y
 - ii) Favorecer la logística que permite disponer de forma temprana del alimento medicado.
4. Desestimar el incremento de mortalidad como un parámetro para la toma de decisión en la aplicación de tratamientos terapéuticos temprano.

5. Considerar el raleo o extracción de peces moribundos orillados previo, durante y posterior al tratamiento terapéutico con la finalidad de eliminar peces con poca posibilidad de sobrevivir y/o respuesta terapéutica favorable.
6. Verificar y vigilar el cumplimiento del consumo de alimento medicado por unidad de cultivo durante el tratamiento.

OBJETIVO 4: IDENTIFICAR Y EVALUAR EN CONDICIONES DE CAMPO LAS VARIABLES AMBIENTALES, CLIMÁTICAS Y SANITARIO-PRODUCTIVAS QUE DETERMINAN EL ESQUEMA TERAPÉUTICO INSTAURADO POR EL MÉDICO VETERINARIO.

Nota: Todos los anexos de este objetivo se encuentran en la sección “Anexos Objetivo 4”.

RACIONALIDAD

Las poblaciones de salmones están expuestas a infectarse y enfermarse por *Piscirickettsia salmonis*, agente que existe en forma natural en el ambiente marino. Por ello, las empresas establecen medidas para prevenir la generación de infección y brotes de la enfermedad, tales como la vacunación de los peces antes de ingresar al mar y de medidas de bioseguridad. Estas medidas no son suficientes, y es altamente probable que las poblaciones de peces se infecten y enfermen con dicha enfermedad por sobre lo aceptable. Para mitigar el impacto productivo y económico de esta enfermedad, las empresas aplican tratamientos con antibióticos a las poblaciones de peces afectados.

Los tratamientos corresponden a una decisión que toma la empresa para controlar la presencia de infección y/o enfermedad. Esta decisión de iniciar el tratamiento, así como cuál esquema terapéutico utilizar, estará influenciado por determinantes ambientales, productivos y sanitarios, más allá de lo que estipule el fabricante del producto farmacéutico o lo que establezca un manual de buenas prácticas o lo que indique la normativa vigente.

Por la naturaleza de la enfermedad y las opciones que implica el esquema terapéutico, es de esperar que haya una alta variabilidad, la cual influirá en cómo se toma dicha decisión.

Una vez tomada la decisión, la implementación del esquema terapéutico escogido también puede estar influenciado por los determinantes que condicionaron la decisión. Los mismos determinantes pueden afectar también la enfermedad, aumentando su frecuencia, distribución y severidad. Así, la eficacia de un tratamiento estará directa o indirectamente afectada por determinantes ambientales, productivos y sanitarios.

Conocer estos determinantes y cómo influyen en el esquema terapéutico y su eficacia, permitirá manejar de mejor forma la enfermedad y, con ello, obtener un mejor tratamiento y mayor éxito terapéutico. De esta manera, se podrán entregar a la autoridad sanitaria y a los productores mejores y pertinentes recomendaciones.

La racionalidad de las decisiones en los tratamientos y su relación con la eficacia terapéutica, así como los determinantes que influyen en ellos, se muestran en la Figura 1.

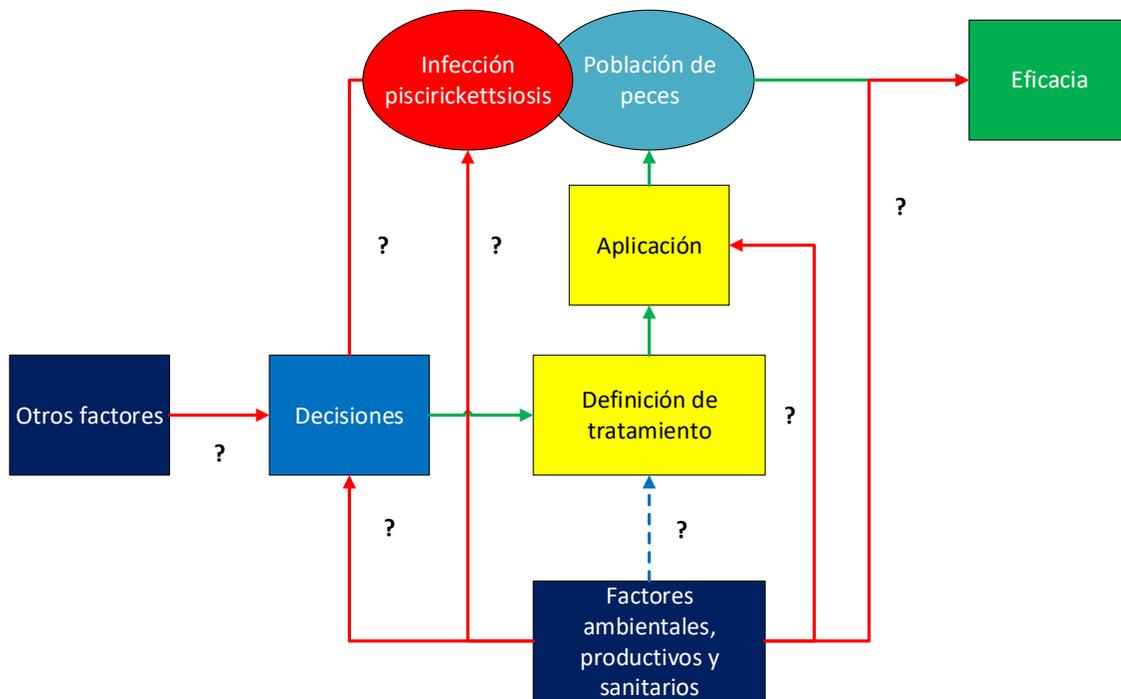


Figura 1: Racionalidad de la aplicación de tratamientos contra piscirickettsiosis.

COMPONENTES

Para el logro del objetivo se establecieron los siguientes componentes:

- A. Construcción de un modelo conceptual de decisiones para los principales esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis y jerarquización de los determinantes que condicionan su elección.
- B. Caracterización de los esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis, así como los determinantes que condicionan su elección.
- C. Evaluación de los esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis asociados a eficacia del tratamiento.

METODOLOGÍA

Construcción de un modelo conceptual de decisiones para los principales esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis y jerarquización de los determinantes que condicionan su elección.

La construcción del modelo conceptual de decisiones para los principales esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis, se realizó mediante la aplicación de una entrevista semi-estructurada y una encuesta dirigida a algunos de los tratamientos realizados por 9 empresas participantes del proyecto. Fueron identificados los principales nodos de decisión¹ y sus principales determinantes (factores que influyen en las decisiones). El modelo de decisión fue validado junto a los equipos técnicos de las empresas participantes y los determinantes identificados fueron jerarquizados, de acuerdo a la importancia relativa al momento de tomar la decisión de escoger un esquema terapéutico.

Además, las empresas identificaron y jerarquizaron los factores que determinan la eficacia de un tratamiento². Para apoyar los procesos de jerarquización, se realizó un análisis jerárquico (AHP)³ que permitió comparar entre sí las respuestas de los participantes utilizando el software Expert Choice®. Esto se complementó con la realización de un ranking de aquellos determinantes que se consideraron para tomar las decisiones en el seguimiento que se les hizo a algunos de los tratamientos durante el 2018⁴.

Caracterización de los esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis, así como los determinantes que condicionan su elección.

Análisis retrospectivo

Se utilizaron bases de datos oficiales de tratamientos, mortalidades semanales, recuento de cáligos y biomasa cosechada, para los años 2014 hasta el primer semestre del año 2018, facilitadas por el Sistema de Fiscalización de la Acuicultura (SIFA) del Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). Los registros fueron estructurados en base a los tratamientos en forma individual y en base a tratamientos dentro de un ciclo productivo para cada uno de los centros de producción. Un tratamiento se definió como un evento en el cual se administra antibiótico contra *Piscirickettsia salmonis* en una o más jaulas de un centro y corresponde a la receta que el médico veterinario ingresa al sistema SIFA. Un ciclo productivo corresponde al tiempo comprendido entre el inicio de la siembra y la finalización de la cosecha de un centro. Para este nivel de estudio, se analizaron todos los

¹ Decisiones que se toman durante un evento de tratamiento contra piscirickettsiosis.

² Se define como tratamiento eficaz al tratamiento que los expertos consideraron que cumplió el objetivo esperado.

³ *Analytic Hierarchy Process*.

⁴ Se entrega detalle en los resultados.

tratamientos que ocurrieron en ciclos terminados, creando variables particulares a nivel de ciclo.

Se evaluaron tratamientos orales e inyectables contra piscirickettsiosis con los principios activos florfenicol y oxitetraciclina, para las tres especies productivas (Salmón del Atlántico, Salmón Coho y Trucha Arcoíris) de la X y XI Región (Tabla 1). No se consideró la Región de Magallanes, ya que no presentó tratamientos orales en agua de mar contra piscirickettsiosis dentro de los años contemplados en este estudio.

Se eliminaron registros inválidos, registros correspondientes a centros reproductores y de tratamientos orales con duración menor a 10 días. Se realizó la corrección de variables fuera de rango y el compendio de registros correspondientes al mismo tratamiento. Se corroboraron y completaron datos faltantes a partir de los registros de mortalidad y consulta a algunas empresas.

Tabla 1: Número de tratamientos analizados a partir del Sistema de Fiscalización de la Acuicultura (SIFA) entre los años 2014 al primer semestre del año 2018 .

VARIABLE	2014	2015	2016	2017	2018	Total
Tratamientos orales	508	1.197	803	951	497	3.956
Tratamientos inyectables	59	269	375	372	99	1.174
Total tratamientos	567	1.466	1.178	1.323	596	5.130
Empresas	19	22	20	21	20	22
Centros	161	327	246	242	169	457
Ciclos	155	204	171	152	82	764

Análisis prospectivo

Se siguieron tratamientos contra piscirickettsiosis en centros de Salmón del Atlántico que fueron ocurriendo durante enero a octubre del año 2018, informados como representativos por las empresas participantes. A través de una encuesta de seguimiento, se obtuvo información sobre el esquema terapéutico utilizado, factores ambientales, factores preventivos, fechas e hitos relacionados con la decisión, factores que pudieran afectar el tratamiento no disponible en SIFA, como estrés de los peces (p.e. depredadores y enfermedades concomitantes) y eventos de interrupción o disminución de consumo de alimento. Se recolectó información de 91 tratamientos, de 54 centros y 1.054 jaulas.

Definición de variables

La

Tabla 2 muestra las variables que componen el esquema terapéutico y la Tabla 3 muestra las variables consideradas determinantes del esquema terapéutico, ambas utilizadas, cuando existiese la información para generarlas, para el análisis retrospectivo y prospectivo.

Tabla 2: Componentes del esquema terapéutico y variables analizadas.

COMPONENTES DEL ESQUEMA TERAPEUTICO	VARIABLE A ANALIZAR			
Momento en el que se inicia el tratamiento	Mortalidad por SRS al inicio del tratamiento	Mortalidad SRS+SCA al inicio del tratamiento	Mortalidad Total al inicio del tratamiento	
Cobertura de las jaulas tratadas	Centro completo		Jaula a jaula	
Vía administración	Oral		Inyectable	
Antibiótico	Florfenicol		Oxitetraciclina	
Dosis	Oral Florfenicol: Mediana y categorías 10, 15, 20, y >20	Oral Oxitetraciclina: Mediana y categorías 75, 100, y >100	Inyectable Oxitetraciclina: Mediana y categorías 25, 30, 35, y >35	
Duración	Oral: Mediana y categorías			
Estrategia de alimentación	1 ración	2 raciones	3 raciones	Microraciones

Tabla 3: Determinantes asociados a la elección del esquema terapéutico y variables analizadas.

DETERMINANTES	VARIABLE A ANALIZAR
Ambientales	Temporada
	Región y macrozona
	Eventos de suspensión de alimentación: lobo, FAN, mal clima, otros.
	Eventos de disminución del consumo de alimento: lobo, FAN, mal clima, otros.
Productivas	Especie
	Peso promedio al tratamiento
Sanitarias	Conteo de cáligos (hembras ovígeras) antes del tratamiento

Descripción y análisis de los datos

Para ambos estudios se describieron las variables en base a frecuencia y medidas de posición central (medianas⁵) y de dispersión (cuartil 1 y 3). La asociación entre variables se midió utilizando regresión logística fundamentalmente y otros tipos de regresiones de acuerdo a la distribución de la variable, con un valor de significancia $\leq 0,05$.

Evaluación de los esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis asociados a eficacia del tratamiento

Se exploraron diferentes definiciones de eficacia del tratamiento para evaluar los esquemas terapéuticos con mejores resultados y los determinantes que los condicionaban.

Eficacia a nivel de tratamiento

A nivel del tratamiento, la eficacia se midió a través de la mortalidad:

- A. En base al valor de la mortalidad por SRS (piscirickettsiosis) que se espera tener dos semanas post tratamiento en las jaulas tratadas, de acuerdo a un panel de expertos conformado por los equipos de salud⁶. Los puntos de corte que indicaban eficacia fueron:
 - Un punto de corte moderado, con una mortalidad menor o igual a 0.016% diario (0,11% semanal)⁷.
 - Un punto de corte estricto con una mortalidad de 0.010% diario (0,07% semanal)⁸.Además de estos puntos de corte, la mortalidad dos semanas post tratamiento debía ser menor que la mortalidad al inicio del tratamiento.
- B. En base a la reducción de la mortalidad por SRS más la sin causa aparente (SCA) entre el inicio del tratamiento y dos semanas post tratamiento en las jaulas tratadas. El punto de corte que indicaba eficacia en el tratamiento fue una reducción mayor o igual a un 50%⁹.

Eficacia a nivel de ciclo

Se definió la eficacia de un ciclo productivo en base al número de tratamientos que se realizaba en él. Los ciclos se clasificaron según dos puntos de corte:

⁵ Se utilizaron medianas ya que presentan una menor influencia de los valores extremos, siendo más representativas de la población, sobre todo en distribuciones de datos que no se ajustan a la normalidad.

⁶ 15 Médicos veterinarios pertenecientes a los equipos de salud de 9 de las empresas más importantes de la industria.

⁷ Corresponde a la mediana de los valores entregados por los expertos.

⁸ Corresponde al menor valor de la dispersión (cuartil 1) de los valores entregados por los expertos.

⁹ Esta definición se estableció modelando la mortalidad de las jaulas tratadas en base a información del SIFA entre 2014-2018.

- Según certificación ASC Salmon Standard¹⁰, que establece por ciclo un límite máximo 3 de tratamientos, diferenciándose en ciclos con ≤ 3 tratamientos y > 3 tratamientos.
- Según la mediana obtenida en los datos SIFA 2014-2018, que corresponde a 6 tratamientos por ciclo, diferenciándose en ciclos con ≤ 6 tratamientos y > 6 tratamientos.

Análisis de datos

Para la evaluación de los esquemas terapéuticos que fueron eficaces, se utilizaron modelos uni y multivariados, empleando métodos de regresión logística. En el caso del análisis multivariado se incluyeron las variables que tenían una significancia $\leq 0,2$ en el análisis univariado y se dejaron en el modelo aquellas con una significancia $\leq 0,05$. El modelo multivariado permitió analizar en forma conjunta las variables y ajustar por los determinantes ambientales, productivos o sanitarios que pudieran afectar el esquema terapéutico. El grado de importancia se mostró través de la medida de riesgo OR (Odds Ratio). El software utilizado fue STATA/SE 14®.

RESULTADOS

Construcción de un modelo conceptual de decisiones para los principales esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis y jerarquización de los determinantes que condicionan su elección.

Construcción de un marco conceptual para la aplicación de un tratamiento contra piscirickettsiosis

El modelo decisional para un tratamiento oral contra piscirickettsiosis tiene 11 nodos de decisión ordenados de forma cronológica (Figura 2). Los nodos son detallados en el Anexo 1.1 a 1.12.

¹⁰ Según *ASC Salmon Standard by Aquaculture Stewardship Council v1.1-April 2017* (disponible en https://www.asc-aqua.org/wp-content/uploads/2017/07/ASC-Salmon-Standard_v1.1.pdf).

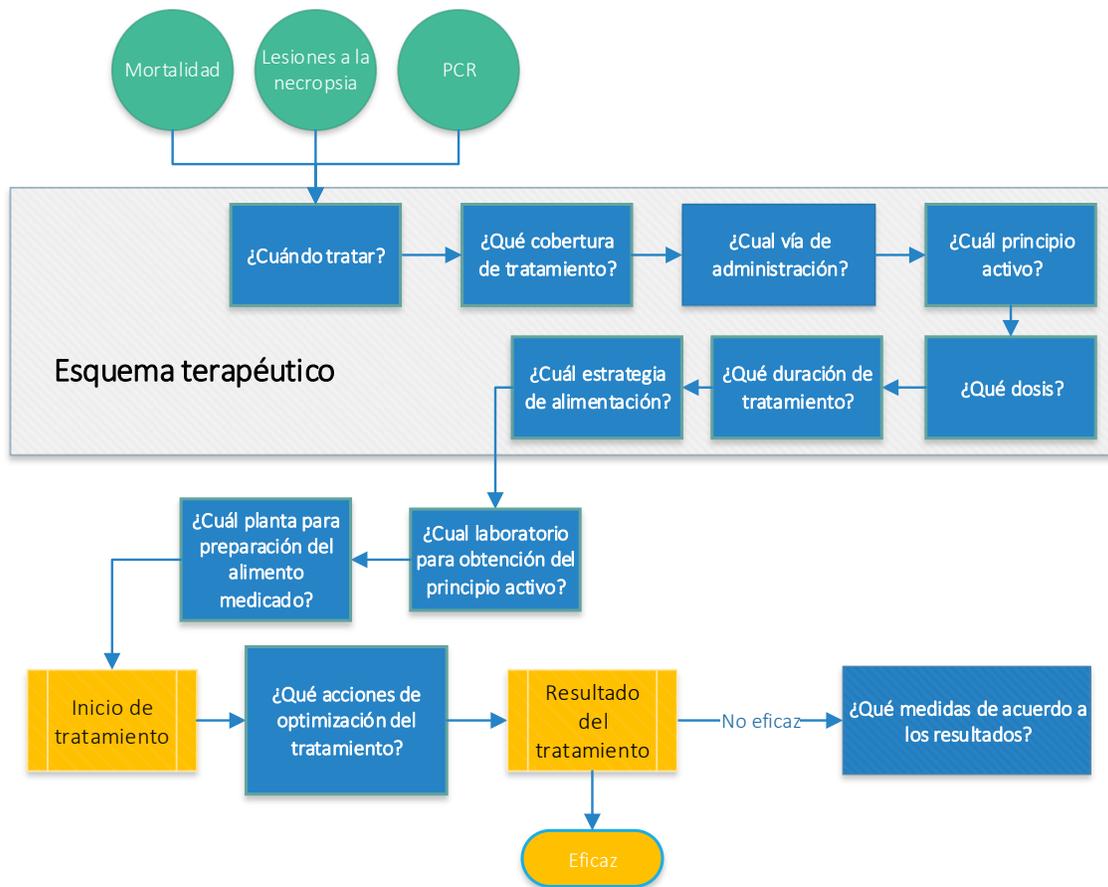


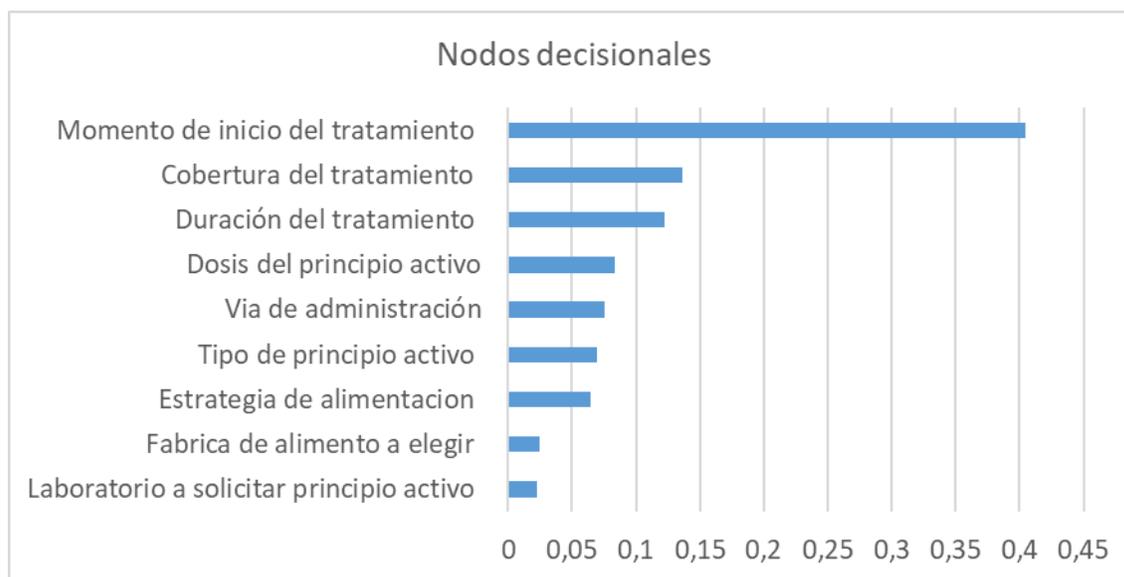
Figura 2. Modelo conceptual de decisiones.

Nodos decisionales

En el Gráfico 1 se muestra el nivel de importancia que le dan los especialistas a los diferentes componentes del esquema terapéutico. Destaca la variable “momento de inicio del tratamiento” que alcanza la mayor proporción, cercana al 40%.

Lo que menos condiciona la eficacia sería el laboratorio y la planta de alimento. Esto debido a que según las empresas existe confianza en la producción de los fármacos y que el origen de las materias primas no varía mucho. Por otra parte, las fábricas de alimentos y las mismas empresas realizan controles de la cantidad de principio activo en los pellets de alimento medicado. El tiempo y forma de almacenamiento del medicado, así como la biodisponibilidad del principio activo según la formulación del alimento, son temas que la industria considera que pueden influir en la eficacia pero que no existe conocimiento suficiente para llegar a un consenso.

Gráfico 1. Nivel de importancia de los nodos de decisión para obtener un tratamiento eficaz¹¹



Determinantes de la decisión

La Tabla 4 muestra los principales determinantes identificados para cada uno de los nodos de decisión del esquema terapéutico.

Se entrega el valor adjudicado por los especialistas como resultado del Expert Choice (de 0 a 1), teniendo valor 1 la sumatoria de todos los determinantes de un nodo. Se observa que, para todos los nodos, los dos primeros determinantes en forma conjunta tienen más del 50% de las preferencias. En todos los nodos se alcanza un alto nivel de consistencia entre los expertos participantes ($\leq 0,06$).

En la misma tabla se muestra el ranking de los determinantes, obtenido del seguimiento de tratamientos durante 2018, con alto nivel de concordancia con los resultados del Expert Choice.

Tabla 4. Jerarquización de determinantes según nodo decisional.

NODO DECISIONAL DEL ESQUEMA TERAPEUTICO	DETERMINANTES	EXPERT CHOICE	SEGUIMIENTO 2018
		Jerarquización	Ranking de importancia
Inicio de tratamiento contra piscirickettsiosis	Aumento de mortalidad	0,246	2
	Lesiones a la necropsia	0,225	1
	Susceptibilidad previa de los peces	0,134	3

¹¹ Se define como tratamiento eficaz al tratamiento que los expertos consideraron que cumplió el objetivo esperado.

NODO DECISIONAL DEL ESQUEMA TERAPEUTICO	DETERMINANTES	EXPERT CHOICE	SEGUIMIENTO 2018
		Jerarquización	Ranking de importancia
	Temporada en que se encuentra el tratamiento	0,122	4
	Peso del pez	0,089	5
	Cepa de <i>Piscirickettsia salmonis</i> actuando	0,068	5
	Condición sanitaria de los centros vecinos	0,060	6
	Ventana de baños contra cáligus	0,056	-
Inconsistencia	0,01		
Cobertura de tratamiento	Cantidad de jaulas afectadas	0,580	1
	Periodo de carencia restante de las jaulas tratadas	0,199	3
	Susceptibilidad previa de los peces	0,151	2
	Certificaciones de la empresa	0,070	4
Inconsistencia	0,02		
Vía de administración	Peso de los peces	0,333	-
	Periodo de carencia restante de las jaulas tratadas	0,281	-
	Falla en el tratamiento oral anterior	0,281	-
	Susceptibilidad previa de los peces	0,105	-
Inconsistencia	0,04		
Principio activo	Peso de los peces	0,258	1
	Posibilidad de exceder el periodo de carencia	0,256	2
	Prohibición del uso del principio activo según mercado de destino	0,192	2
	Gravedad del cuadro	0,146	3
	Cepa de <i>Piscirickettsia salmonis</i> actuando	0,116	2
	Disponibilidad de compra del principio activo	0,031	3
Inconsistencia	0,06		
Dosis	Gravedad del cuadro	0,300	2
	Menor confiabilidad en la estimación de la biomasa a tratar	0,262	2
	Variaciones en la concentración del fármaco en el alimento	0,147	3
	Susceptibilidad previa de los peces	0,138	2
	Peso de los peces	0,113	3
	Dosis indicada por el registro	0,040	2

NODO DECISIONAL DEL ESQUEMA TERAPEUTICO	DETERMINANTES	EXPERT CHOICE	SEGUIMIENTO 2018
		Jerarquización	Ranking de importancia
Inconsistencia	0,04		
Duración del tratamiento	Gravedad del cuadro	0,509	2
	Menor confiabilidad en la estimación de consumo de alimento medicado	0,162	3
	Susceptibilidad previa de los peces	0,151	2
	Peso de los peces	0,134	2
	Duración de tratamiento indicada por el registro	0,045	3
Inconsistencia	0,02		
Estrategia de alimentación	Forma de entrega del alimento que se venía utilizando	0,732	1
	Equipo de alimentación del centro no permite cambios	0,167	2
	Disponibilidad de personal calificado para alimentación	0,101	2
Inconsistencia	0,05		

Se observa que para decidir cuál esquema terapéutico usar los determinantes más importantes en términos generales son los relacionados con la magnitud del cuadro y el peso del animal, este último en el sentido de evitar tratar a cierta edad para no tener residuos de antibióticos que pudieran ser una restricción para el mercado. Aunque no fue incluido en los determinantes, los participantes indicaron además la importancia que tenía la política de la empresa en la decisión del tratamiento y particularmente, del esquema terapéutico como un todo, lo cual podría tener enorme influencia en la toma de decisión.

Para los expertos, un tratamiento eficaz está determinado principalmente por la decisión de cuándo iniciar un tratamiento, lo que concuerda con los resultados de los estudios controlados de los primeros objetivos. Se construyó un flujo de eventos (Figura 3) con tiempos aproximados de demora. Es interesante notar que entre que se detecta el problema hasta que toman la decisión de tratar puede pasar una semana o más, sin embargo, es muy corto el tiempo de aprobación del tratamiento, ya que los equipos veterinarios tienen autonomía la mayoría de las veces. Una excepción a esto son las situaciones en donde el tratamiento interfiere con lo comercial (mercado), acá los equipos de producción son los que toman la decisión y en algunos casos puede retrasarse. Lo que más pudiera demorar el inicio del tratamiento es la preparación del alimento medicado, a pesar que las empresas tienen contratos con las plantas de alimento, los cuales estipulan los días máximos que pueden tardar, en época de mayor demanda esto puede cambiar. El transporte es otro punto crítico, sobre

todo cuando es a la XI región o si hay puerto cerrado. Esto demuestra que, no solo son importantes las decisiones, sino que también hay factores comerciales, logísticos o medioambientales de menor control por parte de la empresa, que pueden incidir en el inicio oportuno de un tratamiento.

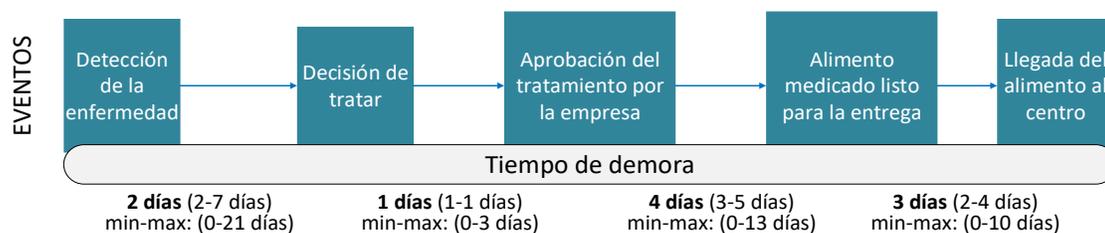


Figura 3. Línea de tiempo de eventos para iniciar un tratamiento¹².

Caracterización de los esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis, así como los determinantes que condicionan su elección.

Caracterización de los esquemas terapéuticos a nivel de tratamiento

La caracterización de los esquemas terapéuticos por especie se encuentra con un mayor detalle en Anexo 2.1.

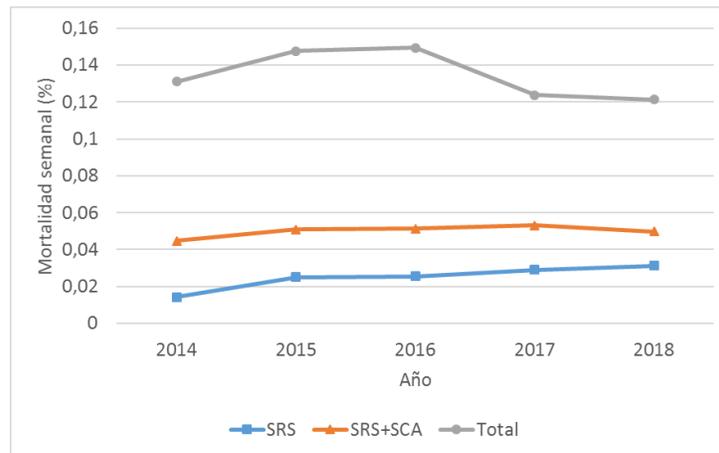
Mortalidad al inicio del tratamiento

La mortalidad con la que se inicia el tratamiento no se observa con cambios significativos cuando se analiza para el periodo 2014-2018 como bloque (Gráfico 2). Sin embargo, hay diferencias estadísticas cuando se analizan algunos años por especie y tipo de mortalidad (Anexo 2.2). El salmón del Atlántico tiene mayores mortalidades semanales por SRS al iniciar un tratamiento (0,031%), seguido por Trucha Arcoíris (0,019%) y Salmón Coho (0,002%). Estas mortalidades por SRS de inicio de tratamiento han aumentado significativamente para Salmón del Atlántico los últimos dos años, pero han disminuido de la misma forma para el resto de las especies. La mortalidad por SRS+SCA al inicio del tratamiento, que podría ser una mejor estimación, experimenta un descenso significativo en los últimos dos años para las tres especies, al igual que la mortalidad total, con la excepción que en esta última Salmon del Atlántico aumenta en el 2018.

La mortalidad al inicio del tratamiento según empresa presenta una alta variabilidad con valores de 0,009% semanal por SRS+SCA a 0,166%, el detalle se encuentra en Anexo 2.3.

¹² Mediana y dispersión, medido como cuartil 1- cuartil 3.

Gráfico 2. Mortalidad semanal (mediana) al inicio del tratamiento a través de los años, según tipo de mortalidad.

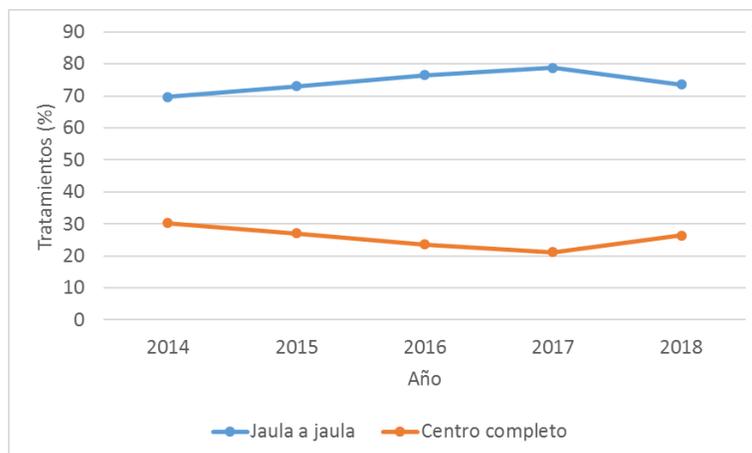


Cobertura del tratamiento

En todo el período se trata fundamentalmente jaula a jaula en todas las especies (Gráfico 3). En Salmón del Atlántico aumentó significativamente la tendencia de tratar jaula a jaula hasta el año 2017, sin embargo, en el 2018 disminuyó y tratar a centro completo aumentó en más de un 7% ($p=0,001$). Por el contrario, en Salmón Coho la tendencia a tratar a centro completo aumentó hasta el 2017, disminuyendo significativamente en el 2018. En Trucha Arcoíris la tendencia ha sido variable hasta el 2016, aumentando los dos últimos años. Los detalles por especie se detallan en Anexo 2.4.

La cobertura del tratamiento según empresa es variable, a pesar de que la gran mayoría trata en un mayor porcentaje jaula a jaula, existen empresas que tratan 100% jaula a jaula y otras a centro completo. Los detalles se encuentran en Anexo 2.5.

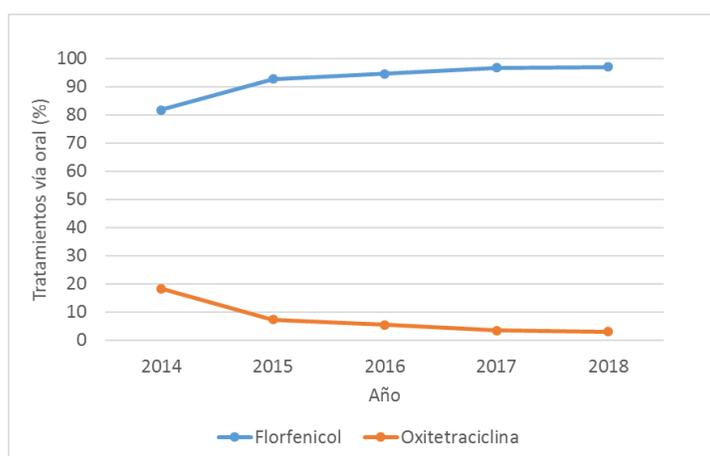
Gráfico 3. Porcentaje de tratamientos según cobertura realizados a través de los años.



Vía de administración y principio activo

La forma de administración más importante es la oral (77%). En los tratamientos orales el florfenicol es el más usado y ha ido aumentando con los años ($p=0,019$). Por el contrario, oxitetraciclina ha disminuido, llegando a un 3% el 2018 (Gráfico 4). Esta tendencia se ve reflejada en las tres especies, a excepción de la Trucha Arcoíris, que mostró una disminución en el porcentaje de uso de florfenicol en el 2018. El detalle por especie se muestra en el Anexo 2.6.

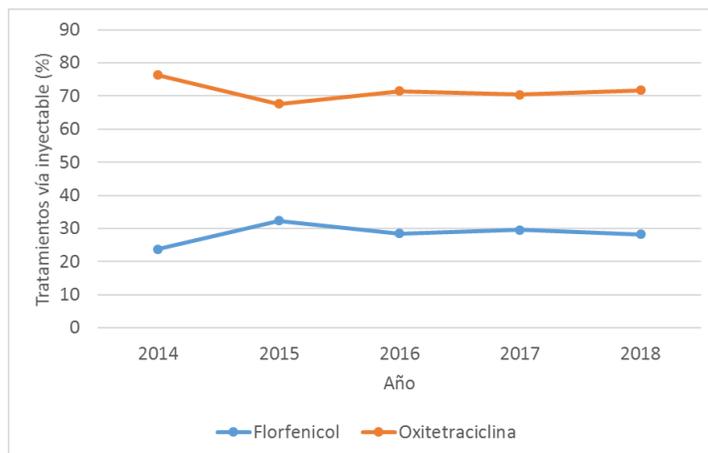
Gráfico 4. Porcentaje de tratamientos vía oral según principio activo utilizado en el tratamiento a través de los años.



Por la vía inyectable se administra fundamentalmente oxitetraciclina (71%) y partir del 2015 el uso de ambos principios activos se ha mantenido sin cambios ($p=0,083$) (Gráfico 5).

Es interesante destacar que a pesar de no existir un registro oficial de medicamentos para el uso de florfenicol inyectable y conocer el reducido tiempo de disponibilidad en el pez, este se utiliza y su aplicación no es menor. Los datos señalan un uso extra-etiqueta en 14 empresas diferentes, llegando a un porcentaje de un 30% de los tratamientos inyectables (Anexo 2.7). Las empresas reconocen este hecho y su uso está limitado la mayoría de las veces a situaciones complicadas de la enfermedad, en donde se inyecta primero y se trata en forma oral a continuación.

Gráfico 5. Porcentaje de tratamientos vía inyectable según principio activo utilizado en el tratamiento a través de los años



Dosis

La dosis de florfenicol oral ha ido disminuyendo ($p=0,000$), reduciendo las dosis máximas utilizadas de 35 a 40 mg/Kg que había en el 2014 a 25 mg/Kg en el 2018, concentrándose actualmente en dosis de 15 y 20 mg/Kg (Gráfico 6).

En el caso de la oxitetraciclina oral, la dosis no ha cambiado mucho con el tiempo, disminuyendo levemente ($p=0,010$) y concentrándose desde el 2017 en 100 mg/Kg (Gráfico 7).

Gráfico 6. Dosis de florfenicol oral utilizada según frecuencia de tratamientos por categoría (%) y mediana anual (mg/kg) a través de los años.

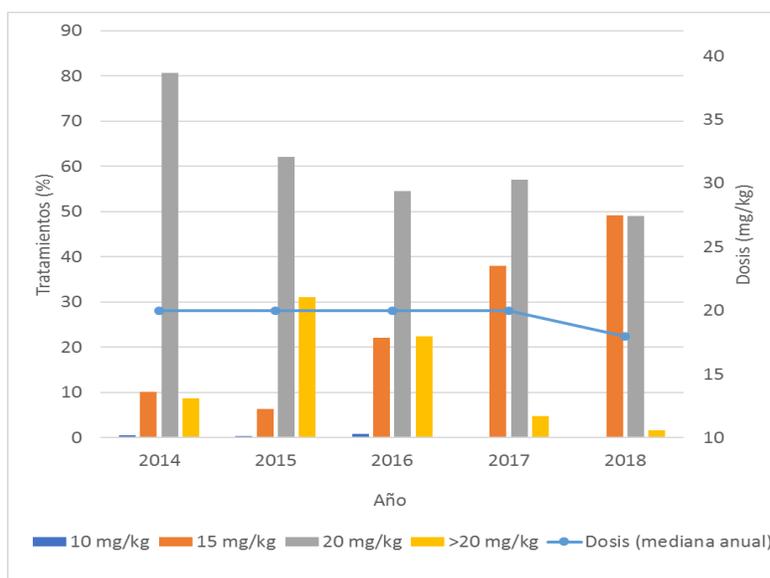
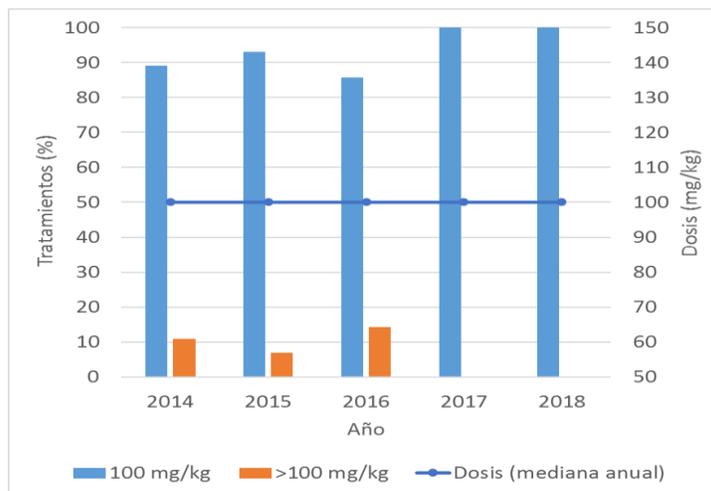


Gráfico 7. Dosis de oxitetraciclina oral utilizada según frecuencia de tratamientos por categoría (%) y mediana anual (mg/kg) a través de los años.



Por la vía inyectable, si bien la dosis de oxitetraciclina como tendencia (mediana) se muestra estable en 35 mg/Kg, en realidad ha disminuido las dosis extremas superiores, lo que se observa en las diferentes categorías a través de los años ($p=0,000$) (Gráfico 8).

Por el contrario, la dosis de florfenicol inyectable ha ido aumentando de 20 mg/Kg en el año 2014 a 40 mg/Kg en el último año ($p=0,000$) (Gráfico 9).

Gráfico 8. Dosis de oxitetraciclina inyectable utilizada según frecuencia de tratamientos por categoría (%) y mediana anual (mg/kg) a través de los años.

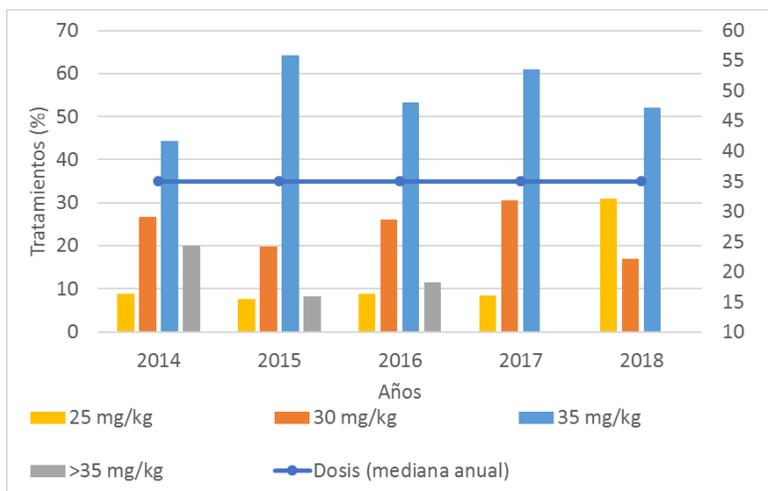
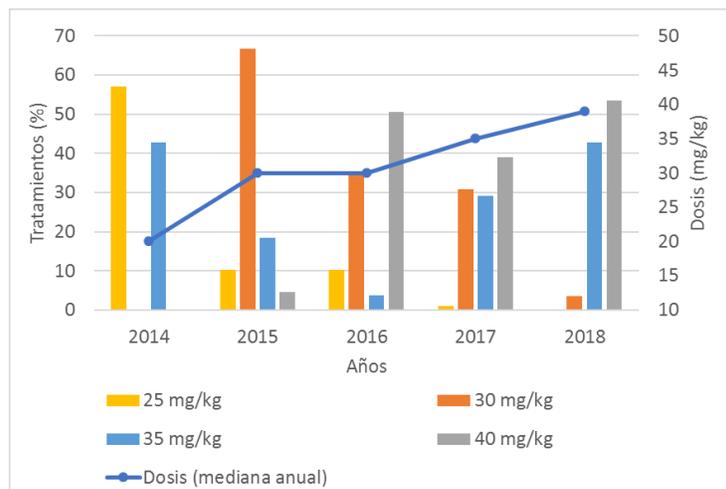


Gráfico 9. Dosis de florfenicol inyectable utilizada según frecuencia de tratamientos por categoría (%) y mediana anual (mg/kg) a través de los años.



Duración

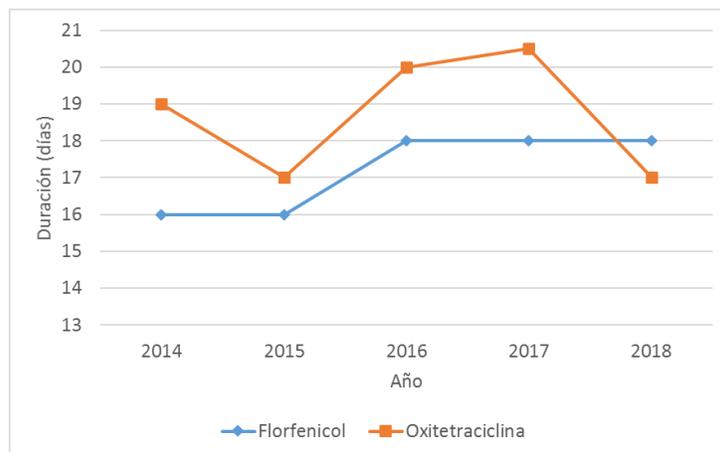
La duración de los tratamientos orales con florfenicol aumentó significativamente el 2016 y se ha mantenido los dos últimos años en 18 días ($p=0,000$). Esta situación ocurre en forma conjunta con la disminución de la dosis y concuerda con lo expresado por las empresas, de que a medida que bajan la dosis de florfenicol extienden los días en tratamiento. En el caso de la oxitetraciclina oral la duración es variable con los años, disminuyendo en el 2018 a 17 días (Gráfico 10).

Cabe destacar que la duración que se registra en el SIFA considera el tiempo desde que se inicia el tratamiento en la primera jaula hasta que termina la última jaula, por lo que no es necesariamente la misma duración que los médicos veterinarios prescriben. En el seguimiento de los tratamientos del 2018 se pudo observar esta diferencia, la duración para el florfenicol fue de 17 días (RI: 15-19) mientras que la duración prescrita en la PMV fue más corta, 14 días (RI: 14-16). Mientras que para oxitetraciclina, se observó una duración de 20,5 días, con mayor variabilidad (RI: 12-21) y una duración prescrita de 14 días sin variación (RI: 14-14).

Por lo tanto, la duración con que se prescribieron los tratamientos en el 2018 fue igual para ambos principios activos y se observó una duración mayor en el tratamiento cuando se usa oxitetraciclina ($p=0,005$). Esto último podría indicar algún problema que afectó el consumo de oxitetraciclina y que por lo tanto hizo que se dilatara el tratamiento, ya sea porque se escoge cuando el cuadro de la enfermedad es peor y menos comen los peces o porque pudiera afectar la palatabilidad del alimento, como algunas empresas manifestaron.

La duración por categorías para cada principio activo se entrega con detalle en el Anexo 2.8.

Gráfico 10. Mediana anual de la duración (días) del tratamiento según principio activo utilizado.

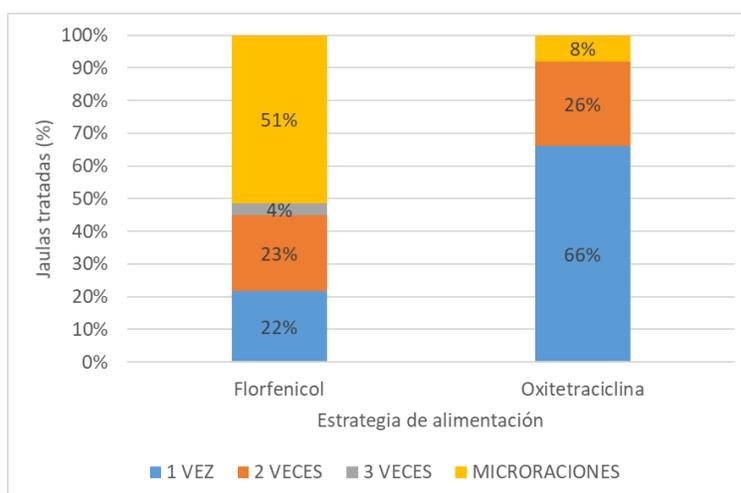


Estrategia de alimentación

La información de la estrategia de alimentación sólo se tuvo disponible en los tratamientos que se siguieron en el año 2018 (Anexo 2.8), por lo que los resultados son para Salmón del atlántico. La principal forma de entrega del florfenicol oral fueron las microraciones (51%), mientras que el resto de los tratamientos fueron entregados fundamentalmente en una y dos raciones al día (Gráfico 11).

En oxitetraciclina se entregó en la gran mayoría en una ración al día (66%), seguido de 2 raciones al día (26%) y muy pocas microraciones (8%).

Gráfico 11. Porcentaje de jaulas tratadas (%) según estrategia de alimentación, por principio activo utilizado.



Caracterización de los determinantes que condicionan un esquema terapéutico a nivel de tratamiento

Los principales determinantes que podrían influir en tomar la decisión de cuál esquema terapéutico escoger, se resumen en general en la Tabla 5 con el número de tratamientos por cada uno, en base a la información retrospectiva 2014-2018. El detalle por especie se encuentra en el anexo 2.9, además de la caracterización de los determinantes de la decisión levantados en seguimiento del año 2018 (anexo 2.10).

Tabla 5. Número de tratamientos realizados según determinante entre el 2014-primer semestre 2018.

DETERMINANTES		GENERAL	
		<i>n</i>	%
Año	2014	567	11,1%
	2015	1.466	28,6%
	2016	1.178	23,0%
	2017	1.323	25,8%
	2018	596	11,6%
	Total	5.130	100,0%
Especie	Salmón del Atlántico	4.402	85,8%
	Salmón Coho	413	8,1%
	Trucha Arcoíris	315	6,1%
	Total	5.130	100,0%
Región	X	2.419	47,2%
	XI	2.711	52,8%
	Total	5.130	100,0%
Macrozonas	1	498	9,7%
	2	938	18,3%
	3	317	6,2%
	4	666	13,0%
	5	587	11,4%
	6	1.436	28,0%
	7	688	13,4%
	Total	5.130	100,0%
Temporada al tratamiento	Invierno	922	18,0%
	Otoño	1.438	28,0%
	Primavera	1.149	22,4%
	Verano	1.621	31,6%
	Total	5.130	100,0%
Peso (Kg)	<1	1.218	23,7%
	1 a 3	2.464	48,0%
	3 a 5	1.170	22,8%
	≥5	278	5,4%
	Total	5.130	100,0%
	<0,5	1.339	26,1%

DETERMINANTES		GENERAL	
		<i>n</i>	%
Cáligus (conteo de HO antes del tratamiento)	0,5 a 1	828	16,1%
	1 a 3	1.789	34,9%
	≥3	1.174	22,9%
	Total	5.130	100,0%
TOTAL		5.130	100,0%

Especie

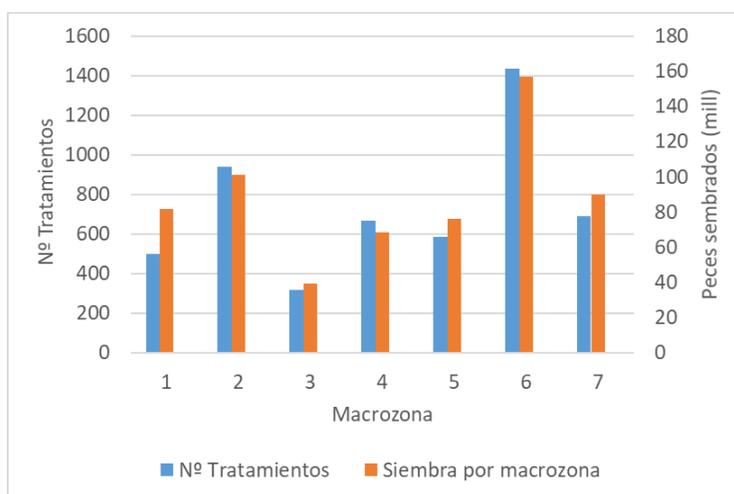
En total un 86% de todos los tratamientos fueron realizados en Salmón del Atlántico, seguidos por un 8% en Salmón Coho y un 6% en Trucha Arcoíris.

Ubicación geográfica

En la X y XI región se observa un número similar de tratamientos, levemente superior en la XI región (47% y 52% respectivamente) (Anexo 2.11).

En términos generales se observan más tratamientos en la macrozona 6 (XI región), seguida de la 2 (X región), lo cual coincide con la mayor cantidad de peces sembrados en ellas (Gráfico 12), sin embargo, no siempre ocurre así ya que existen macrozonas con un porcentaje de tratamientos mayor en relación a los peces sembrados (macrozona 4) y otras con menor porcentaje de tratamientos (macrozona 1). La tabla con los valores se encuentra en el Anexo 2.12.

Gráfico 12. Número de tratamientos realizados y peces sembrados por macrozona.



Temporada

En general los tratamientos se concentran en verano-otoño, bajan en invierno y comienzan a aumentar en primavera. Esto se ve reflejado en Salmón del Atlántico y Trucha Arcoíris, sin embargo, en Salmón Coho hay más tratamientos en invierno y otoño, lo cual puede ser explicado por la temporada de siembra que está acotada a los meses de verano (54,6%) a diferencia de las otras especies que es durante todo el año (Anexo 2.13).

Peso de los peces al tratamiento

La mayor cantidad de tratamientos se realiza entre los 1 a 3 kg de peso en todas las especies. En peces menores de 1 kg existen más tratamientos en Salmón Coho seguido de Trucha Arcoíris (Anexo 2.14).

Evaluación de los esquemas terapéuticos contra piscirickettsiosis asociados a eficacia del tratamiento.

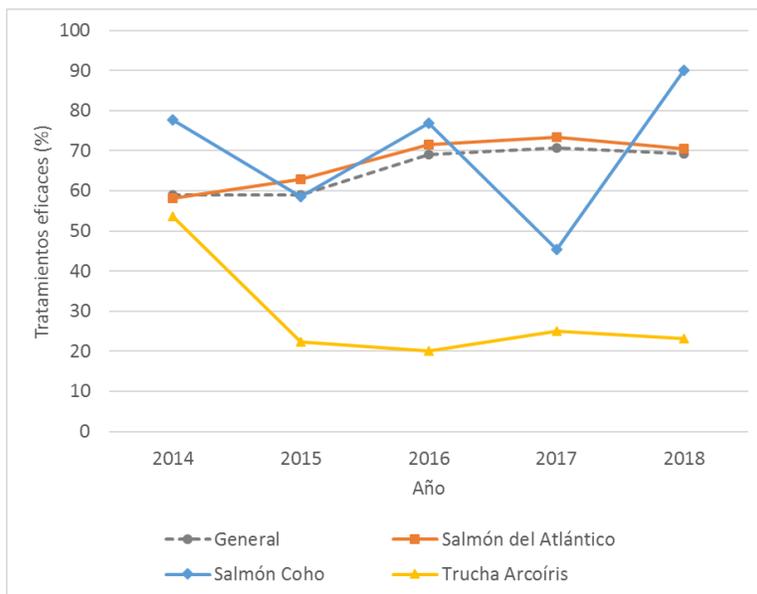
Caracterización de las diferentes definiciones de eficacia a nivel de tratamiento

Eficacia a nivel de tratamiento: punto de corte moderado

Se observa que la eficacia de los tratamientos, definida con el punto de corte moderado, aumenta con los años en Salmón del Atlántico hasta un 70% en el 2017 y en el 2018 tuvo un descenso leve que no fue significativo ($p=0.768$).

En Salmón Coho la eficacia de los tratamientos ha sido variable a través de los años, sin embargo, se observa que aumentó el último año a un 90% ($p=0.015$). En Trucha Arcoíris después de su abrupto descenso en el 2015 a un 21%, se ha mantenido bajo sin cambios significativos ($p=0.910$) (Gráfico 13).

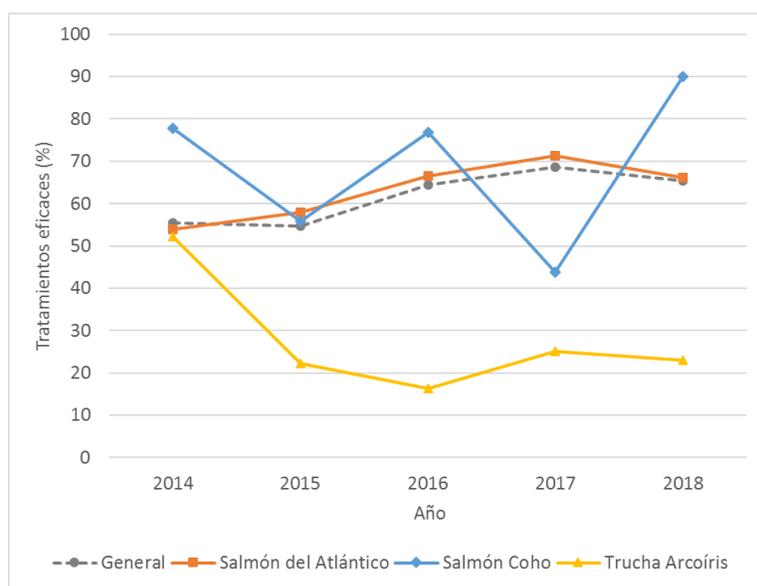
Gráfico 13: Evolución del porcentaje de tratamientos eficaces a través de los años definido por el punto de corte de mortalidad moderada, según especie.



Eficacia a nivel de tratamiento: punto de corte estricto

Para la eficacia definida con el punto de corte estricto se observa la misma tendencia que con el punto de corte moderado, con valores similares en el último año de 65%, 90% y 21% para Salmón del Atlántico, Coho y Trucha Arcoíris, respectivamente (Gráfico 14).

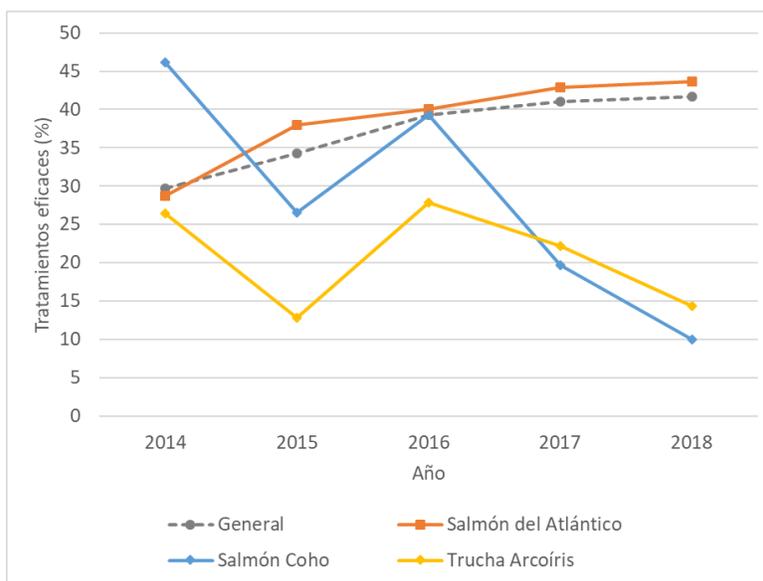
Gráfico 14: Evolución del porcentaje de tratamientos eficaces a través de los años definido por el punto de corte de mortalidad estricto, según especie.



Eficacia a nivel de tratamiento: reducción de mortalidad

Se observa que en Salmón del Atlántico ha ido aumentando el porcentaje de tratamientos que tienen una reducción de la mortalidad $\geq 50\%$ ($p=0,000$), llegando en el 2018 a un 44% de los tratamientos. Sin embargo, para las otras especies, a partir del 2017 hay una caída sostenida que ha sido más importante en el salmón Coho, llegando a un 10% de tratamientos eficaces en comparación al 14% en Trucha Arcoíris (Gráfico 15).

Gráfico 15: Evolución del porcentaje de tratamientos eficaces a través de los años definido por una reducción de un 50% de la mortalidad, según especie.



Eficacia a nivel de tratamiento: seguimiento tratamientos año 2018

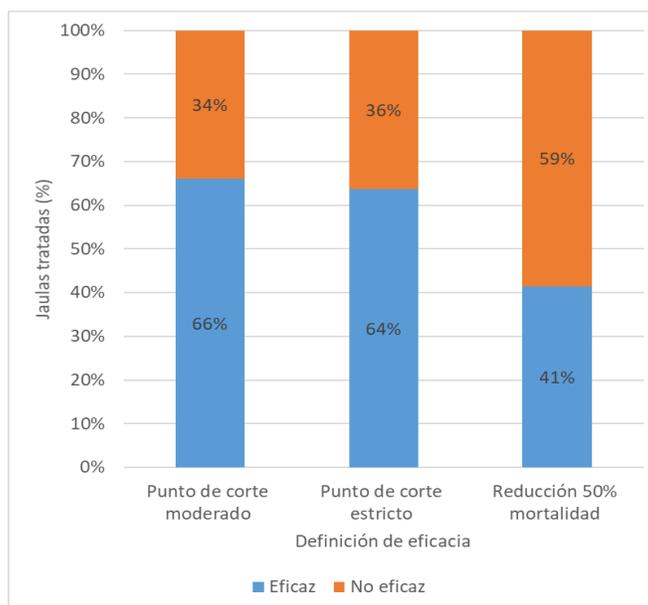
Durante el seguimiento del año 2018 en tratamientos orales de Salmón del Atlántico se observa que los tratamientos eficaces en base a la mortalidad de SRS estuvieron en un 66% y 64% para los puntos de corte moderado y estricto respectivamente¹³. Asimismo, un 41% de los tratamientos redujo la mortalidad en más de un 50% (Gráfico 16). Los valores son levemente menores al año 2018 del estudio retrospectivo.

¹³ **Moderado:** mortalidad SRS semanal dos semanas post tratamiento $\leq 0,11\%$ (0,016% diario).

Estricto: mortalidad SRS semanal dos semanas post tratamiento $\leq 0,07\%$ (0,010% diario).

Reducción $\geq 50\%$ de la mortalidad SRS+SCA entre inicio tratamiento y 2 semanas post tratamiento.

Gráfico 16. Resultado de los tratamientos según definición de eficacia en estudio prospectivo 2018.



Caracterización de las diferentes definiciones de eficacia a nivel de ciclo

Número de tratamientos por ciclo

El número de tratamientos por ciclo para todo el periodo en Salmón del Atlántico es de 7 (RI: 5-11), en la Trucha Arcoíris es de 4 (RI: 2-5) y en el Salmón Coho es de 2 tratamientos (RI: 5-1). En el 2017 el número de tratamientos por ciclo aumentó significativamente para Salmón del Atlántico, manteniéndose sin cambios en el 2018, en donde se registraron 8 tratamientos por ciclo. El Salmón Coho después de su descenso en el 2016, se ha mantenido estable en 2 tratamientos por ciclo y la Trucha Arcoíris no ha tenido una tendencia clara, observándose 3 tratamientos por ciclo en el último año (Gráfico 17) (Anexo 2.16).

Pudiera ser que la duración del ciclo afectara el número de tratamientos ya que al aumentar la duración hay un tiempo en riesgo mayor a tener un evento de piscirickettsiosis. El ciclo del Salmón del Atlántico es más largo que el resto de las especies y ha disminuido con los años, siendo en el 2018 de 504 días (469-525). En la Trucha Arcoíris ha sido variable, manteniéndose en los últimos dos años en 343 días (294-371) y en Salmón Coho la disminución no ha sido significativa, con duración en el 2018 de 287 días (252-294). Para evaluar el efecto de la duración, se generó un indicador que consideró el número de tratamiento ajustado por el número de días del ciclo productivo (Gráfico 18).

Se puede observar que a pesar de que Salmón del Atlántico tiene el ciclo más largo, de igual forma tiene valores de este indicador ajustado más altos que las otras especies con 1,4 (RI: 1-2,1), seguido en el mismo orden por la trucha Arcoíris con 1,1 (RI: 0,7-1,3) y Salmón Coho con 0,8 (RI: 0,5-1,7). Sólo

Salmón del Atlántico mostró un aumento significativo a través de los años ($p= 0,000$), no siendo significativo el descenso del 2018.

Gráfico 17. Evolución del número de tratamientos por ciclo cerrado (mediana) según especie por año que finaliza el ciclo.

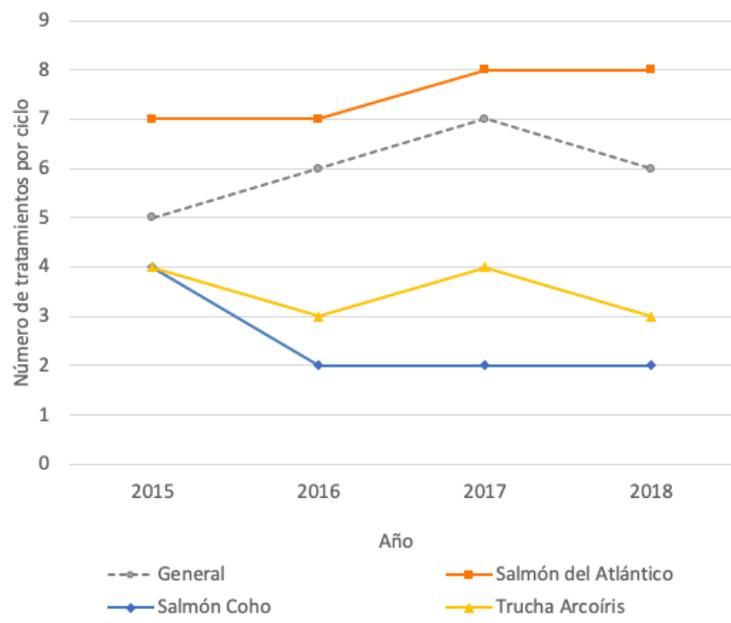
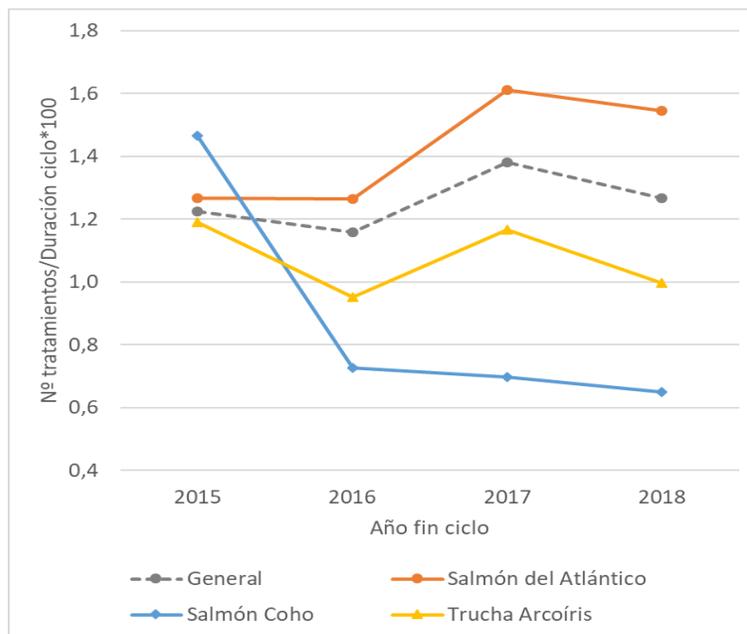


Gráfico 18. Evolución del número de tratamientos por ciclo cerrado (mediana) ajustado por los días de duración del ciclo ($\times 100$), según especie por año que finaliza el ciclo.

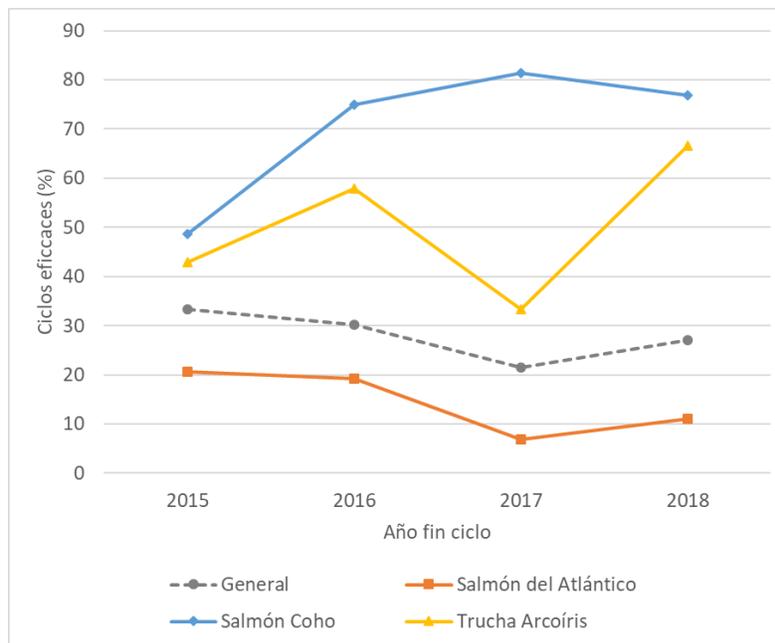


Eficacia a nivel de ciclo: Ciclos con ≤ 3 tratamientos¹⁴

Se observa que los ciclos de Salmón del Atlántico tienen menos tratamientos eficaces que el resto de las especies bajo esta definición de eficacia. En Salmón del Atlántico y Trucha Arcoíris se observó una caída importante en el 2017 y que en el 2018 aumentan los ciclos eficaces en Trucha Arcoíris significativamente a 67% ($p=0,003$), sin embargo, en Salmón del Atlántico no aumentó ($p=0,119$) (Gráfico 19). En Salmón Coho la tendencia es al aumento de los tratamientos eficaces ($p=0,000$) y la caída en el último año no fue significativa ($p=0,759$).

Los ciclos eficaces según empresa se encuentran detallados en Anexo 2.15.

Gráfico 19: Evolución del porcentaje de ciclos eficaces según especie por año que finaliza el ciclo, definido por número de tratamientos por ciclo menor o igual a 3.



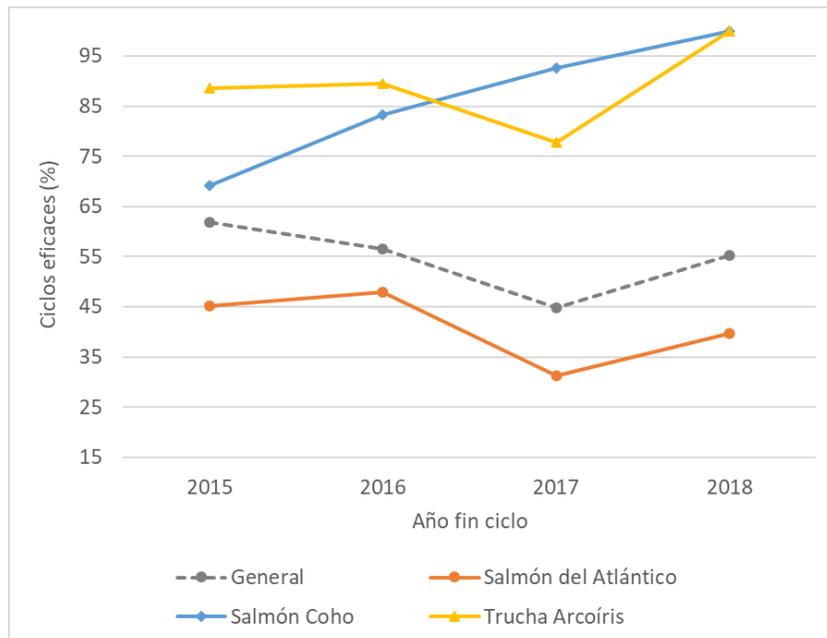
Eficacia a nivel de ciclo: Ciclos con ≤ 6 tratamientos¹⁵

Para Salmón del Atlántico y Coho la tendencia al aumento en el 2018 es similar al punto de corte ≤ 3 tratamientos. En Salmón Coho existe una tendencia al aumento de los tratamientos eficaces sin interrupciones ($p=0,000$) (Gráfico 20).

¹⁴ De acuerdo a punto de corte de la certificación *ASC Salmon Standard by Aquaculture Stewardship Council*.

¹⁵ De acuerdo a la mediana del número de ciclos 2014-2015 SIFA.

Gráfico 20: Evolución del porcentaje de ciclos eficaces según especie por año que finaliza el ciclo, definido por número de tratamientos por ciclo menor o igual a 6.



Análisis univariado

La asociación a través de modelos univariados de los esquemas terapéuticos y los determinantes a las diferentes definiciones de tratamiento eficaz, se muestran en anexos en una tabla resumen para el estudio retrospectivo (Anexo 2.17) y para el prospectivo de seguimiento de tratamientos del 2018 (Anexo 2.18).

El grado de importancia se muestra través de una medida de riesgo llamada OR (Odds Ratio). Un OR >1 indica que la variable está asociada con la eficacia terapéutica, mientras que un OR <1 indica que se asocia con un tratamiento no eficaz. Mientras más grande es el valor del OR, mayor es la importancia de la variable para tener un tratamiento eficaz. El OR tiene que tener un p valor $\leq 0,05$ para que exista asociación estadística.

Análisis multivariado

Esquemas terapéuticos asociados a tratamientos eficaces

Las variables analizadas a continuación fueron ajustadas por ubicación, temporada, especie y peso, de manera de tomar en consideración en forma conjunta sus efectos en la eficacia del tratamiento. Las variables asociadas a la eficacia en sus diferentes definiciones, constituyen hipótesis de causalidad, que deben ser probadas en estudios controlados para poder establecer su relación causal.

Mortalidad con que se inicia el tratamiento

Una baja mortalidad al inicio del tratamiento, se asoció con tratamientos eficaces, siendo el factor con mayor importancia en la mayoría de los modelos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos a nivel de campo en la primera parte del proyecto.

La mortalidad semanal de inicio que mostraron en el seguimiento del año 2018 las jaulas con las diferentes definiciones de tratamientos eficaces, son las que se muestran en la Tabla 6. Estos valores corresponden a lo que ocurre en la actualidad en las principales empresas de la industria y son a nivel de jaula, por lo que podrían ser consideradas como valor máximo de arranque para iniciar un tratamiento en una jaula.

Tabla 6. Mortalidad inicial óptima para iniciar un tratamiento a nivel de jaula.

TIPO DE MORTALIDAD SEMANAL	MEDIANA A NIVEL DE JAULA	DISPERSIÓN
Mortalidad por SRS	0,006%	0 a 0,029%
Mortalidad por SRS+SCA	0,033%	0,015% a 0,068%
Mortalidad total	0,069%	0,043% a 0,113%

Cobertura del tratamiento

Tratar el centro completo se asoció con tratamientos eficaces en comparación a tratar jaula a jaula (Gráfico 21) de acuerdo a los modelos de reducción de la mortalidad y a nivel de ciclo, pero se vuelve no significativo en los modelos a nivel individual basados sólo en la mortalidad final (Gráfico 22). Los modelos se probaron con diferentes niveles de mortalidad y de peso. Esto podría indicar que tratar a centro completo es la mejor manera de reducir la mortalidad y en términos de ciclo tener menos tratamientos.

No obstante, el reporte de empresas que han tenido buenos resultados tratando jaula a jaula podría indicar que, si el tratamiento se inicia sin mortalidad o con mortalidades bajas, los peces están consumiendo adecuadamente alimento y la temporada no es verano ni primavera, podría ser eficaz tratar sólo las jaulas afectadas. En los modelos, esto no fue factible de demostrar, lo que no significa que no sea posible en la práctica.

Gráfico 21. Resultado del tratamiento según cobertura tratada, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.

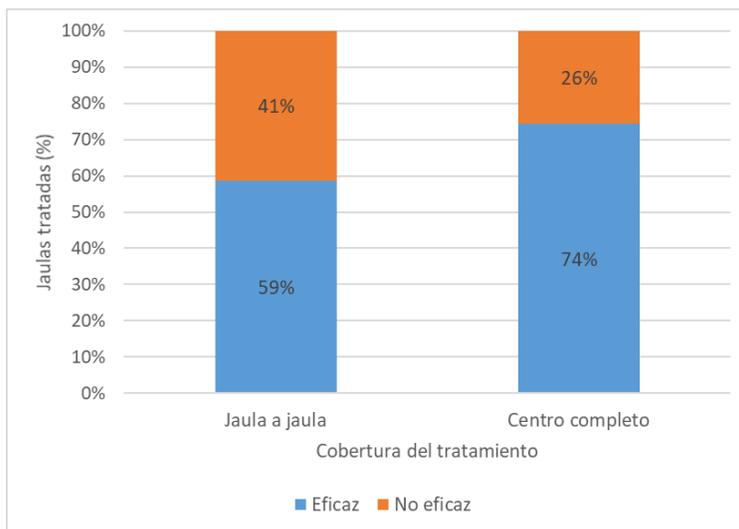
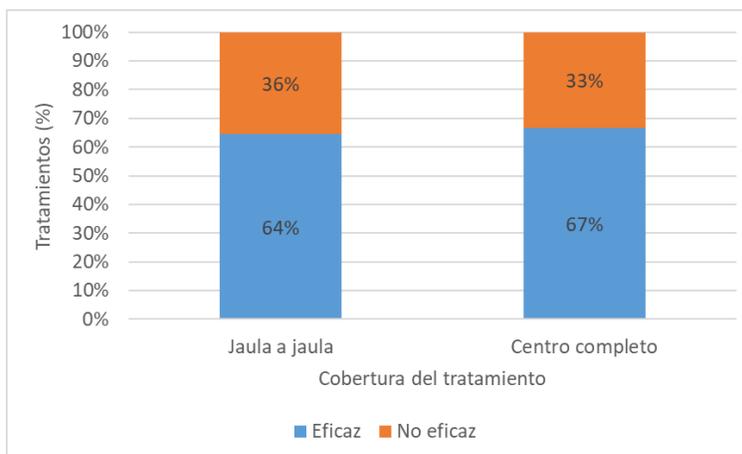


Gráfico 22. Resultado del tratamiento según cobertura tratada, utilizando definición de éxito moderado.



Vía de administración y principio activo

Los tratamientos inyectables se asociaron a tratamientos eficaces (Gráfico 23) y dentro de esta vía la oxitetraciclina tuvo un mejor desempeño (Gráfico 24). De acuerdo a los análisis utilizando las diferentes definiciones de eficacia a nivel de tratamiento, la oxitetraciclina inyectable tendría hasta 2,5 más veces de tener eficacia en el tratamiento en comparación al florfenicol y estuvo asociado a los ciclos con menos tratamientos. Sin embargo, para establecer que se trate realmente de una mejor

eficacia de la oxitetraciclina inyectable y no por efecto de alguna otra variable aquí no analizada, es que debería ser probado a través de estudios controlados.

Hay que considerar que el efecto de los inyectables podría verse potenciado cuando conjuntamente en la inyección se eliminan peces con peor condición corporal, esto no pudo diferenciarse el estudio. Sin embargo, cuando se analizó al florfenicol inyectable, en el cual también pudo realizarse este manejo de eliminación, florfenicol no tuvo significancia estadística.

En el caso del antibiótico oral (Gráfico 25), los tratamientos eficaces se asociaron con el uso de florfenicol tanto a nivel de tratamiento como de ciclo, aumentando en hasta 2 veces la posibilidad de tener eficacia terapéutica. El mejor desempeño del florfenicol concuerda con los resultados de los primeros objetivos del estudio.

Gráfico 18. Resultado del tratamiento según vía de administración, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.

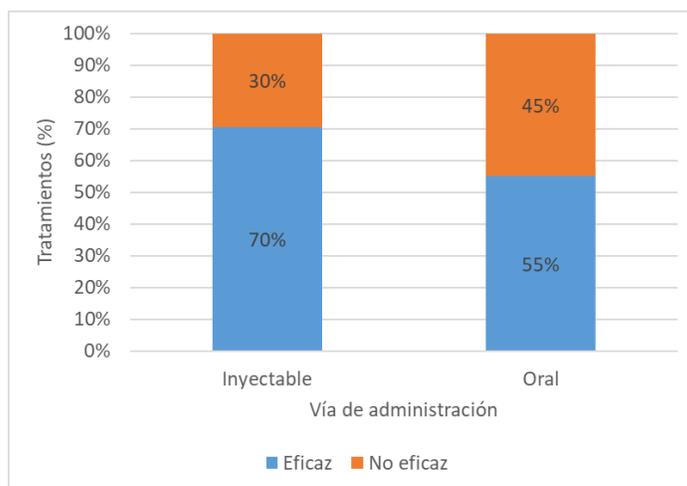


Gráfico 19. Resultado del tratamiento por vía inyectable según principio activo, utilizando definición de éxito estricto.

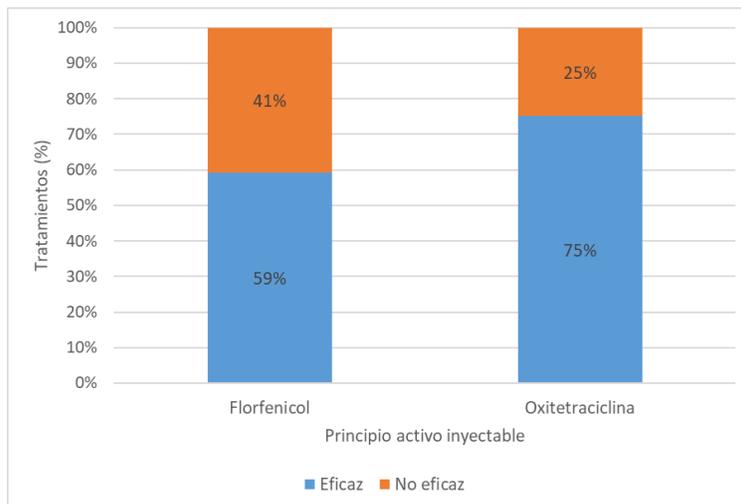
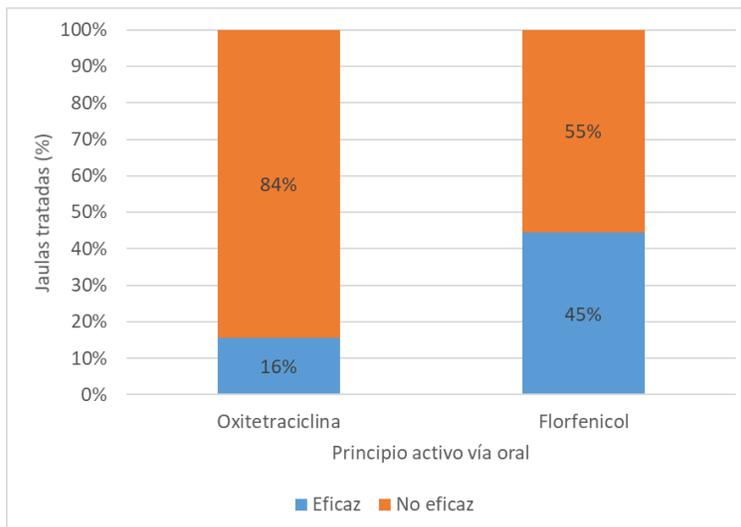


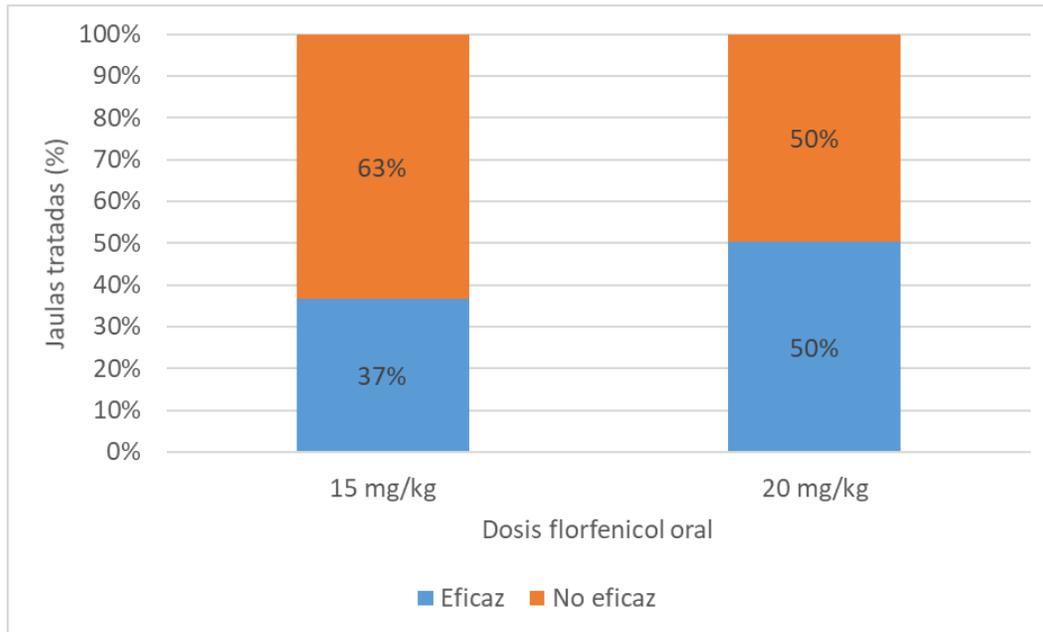
Gráfico 20. Resultado del tratamiento oral según principio activo, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.



La dosis de florfenicol de 20 mg/kg se asoció en mayor medida a tratamientos eficaces en comparación a la dosis de 15 mg/kg (Gráfico 26), lo que es concordante con los estudios controlados realizados en el proyecto. Se observó que la eficacia a esta dosis podría aumentar hasta en 2,6 veces.

En el caso de la oxitetraciclina oral, los modelos no encontraron diferencias entre las diferentes dosis, lo que también se observa como resultado de los estudios controlados realizados en la primera parte del proyecto.

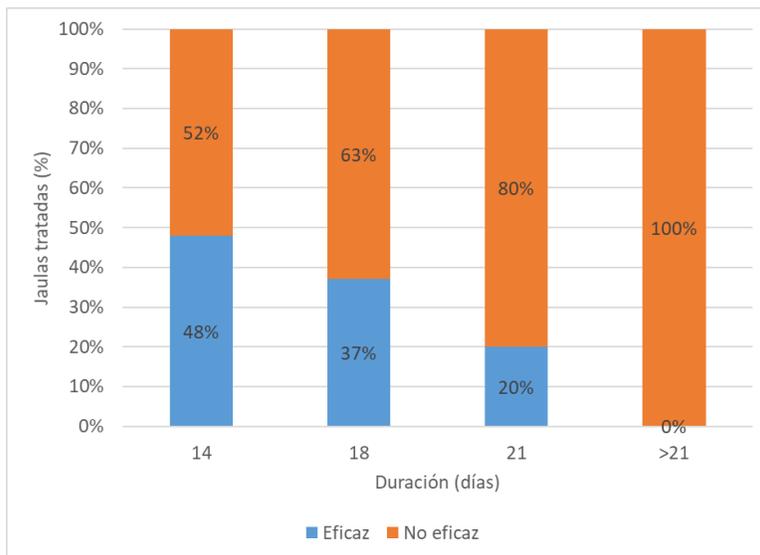
Gráfico 21. Resultado del tratamiento con florfenicol vía oral según dosis utilizada, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.



Duración

Los tratamientos que duraron más días se asociaron a tratamientos no eficaces (Gráfico 27). Esto es probable debido a que los tratamientos más largos se asociaron a la presencia de eventos que pudieron disminuir el consumo de alimentos o suspenderlo por algunos días, tales como ataque de lobos o clima adverso.

Gráfico 22. Resultado del tratamiento según duración, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.

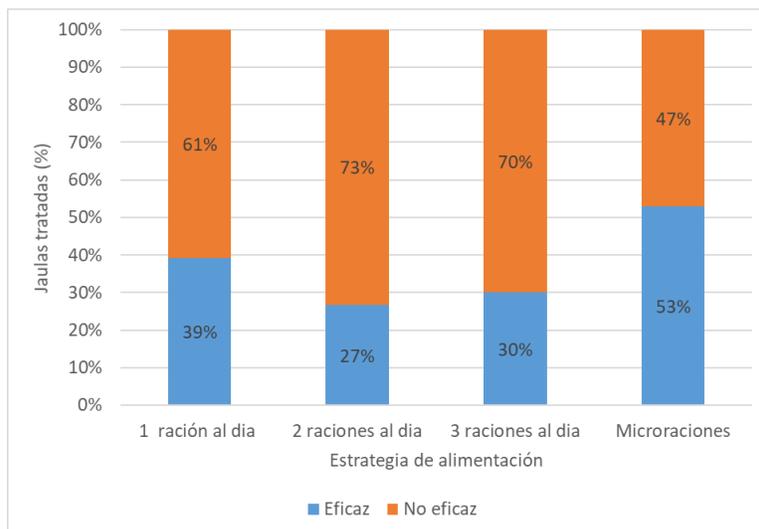


Forma de entrega del alimento medicado

En Salmón del Atlántico, el uso de microraciones con florfenicol se asoció con una mayor cantidad de tratamientos eficaces (Gráfico 28). Dependiendo de la definición de éxito empleada, se observó hasta 4 veces más eficacia en comparación a las otras estrategias de alimentación. Además, se encontró que la administración de dos raciones al día disminuyó la efectividad del florfenicol en comparación a las microraciones.

En el caso de oxitetraciclina oral no hubo asociación, probablemente porque se usan poco las microraciones.

Gráfico 23. Resultado del tratamiento según estrategia de alimentación, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.

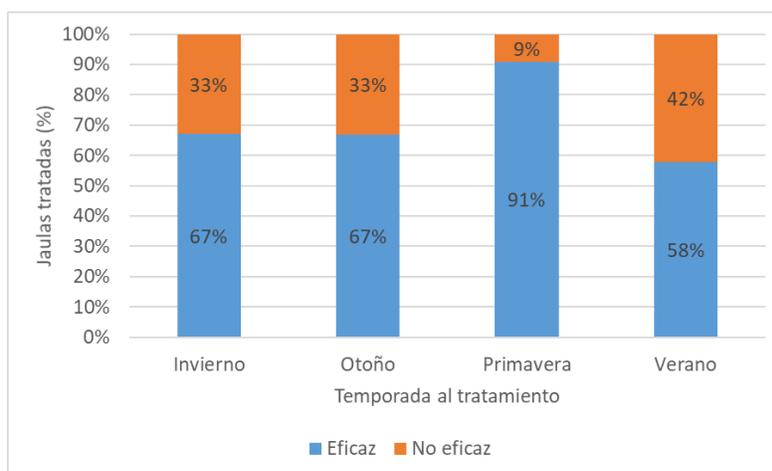


Principales determinantes asociados a la eficacia del tratamiento

Temporada en la cual se realizó el tratamiento

La temporada de verano es donde se observa la menor cantidad de tratamientos efectivos (Gráfico 29), reduciendo este tipo de tratamientos hasta en 2.8 veces. Esta temporada además estuvo asociada a un mayor conteo de cáligos.

Gráfico 24. Resultado del tratamiento según temporada al tratamiento, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.



Peso promedio del pez al tratamiento

En términos generales, al aumentar el peso se observa una asociación a tratamientos no eficaces, esto sólo se pudo apreciar en los tratamientos orales (Gráfico 30), en los inyectables no hubo diferencia (Gráfico 31). Una explicación podría ser porque los peces en la medida que crecen consumen menos alimento en relación a su peso.

Gráfico 3025. Resultado del tratamiento oral según peso promedio al tratamiento, utilizando definición de éxito moderado.

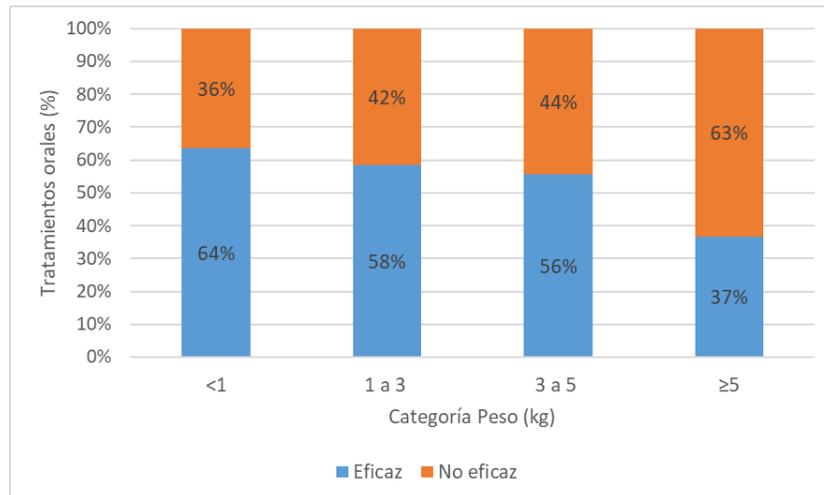
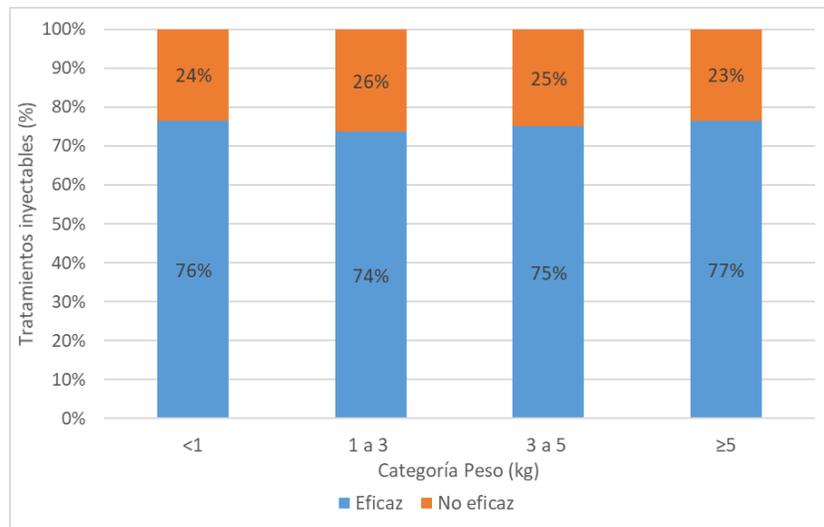


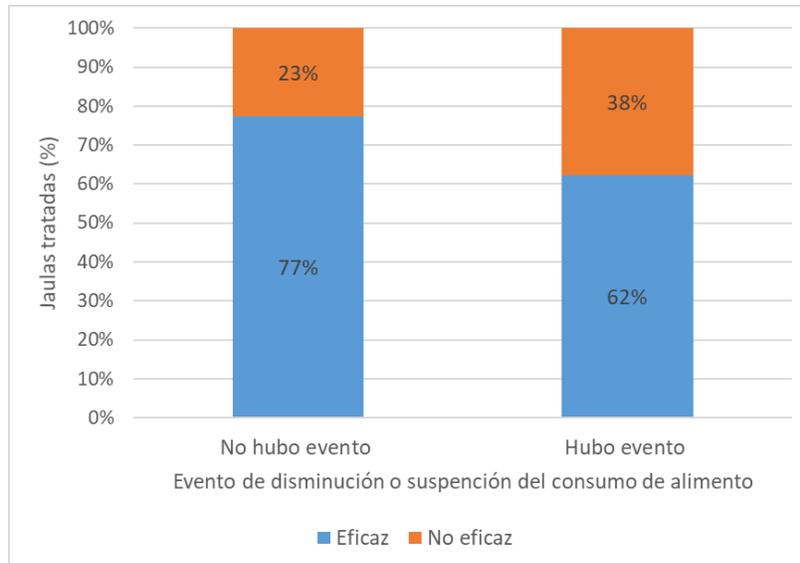
Gráfico 31. Resultado del tratamiento inyectable según peso promedio al tratamiento, utilizando definición de éxito moderado.



Eventos que afectan el consumo del alimento medicado

Si ocurre un evento que provoque detener o disminuir el consumo de alimento, produce una disminución en la posibilidad de tener un tratamiento efectivo comparado a no tener eventos (Gráfico 32). Este efecto se observó ser más importante si ocurre durante el primer tercio del tratamiento.

Gráfico 26. Resultado del tratamiento según eventos que afecten el consumo, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.



Dentro de los eventos que provocaron detener o disminuir el consumo de alimento, el mal clima y los lobos marinos estuvieron asociados a tratamiento no eficaces (Gráfico 33 y 34), teniendo mayor peso el primero, en comparación a los lobos marinos. Si bien los eventos de FAN son importantes, en los modelos no tuvo significancia, probablemente porque fueron tan sólo el 8% de los eventos.

Gráfico 33. Resultado del tratamiento según evento de lobo marino, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.

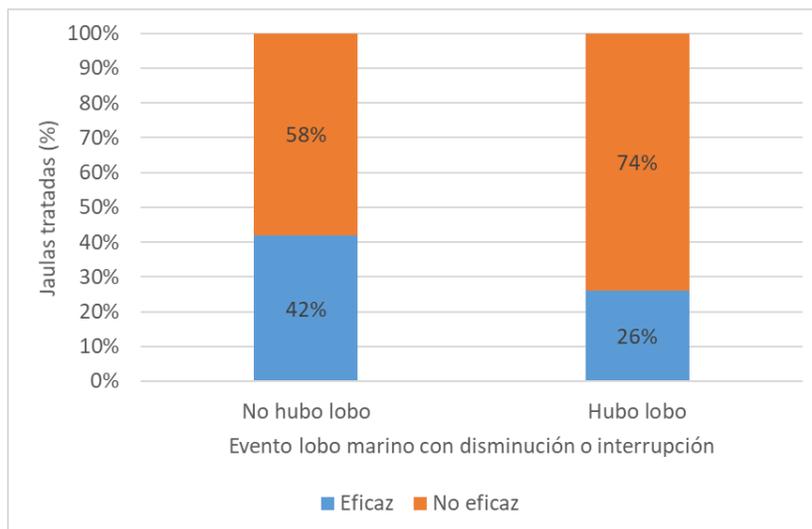
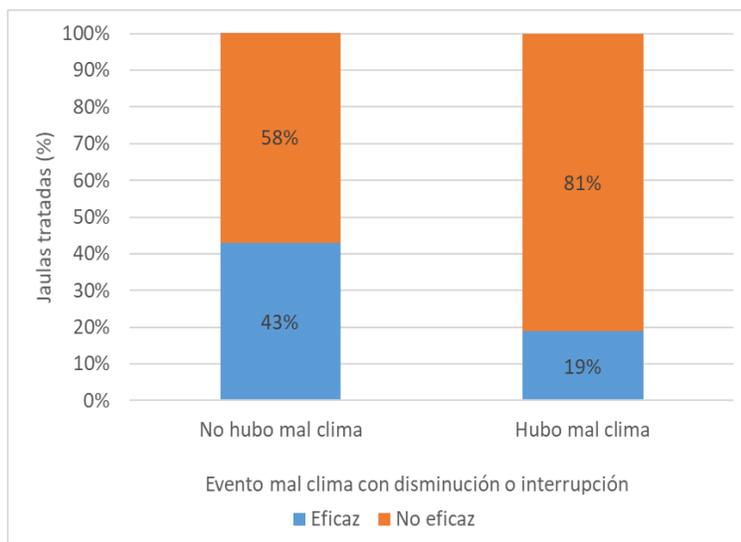


Gráfico 27. Resultado del tratamiento según eventos de mal clima, utilizando definición de éxito reducción de mortalidad 50%.



CONCLUSIONES

Sobre las decisiones

- Existen estrategias y criterios, en general con alta coincidencia con los lineamientos de las buenas prácticas, con variabilidad de acuerdo a la empresa y los determinantes externos.
- Para la industria los determinantes de mayor importancia que influyen en la elección de un esquema terapéutico son la magnitud de la presentación del cuadro y la posibilidad de exceder el periodo de carencia por las restricciones del mercado. Asimismo, para obtener eficacia terapéutica, lo principal es el momento en que se inicia el tratamiento.
- El inicio de un tratamiento puede retrasarse por otros factores que tienen poco o mediano control de las empresas como temas comerciales, logísticos o medioambientales.

Sobre las características de los tratamientos y determinantes

- Todas las especies, todas las regiones y todas las empresas tienen variabilidad en los esquemas terapéuticos que utilizan contra piscirickettsiosis.
- La mortalidad semanal al inicio del tratamiento presenta una alta variabilidad entre las empresas. El salmón del Atlántico tiene mayores valores y Salmón Coho las menores.
- Se utiliza principalmente el tratamiento jaula a jaula, sin embargo, existen empresas que tratan 100% jaula a jaula y otras a centro completo.
- La vía oral es la más empleada y el florfenicol es el principal principio activo, la oxitetraciclina ha disminuido su uso entre el 2014-2018.
- Las dosis de florfenicol han ido disminuyendo en el tiempo y la duración del tratamiento ha aumentado.
- No hay diferencias entre ambos principios activos en relación a la duración prescrita de los tratamientos en el último año, sin embargo, los tratamientos se extienden más con oxitetraciclina.
- El 30% de los tratamientos inyectables es con florfenicol, existiendo 14 empresas diferentes que lo emplean, particularmente en situaciones complicadas de la enfermedad, en donde se inyecta y a continuación se trata en forma oral.
- Existen más tratamientos en las macrozonas 4, 2 y 6, lo cual no siempre está asociado a un mayor número de siembra. También hay un mayor número de tratamientos en el periodo de verano y en pesos de 1 a 3 kg.
- El número de tratamientos por ciclo es mayor en Salmón del Atlántico, seguido por la Trucha Arcoíris y el Salmón Coho (7, 4 y 2 respectivamente). Este orden se mantiene, aunque se ajuste por la duración del ciclo. El único que muestra un aumento en el número de tratamientos por ciclo a través de los años es el Salmón del Atlántico, manteniéndose estable en el año 2018.

Sobre el esquema terapéutico y la eficacia del tratamiento:

- El iniciar un tratamiento con bajas mortalidades se asoció con tratamientos eficaces, siendo el factor de mayor importancia.
- El tratar a centro completo se asoció con una mayor reducción de la mortalidad y menos tratamientos por ciclo en comparación a tratar jaula a jaula.
- El principio activo administrado de manera inyectable que se asoció a tratamientos eficaces fue la oxitetraciclina. Sin embargo, es necesario probar esto en condiciones controladas. En el caso del antibiótico oral, los tratamientos eficaces se asociaron con el uso de florfenicol.
- Se observó que la dosis de florfenicol de 20 mg/kg administrada en forma oral se asoció a los tratamientos eficaces en comparación a la dosis de 15 mg/kg.
- Los tratamientos de mayor duración se asociaron a tratamientos no eficaces y a la presencia de eventos que disminuyeron o pararon el consumo de alimento.
- Las microraciones con florfenicol fue la estrategia de alimentación que se asoció con tratamientos eficaces en Salmón del Atlántico. La administración del florfenicol en 2 raciones/día se asoció con menos tratamientos eficaces en comparación a las microraciones.

Sobre factores no relacionados al esquema terapéutico que pueden afectar la efectividad del tratamiento:

- Los tratamientos realizados en verano se asociaron con los tratamientos no eficaces y con una mayor carga de cáligus.
- Los peces de mayor peso se asociaron a tratamientos no eficaces.
- Un evento que provoque detener o disminuir el consumo de alimento, produce una disminución en la posibilidad de tener un tratamiento efectivo. Los eventos que ocurrieron al inicio del tratamiento se asociaron a tratamiento no eficaces. El mal clima fue el que tuvo mayor peso de los eventos en la efectividad del tratamiento.

RECOMENDACIONES

1. Para el esquema terapéutico

Inicio tratamiento

- Emplear los valores de mortalidad de inicio del tratamiento obtenidos en el presente informe.
- Fortalecimiento de la detección temprana, para lo cual los esfuerzos deberían concentrarse en:

- Uso de técnicas de laboratorio rápidas (PCR) para el monitoreo de la enfermedad en forma periódica, al menos quincenal, de manera que la detección no dependa sólo de la mortalidad.
- Aumentar la frecuencia de la necropsia a más de una vez a la semana y en forma diaria si la mortalidad va aumentando.
- Fortalecer la capacitación del equipo en el reconocimiento de signos clínicos y lesiones a la necropsia.
- Emplear estrategias diferenciadas por el riesgo y mecanismos de toma de decisiones de acuerdo al centro y sus condiciones:

Cobertura

- Preferir la alternativa de tratar al centro completo.
- Usar jaula a Jaula cuando las condiciones sean favorables: se detecte más tempranamente, los peces estén consumiendo alimento y la temporada no sea ni verano ni primavera.

Vía y principio activo

- Preferir la vía inyectable cuando sea posible solo con oxitetraciclina y eliminando peces con mala condición física.
- Preferir por la vía oral el florfenicol antes que la oxitetraciclina.

Dosis y duración

- Preferir el uso de una dosis de florfenicol de 20 mg/Kg

Estrategia de alimentación

- En Salmón del Atlántico, preferir alimentar con microraciones cuando se emplea florfenicol.

2. Para los principales determinantes

- En zonas en donde sea habitual la presencia de lobos marinos que afecten la producción, disminuciones de oxígeno y condiciones de mal clima, se recomienda tomar acciones preventivas que favorezcan la menor susceptibilidad de los peces, tales como la vacunación, eliminación de peces orillados, rezagados y/o desadaptados, limpieza de redes y uso de productos que disminuyan el número de baños para cáligus.
- Frente a la interrupción de un tratamiento por más allá del tiempo que dure la biodisponibilidad del principio activo en el pez, se recomienda iniciar un nuevo tratamiento.

3. Definir una estrategia empresa con estructuras formales de decisión que incorpore el seguimiento dinámico y evaluación. Tomar en cuenta costos y sobretodo los beneficios.
4. Definición de indicadores para la gestión de empresas y de SERNAPESCA. Se recomienda incorporar otros indicadores a parte de la mortalidad, en forma conjunta para evaluar la eficacia y el buen uso de antibióticos. Se proponen indicadores como el número de tratamientos por ciclo, índice de consumo de antibióticos y mortalidad acumulada. Estos indicadores deberían ajustarse por el número de días de duración del ciclo productivo. Por otra parte, se recomienda acordar una definición de “éxito o eficacia terapéutica” y mejorar la calidad y uso de la información.
5. Evaluar el impacto de los incentivos (nuevas regulaciones y actual programa de control de piscirickettsiosis).
6. Realizar la actualización del Manual de Buenas Prácticas en el uso de Antimicrobianos y Antiparasitarios en Salmonicultura chilena, para que incluya los resultados de este y otros trabajos sobre el tema.
7. Continuar avanzando en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, resistencia antimicrobiana, así como los determinantes asociados a esta.

OBJETIVO N°5: PROPONER RECOMENDACIONES PRÁCTICAS PARA OPTIMIZAR EL USO DE ANTIBIÓTICOS CONTRA *P. salmonis*.

El propósito de este estudio fue identificar esquemas terapéuticos óptimos con los principales antibióticos utilizados frente a Piscirickettsiosis, así como los factores que determinan su eficacia y aplicación. A partir de los resultados de este informe se desprenden recomendaciones para el sector privado y público, de manera que puedan servir de fundamento para las empresas y la reglamentación que SERNAPESCA establezca para los sistemas productivos en agua de mar, contribuyendo así a la sustentabilidad de la industria salmonera, minimizando el riesgo de resistencia microbiana y el impacto al medio ambiente.

RECOMENDACIONES PARA EL SECTOR PRIVADO

De acuerdo a los resultados del proyecto se señalan las siguientes recomendaciones prácticas las cuales pueden llevarse a cabo a corto plazo:

- Frente a un diagnóstico empírico de *P. salmonis*, no debería utilizarse terapias con alimento medicado con oxitetraciclina
- La probabilidad de éxito terapéutico con alimento medicado con oxitetraciclina a una dosis de 75 o 100 mg/kg p.v. es > al 90% solo cuando los aislados de un brote tienen una CMI \leq a 0,5 $\mu\text{g/ml}$
- En un tratamiento empírico con florfenicol frente a *P. salmonis*, la dosis más adecuada vía oral está en rangos de 15 y 20 mg/kg p.v.
- Iniciar la terapia frente a un diagnóstico precoz de *P. salmonis* con el fin de que no se vea afectada la ingesta diaria de alimento (SFR)
- Realizar una vigilancia permanente de la sensibilidad de *P. salmonis* frente a oxitetraciclina y florfenicol en el centro de cultivo, ya que la probabilidad de éxito terapéutico se ve disminuida cuando las CMI de *P. salmonis* frente a estos antibióticos están sobre los valores sugeridos como puntos de corte clínico

Las recomendaciones señaladas para el sector privado permitirían a corto y mediano plazo:

- Tener herramientas con fundamentos científicos para utilizar adecuadamente los antibióticos
- Asegurar el éxito terapéutico de florfenicol y oxitetraciclina frente a un brote infeccioso por *P. salmonis*
- Reducir la cantidad de antibióticos utilizados en los centros de cultivo, considerando la eliminación de los tratamientos por sobre las dosis recomendadas para florfenicol y oxitetraciclina

- Disminuir el número de terapias por ciclo productivo
- Reducir el riesgo de resistencia bacteriana utilizando las recomendaciones señaladas en este trabajo (dosis, terapia temprana u oportuna)
- Reducir los costos de producción por menor uso de antibióticos y menor mortalidad.
- Mejorar la imagen internacional de la industria del salmón chileno

RECOMENDACIONES PARA EL SECTOR PÚBLICO

De acuerdo a los resultados del proyecto se señalan las siguientes recomendaciones las cuales pueden llevarse a cabo a corto plazo:

- Realizar una vigilancia permanente de la sensibilidad de *P. salmonis* frente a oxitetraciclina y florfenicol ya que la probabilidad de éxito terapéutico se ve disminuida cuando las CMI de *P.salmonis* están sobre los valores sugeridos como puntos de corte clínico
- Utilizar los puntos de corte ECOFF y los puntos de corte clínico, para definir la susceptibilidad de *P. salmonis* frente a oxitetraciclina y florfenicol en un programa oficial de vigilancia de la resistencia bacteriana
- Revisar las dosis de florfenicol recomendadas en el Registro de Medicamentos Veterinarios
- Fomentar estudios que mejoren la biodisponibilidad de oxitetraciclina administrada a través del alimento.
- Fomentar el diagnóstico precoz de *P. salmonis* a través de una vigilancia sanitaria permanente y preventiva de los centros de cultivo, que considere la revisión de los registros sanitarios y productivos, inspección de la jaula, necropsia de la mortalidad en caso de que exista, y toma de muestra para el envío al laboratorio.
- Fomentar la terapia temprana frente a un diagnóstico precoz.
- Definir el concepto de diagnóstico precoz, las cuales podrían ser:
 - Centro de cultivo con peces positivo a *P.salmonis* mediante la técnica de PCR, sin signos clínicos y/o mortalidad.
 - Centro de cultivo con peces con sintomatología clínica y/o alteraciones a la necropsia correspondientes a *P. salmonis* y sin mortalidad.
- ✓ Fomentar la realización del menor número de terapias por ciclo productivo
- ✓ Aumentar el arsenal terapéutico disponible frente al tratamiento de la piscirickettsiosis

Las recomendaciones señaladas para el sector público permitirían a corto y mediano plazo:

- Tener herramientas con fundamentos científicos para fomentar las Buenas Prácticas del uso de antibióticos en los centros de cultivo de agua de mar
- Reducir la cantidad de antibióticos utilizados en los centros de cultivo, considerando la eliminación de los tratamientos por sobre las dosis recomendadas para florfenicol y oxitetraciclina
- Disminuir el número de terapias por ciclo productivo
- Reducir el riesgo de resistencia bacteriana utilizando las recomendaciones señaladas en este trabajo (dosis, terapia temprana u oportuna)
- Mejorar las regulaciones sobre el uso de antibióticos
- Mejorar la imagen internacional de la industria del salmón chileno

MECANISMOS POR LOS CUALES SE DIFUNDIERON LOS RESULTADOS

- ✓ Una reunión inicial y dos talleres de trabajo con los Médicos Veterinarios de centros de cultivo que colaboraron con el proyecto y con profesionales de SERNAPESCA (Sección “Anexos: Otros”).
- ✓ Un Seminario Internacional denominado “Desafíos en el uso responsable de antibióticos para una salmonicultura competitiva y sustentable (se adjunta invitación, programa y listado asistencia al seminario en Sección “Anexos: Otros”).
- ✓ Publicación científica en una revista internacional de impacto (PLOS ONE), que está en etapa de corrección por los editores “*Optimization of florfenicol dose against Piscirickettsia salmonis in Salmo salar through PK/PD studies*”. (En Sección “Anexos: Otros” se adjunta correo electrónico de recepción de manuscrito).
- ✓ Publicación artículo en revista nacional SalmonExpert N°63, agosto 2018, “Estableciendo las bases para el buen uso de antibióticos en la salmonicultura”, pp.62-64.

ANEXOS OBJETIVO 2

ANEXO 1: AQUAINNOVO - INFECCIÓN CON SRS Y TRATAMIENTO CON FLORFENICOL

INFORME DE BIOENSAYO

CODIGO: RE-ET-67

Título Ensayo	Evaluación de alternativas de manejo terapéutico con Florfenicol para control de <i>Psicirickettsia salmonis</i> en Salmon del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) en condiciones controladas
Tipo de Ensayo	Evaluación tratamiento farmacológico
Código de Ensayo	6303-DPG2-18
Especie	Salmon del Atlántico

Empresa Solicitante:

Autor(s): Marcela Oyarzún

Fecha Creación Informe : 10 de Octubre del 2018

Revisión Vigente de Informe 1

Fecha Revisión vigente 10 de Octubre del 2018



Participantes

EMPRESA PATROCINANTE

FAVET

Ítem	Descripción
Mandante Bioensayo	Betty San Martin Nuñez
cargo	Directora del Laboratorio de Farmacología
dirección	Santa Rosa 11735. La Pintana, Santiago
teléfono	+56 2 2-29785610
mail	bsanmartin@uchile.cl

Representante	Marcela Fresno
cargo	
dirección	Santa Rosa 11735. La Pintana, Santiago
teléfono	+56 984093933
mail	Marcela.fresno@gmail.com

EMPRESA INVESTIGADORA

AQUAINNOVO S.A.

Ítem	Descripción
Gerente General	Pablo Ibarra Faundez
Teléfono	+56 65-2433850
mail	Pablo.ibarra@aquainnovo.com

MONITOR

Jefe Bioensayo Titular	Marcela Oyarzún González
Teléfono	+ 56 65-2433852
mail	Marcela.oyarzun@aquainnovo.com

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Jefe Técnico Operacional	Marco Gómez
Teléfono	+56 65-2433851
mail	Marco.gomez@aquainnovo.com

Coordinador de Operaciones	Eduardo López
Teléfono	+56 65-2433851
mail	eduardo.lopez@aquainnovo.com

1. Objetivos del estudio

1.1 Objetivo general

Evaluar alternativas de manejo terapéutico con florfenicol, para el control de *Piscirickettsia salmonis* en Salmon del Atlántico (*Salmo salar*), en condiciones controladas.

1.2 Objetivos específicos

1.2.1. Realizar el desafío con *P. salmonis* en Salmon del Atlántico por vía intraperitoneal, con dilución calculada mediante determinación de dosis letal (DL₅₀), para lograr una mortalidad acumulada de 40 – 60 %.

1.2.2. Post desafío de los ejemplares, administrar tratamiento con Florfenicol (50 %) en dosis de 20 mg/Kg por vía oral y en micro raciones, bajo 2 estrategias de entrega; tratamiento con diagnóstico prematuro y tratamiento al presentarse la primera mortalidad atribuida a *P. salmonis*.

1.2.3. Determinar si la entrega de Florfenicol (50 %) con distinta estrategia, presenta diferencias significativas en la reducción de la mortalidad.

2. Emplazamiento del estudio

El bioensayo se realizó en las instalaciones del Centro ATC Patagonia, ubicado a 33 km de Puerto Montt, Carretera Austral sector Lenca, Chile.

3. Programa de operaciones de la fase clínica

A continuación, la Tabla 1 indica las actividades realizadas durante la ejecución del estudio, que consistió en un periodo de aclimatación, desafío con *P. salmonis*, administración del tratamiento y seguimiento de mortalidad

Tabla 1. Cronograma de actividades del ensayo

Hitos	jun-18			jul-18		ago-18							sep-18											
	Días	20	22	29	2	3	1	2	9	13	14	17	18	20	28	1	2	11	12	16	17	26	27	
Screening sanitario de animales de estudio	X																							
Muestreo exploratorio de peso ejemplares			X																					
Selección y pesaje inicial de ejemplares DL ₅₀			X																					
Aclimatación			X	X																				
Inoculación con <i>P. salmonis</i> peces DL ₅₀					X																			
Evaluación mortalidad peces DL ₅₀					X	X																		
Eliminación peces sobrevivientes DL50							X																	
Conformación estanques etapa de tratamientos								X																
Aclimatación								X	X															
Desafío con <i>P. salmonis</i>										X														
Toma de muestras y análisis confirmatorios de positividad (3 días)											X													
Administración tratamiento grupo 1												X	X	X	X									
Toma de muestras y análisis confirmatorios de positividad (6 días)													X	X										
Seguimiento mortalidad grupo 1																X	X	X	X					
Eliminación sobrevivientes grupo 1																					X			
Administración tratamiento grupo 2														X	X	X	X	X						
Seguimiento mortalidad grupo 2																		X	X	X	X			
Eliminación sobrevivientes grupo 2																							X	
Término ensayo																							X	

4. Materiales y Métodos

4.1 Diseño general del estudio

Un total de 210 ejemplares de la especie Salmon del Atlántico (*Salmo salar*) fueron mantenidos en 7 estanques de 0.5 m³ y agua de mar, para cumplir con una aclimatación de 5 días. Los estanques se conformaron con 30 ejemplares en cada uno, con peso promedio inicial en un rango a 392 – 405 g y coeficiente de variación de 3.5 a 4.8 %.

Al término del periodo de aclimatación, se procedió al desafío con *P. salmonis* mediante inyección intraperitoneal, en volumen de 0.2 mL/pez y dosis calculada previamente mediante DL₅₀ (1/10). Del total de estanques, 6 fueron desafiados y uno se asignó como control negativo (sin desafío). Posteriormente, se tomaron muestras de peces al día 3 y 6 post inoculación, para realizar análisis de necropsia y detección de SRS mediante la técnica de RT-PCR para confirmar la positividad en los ejemplares.

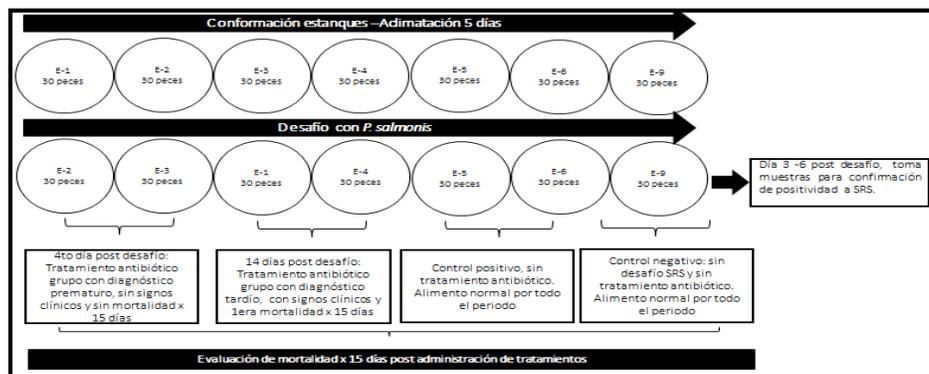
Confirmada la positividad a *P. salmonis*, al 4to día post desafío, se inició la administración del fármaco por vía oral, equivalente al tratamiento prematuro, mediante alimento comercial con el medicamento en dosis de 20 mg de florfenicol/kg de peso vivo. La administración fue a 2 de los estanques conformados, entregado en microraciones entre las 9:00 a 15:00 horas a razón de 1.25

% SFR y por 15 días consecutivos de alimentación. En este caso, la ración de alimentación correspondió a 100 % de alimento medicado y no se suplementó con alimento normal (Fig. 1). A sí mismo, se dejaron 3 estanques sin administración de alimento medicado, que sirvieron como control positivo (2 tk) y negativo (1 tk).

Posteriormente, el día 14 post desafío y después del registro de la primera mortalidad, se inició la administración del fármaco por vía oral a 2 estanques (Fig. 1), equivalente al tratamiento tardío, considerando igual dosis (20 mg/Kg), SFR y tiempo de administración.

Una vez finalizado el tratamiento de los grupos, los peces fueron alimentados con alimento normal y se dejaron por 15 días a la espera de evolución de la mortalidad. Luego los peces sobrevivientes fueron eliminados mediante sobredosis de anestesia dando así por terminado el ensayo.

Fig.1. Diseño general del estudio



4.2 Animales de estudio

Se utilizaron 210 Salmon del Atlántico (*Salmo salar*) con peso promedio general de 399 ± 5.06 gramos al iniciar la aclimatación y que luego alcanzaron un peso promedio 405 gramos al momento del desafío con *P. salmonis*. A sí mismo, se utilizaron 120 ejemplares con peso promedio de $395.1 \pm$

2.47 gramos para determinación de DL₅₀. Los peces se obtuvieron de un stock que mantenía el centro experimental, ingresados en el mes de abril del 2018 y transferidos al agua de mar el día 10 de mayo del 2018 (Tabla 2). El origen de los animales fue de la piscicultura Rio Maullin, Lote S17AGBLURM, perteneciente a la empresa Aquasan S.A, X región (Tabla 1).

TABLA N° 1. Especificación del grupo de peces

Ítem	Aspecto	Descripción
1	Especie	Salmon del Atlántico
2	Etapas de ciclo de vida.	Engorda
3	Peso promedio general	400 g
4	N° de peces totales	330
5	Procedencia	Piscicultura Rio Maullin, X región.
6	Grupo	S17AGBLURM
7	Estado fisiológico o sanitario que deben cumplir los peces en estudio.	Libre de IPN, BKD, SRS y <i>Vibrio ordalii</i>
8	Vacunas	ALPHA JECT 5.1 + ALPHA JECT LiVac®SRS

4.2.1 Condición sanitaria de animales de estudio

Los animales fueron examinados por el Médico Veterinario del centro experimental, para confirmar que los ejemplares estuvieran aptos para el estudio. La condición sanitaria de éstos, fue aprobada mediante el análisis de laboratorio en muestras, a través de la técnica RT-PCR para virus IPN, *Piscirickettsia salmonis* y *Renibacterium salmoninarum* (Anexo 1, Informe de ensayo Caso N° PVP- 19406).

El grupo fue vacunado en el centro de origen con vacuna ALPHA JECT 5.1 (Necrosis Pancreática Infecciosa, Síndrome Rickettsial del Salmón, Furunculosis atípica, Vibriosis y Anemia Infecciosa del Salmón) y ALPHA JECT LiVac®SRS, registrando un total de 1398 UTAs al día del desafío para DL₅₀ y 1775 UTAs al momento del desafío principal.

4.3 Criterio de inclusión y Exclusión de animales

4.3.1 Inclusión

Se incluyeron animales que cumplieron con un rango de peso de 360 – 440 gramos y coeficiente de variación menor o igual al 10 % al iniciar la aclimatación. A sí mismo, clínicamente sanos y que no recibieron tratamiento farmacológico o químico de ningún tipo, que pudiera interferir en los resultados, 90 días antes del inicio del estudio.

4.3.2 Exclusión

No se excluyeron ejemplares, ya que no se observó signos de enfermedad (incluyendo anorexia, letargia, nado errático, lesiones en piel, deformidades u otros) al momento de la selección y distribución en los estanques, descartando solo aquellos que no cumplieron con el rango de peso de selección.

4.4 Producto veterinario o Dieta

4.4.1 Fármaco

Se utilizó Florfenicol al 50 %, Polvo oral, correspondiente a un producto comercial utilizado habitualmente en la fabricación de alimento medicado para centros productivos.

4.4.2 Alimento medicado

El alimento con el medicamento necesario para llevar a cabo el estudio, fue producido por una planta de alimento comercial, bajo el mismo estándar utilizado en la fabricación del medicado destinado a centros productivos. Este fue formulado a razón de 3.2 Kg de Florfenicol (50 %) por tonelada de alimento y calibre de 4 mm

4.4.3 Precauciones

sobre el producto No aplica

4.5 Tratamientos durante el estudio

4.5.1 Permitidos:

Tratamiento con Florfenicol 50 %, en dosis de 20 mg/Kg a 4 estanques de estudio.

4.5.2 No Permitidos:

Durante el estudio, no se aplicó o expuso el grupo de peces a ningún otro tipo de tratamiento antibiótico y/o uso de productos químicos.

4.6 Condiciones de cultivo (Estanque)

Ítem	Aspecto	Descripción
1	Capacidad estanque	4 estanques de 0.5 m ³ para determinación de DL ₅₀ . 7 estanques de 0.5 m ³ para desafío principal con <i>P. salmonis</i> y administración de tratamientos.
2	Parámetros ambientales DL ₅₀ SRS	Temperatura: 14 +/- 1 °C Tasa recambio: 1.5/hora Salinidad: 30-33 ppt. Oxígeno: 80-120 % de saturación. Densidad inicial: 20 – 25 Kg/m ³ pH: 7-8
3	Parámetros ambientales Desafío principal SRS	Temperatura: 14 +/- 1 °C Tasa recambio: 1.5/hora Salinidad: 30-33 ppt. Oxígeno: 80-120 % de saturación. Densidad inicial: 20 -25 Kg/m ³ pH: 7-8

4.7 ETAPA EXPERIMENTAL

A. Determinación dosis letal (DL₅₀)

A.1 Distribución de ejemplares

A partir del grupo en stock, se realizó un muestreo exploratorio para establecer el peso promedio de la población. Posteriormente, se seleccionó un total 120 peces en un rango de peso de 350 -450 gramos. Estos fueron distribuidos en 4 estanques de 0.5 m³ de capacidad, con 30 ejemplares (cada uno), en agua de mar y sistema de recirculación. A continuación la Tabla 2, indica el peso promedio, densidad y coeficiente de variación de los estanques registrado al iniciar el desafío.

TABLA N°2. Peso promedio, coeficiente de variación y densidad al inicio de aclimatación.

Estanques	TK-1	TK-2	TK-3	TK-4
Peso promedio [g]	394,6	392,2	395,5	398,2
Longitud [cm]	32,0	32,0	31,8	32,2
Desv. Estándar	24,3	27,3	24,2	25,4
Coeficiente variación (%)	6,2	7,0	6,1	6,4
K	1,20	1,20	1,23	1,20
Max	445	450	448	447
Min	354	350	357	352
N° peces/TK	30	30	30	30
densidad (Kg/m ³)	23,7	23,5	23,7	23,9

A.2 Aislado *P. salmonis*

Se utilizó aislado de *P. salmonis* estandarizado por Aquainnovo S.A, procedente del laboratorio ADL Diagnostic Chile Ltda (Tabla 3). El inóculo madre registró un título de $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL, determinada a través del método Karber-Spearman, a partir del cual se realizaron las diluciones en base 10 (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000). A sí mismo, se realizó la evaluación de pureza, considerando análisis de RT-PCR ISAv, IPNV, BKD, *F. psychrophilum* y cultivos bacteriológicos en medio TSA y TSA/s a 18 y 35° de incubación (Informe PM-88149).

TABLA N° 3. Aislado de *P. salmonis*

Laboratorio origen	ADL Diagnostic Chile Ltda.
Agente	<i>Piscirickettsia salmonis</i>
Cepa	LF-89
Código laboratorio	PM-38986
Especie de aislado original	Salmon del Atlántico
Especie en donde se reaislo	Salmón del Atlántico
Fecha aislamiento original	30-04-13
Órgano de aislamiento	Hígado
N° de animalizaciones	1
Condición del aislado	Reanimalizado-criopreservado
Tipo producción del inóculo	Cultivo bacteriológico

TABLA N° 4. Recuento bacteriano en placa agar

Dilución inóculo	Recuento bacteriano (ufc/mL)
1:10	8.47×10^8
1:100	7.10×10^7
1:1000	7.33×10^6
1:10000	4.80×10^5

A.3 Inoculación con *P. salmonis*

Para la ejecución, los peces fueron extraídos desde el estanque y dispuestos en un contenedor con solución anestésica, luego se tomaron individualmente y se sostuvieron con la cara ventral hacia arriba. La aguja se insertó en un ángulo de aproximadamente 90° en la línea media ventral, entre las aletas pectorales y las pélvicas, inyectando 0,2 mL/ pez (Fig. 2).



Figura 2. Inoculación con *P. salmonis* DL₅₀.

Posterior a la inoculación, los ejemplares fueron transferidos al estanque de origen, monitoreando constantemente el estado de recuperación. Los peces en general se observaron en buena condición, comportamiento normal y no se registró mortalidad post inoculación.

Finalizado el procedimiento, los estanques se dejaron por 30 días en desafío, durante los cuales se recolectaron datos de mortalidad, alimentación y parámetros ambientales.

A.4 Retiro de mortalidad

La mortalidad fue retirada diariamente y cada vez que se produjo, registrando el peso al momento de muerte e identificando la dilución correspondiente asociada a cada estanque.

A.5 Parámetros ambientales

Durante toda la etapa de desafío se midieron y registraron parámetros ambientales de salinidad (ppt), pH, temperatura y oxígeno, de acuerdo a la rutina del centro experimental. La temperatura promedio fue de 14.5 ± 0.58 , salinidad de 32 ppt, pH de 7.0 a 7.1 y niveles de oxígeno de 100 -120

% de saturación. A continuación, la Tabla 5, indica los parámetros registrados durante el periodo de evaluación.

TABLA N°5. Parámetros ambientales registrados durante el desafío de DL₅₀

Dia	Fecha	T (°C)	pH	Sal (ppt)	Saturación oxígeno (%)			
					TK-1	TK-2	TK-3	TK-4
1	03-jul-18	13,7	7,1	32,0	102,5	103,0	100,0	100,0
2	04-jul-18	14,3	7,0	32,0	112,0	109,7	104,0	111,3
3	05-jul-18	13,4	7,0	32,0	113,7	110,0	105,7	110,0
4	06-jul-18	14,8	7,0	32,0	115,7	115,7	114,3	117,0
5	07-jul-18	13,8	7,0	32,0	116,0	109,5	110,0	115,5
6	08-jul-18	13,9	7,0	32,0	111,7	108,0	108,0	110,3
7	09-jul-18	14,6	7,0	32,0	117,7	115,0	116,3	118,7
8	10-jul-18	14,8	7,0	32,0	116,3	112,0	118,3	117,0
9	11-jul-18	13,5	7,0	32,0	112,0	104,0	111,0	106,7
10	12-jul-18	14,8	7,0	32,0	116,0	114,7	118,7	116,3
11	13-jul-18	15,2	7,0	32,0	118,7	115,0	117,0	117,0
12	14-jul-18	12,7	7,0	32,0	118,0	116,7	118,0	115,67
13	15-jul-18	15,2	7,0	32,0	115,0	105,7	114,67	114,67
14	16-jul-18	14,0	7,0	32,0	117,3	110,3	116,3	113,7
15	17-jul-18	14,4	7,0	32,0	116,0	109,3	118,3	113,3
16	18-jul-18	14,9	7,0	32,0	114,7	110,3	118,3	111,0
17	19-jul-18	14,4	7,0	32,0	114,7	110,0	115,0	114,7
18	20-jul-18	14,6	7,0	32,0	112,7	106,0	113,3	108,7
19	21-jul-18	14,9	7,0	32,0	118,7	110,7	111,7	116,7
20	22-jul-18	15,0	7,0	32,0	120,0	118,3	111,3	120,0
21	23-jul-18	14,8	7,0	32,0	117,0	115,3	109,7	117,0
22	24-jul-18	14,9	7,0	32,0	118,0	111,7	113,7	116,0
23	25-jul-18	14,8	7,0	32,0	117,7	109,3	115,0	115,7
24	26-jul-18	14,8	7,0	32,0	116,3	114,7	109,7	117,3
25	27-jul-18	14,9	7,0	32,0	118,3	111,0	110,3	114,3
26	28-jul-18	14,8	7,0	32,0	118,7	108,7	110,7	117,3
27	29-jul-18	14,5	7,0	32,0	120,0	108,0	103,5	116,0
28	30-jul-18	14,8	7,0	32,0	116,3	110,0	110,3	117,7
29	31-jul-18	14,8	7,0	32,0	110,3	109,0	117,0	117,0
30	01-ago-18	14,7	7,0	32,0	116,7	115,3	110,3	116,0

Temperatura y oxígeno (% sat.)

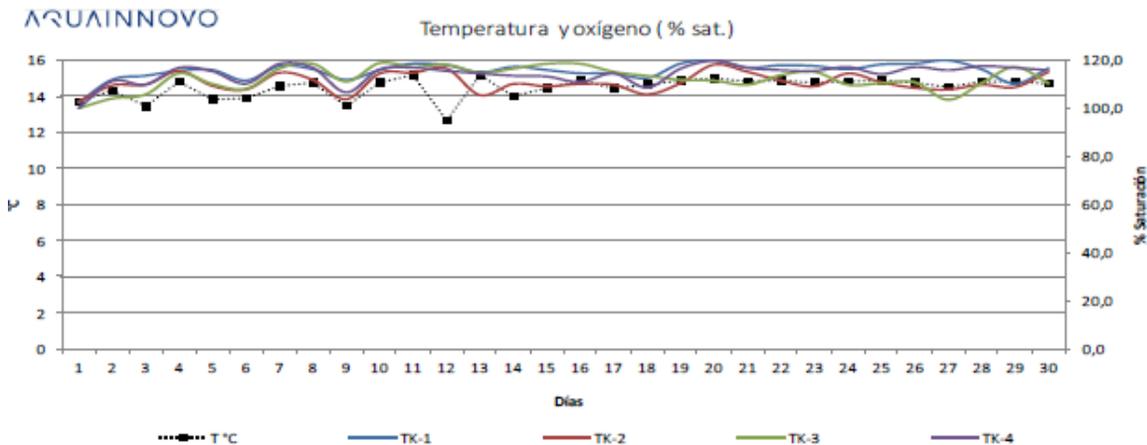


Figura 3. Oxígeno y temperatura durante desafío de DL₅₀

A.6 Diagnóstico

Parte de la mortalidad fue analizada en el Laboratorio Antares S.A, mediante observaciones anatomopatológicas y RT-PCR-SRS, como confirmación de causa de muerte.

B. Desafío principal con *P. salmonis*

B.1 Distribución de ejemplares

Se seleccionó un total 210 peces en un rango de peso de 360 - 440 gramos, con un promedio general de 399.7 ± 5.06 y que presentó una diferencia de 1.5 % respecto al peso registrado en los ejemplares utilizados en DL₅₀. Estos fueron distribuidos en 7 estanques de 0.5 m³ de capacidad, con 30 ejemplares cada uno, en agua de mar y sistema de recirculación (Fig. 4). A continuación la Tabla 6, indica el peso promedio, densidad y coeficiente de variación de los estanques al iniciar la etapa de aclimatación previo al desafío con *P. salmonis*.

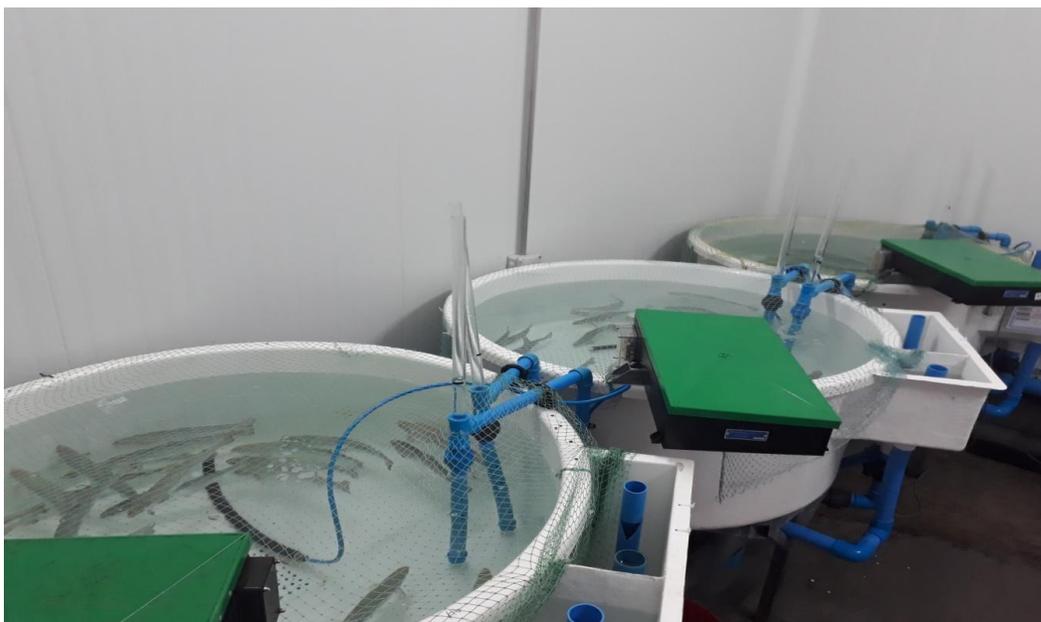


Figura 4. Distribución de ejemplares para desafío principal con *P. salmonis*.

TABLA N°6. Peso inicial de estanques previo al desafío principal con *P. salmonis*.

Estanques	TK- 1	TK- 2	TK- 3	TK- 4	TK- 5	TK- 6	TK- 9
Peso promedio [g]	402,1	402,1	393,6	392,3	403,4	398,9	405,7
Longitud [cm]	32,3	32,7	32,4	32,4	32,7	32,5	32,4
Desv. Estándar	19,4	16,5	13,9	13,6	17,5	16,3	15,2
CV (%)	4,8	4,1	3,5	3,5	4,3	4,1	3,7
K	1,19	1,15	1,16	1,15	1,16	1,16	1,23
Max	425	425	420	430	430	428	438
Min	360	380	366	365	365	380	380
Nº Peces/Estanque	30	30	30	30	30	30	30
densidad (Kg/m ³)	24,1	24,1	23,6	23,5	24,2	23,9	24,3

B.2 Aclimatación

Post conformación de estanques, se dio un periodo de aclimatación de 5 días previo al desafío. Durante este periodo, los peces fueron inspeccionados visualmente, observando buena conducta y ausencia de mortalidad. La temperatura registró un promedio de 14.6 ± 0.31 °C y el consumo de alimento varió de 0.56 a 1.04 % SFR entre los estanques.

B.3 Inoculación con *P. salmonis*

Finalizada la aclimatación, se procedió al desafío de los peces mediante inyección intraperitoneal. Los ejemplares fueron extraídos desde su estanque de origen y dispuestos en un contenedor con solución anestésica, luego se tomaron individualmente y se sostuvieron

con la cara ventral hacia arriba. La aguja se insertó en un ángulo de aproximadamente 90° en la línea media ventral, entre las aletas pectorales y las pélvicas, inyectando 0,2 mL/ pez. El aislado de *P. salmonis* fue el mismo utilizado en DL₅₀ y dilución de 1/10, calculada 30 días previos al desafío principal.

B.4 Confirmación positividad a *P. salmonis*

Se tomaron muestras de peces al día 3 y 6 post desafío, para ser analizada mediante observaciones anatomopatológicas y RT-PCR-SRS (Laboratorio Antares S.A), como verificación de positividad del patógeno. De esta manera, se confirmó la presencia de *P. salmonis* (matriz Riñón-Hígado y Bazo) a partir del día 3 post desafío.

C. Administración de tratamiento antibiótico

C.1. Estrategias de administración

C.1.1. Tratamiento prematuro: Peces con diagnóstico positivo a *P. salmonis*, sin hallazgos de lesiones externas o internas atribuibles al patógeno y sin mortalidad.

Inicio de tratamiento medicado a partir del día 3 post desafío.

C.1.2. Tratamiento tardío: Peces con diagnóstico positivo a *P. salmonis* (mediante la técnica de RT-PCR), signos clínicos, disminución de apetencia y con inicio de mortalidad.

Inicio de tratamiento medicado a partir del día 14 post desafío.

C.2. Administración de alimento medicado

La entrega del alimento medicado, se realizó por 15 días consecutivos (sin interrupción) a razón de 1.25 % de peso vivo (SFR), mediante alimentación automática y microraciones entre las 9:00 am y 15:00 horas. La ración de alimentación medicado correspondió a 100 % y no se suplementó con alimento normal. Los estanques asignados a control positivo y negativo, fueron alimentados a igual SFR con alimento sin medicación por todo el periodo de evaluación.

Posterior a la administración del alimento medicado/día, se estimó el consumo de alimento en todos los estanques de prueba, mediante la recolección del no consumido desde las cajas decantadoras que posee cada estanque.

C.3 Retiro de mortalidad

La mortalidad fue retirada diariamente y cada vez que se produjo, registrando el peso al momento de muerte e identificando el grupo correspondiente asociado a cada estanque.

C.4 Diagnóstico

Parte de la mortalidad fue analizada en el laboratorio Antares S.A, mediante observaciones anatomopatológicas y RT-PCR-SRS, como confirmación de causa de muerte. A sí mismo, en parte de la mortalidad no analizada, se tomaron muestras de tejido en RNA later (Riñón e Hígado) en forma individual, que fue almacenada a -20°C en caso de requerir nuevos análisis. Finalmente, al término del estudio se tomaron 5 muestras de Riñón e Hígado por grupo, a partir de peces sobrevivientes, que se encuentran almacenadas a -20°C para análisis posteriores.

C.5 Parámetros ambientales

Durante toda la etapa de desafío se midieron y registraron parámetros ambientales de salinidad (ppt), pH, temperatura y oxígeno, de acuerdo a la rutina del centro experimental. La temperatura promedio fue de 14.9 ± 0.32 , salinidad de 32 ppt, pH de 7.0 y niveles de oxígeno de 100 -120 % de saturación. A continuación la Tabla 7, indica los parámetros registrados durante el periodo de evaluación.

TABLA N° 7. Parámetros ambientales registrados durante el desafío principal con *P. salmonis*.

Fecha	T °C	pH	sal (ppt)	TK-1	TK-2	TK-3	TK-4	TK-5	TK-6	TK-9
14-ago-18	14,9	7,0	32,0	111,7	115,3	113,7	109,7	117,3	119,7	98,0
15-ago-18	14,7	7,0	32,0	111,3	110,0	109,3	109,0	115,3	113,7	100,3
16-ago-18	15,3	7,0	32,0	118,3	107,7	115,0	119,0	118,7	114,7	104,7
17-ago-18	15,0	7,0	32,0	109,0	115,7	113,3	118,3	115,7	116,7	93,7
18-ago-18	15,5	7,0	32,0	109,7	113,7	111,0	114,7	116,3	111,7	94,5
19-ago-18	14,6	7,0	32,0	109,3	117,3	113,7	115,7	118,7	118,3	92,8
20-ago-18	15,3	7,0	32,0	103,7	97,7	105,7	93,7	98,3	101,0	100,3
21-ago-18	15,4	7,0	32,0	104,7	106,7	115,0	116,3	119,3	112,7	112,3
22-ago-18	15,6	7,0	32,0	108,7	114,7	117,7	117,3	117,0	117,0	112,7
23-ago-18	15,2	7,0	32,0	110,0	103,0	115,0	117,0	115,0	115,0	115,4
24-ago-18	14,4	7,0	32,0	118,0	114,7	115,0	116,7	102,7	102,0	118,0
25-ago-18	14,8	7,0	32,0	111,5	111,7	115,7	101,5	102,5	106,5	118,3
26-ago-18	14,5	7,0	32,0	111,5	110,5	114,0	105,0	108,0	106,5	115,3
27-ago-18	14,8	7,0	32,0	105,0	105,0	106,0	117,0	114,5	114,5	118,7
28-ago-18	14,8	7,0	32,0	108,7	112,7	102,0	118,7	116,7	117,7	99,0
29-ago-18	14,3	7,0	32,0	118,3	107,0	102,3	118,0	114,3	115,3	115,7
30-ago-18	14,6	7,0	32,0	118,7	112,0	112,7	111,3	110,0	105,3	104,0
31-ago-18	14,7	7,0	32,0	115,7	114,3	104,0	118,7	116,3	113,3	101,7
01-sep-18	14,6	7,0	32,0	111,7	109,7	102,0	115,3	111,7	112,7	104,7
02-sep-18	15,2	7,0	32,0	113,7	101,7	109,7	115,3	113,3	118,0	118,3
03-sep-18	15,0	7,0	32,0	114,3	105,0	107,7	112,3	113,7	112,7	116,7
04-sep-18	14,8	7,0	32,0	115,3	100,7	107,3	117,3	118,3	117,3	102,1
05-sep-18	14,4	7,0	32,0	117,3	111,7	104,3	116,0	113,0	114,7	115,7
06-sep-18	14,3	7,0	32,0	116,7	111,7	107,3	116,7	118,7	115,7	113,0
07-sep-18	14,8	7,0	32,0	118,7	114,7	113,7	117,3	100,0	102,3	113,0
08-sep-18	15,4	7,0	32,0	117,7	113,7	112,7	113,7	102,0	105,0	114,3
09-sep-18	15,5	7,0	32,0	115,7	115,7	108,7	108,0	104,0	103,0	93,0
10-sep-18	15,1	7,0	32,0	111,0	110,3	117,3	109,3	111,3	108,3	113,5
11-sep-18	15,0	7,0	32,0	118,0	104,3	117,3	116,3	117,0	118,7	120,0
12-sep-18	14,7	7,0	32,0	116,7	104,0	101,0	104,0	99,0	117,3	120,0
13-sep-18	15,1	7,0	32,0	114,0	113,5	100,5	117,0	117,5	116,0	125,0
14-sep-18	15,1	7,0	32,0	117,0	117,7	107,67	116,7	118,3	118,0	121,3
15-sep-18	15,3	7,0	32,0	110,0	111,7	109,67	114,3	112,3	110,7	119,0
16-sep-18	15,1	7,0	32,0	107,0	105,7	111,33	105,7	112,0	110,3	118,0
17-sep-18	15,0	7,0	32,0	117,3			116,3	106,3	118,7	116,0
18-sep-18	15,0	7,0	32,0	109,7			118,0	105,0	111,3	112,7
19-sep-18	14,6	7,0	32,0	110,0			117,0	110,0	119,0	112,0
20-sep-18	14,8	7,0	32,0	112,7			105,7	102,0	112,0	105,5
21-sep-18	14,6	7,0	32,0	103,0			106,7	101,3	115,0	115,0
22-sep-18	14,7	7,0	32,0	119,0			115,0	107,0	116,0	118,0
23-sep-18	14,6	7,0	32,0	119,0			110,0	109,0	115,0	124,0
24-sep-18	14,8	7,0	32,0	113,7			115,0	103,7	118,0	119,3
25-sep-18	15,0	7,0	32,0	116,7			112,3	106,7	117,3	96,6
26-sep-18	14,8	7,0	32,0	117,7			111,0	100,7	116,7	94,4

5. Resultados

5.1. Determinación de dosis letal (DL₅₀)

La mortalidad fue observada a partir del día 17 post desafío, en la dilución con mayor concentración de la bacteria. En general, se registró mortalidad en los peces desafiados con las diluciones mas concentradas (1/10 -1/100), mientras que las más diluidas (1/1000 - 1/10000) no presentaron mortalidad.

TABLA N° 8. Mortalidad diaria y acumulada en desafío de DL₅₀

Fecha	Día	TK-1 (1 / 10)					TK-2 (1 / 100)					TK-3 (1 / 1000)					TK-4 (1 / 10000)				
		N° Total	Mort/día	% Mort.	Mort. Acum.	% Mort. Acum.	N° Total	Mort/día	Mort. Acum.	% Mort. Acum.	N° Total	Mort/día	Mort. Acum.	% Mort. Acum.	N° Total	Mort/día	Mort. Acum.	% Mort. Acum.			
03-07-2018	1	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
04-07-2018	2	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
05-07-2018	3	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
06-07-2018	4	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
07-07-2018	5	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
08-07-2018	6	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
09-07-2018	7	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
10-07-2018	8	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
11-07-2018	9	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
12-07-2018	10	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
13-07-2018	11	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
14-07-2018	12	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
15-07-2018	13	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
16-07-2018	14	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
17-07-2018	15	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
18-07-2018	16	30	0	0,0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
19-07-2018	17	29	1	3,3	1	3,33	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
20-07-2018	18	28	1	3,4	2	6,67	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
21-07-2018	19	24	4	14,3	6	20,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
22-07-2018	20	20	4	16,7	10	33,33	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
23-07-2018	21	19	1	5,0	11	36,67	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
24-07-2018	22	19	0	0,0	11	36,67	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
25-07-2018	23	17	2	10,5	13	43,33	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
26-07-2018	24	17	0	0,0	13	43,33	29	1	1	3,33	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
27-07-2018	25	16	1	5,9	14	46,67	29	0	1	3,33	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
28-07-2018	26	15	1	6,3	15	50,00	28	1	2	6,67	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
29-07-2018	27	15	0	0,0	15	50,00	28	0	2	6,67	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
30-07-2018	28	15	0	0,0	15	50,00	28	0	2	6,67	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
31-07-2018	29	15	0	0,0	15	50,00	28	0	2	6,67	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			
01-08-2018	30	14	1	6,7	16	53,33	28	0	2	6,67	30	0	0	0,00	30	0	0	0,00			

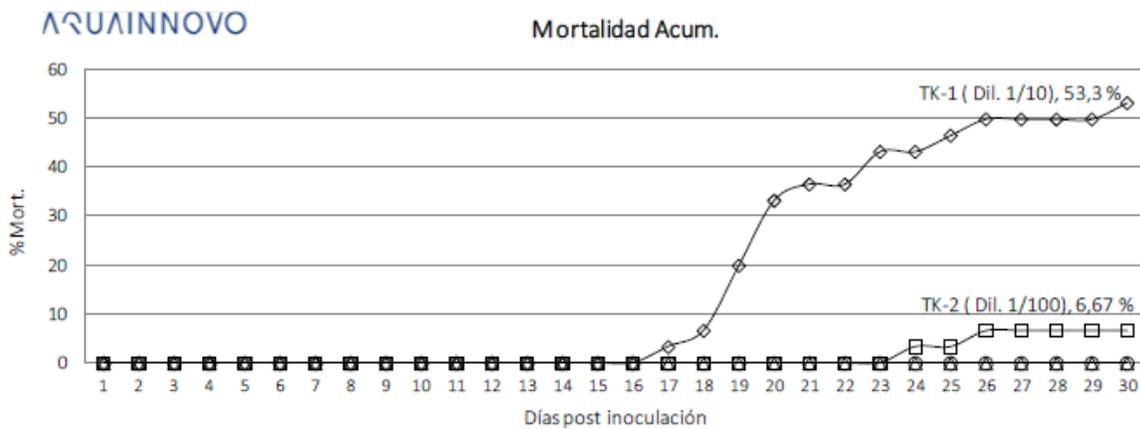


Figura 5. Mortalidad acumulada en Salmon del Atlántico post desafío con *P. salmonis* por vía intraperitoneal, en dilución de 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000.

5.2. Tratamiento con Florfenicol

5.2.1 Confirmación de la presencia de *P. salmonis* previo a la entrega de tratamiento

con Florfenicol Las muestras analizadas el día 3 post desafío, presentaron un 75 % de

prevalencia a *P. salmonis*

(Tabla 9). Internamente se observó congestión en tejido adiposo y ciegos pilóricos (Fig. 6-8-9) sin embargo, estos hallazgos no son del todo atribuibles a un cuadro de SRS.

Las muestras analizadas al día 6 post desafío, presentaron un 100 % de prevalencia a *P. salmonis*. Los hallazgos internos fueron similares a los registrados al día 3, aunque se observó mayor congestión en tejido adiposo y ciegos pilóricos (Fig. 10 a 13)

TABLA N° 9. Resultados de RT-PCR-SRS previo a la administración de tratamiento con Florfenicol (50 %).

TK	Día	N° pez	SRS (+)	Ct	% Prevalencia
2	3	1	2	25.19	100
		2		33.30	
3	3	1	1	No Ct	50
		2		27.89	
1	6	1	2	29.81	100
		2		28.75	
5	6	1	2	24.97	100
		2		32.41	

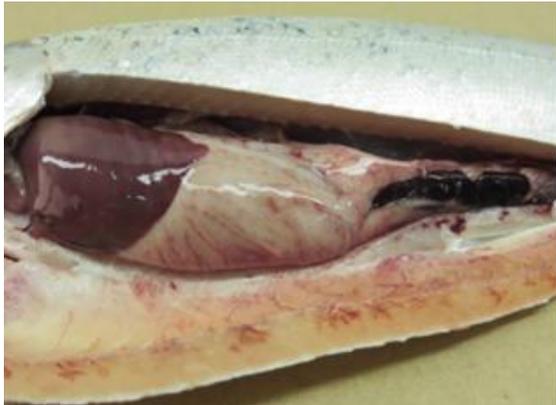


Fig. 6. Tejido adiposo moderado en cantidad y congestivo escaso en cantidad. Bazo con tumefacción (pez N° 1 del TK-2, día 3 post desafío).



Fig. 7. Hígado color café. Tejido adiposo (pez N° 2 del TK-2, día 3 post desafío).

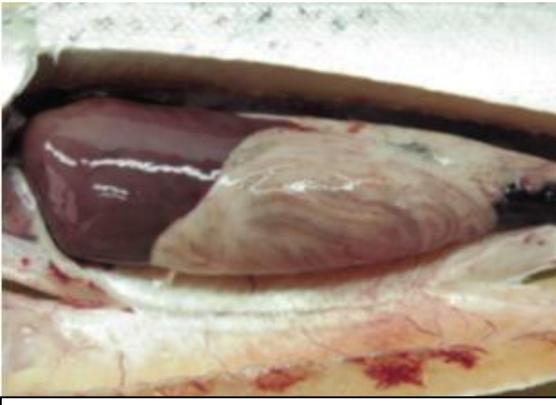


Fig. 8. Tejido adiposo moderado en cantidad, melanosis y congestivo (pez N° 1 del TK-3, día 3 post desafío).



Fig. 9. Hígado tumefacto. Tejido adiposo moderado en cantidad y congestivo (pez N° 2 del TK-3, día 3 post desafío).



Fig. 10. Tejido adiposo con melanosis, congestión moderada y adherido a bazo (pez N° 1 del TK-1, día 6 post Desafío).



Fig. 11. Tejido adiposo con melanosis y congestivo. (pez N° 2 del TK-1 día 6 post desafío).



Fig. 12. Hígado tumefacto. Esplenomegalia (pez N°1 del TK-5, día 6 post desafío).



Fig. 13. Tejido adiposo con melanosis y congestivo. (pez N° 2 del TK-5, día 6 post desafío).

5.2.2 Consumo de alimento medicado (% SFR)

Las siguientes figuras, grafican el consumo de alimento medicado de acuerdo a las 2 estrategias de entrega que fueron evaluadas.

En el caso del tratamiento prematuro, los ejemplares mantuvieron un consumo relativamente constante del medicado, con un promedio de 1.15 % SFR en los 15 días de tratamiento. La pérdida de medicado (no consumido), fue equivalente a un 8 % respecto al calculado (1.25 %). Posterior al tratamiento, los peces registraron un aumento en el consumo de alimento, alcanzando SFR de 1.42 a 1.48 % (Fig. 14).

Respecto al tratamiento tardío, la administración comenzó junto con la primera mortalidad (día 14 post desafío) y una baja en el consumo de alimento (Fig. 15). Los peces tuvieron un

consumo de alimento muy por debajo al SFR establecido (1.25 %), especialmente los primeros días de alimentación, registrando una pérdida total al final del tratamiento, del 28 % de alimento medicado.



Figura 14. Consumo alimento (% SFR) durante la administración de tratamiento antibiótico en grupo con entrega prematura.



Figura 15. Consumo alimento (% SFR) durante la administración de tratamiento antibiótico, en grupo con entrega tardía.

El grupo control positivo, sin tratamiento antibiótico, registró un comportamiento similar al grupo con tratamiento tardío, con una baja en el consumo de alimento a partir del inicio de la mortalidad y durante el brote. Posteriormente, se observó un aumento en el consumo con SFR de 1.0 a 1.5 % que fue coincidente con la estabilización de la mortalidad (Fig. 16).



Figura 16. Consumo alimento (% SFR) durante el desafío con *P. salmonis*, grupo sin tratamiento antibiótico.

El grupo control negativo, mantuvo un consumo constante de alimentación, a excepción de los primeros días de estudio, con una tasa promedio de 1.36 % SFR (Fig. 17).



Figura 17. Consumo alimento (% SFR) grupo sin desafío con *P. salmonis* y sin tratamiento antibiótico.

5.3. Mortalidad

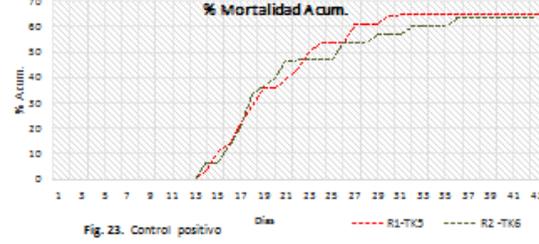
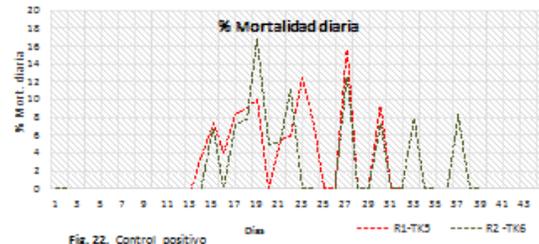
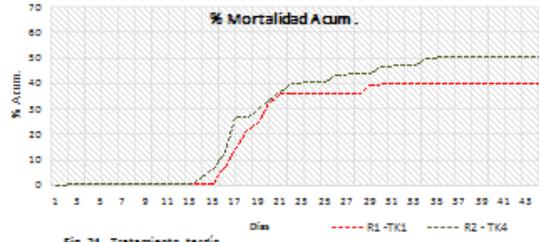
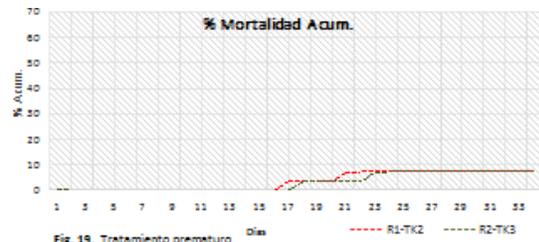
5.3.1 Mortalidad diaria y acumulada por tratamiento y estanque

Las siguientes gráficas, indican el % de mortalidad diaria y acumulada registrada para cada estrategia de entrega del alimento medicado y control positivo.

Como se puede observar, el grupo control sin medicación, registró un mayor % de mortalidad diaria y acumulada respecto a los grupos tratados con florfenicol, acumulando el 63 y 64 % en los respectivos estanques (Fig. 22-23).

El grupo tratado en forma temprana, presentó bajo % de mortalidad/ día (Fig. 18), respecto a la observada en el grupo control durante el mismo periodo de tiempo. A sí mismo, este grupo alcanzó un 7.14 % de mortalidad acumulada al término de la evaluación (Fig. 19).

El grupo tratado en forma tardía, presentó mayor % de mortalidad/ día (Fig. 20), respecto a la observada en el grupo tratado en forma temprana durante el mismo periodo de tiempo. La mortalidad acumulada del grupo registro de 39 y 50 % en los respectivos estanques (Fig. 21).



5.3.2 Mortalidad diaria y acumulada por tratamiento

La siguiente gráfica (Fig. 24) representa el % de mortalidad diaria por grupo de tratamiento. Según se observa, el grupo con tratamiento prematuro registró menor % /día (3.6 – 3.7 %), respecto al grupo con tratamiento tardío y grupo control (1.7 – 13 %).

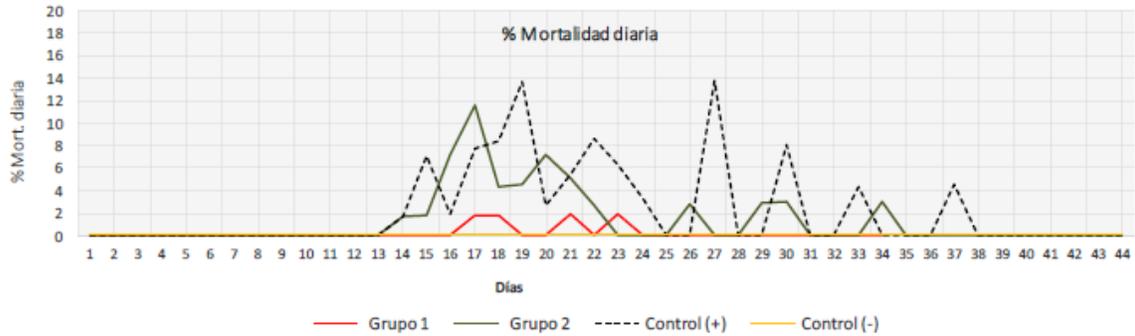


Figura 24: % Mortalidad diaria por grupo de estudio

Al finalizar el periodo de evaluación, las 2 estrategias de entrega del alimento medicado redujeron la mortalidad respecto al grupo control, sin embargo, el grupo con tratamiento prematuro registró la mayor reducción (Fig. 25).

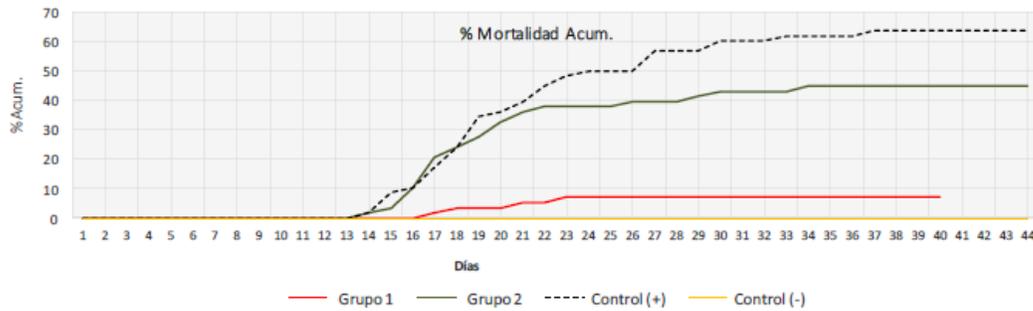


Figura 25. % Mortalidad acumulada por grupo de estudio

5.4. Diagnóstico

La mortalidad analizada presentó lesiones internas atribuibles a *P. salmonis*, siendo las más recurrentes Hepatomegalia, Esplenomegalia, Hemorragia en tejido adiposo y ciegos pilóricos, Cerebro congestivo (Fig. 24 - 11). Por otra parte, en el total de muestras analizadas se detectó la presencia de *P. salmonis*, con Ct de 16 a 27.

Tabla 10. Resultado análisis de IFAT SRS riñón en Salmón del Atlántico durante el desafío con *P. salmonis*

TK	Grupo	N° pez	SRS (+)	Ct	% Prevalencia
1	tratamiento tardío	1	2	20.73	100
		2		23.18	
				17.44	
2	tratamiento prematuro	1	1	21.32	100
3	tratamiento prematuro	1	2	24.06	100
4	tratamiento tardío	1	2	20.95	100
		2		26.04	
				16.82	
5	Control (+)	1	2	21.11	100
		2		22.30	
				16.82	
6	Control (+)	1	2	27.64	100
		2		17.27	
				17.24	

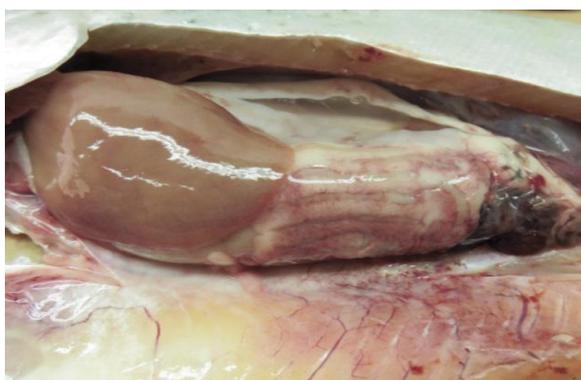


Figura 26. Hepatomegalia, tejido adiposo y ciegos pilóricos congestivos.



Figura 27. Cerebro congestivo.

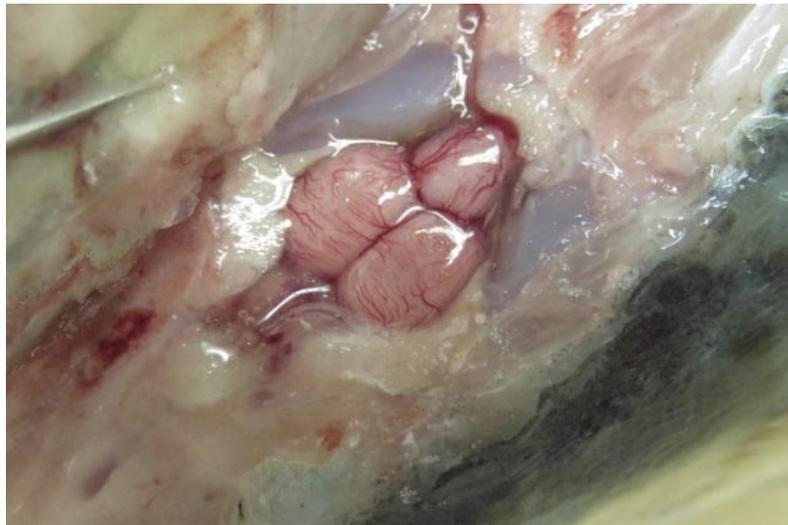


Figura 28. Esplenomegalia. Bazo con pseudomenbrana.

6. CONCLUSIONES

A continuación, se concluye con los resultados relevantes del estudio, en base a los objetivos planteados y metodología descrita.

- El desafío principal con *P. salmonis*, registró un comportamiento y % de mortalidad acumulada de acuerdo a lo esperado (50 -60 %), siendo semejante al calculado previamente, mediante la determinación de DL₅₀ (30 días de evaluación).
- Durante la evaluación, se observó una clara diferencia respecto a la conducta y respuesta a la alimentación de los ejemplares, entre el grupo tratado en forma temprana y tardíamente. Los peces tratados prematuramente tuvieron un consumo de alimento constante, durante el tratamiento y posterior a este, mientras que, los ejemplares con tratamiento tardío presentaron conducta más errática (principalmente letárgica) y mayor pérdida de alimento medicado.
- Al finalizar el periodo de evaluación, las 2 estrategias de entrega del alimento medicado redujeron la mortalidad respecto al grupo control, sin embargo, el grupo con tratamiento prematuro, registró la mayor sobrevivencia con un 92.8 %

De acuerdo a lo indicado, se puede concluir que las estrategias de administración oral con Florfenicol (50 %), en dosis de 20 mg/Kg y micro-rationes, aumentaron la sobrevivencia de los peces al ser expuestos a *Piscirickettsia salmonis*, obteniendo diferencias en la reducción de la mortalidad respecto al grupo que no recibió medicación. Sin embargo, se observa que el grupo tratado en forma prematura obtuvo mayor sobrevivencia.

ANEXO 2: AQUAINNOVO - INFECCIÓN CON SRS Y TRATAMIENTO CON OXITETRACICLINA

INFORME DE BIOENSAYO

Título Ensayo	Evaluación de alternativas de manejo terapéutico con Oxitetraciclina para control de <i>Psicirickettsia salmonis</i> en Salmon del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) en condiciones controladas
Tipo de Ensayo	Evaluación tratamiento farmacológico
Código de Ensayo	6303-DPG2-18
Especie	Salmon del Atlántico

Empresa Solicitante:

Autor(s):	Marcela Oyarzún
Fecha Creación Informe :	28 de Noviembre del 2018
Revisión Vigente de Informe	1
Fecha Revisión vigente	28 de Noviembre del 2018



Participantes

EMPRESA PATROCINANTE

FAVET

Ítem	Descripción
Mandante Bioensayo	Betty San Martin Nuñez
cargo	Directora del Laboratorio de Farmacología
dirección	Santa Rosa 11735. La Pintana, Santiago
teléfono	+56 2 2-29785610
mail	bsanmartin@uchile.cl

Representante	Marcela Fresno
cargo	
dirección	Santa Rosa 11735. La Pintana, Santiago
teléfono	+56 984093933
mail	Marcela.fresno@gmail.com

EMPRESA INVESTIGADORA

AQUAINNOVO S.A.

Ítem	Descripción
Gerente General	Pablo Ibarra Faundez
Teléfono	+56 65-2433850
mail	Pablo.ibarra@aquainnovo.com

MONITOR

Jefe Bioensayo Titular	Marcela Oyarzún González
Teléfono	+ 56 65-2433852
mail	Marcela.oyarzun@aquainnovo.com

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Jefe Técnico Operacional	Marco Gómez
Teléfono	+56 65-2433851
mail	Marco.gomez@aquainnovo.com

Coordinador de Operaciones	Eduardo López
Teléfono	+56 65-2433851
mail	eduardo.lopez@aquainnovo.com

1. Objetivos del estudio

1.1 Objetivo general

Evaluar alternativas de manejo terapéutico con oxitetraciclina, para el control de *Piscirickettsia salmonis* en Salmon del Atlántico (*Salmo salar*), en condiciones controladas.

1.2 Objetivos específicos

1.2.1. Realizar el desafío con *P. salmonis* en Salmon del Atlántico por vía intraperitoneal, con dilución calculada mediante determinación de dosis letal (DL₅₀), para lograr una mortalidad acumulada de 40 – 60 %.

1.2.2. Post desafío de los ejemplares, administrar tratamiento con Oxitetraciclina (80 %) en dosis de 100 mg/Kg por vía oral y en micro raciones, bajo 2 estrategias de entrega; tratamiento con diagnóstico prematuro y tratamiento al presentarse la primera mortalidad atribuida a *P. salmonis*.

1.2.3. Determinar si la entrega de oxitetraciclina (80 %) con distinta estrategia, presenta diferencias significativas en la reducción de la mortalidad.

2. Emplazamiento del estudio

El bioensayo se realizó en las instalaciones del Centro ATC Patagonia, ubicado a 33 km de Puerto Montt, Carretera Austral sector Lenca, Chile.

3. Programa de operaciones de la fase clínica

A continuación, la Tabla 1 indica las actividades realizadas durante la ejecución del estudio, que consistió en un periodo de aclimatación, desafío con *P. salmonis*, administración del tratamiento y seguimiento de mortalidad.

Tabla 1. Cronograma de actividades del ensayo

Hitos	Octubre												nov-18					
	Días	1	4	8	9	12	13	16	23	27	28	8	6	7	11	12	21	22
Muestreo exploratorio de peso ejemplares	X																	
Selección, pesaje y distribución de peces en estanques		X																
Aclimatación		X	X															
Desafío con <i>P. salmonis</i>				X														
Toma de muestras y análisis confirmatorios de positividad (3 días)					X													
Toma de muestras y análisis confirmatorios de positividad (6 días)							X											
Administración tratamiento grupo 1						X	X	X	X									
Seguimiento mortalidad grupo 1										X	X	X	X	X				
Eliminación sobrevivientes grupo 1																X		
Administración tratamiento grupo 2								X	X	X	X	X						
Seguimiento mortalidad grupo 2													X	X	X	X		
Eliminación sobrevivientes grupo 2																		X
Término ensayo																		

4. Materiales y Métodos

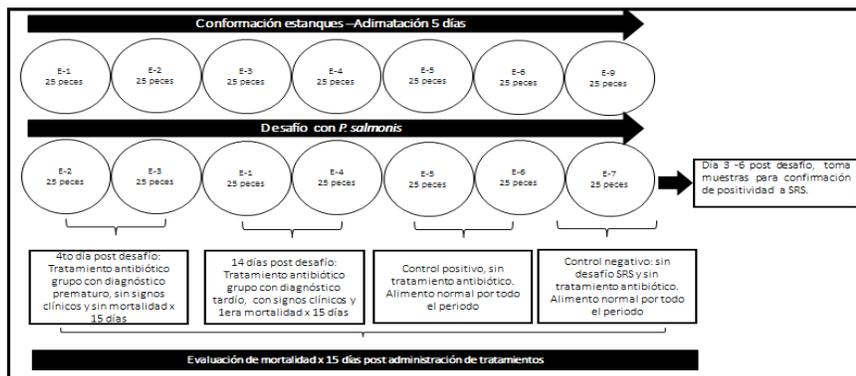
4.1 Diseño general del estudio

Un total de 175 ejemplares de la especie Salmon del Atlántico (*Salmo salar*) fueron mantenidos en 7 estanques de 0.5 m³ y agua de mar, para cumplir con una aclimatación de 5 días. Los estanques se conformaron con 25 ejemplares en cada uno, con peso promedio inicial en un rango a 788 – 843 g y coeficiente de variación de 9.8 a 12.6 %.

Al término del periodo de aclimatación, se procedió al desafío con *P. salmonis* mediante inyección intraperitoneal en volumen de 0.2 mL/pez y dosis calculada previamente mediante DL₅₀ (1/10). Del total de estanques, 6 fueron desafiados y uno se asignó como control negativo (sin desafío). Posteriormente, se tomaron muestras de peces al día 3 y 6 post inoculación, para realizar análisis de necropsia y detección de SRS mediante la técnica de RT-PCR, para confirmar la positividad en los ejemplares. Confirmada la positividad al patógeno, al 4to día post desafío, se inició la administración del fármaco por vía oral, equivalente al tratamiento prematuro, mediante alimento comercial con el medicamento en dosis de 100 mg de oxitetraciclina/kg de peso vivo. La administración fue a 2 de los estanques conformados, entregado en microraciones entre las 9:00 a 15:00 horas a razón de 1.10 % SFR y por 15 días consecutivos de alimentación. La ración de alimentación correspondió a 100 % de alimento medicado y no se suplementó con alimento normal (Fig. 1). A sí mismo, se dejaron 5 estanques sin administración de alimento medicado, que sirvieron como control positivo (2 tk), control negativo (1 tk) y para la administración de tratamiento tardío con el fármaco (2 tk). Posteriormente, el día 14 post desafío y después del registro de la primera mortalidad, se inició la administración del fármaco por vía oral a 2 estanques (Fig. 1), equivalente al tratamiento tardío, considerando igual dosis (100 mg/Kg), SFR y tiempo de administración.

Una vez finalizado el tratamiento de los grupos, los peces fueron alimentados con dieta normal, sin medicación y se dejaron por 15 días a la espera de evolución de la mortalidad. Luego los peces sobrevivientes fueron eliminados mediante sobredosis de anestesia dando así por terminado el ensayo.

Fig.1. Diseño general del estudio



4.2 Animales de estudio

Se utilizaron 175 Salmon del Atlántico (*Salmo salar*) con peso promedio general de 815 ± 92.7 gramos al iniciar la aclimatación y que luego alcanzaron un peso promedio 847 gramos al momento del desafío con *P. salmonis*. Los peces se obtuvieron de un stock que mantenía el centro experimental, ingresados en el mes de abril del 2018 y transferidos al agua de mar el día 10 de mayo del 2018 (Tabla 2). El origen de los animales fue de la piscicultura Rio Maullin, Lote S17AGBLURM, perteneciente a la empresa Aquasan S.A, X región (Tabla 1).

TABLA N° 1. Especificación del grupo de peces

Ítem	Aspecto	Descripción
1	Especie	Salmon del Atlántico
2	Etapa de ciclo de vida.	Engorda
3	Peso promedio general	815 g
4	N° de peces totales	175
5	Procedencia	Piscicultura Rio Maullin, X región.
6	Grupo	S17AGBLURM
7	Estado fisiológico o sanitario que deben cumplir los peces en estudio.	Libre de IPN, BKD, SRS y <i>Vibrio ordalii</i>
8	Vacunas	ALPHA JECT 5.1 + ALPHA JECT LiVac®SRS

4.2.1 Condición sanitaria de animales de estudio

Los animales fueron examinados por el Médico Veterinario del centro experimental, para confirmar que los ejemplares estuvieran aptos para el estudio. La condición sanitaria de éstos, fue aprobada mediante el análisis de laboratorio en muestras, a través de la técnica RT-PCR para virus IPN, *Piscirickettsia salmonis* y *Renibacterium salmoninarum* (Anexo 1, Informe de ensayo Caso N° PVP- 19406).

El grupo fue vacunado en el centro de origen con vacuna ALPHA JECT 5.1 (Necrosis Pancreática Infecciosa, Síndrome Rickettsial del Salmón, Furunculosis atípica, Vibriosis y Anemia Infecciosa del Salmón) y ALPHA JECT LiVac®SRS, registrando un total de 2452 UTAs al día del desafío

4.3 Criterio de inclusión y Exclusión de animales

4.3.1 Inclusión

Se incluyeron animales que cumplieron con un rango de peso de 600 – 995 gramos y coeficiente de variación menor o igual al 15 %, al iniciar la aclimatación. A sí mismo, clínicamente sanos y que no recibieron tratamiento farmacológico o químico de ningún tipo, que pudiera interferir en los resultados 90 días antes del inicio del estudio.

4.3.2 Exclusión

No se excluyeron ejemplares, ya que no se observó signos de enfermedad (incluyendo anorexia, letargia, nado errático, lesiones en piel, deformidades u otros) al momento de la selección y distribución en los estanques, descartando solo aquellos que no cumplieron con el rango de peso de selección.

4.4 Producto veterinario o Dieta

4.4.1 Fármaco

Se utilizó Oxitetraciclina al 80 %, Polvo oral, correspondiente a un producto comercial utilizado habitualmente en la fabricación de alimento medicado para centros productivos.

4.4.2 Alimento medicado

El alimento con el medicamento necesario para llevar a cabo el estudio, fue producido por el centro experimental a partir de alimento sin aceitado, bajo el mismo estándar utilizado en la fabricación del medicado destinado a centros productivos. Este fue formulado a razón de 11.5 Kg de Oxitetraciclina (80 %) por tonelada de alimento y calibre de 6 mm.

4.4.3 Precauciones

sobre el producto No

aplica

4.5 Tratamientos durante el estudio

4.5.1 Permitidos:

Tratamiento con oxitetraciclina 80 %, en dosis de 100 mg/Kg a 4 estanques de estudio.

4.5.2 No Permitidos:

Durante el estudio, no se aplicó o expuso el grupo de peces a ningún otro tipo de tratamiento antibiótico y/o uso de productos químicos.

4.6 Condiciones de cultivo (Estanque)

Ítem	Aspecto	Descripción
1	Capacidad estanque	7 estanques de 0.5 m ³ para desafío con <i>P. salmonis</i> y administración de tratamientos.
3	Parámetros ambientales Desafío principal SRS	Temperatura: 14 +/- 1 °C Tasa recambio: 1.5/hora Salinidad: 30-33 ppt. Oxígeno: 80-120 % de saturación. Densidad inicial: 40 -42 Kg/m ³ pH: 7-8

4.7 ETAPA EXPERIMENTAL

A. Desafío con *P. salmonis*

A.1 Distribución de ejemplares

A partir del grupo en stock, se realizó un muestreo exploratorio para establecer el peso promedio de la población. Posteriormente, se seleccionó un total 175 peces en un rango de peso de 600 -995 gramos. Estos fueron distribuidos en 7 estanques de 0.5 m³ de capacidad, con 25 ejemplares (cada uno), en agua de mar y sistema de recirculación. A continuación la Tabla 2, indica el peso promedio, densidad y coeficiente de variación de los estanques registrado al iniciar el estudio.

TABLA N°2. Peso promedio, coeficiente de variación y densidad al inicio de aclimatación.

Estanques	TK- 1	TK- 2	TK- 3	TK- 4	TK- 5	TK- 6	TK- 7
Peso promedio [g]	806,7	812,4	813,4	815,4	843,5	828,1	788,8
Longitud [cm]	40,3	40,8	40,8	41,1	41,3	41,1	41,0
Desv. Estándar	102,0	79,9	97,2	82,6	85,8	103,1	97,1
CV (%)	12,6	9,8	12,0	10,1	10,2	12,5	12,3
K	1,23	1,20	1,20	1,17	1,19	1,19	1,15
Max	950	917	995	971	951	957	932
Min	618	679	625	672	605	631	641
Nº Peces/Estanque	25	25	25	25	25	25	25

A.2 Aislado *P. salmonis*

Se utilizó aislado de *P. salmonis* estandarizado por Aquainnovo S.A, procedente del laboratorio ADL Diagnostic Chile Ltda (Tabla 3). El inóculo madre registró un título de 10^{6.75} TCID₅₀/mL, determinada a través del método Karber-Spearman. A sí mismo, se realizó la evaluación de pureza, considerando análisis de RT-PCR ISAv, IPNV, BKD, *F. psychrophilum* y cultivos bacteriológicos en medio TSA y TSA/s a 18 y 35° de incubación (Informe PM-89890).

TABLA N° 3. Aislado de *P. salmonis*

Laboratorio origen	ADL Diagnostic Chile Ltda.
Agente	<i>Piscirickettsia salmonis</i>
Cepa	LF-89
Código laboratorio	PM-38986
Especie de aislamiento original	Salmon del Atlántico
Especie en donde se realizó	Salmón del Atlántico
Fecha aislamiento original	30-04-13
Órgano de aislamiento	Hígado
N° de animalizaciones	1
Condición del aislado	Reanimalizado-criopreservado
Tipo producción del inóculo	Cultivo bacteriológico

TABLA N° 4. Recuento bacteriano en placa agar

Dilución inóculo	Recuento bacteriano (ufc/mL)
1:10	3.43×10^8

A.3 Inoculación con *P. salmonis*

Para la ejecución, los peces fueron extraídos desde el estanque y dispuestos en un contenedor con solución anestésica, luego se tomaron individualmente y se sostuvieron con la cara ventral hacia arriba. La aguja se insertó en un ángulo de aproximadamente 90° en la línea media ventral, entre las aletas pectorales y las pélvicas, inyectando 0,2 mL/pez (Fig. 2).



Figura 2. Inoculación con *P. salmonis*.

Posterior a la inoculación, los ejemplares fueron transferidos al estanque de origen (Fig. 3), monitoreando constantemente el estado de recuperación. Los peces en general se observaron en buena condición, comportamiento normal y no se registró mortalidad post inoculación.

Finalizado el procedimiento, los estanques se dejaron a la espera de iniciar el tratamiento con el fármaco según cada estrategia.

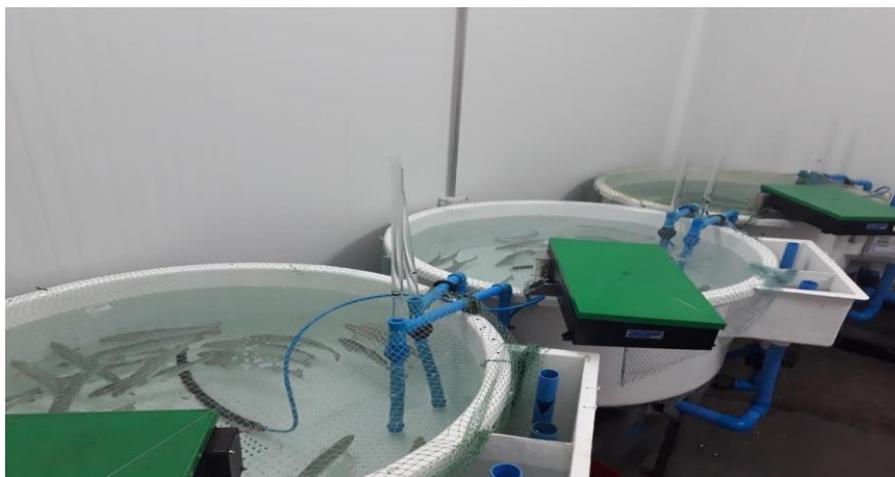


Figura 3. Distribución de ejemplares post desafío con *P. salmonis*.

A.4 Parámetros ambientales

Durante toda la etapa de desafío se midieron y registraron parámetros ambientales de salinidad (ppt), pH, temperatura y oxígeno, de acuerdo a la rutina del centro experimental. La temperatura promedio fue de 14.1 ± 0.44 , salinidad de 32 ppt, pH 7.0 y niveles de oxígeno de 100 -120 % de saturación. La Tabla 5, indica los parámetros registrados durante el periodo de evaluación.

A.5 Confirmación positividad a *P. salmonis*

Se tomaron muestras de peces al día 3 y 6 post desafío, para ser analizada mediante observaciones anatomopatológicas y RT-PCR-SRS (Laboratorio Antares S.A), como verificación de positividad del patógeno. De esta manera, se confirmó la presencia de *P. salmonis* (matriz Riñón-Hígado y Bazo) a partir del día 3 post desafío.

Por otra parte, también se analizaron muestras de las primeras mortalidades que se presentaron post desafío, como verificación de causa de muerte por el agente.

TABLA N° 5. Parámetros ambientales registrados durante el desafío con *P. salmonis*.

Etapa	Fecha	T °C	pH	sal (ppt)	TK-1	TK-2	TK-3	TK-4	TK-5	TK-6	TK-7
Desafío SRS	09-oct-18	15,0	7,0	32,0	107,3	106,0	110,7	111,3	108,0	106,7	109,7
	10-oct-18	14,2	7,0	32,0	101,7	98,3	113,3	107,7	107,7	111,7	115,7
	11-oct-18	14,1	7,0	32,0	105,3	105,3	117,7	104,3	97,7	103,0	118,8
	12-oct-18	14,3	7,0	32,0	102,3	111,0	118,3	111,7	99,3	103,7	119,1
	13-oct-18	13,7	7,0	32,0	112,0	118,0	119,5	117,0	94,5	93,5	119,0
	14-oct-18	14,0	7,0	32,0	111,5	103,5	103,5	102,0	107,5	110,0	110,1
	15-oct-18	14,4	7,0	32,0	108,5	105,5	119,0	111,5	119,5	112,0	110,467
	16-oct-18	14,3	7,0	32,0	101,7	107,3	115,0	112,7	109,0	101,7	119,0
	17-oct-18	14,4	7,0	32,0	112,7	107,0	102,7	107,3	104,3	100,3	116,4
	18-oct-18	14,2	7,0	32,0	118,0	95,0	107,3	113,3	109,0	101,0	116,0
	19-oct-18	14,4	7,0	32,0	103,0	117,7	103,0	100,0	107,7	112,3	119,7
	20-oct-18	14,4	7,0	32,0	104,7	96,0	107,7	103,7	96,0	112,3	109,2
	21-oct-18	14,3	7,0	32,0	109,0	113,5	117,5	100,5	98,0	106,0	106,7
	22-oct-18	14,5	7,0	32,0	98,7	103,7	106,0	104,7	99,7	106,7	106,7
	23-oct-18	14,5	7,0	32,0	98,7	103,0	107,3	104,3	95,3	110,7	109,4
	24-oct-18	14,3	7,0	32,0	114,3	100,3	104,7	106,0	93,3	112,0	99,8
	25-oct-18	14,3	7,0	32,0	114,7	110,3	109,7	108,7	97,3	104,7	93,6
	26-oct-18	13,5	7,0	32,0	114,7	100,7	93,3	110,7	106,7	104,3	92,9
	27-oct-18	13,8	7,0	32,0	115,5	101,5	97,0	117,5	106,5	108,0	89,9
	28-oct-18	13,9	7,0	32,0	113,5	108,5	102,5	117,5	109,0	108,5	94,0
	29-oct-18	13,7	7,0	32,0	114,0	108,5	96,0	119,0	113,5	105,0	95,8
	30-oct-18	13,3	7,0	32,0	110,0	104,0	94,3	106,7	104,7	99,3	97,2
	31-oct-18	14,2	7,0	32,0	104,0	101,0	94,0	102,7	101,0	102,3	93,0
	01-nov-18	13,5	7,0	32,0	113,7	109,0	100,0	106,0	111,7	111,7	101,1
	02-nov-18	13,4	7,0	32,0	110,5	110,7	110,7	116,7	104,0	116,3	100,3
	03-nov-18	13,6	7,0	32,0	102,7	97,0	95,0	106,3	110,3	106,7	104,3
	04-nov-18	13,7	7,0	32,0	101,0	106,3	97,7	109,3	115,3	110,7	96,0
	05-nov-18	14,2	7,0	32,0	107,3	107,0	96,0	107,3	108,3	105,7	105,5
	06-nov-18	14,0	7,0	32,0	107,3	105,0	96,0	107,3	108,0	104,0	97,6
	07-nov-18	14,1	7,0	32,0	106,3	109,0	107,7	106,0	112,3	95,3	96,8
	08-nov-18	14,0	7,0	32,0	99,0	103,7	95,7	100,3	102,7	102,0	99,3
09-nov-18	14,3	7,0	32,0	113,7	108,0	99,0	109,7	110,0	112,0	96,0	
10-nov-18	14,2	7,0	32,0	115,5	118,0	101,5	119,0	109,0	105,0	109,3	
11-nov-18	13,7	7,0	32,0	112,7	112,0	103,3	107,3	100,7	102,3	105,7	
12-nov-18	13,6	7,0	32,0	102,3	99,0		97,3	98,7		115,0	
13-nov-18	14,0	7,0	32,0	108,3	107,7		106,3	102,7		107,3	
14-nov-18	14,8	7,0	32,0	105,7	101,0		97,4	101,6		97,0	
15-nov-18	13,9	7,0	32,0	97,8	96,7		94,6	95,9		94,8	
16-nov-18	15,4	7,0	32,0	119,0	119,0		118,0	111,7		106,0	
17-nov-18	15,1	7,0	32,0	103,0	109,7		104,8	101,8		99,8	
18-nov-18	14,1	7,0	32,0	120,0	117,0		113,3	111,0		99,0	
19-nov-18	14,3	7,0	32,0	111,3	110,7		105,3	106,0		112,0	
20-nov-18	14,4	7,0	32,0	101,4	110,1		103,6	101,4		114,0	
21-nov-18	13,7	7,0	32,0	104,0	101,0		99,7	100,3		105,0	

B. Administración de tratamiento antibiótico

B.1. Estrategias de administración

B.1.1. Tratamiento prematuro: Peces con diagnóstico positivo a *P. salmonis*, sin hallazgos de lesiones externas o internas atribuibles al patógeno y sin mortalidad. Inicio de tratamiento medicado a partir del día 3 post desafío.

B.1.2. Tratamiento tardío: Peces con diagnóstico positivo a *P. salmonis* (mediante la técnica de RT-PCR), signos clínicos, disminución de apetencia y con inicio de mortalidad.

Inicio de tratamiento medicado a partir del día 14 post desafío.

B.2. Administración de alimento medicado

La entrega del alimento medicado, se realizó por 15 días consecutivos (sin interrupción) a razón de

1.10 % de peso vivo (SFR), mediante alimentación automática y microraciones entre las 9:00 am y 15:00 horas. La ración de alimentación medicado correspondió a 100 % y no se suplementó con alimento normal. Los estanques asignados a control positivo y negativo, fueron alimentados a igual SFR con alimento sin medicación por todo el periodo de evaluación.

B.3 Retiro de mortalidad

La mortalidad fue retirada diariamente y cada vez que se produjo, registrando el peso al momento de muerte e identificando el grupo correspondiente asociado a cada estanque.

B.4 Diagnóstico

Parte de la mortalidad fue analizada en el laboratorio Antares S.A, mediante observaciones anatomopatológicas y RT-PCR-SRS, como confirmación de causa de muerte. A sí mismo, en parte de la mortalidad no analizada, se tomaron muestras de tejido en RNA later (Riñón e Hígado) en forma individual, que fue almacenada a – 20°C en caso de requerir nuevos análisis.

Finalmente, al término del estudio se tomaron 5 muestras de Riñón e Hígado por grupo, a partir de peces sobrevivientes, que se encuentran almacenadas a – 20°C para análisis posteriores.

B.5 Muestreo final de peso y eliminación de sobrevivientes

Al término del estudio, los peces fueron eliminados mediante sobredosis de anestesia y enviados al sistema de ensilaje de la estación. A si mismo, los peces fueron medidos en peso y longitud previo a la eliminación.

5. Resultados

5.1 Confirmación de la presencia de *P. salmonis* previo a la entrega de tratamiento con Oxitetraciclina (80 %)

Las muestras analizadas el día 3 post desafío, presentaron un 66.6 % de prevalencia a *P. salmonis* (Tabla 6). Internamente se observó Hígado color café, congestión en tejido adiposo y ciegos pilóricos (Fig. 4-5), sin embargo, estos hallazgos no son del todo atribuibles a un cuadro de SRS.

Las muestras analizadas al día 6 post desafío, presentaron un 100 % de prevalencia a *P. salmonis*. Los hallazgos internos fueron similares a los registrados al día 3, aunque se observó mayor congestión en tejidos adiposos y ciegos pilóricos, bazo con pseudomenbrana, peritoneo parietal congestivo y corazón congestivo (Fig. 6 a 9).

TABLA N° 6. Resultados de RT-PCR-SRS previo a la administración de tratamiento con Florfenicol (50 %).

TK	Día	N° pez	SRS (+)	Ct	% Prevalencia
1		1		25.84	
2		2		No Ct	
3	3	3	6	24.95	66.6
4		4		24.47	
5		5		No Ct	
6		6		37.76	
<hr/>					
1		1		23.99	
2		2		26.01	
4	6	3	4	29.24	100
5		4		28.27	



Fig. 4. Tejido adiposo moderado en cantidad y congestivo. Fig. 5. Hígado color café.

(Pez N° 1 del TK-5, día 3 post desafío).



(Pez N° 1 del TK-4, día 3 post desafío).



6. Bazo con pseudomenbrana
(Pez N° 1 del TK-2, día 6 post desafío)



Fig. 7. Peritoneo parietal congestivo.
(Pez N° 1 del TK-2, día 6 post desafío).



Fig. 8. Corazón pálido y congestivo
(Pez N° 1 del TK-5, día 6 post desafío).



Fig. 9. Hígado color café claro.
(Pez N° 1 del TK-5, día 6 post desafío).

5.2 Consumo de alimento medicado (% SFR)

Las siguientes figuras, grafican el consumo de alimento medicado de acuerdo a las 2 estrategias de entrega que fueron evaluadas.

En el caso del tratamiento prematuro, los ejemplares mantuvieron un consumo similar entre replicas de estanque y poco constante durante los días de medicación, con un promedio de 0.78 % SFR en los 15 días de tratamiento. La pérdida de medicado (no consumido), fue equivalente a un 29.0 % respecto al calculado (1.10 %). Posterior al tratamiento, los peces registraron un aumento en el consumo de alimento, alcanzando un SFR promedio de 0.89 a 1.06 % (Fig. 14).

Respecto al tratamiento tardío, la administración comenzó junto con la primera mortalidad (día 14 post desafío). Los peces tuvieron un consumo de alimento muy por debajo al SFR establecido (1.10 %), especialmente los primeros días de alimentación, registrando una pérdida total al final del tratamiento, del 42.7 % de alimento medicado (Fig. 11). Posterior al tratamiento, se observó un aumento en el consumo de alimento normal con una tasa promedio en estanques de 1.18 y 1.25 % SFR.



Figura 10. Consumo alimento (% SFR) durante la administración de tratamiento antibiótico con Oxitetraciclina, en grupo con entrega prematura.



Figura 11. Consumo alimento (% SFR) durante la administración de tratamiento antibiótico con Oxitetraciclina, en grupo con entrega tardía.

El grupo control positivo, sin tratamiento antibiótico, registró un comportamiento irregular en la alimentación, con bajo consumo a partir del inicio de la mortalidad y durante el brote. Posteriormente, se observó gran variación del SFR, registrando días con alto y bajo consumo en los días posteriores al pick de mortalidad de (Fig. 12).

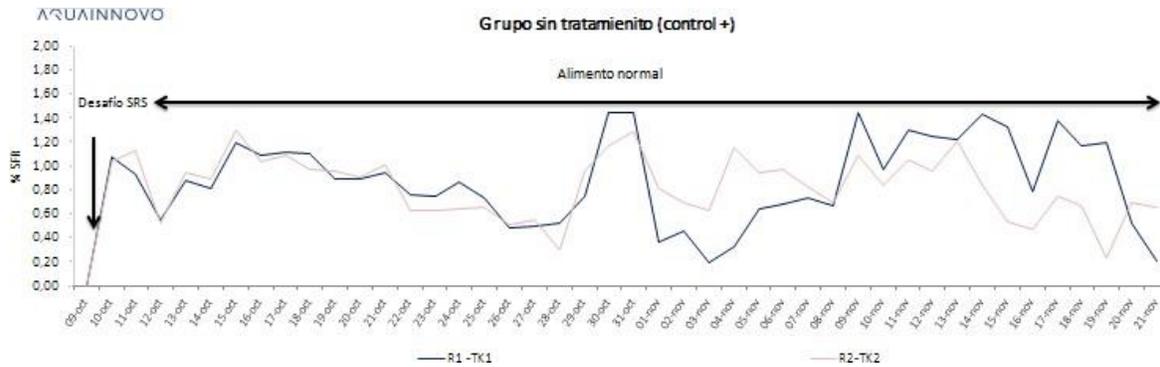


Figura 12. Consumo alimento (% SFR) durante el desafío con *P. salmonis*, grupo sin tratamiento antibiótico.

El grupo control negativo, mantuvo un consumo constante de alimentación, con una tasa promedio de 1.55 % SFR (Fig. 13).



Figura 13. Consumo alimento (% SFR) grupo sin desafío con *P. salmonis* y sin tratamiento antibiótico.

5.3. Mortalidad

5.3.1 Mortalidad diaria y acumulada por tratamiento y estanque

Las siguientes gráficas, indican el % de mortalidad diaria y acumulada registrada para cada estrategia de entrega de alimento medicado y control positivo.

Como se puede observar, el grupo control sin medicación, registró un mayor % de mortalidad diaria y acumulada respecto a los grupos tratados con oxitetraciclina, acumulando el 78.2 y 65.2 % en los respectivos estanques (Fig. 18-19).

El grupo tratado en forma temprana, presentó menor % de mortalidad/ día (Fig. 14), respecto a la observada en el grupo control y grupo con tratamiento tardío durante el mismo periodo de tiempo. A sí mismo, este grupo alcanzó el 29.1 y 20.8 % de mortalidad acumulada al término de la evaluación (Fig. 15).

El grupo tratado en forma tardía, presentó mayor % de mortalidad/ día, respecto a la observada en el grupo tratado en forma temprana durante el mismo periodo de tiempo (Fig. 16). La mortalidad acumulada del grupo registró de 34.7 y 43.4 % en los respectivos estanques (Fig. 17).



Fig. 14. Tratamiento temprano

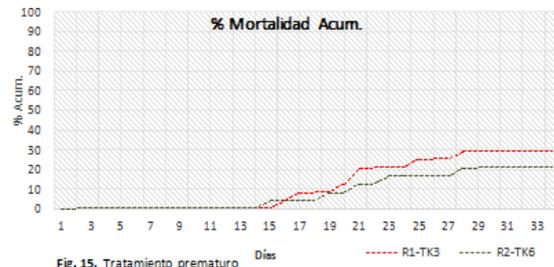


Fig. 15. Tratamiento temprano

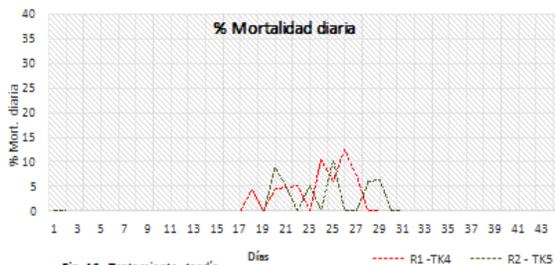


Fig. 16. Tratamiento tardío

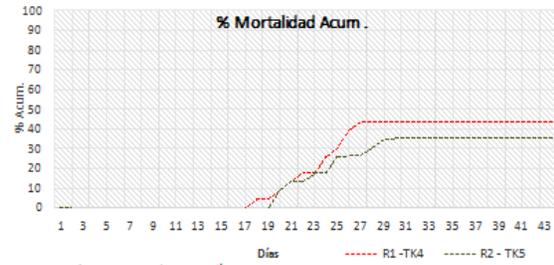


Fig. 17. Tratamiento tardío

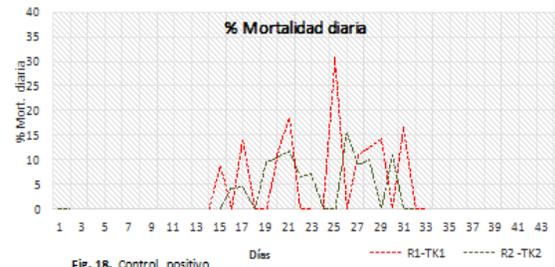


Fig. 18. Control positivo

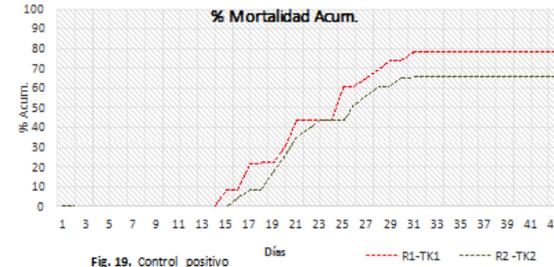


Fig. 19. Control positivo

5.3.2 Mortalidad diaria y acumulada por tratamiento

La siguiente gráfica (Fig. 20) representa el % de mortalidad diaria por grupo de tratamiento. Según se observa, el grupo con tratamiento prematuro y tratamiento tardío registraron menor % de mortalidad/día respecto al grupo control, con rango de 2.1 -8.3 %, mientras que el grupo control registro un rango de 2.3 – 15.0 %.

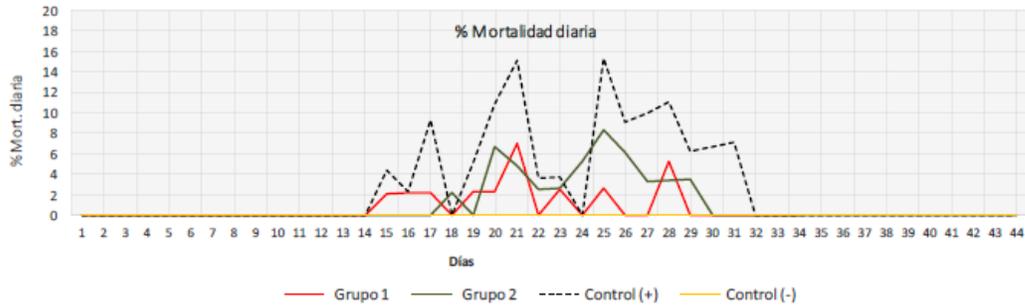


Figura 20. % Mortalidad diaria por grupo de estudio

Al finalizar el periodo de evaluación, las 2 estrategias de entrega del alimento medicado redujeron la mortalidad respecto al grupo control, sin embargo, el grupo con tratamiento prematuro registró la mayor reducción (Fig. 21).

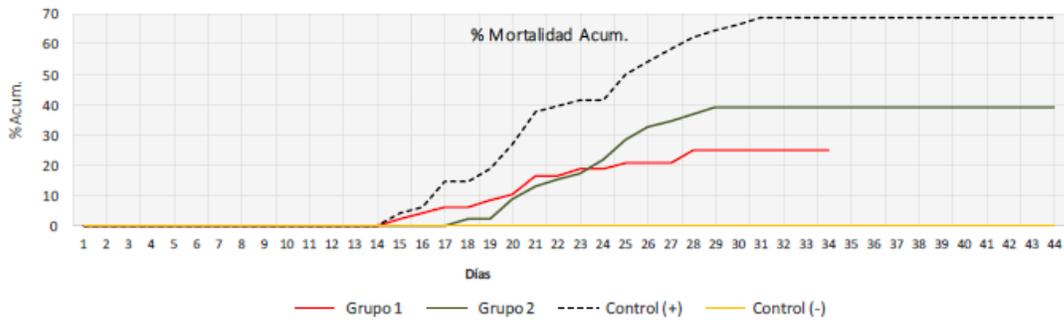


Figura 21. % Mortalidad acumulada por grupo de estudio

5.4. Diagnóstico

La mortalidad analizada presentó lesiones internas atribuibles a *P. salmonis*, siendo las más recurrentes Hepatomegalia, Esplenomegalia, Hemorragia en tejido adiposo y ciegos pilóricos, Cerebro congestivo (Fig. 22 - 24). Por otra parte, en el total de muestras analizadas se detectó la presencia de *P. salmonis*, con Ct de 11 a 28 (Tabla 7).

Tabla 7. Resultado análisis de IFAT SRS riñón en Salmón del Atlántico durante el desafío con *P. salmonis*

TK	Grupo	N° pez	SRS (+)	Ct	% Prevalencia
5	Tratamiento tardío	1	3	14.65	100
		2		13.84	
		3		28.10	
6	Tratamiento prematuro	1	2	18.73	100
		2		17.55	
		3			
3	Tratamiento prematuro	1	2	16.26	100
		2		11.86	
4	Tratamiento tardío	1	2	13.82	100
		2		16.97	
1	Control (+)	1	3	19.18	100
		2		21.00	
		3		15.39	
2	Control (+)	1	3	17.00	100
		2		13.95	
		3		21.37	



Figura 22. Peritoneo parietal congestivo, ciegos pilóricos congestivos y Esplenomegalia (Pez grupo control, tk 1)

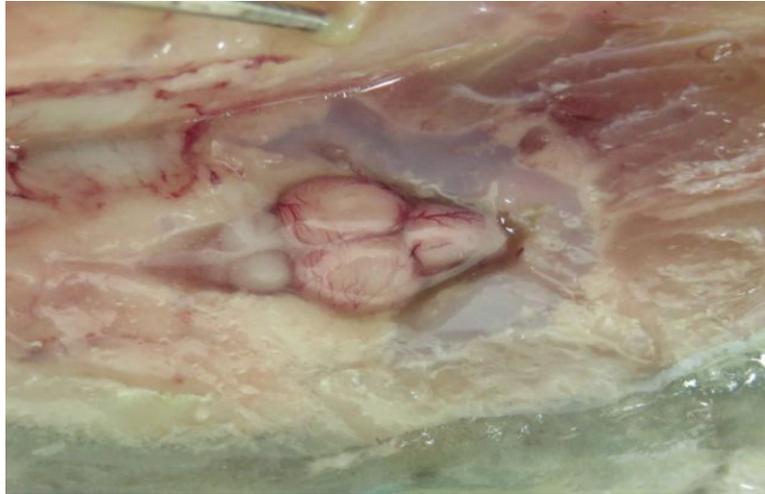


Figura 23. Cerebro congestivo (grupo con tratamiento prematuro Tk3).

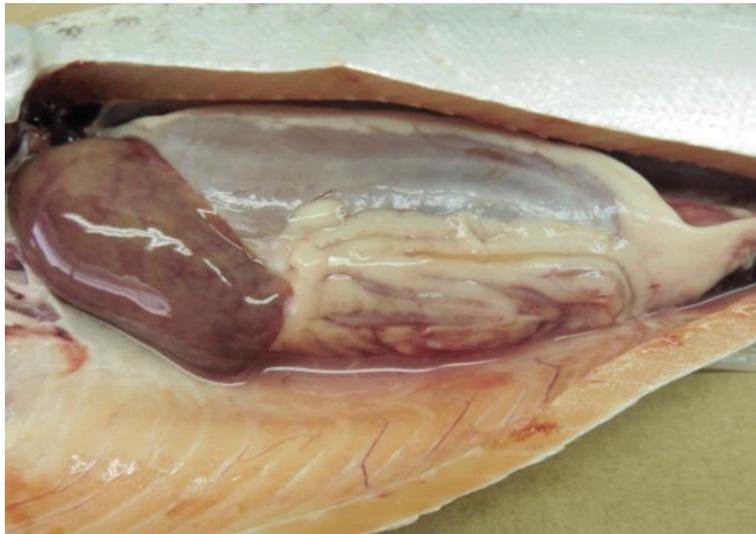


Figura 24. Tejido adiposo congestivo y estomago dilatado con abundante liquido (grupo tratamiento prematuro tk 3).

6. CONCLUSIONES

A continuación, se concluye con los resultados relevantes del estudio, en base a los objetivos planteados y metodología descrita.

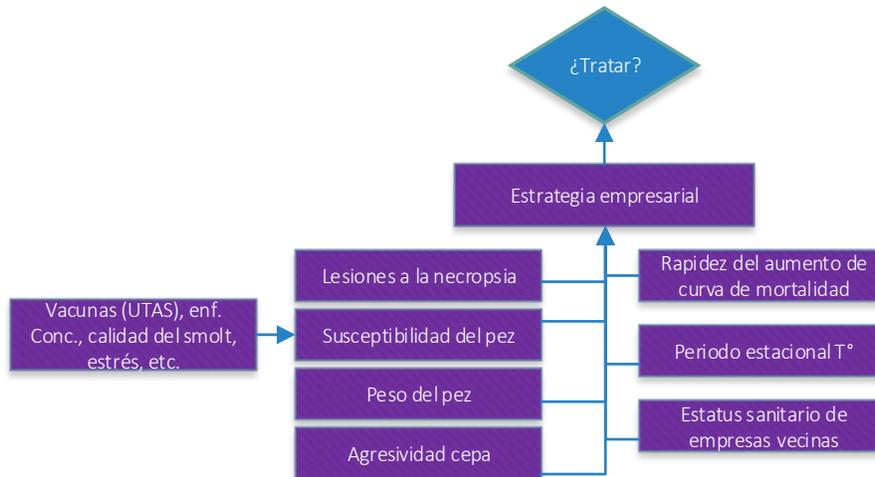
- El desafío principal con *P. salmonis*, registró un comportamiento y % de mortalidad acumulada de acuerdo a lo esperado (50 -70 %), siendo semejante al calculado previamente, mediante la determinación de DL₅₀ (30 días de evaluación).
- Durante la evaluación, no se observó diferencia respecto a la conducta de alimentación en los ejemplares tratados en forma temprana y tardíamente, ambos grupos presentaron variación en el consumo diario, sin embargo, el grupo tratado tempranamente tuvo mayor consumo promedio de alimento durante los días de tratamiento.
- En relación a la conducta, en los ejemplares con tratamiento medicado se observaron más activos, con menor conducta errática o letárgica que los que no fueron medicados (control).
- Al finalizar el periodo de evaluación, las 2 estrategias de entrega del alimento medicado redujeron la mortalidad respecto al grupo control, sin embargo, el grupo con tratamiento prematuro, registró la mayor sobrevivencia con un 75.0 %

De acuerdo a lo indicado, se puede concluir que las estrategias de administración oral con Oxitetraciclina (80 %), en dosis de 100 mg/Kg y micro-rationes, aumentaron la sobrevivencia de los peces al ser expuestos a *Piscirickettsia salmonis*, obteniendo diferencias en la reducción de la mortalidad respecto al grupo que no recibió medicación. Sin embargo, se observa que el grupo tratado en forma prematura obtuvo mayor sobrevivencia.

ANEXOS OBJETIVO 4

ANEXO 1. Figuras

1.1: Nodo tratar.



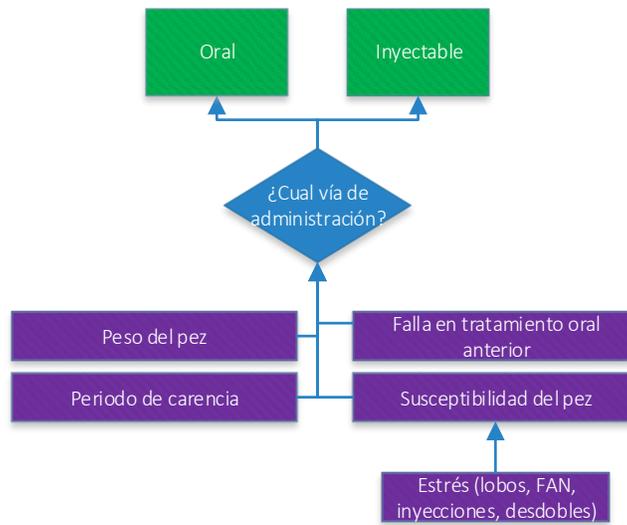
1.2: Nodo cobertura de tratamiento.



1.3: Nodo tipo de antibiótico.



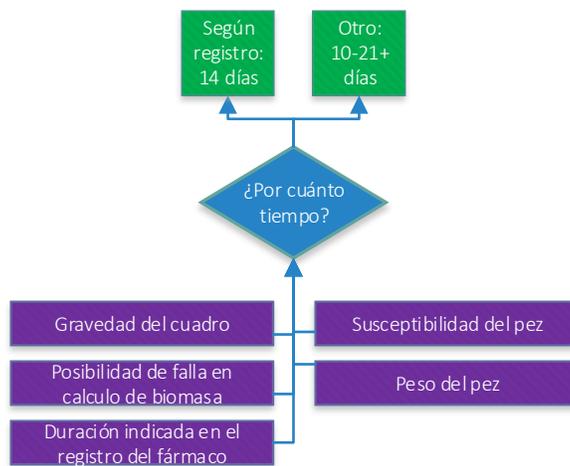
1.4: Nodo vía de administración.



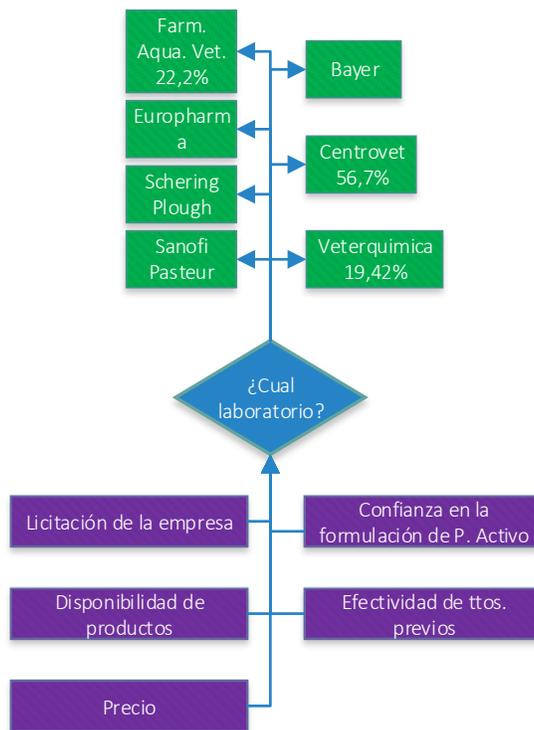
1.4: Nodo dosis.



1.5: Nodo duración de tratamiento.



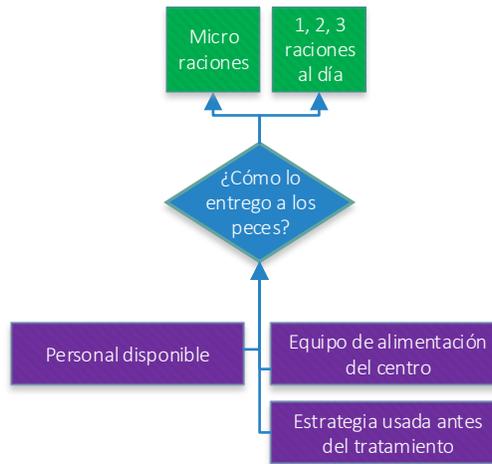
1.6: Nodo laboratorio.



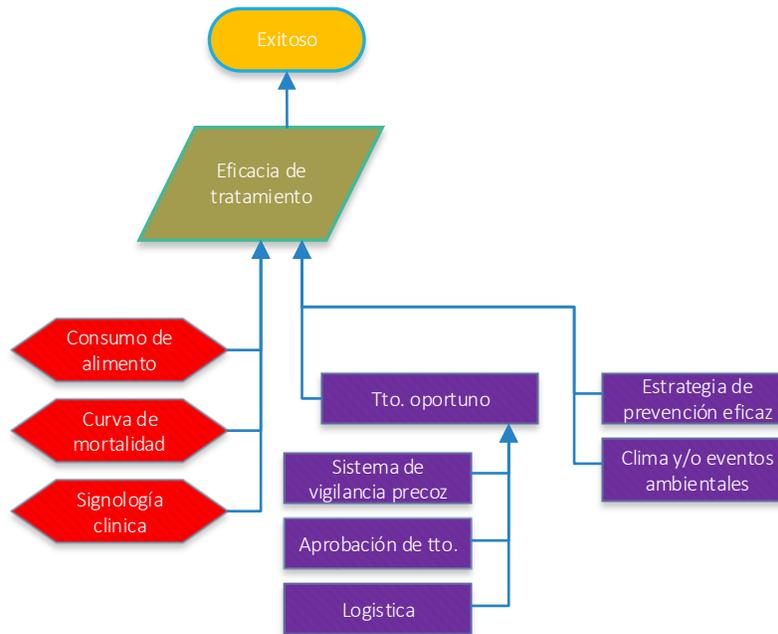
1.7: Nodo planta de alimentos.



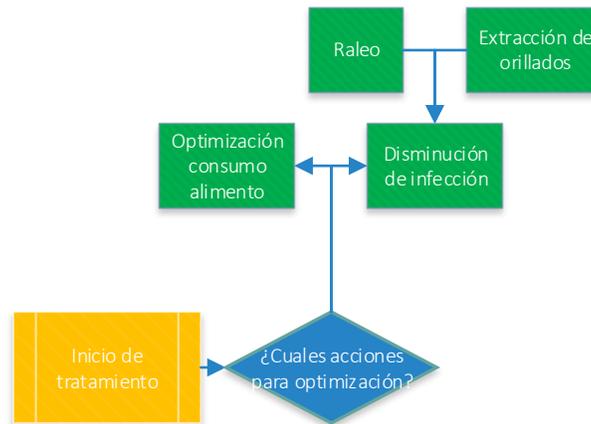
1.8: Nodo estrategia de alimentación.



1.9: Hito resultado de tratamiento.



1.10: Nodo optimización de tratamiento.



1.11: Nodo opciones de resultado.



ANEXO 2. Tablas.

2.1. Caracterización de esquema terapéutico según especie en estudio retrospectivo.

ESQUEMA TERAPÉUTICO		GENERAL		SALMÓN DEL ATLÁNTICO		SALMÓN COHO		TRUCHA ARCOÍRIS		
Mortalidad al inicio del tratamiento	SRS	0,026 ¹	(0,004 0,087)	0.031 ¹	(0,006 0,095)	0,002 ¹	(0,000 0,017)	0,019 ¹	(0,001 0,087)	
	SRS+SCA	0,051 ¹	(0,021 0,126)	0.056 ¹	(0,024 0,137)	0,015 ¹	(0,004 0,043)	0,044 ¹	(0,017 0,130)	
	Total	0,137 ¹	(0,070 0,309)	0.137 ¹	(0,070 0,305)	0,129 ¹	(0,071 0,248)	0,160 ¹	(0,074 0,485)	
Cobertura	Jaula a jaula	3.367	74,9%	2.974	76,4%	225	65,2%	168	65,4%	
	Centro completo	1.126	25,1%	917	23,6%	120	34,8%	89	34,6%	
Vía de administración	Inyectable	1.174	22,9%	954	21,7%	119	28,8%	101	32,1%	
	Oral	3.956	77,1%	3.448	78,3%	294	71,2%	214	67,9%	
Principio activo según vía de administración	Inyectable	Florfenicol	346	29,5%	317	33,2%	6	5,0%	23	22,8%
		Oxitetraciclina	828	70,5%	637	66,8%	113	95,0%	78	77,2%
	Oral	Florfenicol	3.685	93,1%	3.223	93,5%	273	92,9%	189	88,3%
		Oxitetraciclina	271	6,9%	225	6,5%	21	7,1%	25	11,7%
Dosis	Florfenicol oral	10	15	0,4%	10	0,3%	0	0,0%	5	2,7%
		15	868	23,6%	852	26,4%	10	3,7%	6	3,2%
		20	2.199	59,7%	1934	60,0%	140	51,3%	125	66,1%
		>20	603	16,4%	427	13,3%	123	45,1%	53	28,0%
	Florfenicol inyectable	25	29	8,4%	19	6,0%	0	0,0%	10	43,5%
		30	131	37,9%	127	40,1%	2	33,3%	2	8,7%
		35	70	20,2%	57	18,0%	3	50,0%	10	43,5%
		40	116	33,5%	114	36,0%	1	16,7%	1	4,4%

	Oxitetraciclina oral	100	246	90,8%	210	93,3%	21	100,0%	15	60,0%
		>100	22	8,1%	14	6,2%	0	0,0%	8	32,0%
	Oxitetraciclina inyectable	25	86	10,4%	83	13,0%	0	0,0%	3	3,9%
		30	210	25,4%	186	29,2%	5	4,4%	19	24,4%
		35	477	57,6%	327	51,3%	103	91,2%	47	60,3%
		>35	55	6,6%	41	6,4%	5	4,4%	9	11,5%
Duración (tratamientos orales)	Florfenicol	14	596	16,2%	497	15,4%	66	24,2%	33	17,5%
		18	1.866	50,6%	1.514	47,0%	196	71,8%	156	82,5%
		21	1.129	30,6%	1.118	34,7%	11	4,0%	0	0,0%
		>21	94	2,6%	94	2,9%	0	0,0%	0	0,0%
	Oxitetraciclina	14	191	70,5%	147	65,3%	21	100,0%	23	92,0%
		18	77	28,4%	75	33,3%	0	0,0%	2	8,0%
		21	3	1,1%	3	1,3%	0	0,0%	0	0,0%
		>21	191	70,5%	147	65,3%	21	100,0%	23	92,0%

¹Indica **mediana** y dispersión (cuartil 1 y cuartil 3).

2.2. Mortalidad al inicio del tratamiento (%) según año y especie en estudio retrospectivo.

ESPECIE	AÑO	CLASIFICACIÓN MORTALIDAD								
		SRS			SRS+SCA			TOTAL		
		<i>Mediana</i>	<i>Q₁</i>	<i>Q₃</i>	<i>Mediana</i>	<i>Q₁</i>	<i>Q₃</i>	<i>Mediana</i>	<i>Q₁</i>	<i>Q₃</i>
Salmón del Atlántico	2014	0,021	0,002	0,079	0,056	0,024	0,122	0,132	0,065	0,293
	2015	0,036	0,006	0,112	0,060	0,025	0,153	0,151	0,076	0,319
	2016	0,028	0,005	0,096	0,054	0,024	0,139	0,149	0,070	0,363
	2017	0,029	0,006	0,086	0,055	0,022	0,134	0,119	0,065	0,288
	2018	0,036	0,011	0,086	0,054	0,027	0,113	0,126	0,070	0,253
	Total	0,031	0,006	0,095	0,056	0,024	0,137	0,137	0,070	0,305
Salmón Coho	2014	0,000	0,000	0,004	0,020	0,002	0,045	0,118	0,077	0,158
	2015	0,002	0,000	0,017	0,015	0,005	0,042	0,128	0,077	0,239
	2016	0,002	0,000	0,010	0,014	0,005	0,035	0,115	0,070	0,272
	2017	0,012	0,001	0,050	0,024	0,009	0,058	0,174	0,080	0,357
	2018	0,000	0,000	0,001	0,002	0,001	0,013	0,040	0,023	0,082
	Total	0,002	0,000	0,017	0,015	0,004	0,043	0,129	0,071	0,248
Trucha Arcoíris	2014	0,010	0,000	0,039	0,028	0,012	0,075	0,119	0,058	0,309
	2015	0,009	0,001	0,069	0,049	0,020	0,114	0,162	0,070	0,415
	2016	0,072	0,002	3,157	0,081	0,019	3,157	0,351	0,083	4,600
	2017	0,033	0,013	0,153	0,057	0,033	0,159	0,182	0,113	0,337
	2018	0,023	0,004	0,053	0,039	0,011	0,069	0,114	0,071	0,220
	Total	0,019	0,001	0,087	0,044	0,017	0,130	0,160	0,074	0,485
TOTAL	2014	0,014	0,001	0,067	0,045	0,021	0,109	0,131	0,066	0,290
	2015	0,025	0,002	0,097	0,051	0,019	0,129	0,148	0,076	0,314
	2016	0,025	0,004	0,096	0,051	0,022	0,138	0,149	0,070	0,376
	2017	0,029	0,006	0,084	0,053	0,021	0,129	0,124	0,066	0,294
	2018	0,031	0,009	0,081	0,050	0,023	0,106	0,121	0,064	0,245
	Total	0,026	0,004	0,087	0,051	0,021	0,126	0,137	0,070	0,309

2.3. Mortalidad al inicio del tratamiento (%) según empresa en estudio retrospectivo.

N° EMPRESA	CLASIFICACIÓN MORTALIDAD								
	SRS			SRS+SCA			TOTAL		
	<i>Mediana</i>	<i>Q₁</i>	<i>Q₃</i>	<i>Mediana</i>	<i>Q₁</i>	<i>Q₃</i>	<i>Mediana</i>	<i>Q₁</i>	<i>Q₃</i>
2	0,021	0,004	0,065	0,050	0,022	0,111	0,164	0,097	0,333
4	0,020	0,004	0,063	0,046	0,022	0,095	0,107	0,059	0,186
5	0,067	0,015	0,211	0,102	0,038	0,275	0,273	0,116	0,681
6	0,007	0,000	0,059	0,013	0,002	0,073	0,132	0,076	0,227
7	0,015	0,003	0,072	0,041	0,021	0,100	0,101	0,057	0,189
8	0,016	0,003	0,077	0,049	0,028	0,117	0,107	0,055	0,212
9	0,000	0,000	0,001	0,016	0,005	0,078	0,108	0,056	0,148
10	0,057	0,011	0,201	0,138	0,045	0,320	0,485	0,209	1,047
11	0,000	0,000	0,005	0,016	0,007	0,033	0,066	0,034	0,145
12	0,053	0,026	0,104	0,059	0,030	0,115	0,130	0,076	0,236
13	0,032	0,011	0,157	0,057	0,015	0,235	0,142	0,087	0,521
14	0,041	0,016	0,102	0,072	0,025	0,135	0,258	0,131	0,585
15	0,041	0,007	0,141	0,073	0,031	0,187	0,148	0,065	0,294
16	0,020	0,020	0,020	0,166	0,166	0,166	0,187	0,187	0,187
17	0,035	0,010	0,083	0,050	0,018	0,105	0,101	0,054	0,193
18	0,016	0,001	0,077	0,067	0,034	0,159	0,129	0,072	0,291
19	0,020	0,002	0,075	0,047	0,020	0,121	0,096	0,044	0,215
20	0,008	0,000	0,024	0,037	0,021	0,067	0,088	0,054	0,166
21	0,030	0,002	0,189	0,056	0,017	0,239	0,148	0,072	0,448
22	0,001	0,000	0,014	0,028	0,015	0,047	0,142	0,088	0,289
23	0,018	0,006	0,038	0,038	0,022	0,069	0,125	0,079	0,200
24	0,002	0,000	0,030	0,009	0,002	0,042	0,106	0,051	0,236
TOTAL	0,026	0,004	0,087	0,051	0,021	0,126	0,137	0,070	0,309

2.4: Número de tratamientos según cobertura del esquema terapéutico, año del tratamiento y especie en estudio retrospectivo.

ESPECIE	AÑO	GENERAL	COBERTURA DEL ESQUEMA TERAPÉUTICO			
			JAULA A JAULA		CENTRO COMPLETO	
		<i>n</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Salmón del Atlántico	2014	447	314	70,3	133	29,8
	2015	981	742	75,6	239	24,4
	2016	890	680	76,4	210	23,6
	2017	1.082	877	81,1	205	19,0
	2018	491	361	73,5	130	26,5
	Total	3.891	2.974	76,4	917	23,6
Salmón Coho	2014	42	32	76,2	10	23,8
	2015	177	120	67,8	57	32,2
	2016	48	32	66,7	16	33,3
	2017	65	30	46,2	35	53,9
	2018	13	11	84,6	2	15,4
	Total	345	225	65,2	120	34,8
Trucha Arcoíris	2014	69	43	62,3	26	37,7
	2015	97	54	55,7	43	44,3
	2016	52	45	86,5	7	13,5
	2017	24	16	66,7	8	33,3
	2018	15	10	66,7	5	33,3
	Total	257	168	65,4	89	34,6
TOTAL	2014	558	389	69,7	169	30,3
	2015	1.255	916	73,0	339	27,0
	2016	990	757	76,5	233	23,5
	2017	1.171	923	78,8	248	21,2
	2018	519	382	73,6	137	26,4
	Total	4.493	3.367	74,9	1.126	25,1

2.5: Número de tratamientos según cobertura del esquema terapéutico por empresa en estudio retrospectivo.

N° EMPRESA	GENERAL	COBERTURA DEL ESQUEMA TERAPÉUTICO			
		JAULA A JAULA		CENTRO COMPLETO	
	<i>n</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
2	464	305	65,7	159	34,3
4	209	125	59,8	84	40,2
5	410	350	85,4	60	14,6
6	233	197	84,6	36	15,5
7	172	133	77,3	39	22,7
8	123	106	86,2	17	13,8
9	3	0	0,0	3	100,0
10	260	115	44,2	145	55,8
11	209	169	80,9	40	19,1
12	589	578	98,1	11	1,9
13	3	3	100,0	0	0,0
14	53	52	98,1	1	1,9
15	186	113	60,8	73	39,3
16	1	1	100,0	0	0,0
17	311	304	97,8	7	2,3
18	226	194	85,8	32	14,2
19	358	204	57,0	154	43,0
20	165	100	60,6	65	39,4
21	204	159	77,9	45	22,1
22	93	65	69,9	28	30,1
23	136	44	32,4	92	67,7
24	77	43	55,8	34	44,2
	4.485	3.360	74,9	1.125	25,1

2.6: Número de tratamientos vía oral según principio activo, por año del tratamiento y especie en estudio retrospectivo.

ESPECIE	AÑO	GENERAL	PRINCIPIO ACTIVO ORAL			
			FLORFENICOL		OXITETRACICLINA	
		<i>n</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Salmón del Atlántico	2014	430	352	81,9	78	18,1
	2015	951	886	93,2	65	6,8
	2016	729	693	95,1	36	4,9
	2017	868	836	96,3	32	3,7
	2018	470	456	97,0	14	3,0
	Total	3.448	3.223	93,5	225	6,5
Salmón Coho	2014	31	25	80,6	6	19,4
	2015	149	136	91,3	13	8,7
	2016	41	40	97,6	1	2,4
	2017	61	61	100,0	0	0,0
	2018	12	11	91,7	1	8,3
	Total	294	273	92,9	21	7,1
Trucha Arcoíris	2014	47	38	80,9	9	19,1
	2015	97	88	90,7	9	9,3
	2016	33	26	78,8	7	21,2
	2017	22	22	100,0	0	0,0
	2018	15	15	100,0	0	0,0
	Total	214	189	88,3	25	11,7
TOTAL	2014	508	415	81,7	93	18,3
	2015	1.197	1.110	92,7	87	7,3
	2016	803	759	94,5	44	5,5
	2017	951	919	96,6	32	3,4
	2018	497	482	97,0	15	3,0
	Total	3.956	3.685	93,1	271	6,9

2.7: Número de tratamientos realizados vía inyectable según principio activo, empresa y especie en estudio retrospectivo.

N° EMPRESA	GENERAL INYECTABLE	PRINCIPIO ACTIVO INYECTABLE			
		FLORFENICOL		OXITETRACICLINA	
	<i>n</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
2	76	11	14,5	65	85,5
4	7	0	0,0	7	100,0
5	140	80	57,1	60	42,9
6	140	0	0,0	140	100,0
7	23	0	0,0	23	100,0
10	155	74	47,7	81	52,3
11	89	8	9,0	81	91,0
12	83	15	18,1	68	81,9
13	15	0	0,0	15	100,0
14	36	9	25,0	27	75,0
15	70	2	2,9	68	97,1
17	11	3	27,3	8	72,7
18	34	3	8,8	31	91,2
19	147	18	12,2	129	87,8
20	8	0	0,0	8	100,0
21	110	110	100,0	0	0,0
22	9	3	33,3	6	66,7
23	11	6	54,5	5	45,5
24	6	2	33,3	4	66,7
	1.170	344	29,4	826	70,6

2.8. Caracterización del esquema terapéutico en estudio prospectivo.

ESQUEMA TERAPÉUTICO			TOTAL		
Mortalidad al inicio del tratamiento ¹	SRS		0,006	(0,000 0,031)	
	SRS+SCA		0,030	(0,012 0,057)	
	Total		0,072	(0,045 0,124)	
Cobertura	Jaula a jaula		351	33,3%	
	Centro completo		703	66,7%	
Principio activo vía oral	Florfenicol	14	14	1,6%	
		15	345	40,4%	
		20	489	57,3%	
		>20	6	0,7%	
	Oxitetraciclina	75	-	-	
		100	200	100,0%	
		>100	-	-	
Duración real (tratamientos orales)	Florfenicol	14	410	49,0%	
		18	344	41,2%	
		21	45	5,4%	
		>21	37	4,4%	
	Oxitetraciclina	14	68	39,5%	
		18	18	10,5%	
		21	50	29,1%	
		>21	36	20,9%	
	Duración prescrita (tratamientos orales)	Florfenicol	14	642	75,2%
			18	212	24,8%
Oxitetraciclina		14	176	88,0%	
		18	24	12,0%	
Estrategia de alimentación	1 ración al día		314	30,4%	
	2 raciones al día		245	23,7%	
	3 raciones al día		30	2,9%	
	Microraciones		445	43,0%	

¹Indica **mediana**, cuartil 1 y cuartil 3

2.9. Número de tratamientos realizados según determinantes y especie en estudio retrospectivo.

DETERMINANTES		GENERAL	SALMÓN DEL ATLÁNTICO		SALMÓN COHO		TRUCHA ARCOÍRIS	
		<i>n</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Año	2014	567	452	79,7%	43	7,6%	72	12,7%
	2015	1.466	1.145	78,1%	195	13,3%	126	8,6%
	2016	1.178	1.060	90,0%	57	4,8%	61	5,2%
	2017	1.323	1.208	91,3%	77	5,8%	38	2,9%
	2018	596	537	90,1%	41	6,9%	18	3,0%
Región	X	2.419	1.897	78,4%	381	15,8%	141	5,8%
	XI	2.711	2.505	92,4%	32	1,2%	174	6,4%
Macrozonas	1	498	289	58,0%	175	35,1%	34	6,8%
	2	938	740	78,9%	113	12,1%	85	9,1%
	3	317	245	77,3%	56	17,7%	16	5,1%
	4	666	623	93,5%	37	5,6%	6	0,9%
	5	587	558	95,1%	9	1,5%	20	3,4%
	6	1.436	1.350	94,0%	3	0,2%	83	5,8%
	7	688	597	86,8%	20	2,9%	71	10,3%
Temporada al tratamiento	Invierno	922	688	74,6%	171	18,6%	63	6,8%
	Otoño	1.438	1.188	82,6%	157	10,9%	93	6,5%
	Primavera	1.149	1.014	88,3%	61	5,3%	74	6,4%
	Verano	1.621	1.512	93,3%	24	1,5%	85	5,2%
Peso (Kg)	<1	1.218	988	81,1%	153	12,6%	77	6,3%
	1 a 3	2.464	1.987	80,6%	239	9,7%	238	9,7%
	3 a 5	1.170	1.156	98,8%	14	1,2%	0	0,0%
	≥5	278	271	97,5%	7	2,5%	0	0,0%
Cálignos	<0,5	1.339	1.124	83,9%	125	9,3%	90	6,7%
	0,5 a 1	828	779	94,1%	3	0,4%	46	5,6%
	1 a 3	1.789	1.679	93,9%	2	0,1%	108	6,0%
	≥3	1.174	820	69,9%	283	24,1%	71	6,1%
TOTAL		5.130	4.402	85,8%	413	8,1%	315	6,1%

2.10. Número de jaulas tratadas según determinante en estudio prospectivo.

DETERMINANTES		TOTAL	
		<i>n</i>	%
Región	X	427	40,7%
	XI	622	59,3%
	Total	1.049	100,0%
Macrozonas	1	134	12,9%
	2	144	13,8%
	3	32	3,1%
	4	101	9,7%
	5	400	38,4%
	6	204	19,6%
	7	27	2,6%
	Total	1.042	100,0%
Temporada al tratamiento	Invierno	152	14,4%
	Otoño	511	48,5%
	Primavera	43	4,1%
	Verano	348	33,0%
	Total	1.054	100,0%
Peso (Kg)	<1	392	37,2%
	1 a 3	319	30,3%
	3 a 5	328	31,1%
	≥5	15	1,4%
	Total	1.054	100,0%
Cáligus	<0,5	335	31,8%
	0,5 a 1	165	15,7%
	1 a 3	437	41,5%
	≥3	117	11,1%
	Total	1.054	100,0%

2.11: Número de tratamientos según región y especie en estudio retrospectivo.

REGIÓN	Nº DE TRATAMIENTOS TOTALES		ESPECIE					
			SALMÓN ATLÁNTICO		SALMÓN COHO		TRUCHA ARCOÍRIS	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
X	2.419	47,2	1.897	43,1	381	92,3	141	44,8
XI	2.711	52,9	2.505	56,9	32	7,8	174	55,2
TOTAL	5.130	100,0	4.402	100,0	413	100,0	315	100,0

2.12: Número de peces sembrados (millones) durante el período 2014 - 2018 según región, macrozona y especie en estudio retrospectivo.

REGIÓN	MACROZONA	PECES SEMBRADOS (MILL)		ESPECIE					
				SALMÓN ATLÁNTICO		SALMÓN COHO		TRUCHA ARCOÍRIS	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
X	1	81,7	13,3	37,5	8,0	35,0	41,3	9,3	13,9
	2	101,0	16,5	62,1	13,2	21,3	25,1	17,9	26,8
	3	39,2	6,4	24,2	5,1	12,5	14,7	2,5	3,7
	4	68,3	11,2	70,0	14,9	5,3	6,3	2,0	3,0
XI	5	75,8	12,4	71,4	15,2	2,0	2,4	2,4	3,6
	6	156,7	25,6	133,0	28,3	0,0	0,0	23,6	35,4
	7	89,6	14,6	71,9	15,3	8,7	10,3	9,0	13,5
TOTAL		612,8	100,0	470,1	100,0	84,8	100,0	66,7	100,0

2.13: Número de tratamientos según temporada al tratamiento y especie en estudio retrospectivo.

TEMPORADA TRATAMIENTO	N° TRATAMIENTOS		ESPECIE					
	TOTAL		SALMÓN ATLÁNTICO		SALMÓN COHO		TRUCHA ARCOÍRIS	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Verano	1.621	31,6	1.512	34,4	24	5,8	85	27,0
Otoño	1.438	28,0	1.188	27,0	157	38,0	93	29,5
Invierno	922	18,0	688	15,6	171	41,4	63	20,0
Primavera	1.149	22,4	1.014	23,0	61	14,8	74	23,5
TOTAL	5.130	100,0	4.402	100,0	413	100,0	315	100,0

2.14: Número de tratamientos según peso promedio al tratamiento y especie en estudio retrospectivo.

PESO PROMEDIO (Kg)	N° TRATAMIENTOS		ESPECIE					
	TOTAL		SALMÓN ATLÁNTICO		SALMÓN COHO		TRUCHA ARCOÍRIS	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<1	1.218	23,7	988	22,4	153	37,1	77	24,4
1-3	2.446	47,7	1.987	45,1	239	57,9	220	69,8
3-5	1.170	22,8	1.156	26,3	14	3,4	0	0,0
≥5	296	5,8	271	6,2	7	1,7	18	5,7
Total	5.130	100,0	4.402	100,0	413	100,0	315	100,0

2.15: Número de ciclos que están en la categoría de tratamientos por ciclo establecidas por certificación ASC según empresa.

N° EMPRESA	Nº CICLOS GENERAL	≤3 TRATAMIENTOS POR CICLO		>3 TRATAMIENTOS POR CICLO	
	<i>n</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
2	91	41	45,1	50	54,9
4	29	5	17,2	24	82,8
5	43	12	27,9	31	72,1
6	30	7	23,3	23	76,7
7	15	0	0,0	15	100,0
8	10	0	0,0	10	100,0
9	-	-	-	-	-
10	47	13	27,7	34	72,3
11	27	15	55,6	12	44,4
12	39	4	10,3	35	89,7
13	5	1	20,0	4	80,0
14	12	6	50,0	6	50,0
15	23	2	8,7	21	91,3
16	1	1	100,0	0	0,0
17	28	0	0,0	28	100,0
18	19	3	15,8	16	84,2
19	45	12	26,7	33	73,3
20	31	18	58,1	13	41,9
21	20	1	5,0	19	95,0
22	20	9	45,0	11	55,0
23	20	3	15,0	17	85,0
24	20	9	45,0	11	55,0

2.16: Número de ciclos clasificados según rangos de números de tratamientos en cada ciclo por especie.

Nº DE TRATAMIENTOS POR CICLO	GENERAL			ESPECIE								
				SALMÓN DEL ATLÁNTICO			SALMÓN COHO			TRUCHA ARCOÍRIS		
	<i>n</i>	%	% <i>acum</i>	<i>n</i>	%	% <i>acum</i>	<i>n</i>	%	% <i>acum</i>	<i>n</i>	%	% <i>acum</i>
≤3	163	28,3	28,3	58	14,5	14,5	70	67,3	67,3	35	48,6	48,6
4 a 6	152	26,4	54,7	107	26,8	41,3	16	15,4	82,7	29	40,3	88,9
7 a 10	154	26,7	81,4	132	33,0	74,3	15	14,4	97,1	7	9,7	98,6
>10	107	18,6	100,0	103	25,8	100,0	3	2,9	100,0	1	1,4	100,0
TOTAL	576	100,0	100,0	400	100,0	100,0	104	100,0	100,0	72	100,0	100,0

2.17. Asociación de diferentes definiciones de eficacia con esquema terapéutico y determinantes para el estudio retrospectivo.

ESQUEMA TERAPÉUTICO	EFICACIA NIVEL TRATAMIENTO						EFICACIA NIVEL CICLO			
	ESTRICTA		MODERADA		≥50% DE REDUCCIÓN		≤3 TTO		≤6 TTO	
	OR	p valor	OR	p valor	OR	p valor	OR	p valor	OR	p valor
Mortalidad SRS inicio tratamiento	0,70	0,000	0,89	0,006	59,75	0,000	0,14	0,000	0,35	0,000
Mortalidad SRS+SCA inicio tratamiento	0,69	0,000	0,88	0,003	28,87	0,000	0,17	0,000	0,39	0,000
Mortalidad total inicio tratamiento	0,88	0,000	0,93	0,002	1,85	0,000	0,79	0,026	0,73	0,000
Centro completo	0,87	0,055	0,81	0,003	0,58	0,000	5,59	0,000	5,37	0,000
Jaula a Jaula	1,15	0,055	1,24	0,003	1,71	0,000	0,18	0,000	0,19	0,000
Florfenicol oral	0,83	0,158	0,89	0,367	1,25	0,124	0,63	0,027	0,60	0,000
Oxitetraciclina oral	1,20	0,158	1,13	0,367	0,80	0,124	1,58	0,027	1,66	0,000
Florfenicol inyectable	0,48	0,000	0,60	0,001	1,06	0,669	0,18	0,004	0,37	0,000
Oxitetraciclina inyectable	2,07	0,000	1,67	0,001	0,94	0,669	5,62	0,004	2,69	0,000
Florfenicol oral 10 mg/kg	0,55	0,257	0,83	0,715	1,82	0,249	1,79	0,452	1,48	0,490
Florfenicol oral 15 mg/kg	1,19	0,036	1,22	0,022	1,20	0,033	0,28	0,000	0,38	0,000
Florfenicol oral 20 mg/kg	0,99	0,929	0,98	0,727	0,94	0,419	1,10	0,450	1,27	0,005
Florfenicol oral >20 mg/kg	0,84	0,049	0,83	0,047	0,86	0,136	2,01	0,000	1,67	0,000
Oxitetraciclina oral 100 mg/kg	1,68	0,256	1,80	0,197	0,98	0,962	0,16	0,002	0,19	0,015
Oxitetraciclina oral >100 mg/kg	0,60	0,256	0,55	0,197	1,02	0,962	6,32	0,002	5,15	0,015
Florfenicol inyectable 25 mg/kg	0,24	0,001	0,22	0,000	0,28	0,004	6,57	0,131	26,60	0,000
Florfenicol inyectable 30 mg/kg	1,17	0,500	1,09	0,728	0,67	0,082	-	-	0,24	0,011
Florfenicol inyectable 35 mg/kg	0,80	0,425	0,89	0,705	0,88	0,645	-	-	1,08	0,888

ESQUEMA TERAPÉUTICO	EFICACIA NIVEL TRATAMIENTO						EFICACIA NIVEL CICLO			
	ESTRICTA		MODERADA		≥50% DE REDUCCIÓN		≤3 TTO		≤6 TTO	
	OR	p valor	OR	p valor	OR	p valor	OR	p valor	OR	p valor
Florfenicol inyectable 40 mg/kg	1,71	0,036	1,91	0,021	2,94	0,000	4,00	0,26	0,37	0,076
Oxitetraciclina inyectable 25	0,66	0,115	0,73	0,265	1,42	0,160	0,61	0,501	2,26	0,006
Oxitetraciclina inyectable 30	1,05	0,813	0,98	0,906	0,93	0,649	0,82	0,629	0,63	0,056
Oxitetraciclina inyectable 35	0,98	0,922	1,03	0,881	0,98	0,896	1,57	0,218	0,98	0,930
Oxitetraciclina inyectable >35	2,01	0,094	1,69	0,209	0,83	0,526	0,41	0,39	1,18	0,673
Duración tratamiento ¹	1,03	0,000	1,03	0,000	1,03	0,000	0,99	0,191	1,00	0,764
Temporada invierno	0,72	0,000	0,69	0,000	0,53	0,000	1,39	0,013	1,12	0,217
Temporada otoño	0,96	0,495	0,99	0,867	1,18	0,012	0,97	0,829	1,09	0,282
Temporada primavera	0,73	0,000	0,72	0,000	0,72	0,000	1,04	0,770	1,11	0,228
Temporada verano	1,72	0,000	1,77	0,000	1,66	0,000	0,75	0,030	0,78	0,002
Temperatura ¹	1,21	0,000	1,24	0,000	1,30	0,000	0,94	0,144	0,93	0,004
Macrozona 1	0,88	0,193	0,84	0,086	0,90	0,296	4,29	0,000	2,16	0,000
Macrozona 2	0,98	0,800	0,97	0,725	0,99	0,908	1,00	0,990	0,76	0,003
Macrozona 3	0,58	0,000	0,63	0,000	0,70	0,007	1,76	0,006	0,75	0,085
Macrozona 4	1,53	0,000	1,55	0,000	1,41	0,000	0,40	0,000	0,63	0,000
Macrozona 5	1,02	0,841	1,01	0,892	0,92	0,384	0,98	0,918	1,26	0,026
Macrozona 6	0,88	0,060	0,88	0,057	1,05	0,487	0,43	0,000	0,79	0,005
Macrozona 7	1,20	0,035	1,21	0,035	0,90	0,242	1,02	0,914	1,57	0,000
Especie Salmón del Atlántico	2,16	0,000	2,41	0,000	1,97	0,000	0,09	0,000	0,14	0,000

ESQUEMA TERAPÉUTICO	EFICACIA NIVEL TRATAMIENTO						EFICACIA NIVEL CICLO			
	ESTRICTA		MODERADA		≥50% DE REDUCCIÓN		≤3 TTO		≤6 TTO	
	OR	<i>p valor</i>	OR	<i>p valor</i>	OR	<i>p valor</i>	OR	<i>p valor</i>	OR	<i>p valor</i>
Especie Salmón Coho	0,89	0,293	0,82	0,069	0,66	0,000	8,65	0,000	4,11	0,000
Especie Trucha Arcoíris	0,23	0,000	0,20	0,000	0,40	0,000	5,01	0,000	8,79	0,000
Peso a la siembra	1,00	0,000	1,00	0,000	1,00	0,060	1,00	0,000	1,00	0,000
Cáligus ¹	0,97	0,174	0,99	0,720	1,05	0,024	0,91	0,124	0,96	0,210
Peso <1 kg	1,54	0,000	1,40	0,000	0,93	0,346	1,40	0,007	1,23	0,011
Peso 1 a 3 kg	0,94	0,308	0,97	0,617	1,22	0,001	1,71	0,000	1,27	0,001
Peso 3 a 5 kg	0,72	0,000	0,74	0,000	0,71	0,000	0,30	0,000	0,78	0,006
Peso ≥5 kg	0,96	0,772	1,07	0,633	1,51	0,002	0,22	0,001	0,22	0,000
Nº ordinal de tratamiento	1,00	0,797	1,00	0,500	1,02	0,000	0,40	0,000	0,61	0,000
Primer tratamiento exitoso	1,51	0,000	1,52	0,000	1,45	0,000	-	-	-	-
Primer tratamiento inyectable	1,52	0,000	1,43	0,000	1,53	0,000	0,61	0,024	0,73	0,002

¹Evaluada como variable continua

2.18. Asociación de diferentes definiciones de eficacia con esquema terapéutico y determinantes para el estudio prospectivo.

ESQUEMA TERAPÉUTICO	EFICACIA NIVEL TRATAMIENTO							
	ESTRICTA		MODERADA		≥50% DE REDUCCIÓN DIARIO		≥50% DE REDUCCIÓN SEMANAL	
	<i>OR</i>	<i>p valor</i>	<i>OR</i>	<i>p valor</i>	<i>OR</i>	<i>p valor</i>	<i>OR</i>	<i>p valor</i>
Mortalidad SRS inicio tratamiento	0,19	0,344	2,20	0,679	0,32	0,499	0,01	0,026
Mortalidad SRS+SCA inicio tratamiento	0,93	0,932	0,79	0,794	1,93	0,475	233,41	0,000
Mortalidad total inicio tratamiento	0,28	0,032	1,03	0,950	0,95	0,906	0,15	0,025
Centro completo	0,92	0,700	0,90	0,634	0,49	0,000	0,49	0,000
Jaula a Jaula	1,08	0,700	1,11	0,634	2,04	0,000	2,04	0,000
Florfenicol oral	1,59	0,028	1,55	0,039	0,27	0,000	4,34	0,000
Oxitetraciclina oral	0,63	0,028	0,65	0,039	3,71	0,000	0,23	0,000
Florfenicol oral dosis 15 mg/kg	2,17	0,002	2,05	0,004	0,81	0,158	0,57	0,001
Florfenicol oral dosis 20 mg/kg	0,46	0,002	0,49	0,004	1,24	0,158	1,75	0,001
Duración prescrita 14 días	0,48	0,005	0,51	0,009	0,46	0,464	0,62	0,010
Duración prescrita 18 días	2,09	0,005	1,97	0,009	2,16	0,000	1,61	0,010
Duración real tratamiento ¹	1,01	0,776	1,00	0,891	0,96	0,047	0,83	0,000
Microraciones	1,06	0,759	1,09	0,659	1,35	0,032	2,30	0,000
1 ración al día	0,84	0,395	0,79	0,226	1,39	0,030	0,90	0,566
2 raciones al día	1,21	0,479	1,32	0,308	0,42	0,000	0,42	0,000
3 raciones al día	0,97	0,955	0,92	0,896	0,77	0,504	0,60	0,214
Temporada invierno	1,11	0,680	1,20	0,477	1,23	0,291	12,44	0,000
Temporada otoño	1,17	0,424	1,20	0,347	0,41	0,000	0,26	0,000

ESQUEMA TERAPÉUTICO	EFICACIA NIVEL TRATAMIENTO							
	ESTRICTA		MODERADA		≥50% DE REDUCCIÓN DIARIO		≥50% DE REDUCCIÓN SEMANAL	
	OR	p valor	OR	p valor	OR	p valor	OR	p valor
Temporada primavera	5,66	0,021	5,40	0,024	20,33	0,003	-	-
Temporada verano	0,63	0,020	0,59	0,008	1,96	0,000	0,75	0,139
Siembra a doble densidad	1,41	0,245	1,46	0,209	0,29	0,000	0,45	0,001
Clasificación SRS previa vigilancia	8,67	0,001	6,24	0,002	2,60	0,001	0,78	0,371
Clasificación SRS previa alerta	0,12	0,001	0,16	0,002	0,34	0,001	0,61	0,165
Peso <1 kg	1,01	0,956	1,00	0,989	1,65	0,001	0,32	0,000
Peso 1 a 3 kg	1,17	0,474	1,10	0,658	0,77	0,080	1,24	0,173
Peso 3 a 5 kg	0,85	0,446	0,91	0,677	0,92	0,556	1,96	0,000
Peso ≥5 kg	-	-	-	-	0,07	0,000	0,88	0,860
Cáligus ¹	1,11	0,148	1,09	0,229	0,92	0,028	0,95	0,126
Hubo evento que causara suspensión o disminución de consumo	0,53	0,002	0,53	0,002	0,48	0,000	1,16	0,364
Hubo evento de suspensión o disminución al inicio del tratamiento	0,49	0,000	0,45	0,000	0,45	0,000	1,29	0,105
Hubo evento de suspensión o disminución a la mitad del tratamiento	0,62	0,019	0,63	0,023	0,44	0,000	0,84	0,275
Hubo evento de suspensión o disminución al final del tratamiento	0,62	0,019	0,63	0,023	0,44	0,000	0,84	0,275
Hubo lobo de mar durante el tratamiento	2,10	0,069	2,40	0,041	0,42	0,000	0,49	0,004
Hubo FAN durante el tratamiento	0,35	0,019	0,34	0,014	3,53	0,019	-	-

ESQUEMA TERAPÉUTICO	EFICACIA NIVEL TRATAMIENTO							
	ESTRICTA		MODERADA		≥50% DE REDUCCIÓN DIARIO		≥50% DE REDUCCIÓN SEMANAL	
	<i>OR</i>	<i>p valor</i>	<i>OR</i>	<i>p valor</i>	<i>OR</i>	<i>p valor</i>	<i>OR</i>	<i>p valor</i>
Hubo mal clima durante el tratamiento	0,50	0,012	0,55	0,031	0,45	0,000	0,31	0,000

¹Evaluada como variable continua

ANEXOS: OTROS

ANEXO 1: Listado de asistentes Reunión inicial de trabajo con los Médicos Veterinarios de empresas colaboradoras. Marzo 2018. Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas, Chile.

TALLER INICIAL PROYECTO PGSA 2018 SERNAPESCA-FARMAVET

Lugar: Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas.

Fecha: 22 de marzo de 2018

Hora inicio: 14:30

Hora término: 18:30

Empresa	Nombre	Correo electrónico
Marine Harvest	Marcelo Imilan	marcelo.imilan@marineharvest.com
Salmones Aysén	David Garrido	dgarrido@salmonesaysen.cl
Cía. Pesquera Camanchaca	Jaime Santana	jaime.santana@camanchaca.cl
Salmones Multiexport	Paulo Díaz	pdiaz@multiexportfoods.com
Salmones Multiexport	Cristian Gallardo	cgallardog@multiexportfoods.com
Biomar Chile S.A.	Oscar Berríos	obc@biomar.com
Salmones Blumar	Francisco Vallejos	francisco.vallejos@blumar.com
Salmones Friosur	Claudio Astorga	castorga@friosur.cl
Pesquera Los Fiordos	Mauricio Labraña	mlabrana@agrosuper.com
Salmones Austral	Andrés Sepúlveda	andres.sepulveda@salmonesaustral.cl
Salmones Austral	Jorge Leal	jorge.leal@salmonesaustral.cl
Empresas Aquachile	Claudio Valenzuela	cvalenzuela@aquachile.com
Cermaq Chile	Cristian Uribe	cristian.uribe@cermaq.com
INTESAL	Rolando Ibarra	ribarra@intesal.cl
FARMAVET	Betty San Martín	bsmartin@uchile.cl
FARMAVET	Javiera Cornejo	jacornej@uchile.cl
FARMAVET	Marcela Fresno	mfresno@uchile.cl
CIBA	Marcos Godoy	marcos.godoy@ciba.cl
CIBA	Jorge Santana	jorge.santana@ciba.cl
CERES BCA	Hernán Rojas	hernan.rojas@ceresbca.cl
CERES BCA	Paulina Reyes	paulina.reyes@ceresbca.cl

ANEXO 2: Listado de asistentes Taller de trabajo de Farmacología, con los Médicos Veterinarios de empresas colaboradoras. Octubre 2018. Hotel Radisson, Puerto Varas, Chile.

TALLER "AVANCES EN ASPECTOS FARMACOLÓGICOS EN LA OPTIMIZACIÓN DE ESQUEMAS TERAPÉUTICOS DE OXITETRACICLINA Y FLORENICIL PARA EL TRATAMIENTO DE PISCICULTIVOS"
 Lugar: Hotel Telemática, Puerto Varas, Chile
 Fecha: 23 de octubre de 2018

Nombre	Empresa	Córeo electrónico
DAVID VALDEZUELA P.	ETIP ABLADUNE	DAVIDVALDEZUELA@ETIP.ABLADUNE.COM
UDONED MONTE	SANMUSE ANCHILVA	UDONEDMONTE@SANMUSEANCHILVA.COM
Esteban Ibarra M.	INTERAL S.A.	ESTEBANIBARRA@INTERAL.COM
François LABRIN	LOI FARMACIA	FRANCOISLABRIN@LOIFARMACIA.COM
Alma Javilla U.	Lawey Chile	ALMAJAVILLA@LAWEYCHILE.COM
Yessica Rojas	Genes Bio - Chile	YESSICAROJAS@GENESBIOCHILE.COM
José Wpuel Burgos	UNIVERSUM Chile	JOSEWPUELBURGOS@UNIVERSUMCHILE.COM
Roberto Adolfo Godínez	Santofelia	ROBERTOAGODOINEZ@SANTOFELIA.COM
Rafael Sambo	V. J. C.I.E.	RAFAELSAMBO@VJCIE.COM
Francisco Castro	Consorcio SPA	FRANCISCOCASTRO@CONSORCIOSPA.COM
Diego Aguilar	Selkeltes Animal Health	DIEGOAGUILAR@SELKELTESANIMALHEALTH.COM
Manuel Vargas	Alumina	MANUELVARGAS@ALUMINA.COM
Fernando Balleja	Alumina	FERNANDOBALLEJA@ALUMINA.COM
Paola Díaz	CEBSA SPA	PAOLA DIAZ@CEBSASPA.COM
COBET OVAREZ	IFOP	COBETOVAREZ@IFOP.COM
Pamela Herrera	Somacsa	PAMELAHERRERA@SOMACSA.COM
Andrés Pizarro	CERES SPA	ANDRESPIZARRO@CERESSPA.COM
Paulina Rojas	CERES ANCHILVA	PAULINAROJAS@CERESSPAANCHILVA.COM
David García	SSA ANCHILVA	DAVIDGARCIA@SSAANCHILVA.COM

Lugar: Hotel Bellavista, Puerto Varas, Chile
 Fecha: 23 de octubre de 2018

Nombre	Empresa	Correo electrónico
Agustín González	SENADES	Agustin@senades.cl
Rodrigo González	Senades	Rodrigo@senades.cl
Rafael Sánchez	CIBK	Rafael@senades.cl
Alejandro Hysinger	MUTEX PAID	Alejandro@senades.cl
Teresa Nasser	BANK	Teresa@senades.cl
Marta Martínez	FUNORIN	Marta@senades.cl
Marta Martínez	FUNORIN	Marta@senades.cl

ANEXO 3: Listado de asistentes Taller de trabajo de Epidemiología, con los Médicos Veterinarios de empresas colaboradoras. Octubre 2018. Hotel Radisson, Puerto Varas, Chile.

Lugar: Hotel Ballarista, Puerto Varas, Chile
 Fecha: 23 de octubre de 2018

TALLER "PISICRIETISIOSIS: APROVANDO LA TOMA DE DECISIONES CRITICAS EN LAS TERAPIAS ANTIMICROBIANAS"

Nombre	Empresa	Correo electrónico
RODRIGO NOBREGA V.	OXVAUCATA SA	rodri.no@oxvaucata.cl
PAULINA VALDEBENA	ETI ADAPTADA	pauli.valde@eti.cl
ESTEBAN USMIEL N.	EL ESTER S.A.	esteban.usmiel@elster.cl
MARCO LASANDA P.	LOS FERROS	marco.lasanda@losferros.cl
ALEX HERRERA	Genes DSA	alex.herrera@genesdsa.cl
JOSE MANUEL DURROS G.	GENESCA-U. CHILE	josman.durros@genesca.cl
PAULINA VALDEBENA	ROBILMON	pauli.valde@robilmon.cl
ESTEBAN USMIEL N.	SPINNET AUSTRIA	esteban.usmiel@spinnet.cl
LORETO OVALLE P.	EL POP	loreto.ovalle@elpop.cl
PAOLA OLIVERO	SEUR	paola.olivero@seur.cl
RODRIGO MONTAÑA	SYNOPSIS	rodrigo.montana@synopsis.cl
PAULINA VALDEBENA	CELIS BCT	pauli.valde@celisbct.cl
DAVID GARCÍA	SALMORBI AYSÉN S.A.	dauid.garcia@salmorbi.cl
ALVARO GILLES	SEARSA	alvaro.gilles@searsa.cl
ALVARO GILLES	SEARSA	alvaro.gilles@searsa.cl
ALVARO GILLES	SEARSA	alvaro.gilles@searsa.cl

Lugar: Hotel Bellavista, Puerto Varas, Chile
 Fecha: 23 de octubre de 2018

Nombre	Empresa	Correo electrónico
MAYRA BOGOTÁ	CIBA	MAYRA.S.GODOL@CIBA.CL
LADY SUAREZ NUÑEZ	MUTUAL PUF	LADY.SUAREZ@MUTUALPUF.COM
ALEXANDRE HEISSINGER Z	MUSIC HANSEN	ALEXANDRE.HEISSINGER@MUSICHANSEN.COM
FRANCISCO PUECO	FRANCISCO	FRANCISCO.PUECO@FRANCISCO.COM
MARCELA ESCOBAR	FRANCISCO	MARCELA.ESCOBAR@FRANCISCO.COM

ANEXO 4: Invitación Seminario Internacional “Desafíos en el uso responsable de antibióticos para una salmonicultura competitiva y sustentable”, Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas, Chile. 7 de diciembre de 2018.

PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA

Ministerio de Economía, Fomento y Turismo
Gobierno de Chile

SalmonChile

Subsecretaría de Pesca y Acuicultura
Gobierno de Chile

FAVET

SEMINARIO INTERNACIONAL

“ DESAFÍOS EN EL USO RESPONSABLE DE ANTIBIÓTICOS PARA UNA SALMONICULTURA COMPETITIVA Y SUSTENTABLE ”

7 DICIEMBRE 2018 / 8:30-16:30 HRS. (ALMUERZO INCLUIDO)
HOTEL PARK INN BY RADISSON: LA PAZ 471, PUERTO VARAS

EXPOSITORES

Betty San Martín
FAVET

Alicia Gallardo
SERNAPESCA-OIE

Marisa Caipo
FAO

Arturo Anadón
U. COMPLUTENSE

Javiera Cornejo
FAVET-LIA

Marcos Godoy
USS-CIBA
UNIVERSIDAD SAN SEBASTIAN

Hernán Rojas
CERES
CERES BCA

OIE - SEMANA MUNDIAL DE CONCIENTIZACIÓN SOBRE LOS ANTIBIÓTICOS 2018

ANEXO 5: Programa Seminario Internacional “Desafíos en el uso responsable de antibióticos para una salmonicultura competitiva y sustentable”, Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas, Chile. 7 de diciembre de 2018.



**SEMINARIO INTERNACIONAL "DESAFÍOS EN EL USO RESPONSABLE DE ANTIBIÓTICOS
PARA UNA SALMONICULTURA COMPETITIVA Y SUSTENTABLE"**

PROGRAMA

CONTENIDO	HORARIO
Inscripciones	8:30 - 9:00
Bienvenida Alicia Gallardo (Sernapesca)/ Nuri Grass (ACHIPIA)	9:00 - 9:20
Esteban Ramírez - INTESAL "Visión de la Industria en el uso de fármacos"	9:20 - 9:40
Arturo Anadón – Universidad Complutense de Madrid "Reglamentación en el uso de antibióticos en Medicina Veterinaria"	9:40 - 10:20
Coffee break	10:20 – 10:50
Betty San Martín – FARMAVET, Universidad de Chile "Los antibióticos en la salmonicultura a nivel nacional: ¿En qué estamos?"	10:50 – 11:30
Marcos Godoy – CIBA y Universidad San Sebastián "Evaluación en condiciones de campo la eficacia clínica y bacteriológica de los esquemas terapéuticos con oxitetraciclina y florfenicol frente a un cuadro clínico de <i>P. salmonis</i> "	11:30 – 12:10
Preguntas	12:10 – 12:30
Almuerzo/Inscripciones	12:30 – 14:00
Hernán Rojas – Ceres BCA "Determinantes que condicionan los esquemas terapéuticos contra Piscirickettsiosis"	14:00 – 14:40
Javiera Cornejo - FARMAVET, Universidad de Chile "Depleción de oxitetraciclina utilizada en centros de cultivo de salmones con brotes de Piscirickettsiosis"	14:40 – 15:20
Alicia Gallardo - SERNAPESCA / OIE "Lineamientos de la OIE en el rol de uso de antimicrobianos y visión de la autoridad competente"	15:20 – 16:00
Preguntas y panel de cierre	16:00 - 16:30

ANEXO 6: Lista de asistentes Seminario Internacional "Desafíos en el uso responsable de antibióticos para una salmicultura competitiva y sustentable", Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas, Chile. 7 de diciembre de 2018.

* Seminario "Desafíos en el uso responsable de antibióticos para una salmicultura competitiva y sustentable"
 Fecha: 7 de diciembre de 2018
 Lugar: Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas

93

Empresa	Nombre	Correo electrónico
1 MSD Salud Animal	Oscar Parra Ponce	oscar.parra.2@gmail.com
2 INNOVET SPA	Rafael Sabatini Doumy	rsabatini@innovet.com
3 MALLUS PAN	Rafael Sabatini Doumy	F.Sabatini@malluspan.com
4 MULTIFUNT FOODS	Ben Kaur	benkaur@multifuntfoods.com
5 MULTIFUNT FOODS	Brenda Cordero	brenda.cordero@multifuntfoods.com
6 BEVER	Ignacio Valderrama	ignacio.valderrama@bever.com
7 KOVIM COPIA &	Ignacio Valderrama	ignacio.valderrama@kovim.com
8 MULTIFUNT FOODS	Daniel Zúñiga	danielzuniga@multifuntfoods.com
9 MULTIFUNT FOODS	David Soto Peña	dsoto@multifuntfoods.com
10 Los Alimentos	Felipe Simeón V. Zúñiga	fsimeon@losalimentos.com
11 Los Alimentos	Paula Espinoza	pe Espinoza@losalimentos.com
12 Anuphokhai	Kunida Gutierrez	kunida.gutierrez@anuphokhai.com
13 FATESA - S.A. S.A.	Estelina Ramírez	estelina.ramirez@fatesa.com
14 USS	Valeria Jara	valeria.jara@uss.com
15 USS	Valeria Valderrama Miranda	valeria.valderrama@uss.com
16 USS	Karen Acuña Acuña	karen.acuna@uss.com
17 USS	Karen Acuña Acuña	karen.acuna@uss.com
18 USS	Lucy H. Pérez	lucy.perez@uss.com
19 USS	Carolina Quiroga	carolina.quiroga@uss.com
20 USS	S. Camallana	s.camallana@uss.com
21 USS	Bolívar Villón	bolivar.villon@uss.com
22 USS	Virginia Santos	virginia.santos@uss.com
23 USS	Marek Kuselica Ordoz	marek.kuselica@uss.com
24 USS	Agostinho Ribeiro	agostinho.ribeiro@uss.com
25 USS	Agostinho Ribeiro	agostinho.ribeiro@uss.com
26 USS	Agostinho Ribeiro	agostinho.ribeiro@uss.com
27 USS	Agostinho Ribeiro	agostinho.ribeiro@uss.com
28 USS	Agostinho Ribeiro	agostinho.ribeiro@uss.com
29 USS	Agostinho Ribeiro	agostinho.ribeiro@uss.com

30	SINOPESIA		
31	NEVROS	GOY 6	Caishay Jans Yawwa
32	JORRAE	bol	CLB4
33	ADVA	REULT	SARAWAN Ansmal
34	AIOTOLA		ANANAS GIZAT
35	MAROTO	ACEYENS	Campana Anin Gay
36	PONA	WASETHA	ALINAT CHIT
37	ADVA		
38	CARTILL		BOA TROCAR
39	MUTHER	PANT	ALIXANDRE Haisinger
40	JAHUBOZA		BURBULE VANT
41	JOUVEBON	SA	Thuy Th Young Anou
42	MANNE	HARVEST	Buguis
43	SEWA	QUNA	Quile FOn Mafta 94
44			DARUSSO ANOAN
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			

Seminario "Desafíos en el uso responsable de antibióticos para una salmicultura competitiva y sustentable"

Fecha: 7 de diciembre de 2018

Lugar: Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas

327 42

Empresario	Nombre	Correo electrónico
1 Pontchartrón	Mauricio Pineda Ullmann	mipineda@ullmann.com
2 Vivier S.A. S. de Chile	Tarver Campbell Guivias	Tarver.Campbell@USC.cl
3 Salmoson Cuperolam S.A.	Wesley Silva Guzmán	Wesley20@gmail.com
4 Salmoson Cuperolam S.A.	Wesley Katerina Strocada	WesleyKaterina@gmail.com
5 Los Finchos	MAURA VARELA	MAURAVARELA@GONDOPR.COM
6 EMP. AQUICULT.	CLAUDIO VARELA	CLAUDIOVARELA@GONDOPR.COM
7 Salmoson	FRANCISCA ROSA VON	FRANCISCA.ROSA@GONDOPR.COM
8 FIVICULT	Roberto Ovalle	ROBERTO.OVALLE@FIVICULT.COM
9 SERRAVALLO	Roberto Ovalle	ROBERTO.OVALLE@FIVICULT.COM
10 Biovent	Esteban Zamora	Esteban@biovent.com
11 CERVENA	Francoise Veronnet Hollweber	Francoise.Veronnet@CERVENA.COM
12 Agrihoy	Rebeca Dues Pardo	Rebeca.Dues@agrihoy.com
13 Veterinaria	Rebeca Zambrano Aguayo	RebecaZambrano@agui.com
14 Los Finchos	Daniela Huete Henríquez	DanielaHuete@losfinchos.com
15 U.S.	ENZO CANAVESE U.	ENZO.CANAVESE@USC.COM
16 SKA HILL	Horacio Luis Traverso	HoracioLuis@ska.com
17 Serravallo	Horacio Luis Traverso	HoracioLuis@Serravallo.com
18 Serravallo	Horacio Luis Traverso	HoracioLuis@Serravallo.com
19 Serravallo	Horacio Luis Traverso	HoracioLuis@Serravallo.com
20 Serravallo	Horacio Luis Traverso	HoracioLuis@Serravallo.com
21 Veterinaria	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl
22 Serravallo	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl
23 U.S.	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl
24 U.S.	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl
25 IPS	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl
26 GNT	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl
27 IPOP	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl
28 DIVERSA TECNOLOGÍAS	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl
29 AQUICULTURA	Amel Millán B.	Amel.Millan@veterinaria.cl

30	SARRECA	Felipe Vasquez Quid	Pvnaoq7@Sarrasca.cl
31	SERAPTESA	Karen Nonheiser	kmontinas@Seraptesa.cl
32	ESSELA	Ricardo Nolasco	pmwva@essela.cl
33	KALAMU GOMONDYCA	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Kalamu.cl
34	PAVUE KANIST	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Pavue.cl
35	USYKALIS	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Usykalis.cl
36	INTSAL	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Intsal.cl
37	INTSAL	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Intsal.cl
38	ADL DIAGNOSTIC	Daniel Ortega E.	dortega@adl-diagnostics.cl
39	SARRECA	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Sarresca.cl
40	STAPKON AKWA	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Stapkon.cl
41	CAOSINE DITENIU	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Caosine.cl
42	NAURCO TUEZ	Francisco Gonzalez	Francisco.Gonzalez@Naurco.cl
43		FABIAN	victor.telleriaz@fabian.cl
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			

Seminario "Desafíos en el uso responsable de antibióticos para una salmicultura competitiva y sustentable"

Fecha: 7 de diciembre de 2018

Lugar: Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas

30

Empresa	Nombre	Correo electrónico
1 MSD 4H	Sergio Vargas	sergio.vargas@msd.com
2 Sandoz Argentina	Valeria Alarcón	valeria.alarcon@sandoz.com
3 Castera Bay Mx SPA	Wils HERNANDEZ	whernandez@casterspa.com
4 Sempasa	José Ignacio Kock	j.kock@sempasa.cl
5 Grogel	Sandra Riquelme	sandra.riquelme@grogel.com
6 Grogel	Carla Jorjini	carla.jorjini@grogel.com
7 Silvestre Knapp	Ana Valeria Herrera	ana.valeria@silvestre.com
8 Summa	Daniela Vargas	daniela.vargas@summa.com
9 Europa GCL	Chela Sepúlveda	chela.sepulveda@europa.com
10 Europa GCL	Karen Hernández	karen.hernandez@europa.com
11 Europa GCL	?	
12 Sempasa	Jake Morales	jake.morales@sempasa.com
13 Sandoz Chile Bvty	Daniela Zúñiga	daniela.zuniga@sandoz.com
14 Hirono Bvty		
15 Sandoz Chile		
16 Salmora Aquatics	León Fuentetaja	leon.fuentetaja@salmora.com
17 Clavira Dicks	Fish List Group	fishlist@clavira.com
18 Clavira Dicks		
19 Salmora Aquatics	Ortiz Gregor Kersch	gregor.kersch@salmora.com
20 Salmora Aquatics	Sergio	sergio@salmora.com
21 HOP	LORETO OVALLE	loreto.ovalle@hop.cl
22 Europa GCL	?	
23 V. ANID	ROCKE BURKE	rocke.burke@v-anid.com
24 Salmora	Claudia Zúñiga	claudia.zuniga@salmora.com
25 Salmora	Mishina Winkler	mishina.winkler@salmora.com
26 Salmora		
27 Salmora	Nicolás Zamora	nicolas.zamora@salmora.com
28 ELANCO	Silvia Ballesteros	silvia.ballesteros@elanco.com
29 Salmora	OSMAR SANDOZ	osmar.sandoz@salmora.com

30	FARDA AUSTRI	Pesao Chavez S.L.U.	pcharve@pindabaubakl.cl
31	FORALE BROSTAN	Aguarino S.A.	forale@aguarino.com
32	EMPI SAMPSON	SEA SAMPSON LTD	emp@seasampson.com
33	JULIO LONCEN	Cerny	seah@seah.com
34	Y. R. J. L.	Y. R. J. L.	Y. R. J. L.
35	Y. R. J. L.	Y. R. J. L.	Y. R. J. L.
36	FARMNET	Y. R. J. L.	Y. R. J. L.
37	FARMNET	Y. R. J. L.	Y. R. J. L.
38	FARMNET	Y. R. J. L.	Y. R. J. L.
39	FARMNET	Y. R. J. L.	Y. R. J. L.
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			

ANEXO 7: Correo electrónico de recepción de manuscrito “*Optimization of florfenicol dose against Piscirickettsia salmonis in Salmo salar through PK/PD studies*”. Revista PLOS ONE.

13/12/2018

Fwd: PLOS ONE: PONE-D-18-32626 - [EMID:19415aa3af161897] - mfresno@uchile.cl - Correo de Universidad de Chile

From: **Jo George** <em@editorialmanager.com>
Date: jue., 22 de nov. de 2018 12:13 PM
Subject: PLOS ONE: PONE-D-18-32626 - [EMID:19415aa3af161897]
To: Lisette Lapierre <llapierre@uchile.cl>

PONE-D-18-32626
Optimization of florfenicol dose against *Piscirickettsia salmonis* in *Salmo salar* through PK/PD studies
PLOS ONE

Dear Dr. Lapierre,

Thank you for returning your manuscript.

This is a notice that your manuscript has been approved by our internal Editors and your submission will now be sent for Academic Editor invitation before being passed to peer review.

Regards,

Jo George
PLOS ONE

In compliance with data protection regulations, please contact the publication office if you would like to have your personal information removed from the database

<https://mail.google.com/mail/u/1/#search/lisette+lapierre/FMfcgvzLHtHfHKzBglCVFcCgpmLmvzn>

1/1