



Línea de Proyecto:
**Establecer las bases para el buen uso de antibióticos en la
salmonicultura**

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, FARMAVET





FINANCIAMIENTO: PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA

Línea de Proyecto:

Establecer las bases para el buen uso de antibióticos en la salmonicultura

Investigadora Responsable:

Dra. Betty San Martín (M.V., Ph.D.)

Profesora Titular, Universidad de Chile

Directora de Laboratorio de Farmacología Veterinaria, FARMAVET

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
INDICE	2
MARCO TEÓRICO	4
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
✓ Objetivo 1: Definir la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC ₉₀) de Oxitetraciclina y Florfenicol frente a <i>P. salmonis</i> .	16
a) Establecimiento de una colección de aislados de <i>Piscirickettsia salmonis</i> , agente causal de la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS)	16
b) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>Piscirickettsia salmonis</i> genotipificadas frente a Oxitetraciclina y Florfenicol	18
c) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) clínica de aislados De <i>P. salmonis</i> frente a Oxitetraciclina y Florfenicol	22
✓ Objetivo 2: Evaluación del efecto del proceso de elaboración de los alimentos medicados sobre las diferentes premezclas de oxitetraciclina y florfenicol.	23
a) Evaluación de la potencia microbiológica de premezclas de Oxitetraciclina y Florfenicol frente a <i>Piscirickettsia salmonis</i>	23
b) Verificación del porcentaje de pureza de oxitetraciclina y florfenicol declarado en las premezclas	26
c) Verificación de la estabilidad, concentración y homogeneidad de florfenicol y oxitetraciclina en los alimentos medicados.	33
d) Propuesta de elaboración de alimentos con concentraciones preestablecidas de antimicrobianos.	40
✓ Objetivo 3: Comparar y evaluar mediante estudios de biodisponibilidad la relación entre la liberación y disolución de oxitetraciclina y florfenicol a nivel intestinal con las concentraciones plasmáticas de los diferentes alimentos medicados, Etapa 1: Determinación de la liberación de florfenicol y oxitetraciclina desde alimentos medicados para peces.	41
✓ Objetivo 4: Verificación de las dosis y ritmo horario de oxitetraciclina y florfenicol que asegure la eficacia clínica de estos fármacos, utilizando el modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD). Etapa 1.	44
a) Administración de florfenicol 50%, por vía oral, a salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>) en distintas pautas horarias.	44
b) Validación para la determinación de la concentración de florfenicol y florfenicolamina en plasma de Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>).	55
c) Determinación de las concentraciones plasmáticas de florfenicol administrado vía alimento.	60

CONTENIDO	PAGINA
RESULTADOS	61
✓ Objetivo 1: Definir la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC ₉₀) de Oxitetraciclina y Florfenicol frente a <i>P. salmonis</i> .	61
a) Establecimiento de una colección de aislados de <i>Piscirickettsia salmonis</i> , agente causal de la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS)	61
b) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>Piscirickettsia salmonis</i> genotipificadas frente a Oxitetraciclina y Florfenicol	67
c) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) clínica de aislados De <i>P. salmonis</i> frente a Oxitetraciclina y Florfenicol	75
✓ Objetivo 2: Evaluación del efecto del proceso de elaboración de los alimentos medicados sobre las diferentes premezclas de oxitetraciclina y florfenicol.	77
a) Evaluación de la potencia microbiológica de premezclas de Oxitetraciclina y Florfenicol frente a <i>Piscirickettsia salmonis</i>	77
b) Verificación del porcentaje de pureza de oxitetraciclina y florfenicol declarado en las premezclas	82
c) Verificación de la estabilidad, concentración y homogeneidad de florfenicol y oxitetraciclina en los alimentos medicados.	86
d) Propuesta de elaboración de alimentos con concentraciones preestablecidas de antimicrobianos.	93
✓ Objetivo 3: Comparar y evaluar mediante estudios de biodisponibilidad la relación entre la liberación y disolución de oxitetraciclina y florfenicol a nivel intestinal con las concentraciones plasmáticas de los diferentes alimentos medicados, Etapa 1: Determinación de la liberación de florfenicol y oxitetraciclina desde alimentos medicados para peces.	96
✓ Objetivo 4: Verificación de las dosis y ritmo horario de oxitetraciclina y florfenicol que asegure la eficacia clínica de estos fármacos, utilizando el modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD). Etapa 1.	112
CONCLUSIONES	115
RECOMENDACIONES	117
REFERENCIAS	118
ANEXOS	121
✓ Anexo 1: Programa piloto de Prescripciones Médico Veterinarias en línea para terapias antimicrobianas en agua de mar	121
✓ Anexo 2: Objetivo 1 - CMI obtenida para cada cepa analizada.	123

MARCO TEÓRICO

Generalidades

Dentro de las áreas prioritarias del Programa de Gestión Sanitaria para la Acuicultura, está considerado Establecer las Bases y estrategias para mejorar el uso de antimicrobianos.

Para lograr este fin, deben analizarse todos los eslabones involucrados en el uso de antibióticos.

Al respecto la OIE señala que deben existir legislaciones nacionales sólidas para los animales acuáticos y terrestres que cubra:

- La autorización de comercialización, fabricación e importación
- Distribución (restricción del libre acceso)
- Prescripción y administración
- Seguimiento de las cantidades que se utilizan en los animales (en este caso centros de cultivos de salmones)
- Supervisión por arte de los Organismos Estatutarios

En el caso particular de la salmonicultura a nivel nacional, el mayor porcentaje de terapias con antibióticos se realiza en la fase de engorda en agua de mar, administrándose principalmente por vía oral a través del alimento.

La calidad de los alimentos medicados, específicamente relacionada con la cantidad solicitada por el Médico Veterinario mediante prescripción y la homogeneidad del antibiótico en el alimento, son de vital importancia para asegurar el éxito de una terapia.

En relación a lo señalado, en el presente estudio se planteó evaluar la cantidad declarada y la homogeneidad del antibiótico en el alimento, debido a que a la fecha no existen estudios nacionales que entreguen información al respecto. Se suma a esto la ausencia de legislaciones nacionales en el control de los alimentos medicados, quedando estos, a criterio de las plantas procesadoras de alimento medicado.

En estos últimos años se ha observado un aumento en la cantidad de antibióticos utilizados por la industria del salmón, atribuyéndose fundamentalmente al aumento de las dosis y duración de las terapias en relación a lo recomendado por la industria farmacéutica en el Registro de medicamentos. Así también, se sabe que psicricetosis es la principal causa del uso de antibióticos durante la fase de engorda en mar y que las terapias se realizan principalmente con alimento medicado de oxitetracina y florfenicol, siendo este último el de mayor uso.

Los Médicos Veterinarios encargados de la sanidad de los peces y responsables de realizar las terapias, señalan que una de las causas del aumento de la duración de las terapias es la demora en llegar el alimento medicado.

Factores que influyen en el proceso de absorción de un fármaco

El proceso de absorción de un API liberado desde una forma farmacéutica, puede verse afectado por características propias del fármaco, de la forma farmacéutica y del sitio de administración.

Características propias del fármaco

Entre las características relevantes para la disolución se encuentran el tamaño de partícula, la presencia de polimorfos físicos, sus características de ácido o base débil o la ausencia de ellas, si está en forma de ácido, base o sal, todas características que pueden influir en su solubilidad y/o la velocidad del proceso. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS por su sigla en inglés) puso en contexto los 2 atributos que definen la posibilidad de que un fármaco sólido pueda finalmente absorberse: la solubilidad de la máxima dosis administrada como dosis unitaria y la permeabilidad (Amidon *et al.* 1995). Puede ocurrir que un fármaco sea altamente soluble y altamente permeable, de forma que todo el API que vaya disolviéndose será rápidamente retirado por la circulación desde el sitio donde debe verificarse la absorción, creando una condición llamada *sink*, donde la fuerza motriz del proceso de disolución, -dada por la diferencia de concentración entre la capa de solución saturada que recubre la partícula sólida y el seno de la solución-, se mantiene a favor del paso desde el estado sólido al soluble. Sin embargo, una molécula de alta solubilidad y poco permeable, puede generar transitoriamente una alta concentración en el sitio de disolución, con lo que tendería a frenar el proceso de disolución al disminuir la diferencia de concentración entre la superficie del sólido y la solución, generando un proceso llamado *non sink*. Ambas situaciones son factibles de encontrar *in vivo*, dependiendo de las características del API.

Los fármacos de interés en este proyecto, **florfenicol y oxitetraciclina**, formulados en alimentos medicados para peces, presentan las siguientes características:

Los fenicoles- cloranfenicol, tiamfenicol y florfenicol, son compuestos derivados del ácido tricloroacético, cuya acción bacteriostática se basa en la inhibición de la síntesis proteica de la célula bacteriana. Para uso veterinario en Chile está autorizado el florfenicol. **Florfenicol** es una molécula neutra, no posee grupos ionizables en un rango de pH de 3 a 9. Es soluble en solventes polares orgánicos y ligeramente soluble en agua. Su coeficiente de partición octanol/agua log Pow es de 2,36, posee relativamente una elevada solubilidad lipídica facilitando su amplia distribución tisular. En estado sólido, es estable a la luz, al calor y a la humedad y no es higroscópico (Schering Plough 2007, Nuflor Gold). Sus características de no ionizable hacen poco probable que su disolución sea afectada por las condiciones de pH, considerando que el rango de pH en el estómago del pez es entre 2,5 y 5, aunque este último puede tener un rol mayoritario en el comportamiento de disolución de los fármacos, por el tiempo que permanece ese valor de pH después de la ingesta de alimentos. Debido a su alta solubilidad lipídica, su solubilidad en medios acuosos puede verse disminuida en medios con una fuerza iónica alta, como el agua de mar, que dejan menos agua libre disponible para el proceso de disolución. Los datos de disolución disponibles están a temperaturas en el rango de 20-25°C, desconociéndose la magnitud del cambio en su solubilidad cuando la temperatura es más baja. Estudios

farmacocinéticos se han llevado a cabo con florfenicol tras una administración oral única de 10 mg/kg peso vivo a truchas arcoíris a 10°C y 16°C. Tras la administración oral de pienso medicado conteniendo florfenicol, se alcanzaron concentraciones plasmáticas máximas de 3,0 y 3,7 µg/ml a las 13,7 y 10,9 horas respectivamente tras la administración a 10°C y 16°C. El florfenicol tiene una biodisponibilidad oral del 73,9% a 10°C y del 66,3% a 16°C (Florocol Aqua, 2013).

La **Oxitetraciclina** es una sustancia cristalina ligeramente amarilla, sin olor y levemente amarga, es anfótera ya que en solución acuosa forma sales tanto con ácidos como con bases. Es estable en forma de polvo, pero no en solución acuosa, siendo particularmente inestable a pH superiores a 7. Se destruye con soluciones ácidas de pH inferiores a 2. En un pH ácido es poco soluble, pero puede combinarse con sodio o formar el clorhidrato lo que la hace más estable (USP, 2003). La oxitetraciclina clorhidrato es un fármaco con constantes de disociación (pKa) de 3,3, 7,3 y 9,1 y, por lo tanto, se encuentra ionizada en todo el intervalo de pH fisiológico, existiendo en forma catiónica a valores de pH ácidos, aniónico a pH alcalino y en forma zwitterionica a pH neutro (Guimerá et al., 1992.). Su peso molecular es 460,44 gr/mol. Su solubilidad en agua es de 313 mg/L a 25 °C (Oxytetracycline Drug Bank). Su biodisponibilidad en el ser humano es relativamente baja, alrededor del 40-55%, producto de su baja permeabilidad. Su solubilidad y biodisponibilidad están dentro del mismo rango que la tetraciclina, compuesto de la misma familia que está clasificado como Clase 1 según el BCS, lo que significa que presenta una alta solubilidad y una baja permeabilidad. Resultados en trucha arcoíris muestran una biodisponibilidad muy inferior al 10% (USP 2003) que puede deberse a la posibilidad de quelación con cationes bi y trivalentes presentes en el agua de mar (Lunestad, B.T. & Goksøyr, J. 1990). Un trabajo de tesis de grado de la Universidad Austral demostró una biodisponibilidad inferior al 1% cuando los peces fueron alimentados al 1,4% de su peso vivo durante 28 días. Los primeros 21 días los peces fueron alimentados con alimento medicado vertido en el agua, el que contenía 100 mg de oxitetraciclina/Kg de biomasa cada 24 horas y los otros 7 días sólo con el alimento (Benavente J.2013). Biodisponibilidades mayores se obtuvieron en trabajos donde el alimento medicado fue envasado en una cápsula y depositado directamente en el estómago del pez. (Miller et al. 2012). De acuerdo a las características previamente expuestas, la solubilidad de la oxitetraciclina debería mantenerse dentro de niveles altos en las diferentes condiciones de pH y bajo la influencia de sustancias tensoactivas. Especial precaución se deberá tener en la formulación de los medios de disolución, los que deberán reflejar certeramente la composición del agua de mar, por la posibilidad de que algunos de los cationes presentes puedan eventualmente formar complejos insolubles con el API.

Características propias de la forma farmacéutica

La composición de los excipientes, que pueden eventualmente interactuar con el API, así como las características físicas del producto farmacéutico, dadas por los procesos de manufactura, pueden crear condiciones que hacen que diferentes formulaciones presenten patrones diferentes de liberación de fármaco. Estas características diferenciadoras quedan en evidencia cuando se realizan controles al producto como dureza, friabilidad, tiempos de desintegración y de disolución. En el caso de los alimentos medicados para peces, el sistema que soporta al API es un alimento, matriz de carácter complejo, que, dependiendo de las variaciones en su

composición, puede generar diferentes patrones de liberación de los fármacos. También la composición del alimento tiene una fuerte influencia en el tiempo de tránsito gastrointestinal, como se verá posteriormente.

Respecto a los excipientes, los alimentos medicados para uso en acuicultura suelen ser matrices complejas, cuyas posibilidades de interacción con los APIs pueden ser de variada índole, dependiendo de las características del fármaco involucrado. Es ampliamente conocida la interacción de las tetraciclinas con cationes bi y trivalentes que, si bien es una interacción importante para su paso a través de membranas, específicamente con Mg^{+2} , a nivel del proceso de liberación del API desde la matriz de excipientes puede resultar en una modificación importante de la disponibilidad del fármaco para ser absorbido.

Las fórmulas usadas en Chile en alimentos pelletizados y extruidos (Castro, 1992) se caracterizan por un alto contenido proteico y graso según muestra la tabla.

Ingrediente	Dieta pelletizada (%)	Dieta extruida (%)
Harina de pescado	60	60
Subproductos del trigo	13	23
Trigo entero molido	10	-
Premezcla vitamínica	2	2
Premezcla de minerales	0,1	0,1
Cloruro de colina (60%)	0,5	0,5
Ácido ascórbico	0,5	0,5
Aglutinante	2	0
Aceite de pescado	10 – 11	14
Análisis proximal		
Humedad	8	8
Proteína cruda	45	46
Extracto etéreo	14 – 15	18

Estos pellets son proporcionados a los salmones lanzándolos al agua dentro de jaulas o balsas marinas donde entran en contacto con el agua de mar, cuyas características abióticas (tomando como referencia el sector de Chiloé) son: temperaturas aproximadas de 10,5°C, salinidades de 32,6 ‰ y un pH aproximado de 7,4 a 10 metros de profundidad (Fishing Partners Ltda, 2006). Estos pellets una vez que están en el agua de mar, son ingeridos por los peces, llegando prácticamente intactos a su estómago. Posteriormente se produce la digestión del pellet al entrar en contacto con los jugos gástricos del salmón, en un medio cuyo pH gástrico variará entre 2,5 a 4,0 dependiendo de la cantidad de agua ingerida con la comida (Seki, 1969). Luego, el alimento sigue su digestión normal, con un tiempo de vaciamiento gástrico aproximado de 28.4 y 18.1 h a 11.4 y 13.7° C, respectivamente (Brodeur y Percy, 1978). En estas condiciones los salmones crecen y se desarrollan para alcanzar el peso y tamaño adecuado para su posterior faenamiento y comercialización (Valenzuela, 2005).

Características propias del sitio de administración

El planteamiento de ensayos de disolución tiene que considerar lo que se denomina características biofarmacéuticas de la vía de administración, que considera cuáles características anatómicas y/o fisiológicas pueden tener influencia sobre el proceso de liberación del API desde la forma farmacéutica. Factores importantes son la irrigación sanguínea, permeabilidad celular, presencia de enzimas biotransformadoras, de transportadores de eflujo, además de las referentes a las estructuras mismas que componen el sistema digestivo. Algunas de estas características pueden influir en la disolución de medicamentos y se hace lo posible por emularlas y otras no tienen relación con el proceso.

La morfología del tracto gastrointestinal de los peces varía según las especies, hábitat y dietas. Pero en general, es esencialmente un tracto muscular lineal, cubierto por una membrana mucosa que exhibe variación en sus estructuras, lo que le otorga las diferencias funcionales. El tracto digestivo puede dividirse principalmente en 3 importantes segmentos o tramos (en la mayoría de los peces) estos son estómago, ciegos pilóricos, e intestino. El primer tramo, el estómago, posee un revestimiento celular distintivo formado por células que secretan ácido al lumen, este ácido es generalmente secretado en conjunto con algunas enzimas digestivas como la pepsina. El alimento en el estómago se desmenuza realmente por acción de ácidos, enzimas digestivas (como la pepsina que digiere en parte las proteínas) y por acción trituradora de las paredes del estómago. El pH de este órgano varía entre 3.0 y 4.5. Los ciegos pilóricos se extienden desde donde termina el estómago hasta donde comienza el intestino, su función es incrementar la superficie de absorción digestiva y presenta un pH de 7.0. El último segmento del tracto digestivo, el intestino, posee un pH de 7.4 y se caracteriza por ser un órgano complejo y multifuncional. En adición a su función digestiva y absorptiva, el intestino también cumple funciones en el balance de electrolitos, regulación endocrina de digestión y metabolismo, e inmunidad. Estudios señalan que el intestino se divide a su vez en dos zonas: una zona proximal que limita con los ciegos pilóricos, donde se centra la hidrólisis de macromoléculas mediadas por enzimas líticas y la absorción de nutrientes de bajo peso molecular, y una zona distal en la cual se señala como función principal la endocitosis de macromoléculas y proteínas intactas en teleósteos (Mancini M. 2002; Ringø et al. 2016).

En el 2009 Yendo y Wood observaron el efecto del alimento en el pH del estómago. Los autores alimentaron a la trucha arco iris (peso promedio 350 g) con un alimento acuícola comercial para trucha, que poseía una proteína cruda del 41% en una sola comida (ración al 2% del peso corporal) y monitorearon el pH resultante en el estómago. Justo antes de suministrar el alimento, el pH del estómago fue de $\approx 2,7$, mientras que una hora después de ingerido el alimento, el pH fue significativamente superior (4,9). Permaneció allí durante al menos 8 horas, estando muy por encima del nivel óptimo para la actividad de la pepsina. El quimo se liberó en el duodeno 8 horas después de suministrado el alimento, por lo que los niveles de pH fueron demasiado altos. Los autores especularon que la capacidad de amortiguación del alimento fue el principal elemento que influyó en el aumento del pH de los fluidos gástricos. A los peces le tomó más de 24 horas llegar al "bajo" pH inicial del estómago. Estos antecedentes deben ser tomados en consideración

cuando se evalúe el efecto del pH en la liberación de los fármacos, considerando que los alimentos que sirven de base para la administración de los fármacos tienen un porcentaje de proteínas de 45-46%) (<http://www.aqua.cl/wp-content/uploads/sites/3/2015/04/Acidificacion-en-Peces-Monogastricos.pdf>).

A nivel del intestino, las enzimas desdoblan las grasas, proteínas y azúcares que luego de atravesar la pared intestinal son llevados al hígado. El resto de alimentos se evacúan junto con las heces. El alimento utilizado en la forma de balanceado comercial tiene alta cantidad de proteína (en algunos casos superior al 40%) y alta cantidad de energía (dada principalmente por lípidos). El exceso de grasa es utilizado como energía y se almacena principalmente en músculo. El tiempo que tarda en recorrer el alimento el tubo digestivo puede variar desde unas pocas horas hasta días, dependiendo de los distintos procesos metabólicos que están dados principalmente por la temperatura, ya que a mayor temperatura se aceleran (Mancini M. 2002).

El hígado es la principal fábrica del organismo interviniendo en distintos procesos metabólicos. Es blando, de color pardo rojizo y muy voluminoso, presentando en ocasiones de color rosa – crema, situación que no siempre indica un cuadro patológico. La vesícula biliar está bien desarrollada. El colédoco vierte en la primera porción del intestino delgado la bilis, que emulsiona las grasas para que sean fácilmente atacadas por las lipasas pancreáticas. Por su parte el páncreas segrega amilasas, tripsina y quimiotripsina. El conducto pancreático vierte casi siempre en el colédoco (Mancini M. 2002).

De todas estas características previamente mencionadas, desde el punto de vista biofarmacéutico las condiciones fisicoquímicas del medio fisiológico más importantes a evaluar en el proceso de disolución lo constituyen el pH, la fuerza iónica, la tensión superficial dada por la presencia fisiológica de sales biliares, y los tiempos de permanencia del fármaco en estómago e intestino.

Adicionalmente, considerando que los peces son poiquiloterms y que, en consecuencia, su temperatura corporal varía según la del medio ambiente, la disolución de los APIs podría verse alterada según la variación estacional de la temperatura. Según el registro de temperaturas del agua de mar del año 2016, las temperaturas extremas fueron 10 y 15°C en la zona de Chiloé. La influencia de la fuerza iónica no sería una variable, sino una condición que debe incluirse en todos los medios para acercarse más a la caracterización de la disolución *in vivo*.

Los equipos de disolución y condiciones *sink* y *non sink*

Para realizar los ensayos de disolución desde productos farmacéuticos, existen varios equipos oficiales descritos en las farmacopeas. De ellos, los más utilizados son los Aparatos 1 y 2 de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 39). El primero corresponde a un canastillo y suele recomendarse para productos que tienen a flotar y el segundo es un sistema de paleta que se recomienda usar para productos sólidos que no flotan. Existen otros equipos que intentan acercarse a la condición fisiológica, retirando del sistema el fármaco que se va disolviendo, como el Aparato 4 de la USP o aparato de flujo continuo, que fue diseñado bajo el concepto de que *in vivo*, el API que se disuelve no queda en el medio de disolución, sino que es retirado por la circulación, condición *sink*. No es un equipo de amplio uso y su aplicación ha estado focalizada en los sistemas de liberación controlada. Todos los equipos mencionados tienen algún tipo de receptáculo, de geometría muy específica, donde se introduce el medio de disolución, un sistema que agita o hace circular el medio y, en el caso de productos para uso humano, la temperatura del sistema se fija en 37°C. En los primeros 2 equipos mencionados, al no retirar el fármaco disuelto, la condición podría ser *non sink*. Sin embargo, la condición *sink* se consigue trabajando con una cantidad disuelta máxima no superior al 20% de la solubilidad del fármaco. Estos equipos admiten una amplitud de medios de disolución, velocidades de agitación y tiempos de muestreo, por lo que se pueden explorar abundantes condiciones experimentales.

Modelos para describir el proceso de disolución

Los correspondientes modelos cinéticos destinados a describir la liberación desde formas de dosificación inmediata o modificada, se pueden agrupar en los denominados modelos matemáticos mecanicistas o reales, en los que los parámetros que la constituyen surgen o se explican como resultado de un análisis teórico. Entre ellos se encuentran los denominados de orden cero, orden uno, modelo de la raíz cuadrada o de Higuchi y de la raíz cúbica o de Hixson-Crowell. El modelo conocido como “Ley de la Potencia” o modelo de Peppas, así como las modificaciones posteriores de este modelo, son en esencia modelos empíricos, aun cuando en determinadas ocasiones puedan dar una explicación mecanicista de liberación (Costa y Sousa, 2001; Yuksel et al. 2001).

Independientemente de cuál sea el modelo que describe al proceso, existe un tratamiento estadístico, modelo independiente, que se aplica en la comparación de perfiles de disolución y que mide las diferencias absolutas que se producen entre perfiles de disolución promedio, cuyo parámetro es denominado factor de similitud f_2 , que obedece a la siguiente expresión:

$$f_2 = 50 \log \left(1 + \frac{1}{n} \sum_{(1-n)} (T_{ti} - R_{ti})^2 \right)^{-1/2} \cdot 100$$

Donde:

n = Número de tomas de muestra durante el ensayo de disolución.

R_{ti} = Promedio del % disuelto acumulado de la formulación de referencia.

T_{ti} = Promedio del % disuelto acumulado de la formulación a ensayar.

Este factor de similitud permite establecer si las diferencias observadas tienen algún significado real, ya que la condición para declarar diferentes a 2 situaciones es que en promedio las curvas se diferencien en más de un 10%. Variaciones menores al 10% suelen encontrarse entre los lotes de una misma formulación. Como compara situaciones promedio, tiene requerimientos de variabilidad y de número de experimentos. Para cada situación deben ensayarse 12 unidades y el coeficiente de variación para los tiempos de disolución tempranos no puede exceder el 20% y para los tiempos posteriores, el 15% (Liu J et al. 1997).

Teniendo en consideración lo anteriormente expuesto, resulta importante la caracterización de la disolución de los API de interés desde las matrices de alimentos en que son formulados para su administración a peces, tanto para evaluar la cesión de fármaco desde las formulaciones, emulando las condiciones *in vivo* en que ello ocurre, como para tener los antecedentes que permitan correlacionar los datos que se obtengan en esta etapa con los que se obtengan de experimentos posteriores de farmacocinética en peces.

Efecto del proceso de elaboración de los alimentos medicados

En los antibióticos pueden existir ligeros cambios químicos que se traducen en pérdida de actividad antimicrobiana, o pérdida de potencia microbiológica, la cual no puede demostrarse por métodos químicos. Para valorar la potencia se utilizan métodos de difusión en agar y métodos en medios de cultivo líquidos. La potencia se calcula comparando el grado de inhibición de un microorganismo específico sensible frente a un antibiótico de referencia, con el grado de inhibición frente a una muestra (pre-mezcla de antibiótico) tratadas en las mismas condiciones. En los métodos que utilizan medios de cultivo líquido, al adicionar concentraciones crecientes del antibiótico, se inhibe el crecimiento bacteriano en forma proporcional a la concentración de antibiótico adicionado. El crecimiento del microorganismo de prueba se mide espectrofotométricamente (absorbancia). Para evaluar la potencia de cada premezcla, se deben preparar soluciones stock equivalentes del antibiótico de referencia y de las premezclas. A partir de ellas se preparan diferentes concentraciones de trabajo.

Efecto en la biodisponibilidad de acuerdo a la relación entre liberación y disolución

La administración de fármacos a un organismo vivo es realizada a través de una forma farmacéutica, entendiéndose por tal a un sistema fisicoquímico que es diseñado para entregar la dosis a una velocidad y cantidad que sea apropiada para tratar la patología. Para transformar el fármaco en un producto farmacéutico se requiere del uso de excipientes, los que, si bien son farmacológicamente inertes, no lo son desde un punto de vista fisicoquímico, ya que son los encargados de modular la entrega del principio activo (API por su sigla en inglés).

Es sabido desde hace mucho tiempo que, salvo mecanismos excepcionales, el API debe encontrarse disuelto en los medios fisiológicos para ser absorbido, llegar a la circulación sistémica y mediante el proceso de distribución, llegar al sitio donde ejercerá su acción. Sin

embargo, no fue hasta la década del 60 del siglo pasado que este fenómeno fue puesto de relevancia por Campagna en un trabajo clásico de la Biofarmacia, donde demostró la importancia del proceso de disolución para el efecto farmacológico de comprimidos de prednisona (Campagna *et al.* 1963). En el caso de los medicamentos de uso humano, a partir de este trabajo se produjo, en pocos años, un aumento exponencial de ensayos de disolución, hasta llegar a un acuerdo respecto del diseño y estandarización de los equipos que permitirían medir el fenómeno, haciendo las mediciones repetibles y comparables entre distintos laboratorios. En la actualidad, para la mayoría de los medicamentos orales sólidos de uso humano existe un ensayo de disolución descrito en los compendios oficiales como la USP (United States Pharmacopeia. USP 39 2016).

Efecto de la pureza declarada en las premezclas de oxitetraciclina y florfenicol

Las premezclas de antibiótico, en este caso oxitetraciclina y florfenicol, son consideradas medicamentos veterinarios preparados con vista a la fabricación de alimentos medicado para animales. Son de naturaleza sólida, incorporándose al alimento durante su elaboración en proporciones no inferiores al 2%.

Como todo medicamento veterinario, deben estar autorizadas por las autoridades reguladoras, que en el caso de Chile es el Servicio Agrícola Ganadero (SAG). Estos organismos son responsables de controlar los requerimientos de calidad, seguridad y eficacia antes y después de su comercialización.

Por otro lado, toda premezcla medicamentosa debe incorporar en el etiquetado las características cualitativas y cuantitativas de los principios activos, dentro de las cuales la estabilidad y pureza son respectivamente las más importantes.

La pureza se refiere al porcentaje efectivo del principio activo puro en la masa total (en este caso los antibióticos). Tiene relación directa con la eficacia de una terapia con alimento medicado, ya que la cantidad de antibiótico incorporado en el alimento, depende de la dosis calculada por el Médico Veterinario. Para el cálculo de la dosis se debe considerar la pureza del antibiótico declarado en la etiqueta de la premezcla.

Los rangos de aceptabilidad de la pureza de una premezcla de antibiótico son de un 5% con respecto al valor declarado. Valores menores al declarado pueden ser causa de fracaso terapéutico en todas las especies animales y en el caso particular de la salmonicultura, valores mayores a los declarados favorecen además el impacto negativo sobre el medio ambiente acuático (por pérdida de alimento medicado no ingerido por los peces).

Estabilidad del alimento medicado

Los estudios de estabilidad suministran la evidencia necesaria de como la calidad de un medicamento varía con el tiempo por la influencia de diferentes factores ambientes, como la temperatura, la luz y la humedad entre otros.

Estos estudios, permiten definir la fecha de caducidad de un medicamento, es decir el período de tiempo durante el cual el medicamento mantiene un mínimo del 90% del principio activo (p.a.) sin que se aprecien pérdidas en su calidad. Son solicitados por los organismos reguladores correspondientes, antes de autorizar su comercialización. En el caso de los piensos medicados para animales, incluido las especies acuáticas, estos estudios no son solicitados ya que no están considerados como medicamentos.

Debido a lo mencionado se hace necesario realizar estudios de estabilidad en los piensos medicados con oxitetraciclina y florfenicol destinados a los centros de cultivo en etapa de engorda en agua de mar. Esto, permitirá tener una orientación de su vida útil post venta, en relación a las condiciones de almacenamiento. Dentro de estos estudios, la estabilidad química (degradación del antibiótico) en diferentes condiciones de humedad y temperatura es la más importante de evaluar.

Existen estudios de estabilidad acelerada y a tiempo real.

En este caso se realizarán estudios de estabilidad acelerada, ya que estos se realizan en condiciones extremas de almacenamiento, con el fin de acelerar la degradación química y los cambios físicos. El objetivo es predecir el período de validez, en condiciones normales reduciendo el tiempo de ensayo.

Modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD)

El éxito de una terapia antimicrobiana depende de que, a una dosis determinada del antibiótico en el animal o biomasa a tratar, se produzca una adecuada relación entre los parámetros farmacocinéticos y la sensibilidad *in vitro* de la bacteria (Concentración Mínima Inhibitoria - CMI). Dentro de este contexto, el desarrollo de modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD), han contribuido a mejorar la eficiencia de uso de los antibióticos. Para poder evaluar la relación entre estas dos variables, se establecieron los Índices de Eficacia de los antibióticos, a través de los cuales objetivamente se puede predecir el éxito de una terapia antimicrobiana.

Los modelos PK/PD, relacionan las concentraciones de un fármaco en el plasma y otros tejidos con la información farmacodinámica (sensibilidad del microorganismo patógeno frente al antibiótico). Los estudios de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) describen la sensibilidad de una bacteria frente a un determinado antibiótico y los estudios poblacionales permiten definir los puntos de corte de la CMI clínica (Sensibles o Resistentes), necesarios para realizar los estudios PK/PD. En estos últimos años ha habido cambios en la definición de los puntos de corte de un antibiótico. Los puntos de corte epidemiológico (ECV) son criterios interpretativos agente, protocolo y especie específicos. Su objetivo es facilitar la categorización de un aislado como miembro totalmente susceptible de su especie o manifestando susceptibilidad reducida. Estos ECV son utilizados para determinar la dosis óptima y el punto de corte clínico (Canut *et al.*, 2015).

En el caso particular de Chile, florfenicol es el principal antibiótico utilizado en los centros de cultivo durante la etapa de engorda en agua de mar, debido a sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Además, sus características de liposolubilidad y baja unión a proteínas plasmáticas le permite actuar sobre bacterias intracelulares como *Piscirickettsia salmonis*. Los

Índices de Eficacia a evaluar en este antibiótico son: ABC/CMI y $t > CIM$, los cuales en una terapia adecuada deben ser ≥ 125 h y $>$ al 50% del intervalo de dosificación respectivamente.

A nivel nacional no existe una definición de la CMI clínica de *Piscirickettsia salmonis* frente a oxitetraciclina y florfenicol, antibióticos de mayor uso en los centros de cultivo en etapa de engorda en agua de mar. Por otro lado, en las declaraciones realizadas estos últimos 5 años, en el SIFA (Sistema de Información para la Fiscalización de Acuicultura - SERNAPESCA), alrededor del 80% de los Médicos Veterinarios declaran utilizar dosis 2 veces mayor a la registrada y un porcentaje cercano al 8% dosis 3 a 4 veces mayores a la registrada. Debido a que uno de los objetivos de este proyecto es optimizar el uso de antimicrobianos en la salmonicultura, se hace necesario realizar estudios PK/PD para definir las dosis más adecuadas de oxitetraciclina y florfenicol frente a *P. salmonis*. Para estos estudios previamente se necesita conocer la CMI clínica de esta bacteria frente a los antibióticos señalados.

Considerando que el objetivo central de este proyecto es “Establecer las Bases para el buen uso de antimicrobianos en la salmonicultura”, ya que la industria del salmón ha sido permanentemente cuestionada por la cantidad de antibiótico utilizado, afectando la imagen internacional del sector, en este trabajo evaluó la eficacia de productos antimicrobianos con la finalidad de obtener información relevante para el registro de fármacos utilizados en la acuicultura, considerando diferentes aspectos como la Concentración Mínima Inhibitoria de oxitetraciclina y florfenicol, los antibióticos más utilizados a nivel nacional contra *Piscirickettsia salmonis*, la elaboración de los alimentos medicados con estos antibióticos, determinar la liberación de estos antibióticos desde los alimentos medicados y verificar la dosis y el ritmo horario de estos mismos utilizando modelos PK/PD.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluación de la eficacia de productos antimicrobianos con la finalidad de obtener información relevante para el registro de fármacos utilizados en la acuicultura; primera etapa.

Objetivos específicos

1. Definir la Concentración Mínima Inhibitoria 90 (CMI₉₀) de oxitetraciclina y florfenicol frente a *P. salmonis*.
2. Evaluación del efecto del proceso de elaboración de los alimentos medicados sobre las diferentes premezclas de oxitetraciclina y florfenicol.
3. Comparar y evaluar mediante estudios de biodisponibilidad la relación entre la liberación y disolución de oxitetraciclina y florfenicol a nivel intestinal con las concentraciones plasmáticas de los diferentes alimentos medicados, ETAPA 1: Determinación de la liberación de florfenicol y oxitetraciclina desde alimentos medicados para peces.
4. Verificación de las dosis y ritmo horario de oxitetraciclina y florfenicol que asegure la eficacia clínica de estos fármacos, utilizando el modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD). ETAPA 1.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBJETIVO 1: DEFINIR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC₉₀) DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL FRENTE A *P. salmonis*.

a) Establecimiento de una colección de aislados de *Piscirickettsia salmonis*, agente causal de la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS)

Unidad Ejecutora: Centro de Investigaciones Biológicas Aplicadas (CIBA)

Aislados.

Los aislados de *Piscirickettsia salmonis* utilizados para el establecimiento de la colección en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias – Universidad de Chile, fueron recuperados de la colección de patógenos mantenidos por el Laboratorio ETECMA y Laboratorio CIBA, provenientes de casos de Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) que afectaron a cultivos de salmónidos entre los años 2014 a 2016. Adicionalmente, se implementó un programa de aislamiento de aislados durante los años 2016 y 2017. Se incluye, de forma complementaria, en el programa una cepa del año 2012 y una del año 2013.

Recuperación de aislados de *Piscirickettsia salmonis*.

Los aislados de *P. salmonis* fueron mantenidos en crioviales congelados a una temperatura de -80 °C. Para la recuperación de los aislados, los crioviales fueron abiertos en un gabinete de bioseguridad de acuerdo a los protocolos establecidos por el laboratorio. Utilizando una pinza o asa se removerá entre una a cuatro perlas de cada criovial, las cuáles serán inoculadas sobre la superficie de una placa de Agar CHAB (caldo infusión corazón, 25 g/L; glucosa 10g/L; L-cisteína 1 g/L; agar 15g/L; hemoglobina 2 g/L, suplementado con 5 % de sangre de ovino) para su posterior incubación a 16 °C durante 7 a 12 días (Mikalsen *et al.*, 2008). En caso que la cepa no pueda ser recuperada en el primer intento se procederá a realizar el mismo procedimiento, en la eventualidad que la cepa no pueda ser recuperada después de 5 intentos se procederá a reemplazar por una aislado de campo.

Aislamiento en campo aislados 2016 – 2017.

El aislamiento de *P. salmonis* se realizará a partir en centros de cultivo de salmónidos que cursen con un cuadro clínico de Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) y que no se encuentren en terapia antibacteriana. El diagnóstico clínico será reportado por un Médico Veterinario y confirmado mediante la aplicación de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y/o inmunofluorescencia indirecta (IFAT) para *Piscirickettsia salmonis*.

Se procederá a seleccionar peces letárgicos capturados utilizando una quecha o mortalidad fresca recuperada a través del buceo o lift up. Sera considerada mortalidad fresca aquella que sea extraída en un plazo no superior a 24 horas.

Los peces serán dispuestos en una superficie limpia para proceder a realizar la necropsia. 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 será insertada en los tejidos a elección, de preferencia aquellos que presentan signología macroscópica consistente con Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS). Entre los signos clínicos a considerar se encuentran lesiones nodulares hígado, vesículas en la piel, bullas, úlceras, cavernas musculares, esplenomegalia, hepatomegalia, enteritis congestiva entre otros (Branson and Díaz-Muñoz, 1991; Birrel *et al.*, 2003; Cusack *et al.*, 2002; Lannan and Fryer, 1993; Larenas *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1997).

Finalmente, la muestra será 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 (ETECMA-PT-BA-07).

b) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Piscirickettsia salmonis* genotipificadas frente a Oxitetraciclina y Florfenicol

Unidad Ejecutora: Laboratorio de Inocuidad Alimentaria (LIA), Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Introducción:

La concentración mínima inhibitoria o CIM es la concentración más baja de un antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento de una cepa bacteriana que no posee mecanismos de resistencia. La CIM se obtiene realizando un estudio estandarizado siguiendo un documento de referencia. Los documentos que pueden ser utilizados normas ISO (este último es el que sigue oficialmente EUCAST), o el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Previo al procedimiento se realizaron las siguientes actividades:

- Crecimiento de las cepas en caldo ADL-PBS. Esto se evaluó mediante absorbancia por espectrometría utilizando una OD₆₀₀
- Adaptación de la Cepa control *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) al caldo.
- Se realizó una curva estándar de crecimiento en caldo para *E. coli* ATCC 25922 y para *P. salmonis* L89.

Metodología:

Se utilizaron dos métodos de dilución y la medición de los resultados fue espectrofotométrica (absorbancia):

- a) Método de Macrodilución en caldo, la cual se realizó por duplicado
- b) Método de Microdilución en caldo, la cual se hizo por triplicado

En ambos casos se siguieron las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para animales acuáticos M49-A "Methods for Broth Dilution Susceptibility testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Appoved Guideline" y la norma ISO.

Materiales e insumos:

- Antimicrobianos como droga pura: a) Oxitetraciclina: potencia: 860,46 ug/mg (86%), b) Florfenicol: potencia: 987,03 ug/mg (98,7%), ambos antibióticos Marca: Dr. Ehrenstorfer Gmbn
- Solventes: Metanol HPLC (Merck); Etanol, 95% HPLC (Merck)
- Diluyentes: Agua HPLC (Merck)
- Solución stock de antimicrobianos
- Caldo ADL-PBS comercial (Lab-Diagnostic)
- Cepas ATCC *E. coli* 25922

Instrumentos y equipos:

- Espectrofotómetro Pharo 300 (WPA Biowave®), calibrado a una longitud de onda de 600 nm
- Microscopio Invertido OPTIKA® XDS-2
- Cámara de Neubauer IMPROVED®
- Balanza analítica DENVER Instrument®
- Lámpara de luz clara.
- Campana de flujo laminar JSCB-900 SB®.
- Incubadora Shaker LABWIT® ZWYR-240.
- Estufas de cultivo, MEMMERT®.

Controles de los métodos de análisis:

- Control positivo para verificar el medio de cultivo a las 24 horas y 14 días de incubación:

Control positivo a las 24 horas: medio inoculado con *E. coli* ATCC 25922

Control positivo a los 14 días medio inoculado con *P. salmonis* L89

- Control negativo caldo sin antibióticos y bacterias para comparar la concentración mínima inhibitoria (CIM) cuya absorbancia debe ser igual a 0,00.

- Controles para evaluar las diferentes concentraciones de antimicrobiano a las 24 horas:

Medios de cultivo con Inóculos de *E. coli* ATCC 25922 equivalente a 0,5 Mc Farland con las siguientes concentraciones de oxitetraciclina: 0,125-0,25-0,5-1-2 µg/ml.

Medios de cultivo con Inóculos de *E. coli* ATCC 25922 equivalente a 0,5 Mc Farland con las siguientes concentraciones de florfenicol: 0,5-1-2- 4 – 8- 16 µg/ml.

- Control de estabilidad de antibióticos: Se realizó por método microbiológico y por método cromatográfico:

Método Microbiológico: A un tubo con caldo se le agrega una concentración de oxitetraciclina igual a 2µg/ml, otro tubo con caldo se agrega una concentración de florfenicol de 4 µg/ml. Ambos tubos se deja sin inocular y se incuba por 14 días. Al día 14 se inoculó la cepa *E. coli* ATCC a una concentración de 0,5 de Mc Farland y se observó si se inhibe el crecimiento 18 horas después.

Método cromatográfico: En paralelo se observó si oxitetraciclina mantiene su concentración constante en el tiempo en las condiciones de cultivo, para ello se utiliza la metodología de cromatografía HPLC acoplada a un detector con arreglo de diodos o DAD. Se probó de forma independiente la expresión cromatográfica de oxitetraciclina mediante el área del peak cromatográfico utilizando un estándar certificado analíticamente (estándar puro). La concentración de la solución stock fue de 4 ppm (4 mg/Kg). Se fortificaron los mismos medios a una concentración de 128 µg/ml para probar su estabilidad durante 14 días. Los medios fortificados se mantuvieron entre 18 y 21°C en agitación y una alícuota fue tomada cada 2 días (48 hrs) para hacer la determinación.

- Verificación de la concentración bacteriana equivalente al 0,5 de Mc Farland:

Para *P. Salmonis* L89 se realizó en la cámara de Neubauer verificando el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), que debe ser equivalente a $1-2 \times 10^6$. Para el caso de *E. coli* la verificación de las UFC se realizó en placa de cultivo y el recuento se realiza bajo lupa.

- Preparación de las soluciones stock de antimicrobianos:

Se prepararon soluciones stock de los estándares de oxitetraciclina y florfenicol a una concentración inicial de 1280 µg/ml, las que se conservaron a -80°C hasta su análisis.

De acuerdo al CLSI para la preparación de la solución stock se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Peso del antibiótico (mg)} = \frac{\text{volumen (ml)} \times \text{concentración (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mg)} \text{ o pureza.}}$$

Preparación de las soluciones seriadas de antimicrobianos

Ya que no existen puntos de corte oficiales para *P. salmonis*, se trabajó con las siguientes concentraciones para ambos antibióticos: 0,0125-0,03-0,06-0,125-0,25-0,5-1-2-4-8-16-32-64-128 µg/ml.

-Método de Macrodilución en caldo para las cepas de *P. salmonis*:

Se utilizó el caldo ADL-PBS. En tubos de vidrio estériles se agregó 8 ml de caldo, 1 mL del inóculo bacteriano ajustado a la concentración 0,5 Mc Farland y 1 mL de cada concentración del antimicrobiano de referencia o de cada premezcla según corresponda. Para cada caso, cada tubo se realizó por duplicado.

Los tubos se incubaron a 18°C por 14 días con agitación constante.

-Método de Microdilución en caldo para las cepas de *P. salmonis*:

La prueba se realiza en policubetas de plástico de fondo redondo estériles, en cada pocillo se colocó 155 µl de caldo ADL-PBS, 20 µl de inóculo bacteriano equivalente al 0,5 Mc Farland y 25 µl de cada concentración de antibiótico de referencia o de las premezclas, llegando a un total de 0,2 ml por pocillo. El ensayo se realizó por triplicado para cada caso.

Las placas fueron incubadas en agitación constante a 18°C por 14 días. Para evitar la desecación se selló cada policubeta con su tapa plástica.

-Lectura de los resultados:

La CIM para cada aislado y antimicrobiano, se determinó visualmente por turbidez y se confirmó por absorbancia. Después de 14 días de incubación se determinó la CIM, la cual corresponde a la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en el tubo o en la policubeta. En el caso de la técnica de macrodilución esta concentración se determinó visualmente por turbidez comparándola con el tubo control negativo y se confirmó por absorbancia, la cual fue igual a 0,0. En el caso de microdilución esta concentración se determinó sólo por absorbancia, siendo esta igual a 0,0.

Cepas utilizadas en el estudio:

Cepas donadas por el INTA:

- CRG1
- CRG2
- INTA
- LF-89 light

Cepas donadas por la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso:

- EM-90
- TGIM-11
- SGIM-12
- L89

Cepa donada por el Laboratorio de Vacunas Veterinarias de FAVET:

- L89 LVV

Las cepas donadas por el INTA se señala código y link para acceder a su genoma en las que está disponible:

CRG01: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11769?genome_assembly_id=262491

CRG02: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11769?genome_assembly_id=263622

LF-89 (referencia comprada en ATCC): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/965557290/>

c) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) clínica de aislados De *P. salmonis* frente a Oxitetraciclina y Florfenicol

Unidad Ejecutora: Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) y Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos (LIA), Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Los aislados e identificación bacteriana de *Piscirickettsia salmonis* fueron realizados por el Laboratorio CIBA, tal como fue señalado en el informe entregable del año 2016.

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias fueron realizadas en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria (LIA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, mediante el método de macrodilución, cuya validación fue señalada anteriormente.

Aislamiento bacteriano: Se aislaron 87 cepas. En resultados se muestra la distribución geográfica de los centros de cultivo de donde se obtuvieron las cepas.

OBJETIVO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LOS ALIMENTOS MEDICADOS SOBRE LAS DIFERENTES PREMEZCLAS DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL

a) Evaluación de la potencia microbiológica de premezclas de Oxitetraciclina y Florfenicol frente a *Piscirickettsia salmonis*

Unidad Ejecutora: Laboratorio de Inocuidad Alimentaria (LIA), Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Se evaluó la potencia microbiológica de 13 premezclas de antibióticos (3 de oxitetraciclina y 10 de florfenicol) frente a *P. salmonis*. Se utilizaron dos métodos de dilución y la medición de los resultados fue espectrofotométrica (absorbancia):

- I. Método de Macrodilución en caldo, la cual se realizó por duplicado
- II. Método de Microdilución en caldo, la cual se hizo por triplicado

En ambos casos se siguieron las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para animales acuáticos M49-A “Methods for Broth Dilution Susceptibility testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Appoved Guideline”.

Materiales e insumos:

- Antibióticos de referencia con potencia conocida: a) Oxitetraciclina con potencia de 860,46 µg (86%), b) Florfenicol con potencia de: 987,03 µg (98,7%), ambos antibióticos Marca: Dr. Ehrenstorfer Gmbn®
- Solventes: Metanol HPLC (Merck); Etanol, 95% HPLC (Merck)
- Diluyentes: Agua HPLC (Merck)
- Caldo ADL-PBS comercial (Lab-Diagnostic)
- Cepas ATCC *E. coli* 22925.
- Cepa *P. salmonis* L89
- Pre-mezclas de antibióticos

Instrumentos o equipos y accesorios:

- Espectrofotómetro Pharo 300 (WPA Biowave ®), calibrado a una longitud de onda de 600 nm.
- Microscopio Invertido OPTIKA® XDS-2
- Cámara de Neubauer IMPROVED®
- Balanza analítica DENVER Instrument®
- Lámpara de luz clara.
- Campana de flujo laminar JSCB-900 SB®.

- Incubadora Shaker LABWIT® ZWYR-240.
- Estufas de cultivo, MEMMERT®.

Controles de los métodos de análisis:

- Control positivo para verificar el medio de cultivo a las 24 horas y 14 días de incubación:

Control positivo a las 24 horas: medio inoculado con *E. coli* ATCC 25922

Control positivo a los 14 días medio inoculado con *P. salmonis* L89

- Control negativo caldo sin antibióticos y bacterias para comparar la concentración mínima inhibitoria (CIM) cuya absorbancia debe ser igual a 0,00.

- Controles para evaluar las diferentes concentraciones de antimicrobiano a las 24 horas:

Medios de cultivo con Inóculos de *E. coli* ATCC 25922 equivalente a 0,5 Mc Farland con las siguientes concentraciones de oxitetraciclina: 0,06-0,125-0,250-0,5- 1- 2 -4 µg/ml.

Medios de cultivo con Inóculos de *E. coli* ATCC 25922 equivalente a 0,5 Mc Farland con las siguientes concentraciones de florfenicol: 0,06-0,125-0,250-0,5- 1- 2 -4 µg/ml.

- Controles para evaluar las diferentes concentraciones de antimicrobiano a los 14 días:

Medios de cultivo con Inóculos de *P. salmonis* L89 equivalente a 0,5 Mc Farland con las siguientes concentraciones de oxitetraciclina: 0,0125- 0,03- 0,06 0,125- 0,250- 0,5-1 µg/ml.

Medios de cultivo con Inóculos de *P. salmonis* L89 equivalente a 0,5 Mc Farland con la con las siguientes concentraciones de florfenicol: 0,0125- 0,03- 0,06 0,125- 0,250- 0,5- 1 µg/ml.

- **Verificación de la concentración bacteriana equivalente al 0,5 de Mc Farland:**

Para *P. Salmonis* L89 se realizó en la cámara de Neubauer verificando el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), que debe ser equivalente a 1-2 x 10⁶. Para el caso de *E. coli* la verificación de las UFC se realizó en placa de cultivo y el recuento se realiza bajo lupa.

- **Preparación de las soluciones stock de antimicrobianos de referencia y de las premezclas:**

Se prepararon soluciones stock de los estándares de oxitetraciclina y florfenicol y de las premezclas correspondientes a una concentración inicial de 1280 µg/ml, las que se conservaron a -80°C hasta su análisis.

De acuerdo al CLSI para la preparación de la solución stock se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Peso del antibiótico (mg)} = \frac{\text{volumen (ml)} \times \text{concentración (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mg) o porcentaje}}$$

En el caso de las premezclas, se consideró el porcentaje de pureza descrito por el fabricante.

-Preparación de las soluciones seriadas de antimicrobianos:

A partir de las soluciones de las drogas de referencia y de las premezclas, se prepararon las siguientes concentraciones decrecientes: 0,03- 0,06-0,125-0,25-0,5-1 µg/ml.

-Método de Macrodilución en caldo para *P. salmonis* L89:

Se utilizó el caldo ADL-PBS. En tubos de vidrio estériles se agregó 8 ml de caldo, 1 mL del inóculo bacteriano ajustado a la concentración 0,5 Mc Farland y 1 mL de cada concentración del antimicrobiano de referencia o de cada premezcla según corresponda. Para cada caso, cada tubo se realizó por duplicado.

Los tubos se incubaron a 18°C por 14 días con agitación constante.

-Método de Microdilución en caldo para *P. salmonis* L89:

La prueba se realiza en policubetas de plástico de fondo redondo estériles, en cada pocillo se colocó 155 µl de caldo ADL-PBS, 20 µl de inóculo bacteriano equivalente al 0,5 Mc Farland y 25 µl de cada concentración de antibiótico de referencia o de las premezclas, llegando a un total de 0,2 ml por pocillo. El ensayo se realizó por triplicado para cada caso.

Las placas fueron incubadas en agitación constante a 18°C por 14 días. Para evitar la desecación se selló cada policubeta con su tapa plástica.

Lectura de los resultados

Después de 14 días de incubación para *P. salmonis* L89 y de 18 horas en el caso de *E. coli* ATCC 25922 se determinó la absorbancia para cada concentración de antibióticos de referencia y para las premezclas.

b) Verificación del porcentaje de pureza de oxitetraciclina y florfenicol declarado en las premezclas

Unidad Ejecutora: Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET), Universidad de Chile.

La validación del método analítico se realizó siguiendo las siguientes recomendaciones:

- Unión Europea, Decisión de la Comisión 2002/657/CE
- FDA, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology
- NCh-ISO 17025.Of.2005

Equipamiento

- a. Balanza analítica
- b. Agitador Vortex
- c. Sonificador
- d. Centrifuga
- e. Tubos de propileno de 50 mL
- f. Viales de inyección de vidrio, ambar.
- g. Insertos desechables para viales (250 uL)
- h. Micropipeta 100-1000 uL

Reactivos y Soluciones

- i. Agua HPLC
- j. Acetonitrilo HPLC
- k. Ácido Oxálico grado P.A.
- l. Metanol HPLC

Fase Móvil pH 4.5 ± 0.2

Fase móvil A: Acetonitrilo grado HPLC

Fase móvil B: Ácido oxálico 0,01 M en Agua grado HPLC: Por cada 100 mL de solución, pesar 0,126 g de ácido oxálico dihidratado y luego terminar de aforar con agua HPLC. Agitar y sonicar hasta disolver completamente.

Fase móvil C: Metanol grado HPLC.

Estándares

a. Procedencia:

- Oxitetraciclina hydrochloride (Dr. Ehrenstorfer, Sigma o similar). Pureza certificada: 95.6% ± 1%
- Florfenicol (Dr. Ehrenstorfer, Sigma o similar). Pureza certificada: 99.0% ± 1%

a. Preparación de la solución de trabajo: 1 mg/ml

Para preparar la solución de trabajo se utilizó la siguiente fórmula

$$\text{Peso (mg)} = \text{Concentracion} \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * \text{Volumen de aforo (mL)} / \left(\% \frac{\text{Pureza}}{100} \right)$$

Dónde:

Peso (mg) = Cantidad de estándar certificado a pesar.

Concentración mg/ml = 1mg/ml como valor constante.

Volumen de Aforo=10 ml como valor constante.

% Pureza= % de pureza declarada para cada estándar puro certificado.

Se preparó una solución de trabajo de 40 mg/40 ml de metanol. Se agitó durante 10 minutos y se sonicó 20 minutos. Se tomaron 300 µl con micropipeta calibrada y se traspasaron a un vial de inyección para HPLC.

Análisis Instrumental

b. Condiciones instrumentales para el método analítico

Para el análisis de las muestras, se utilizó un Cromatógrafo líquido acoplado a un detector de arreglo de diodos de marca Elite LaChrom, el cual se subdivide en los siguientes módulos:

- Bomba HPLC Elite La Chrom modelo L2130
- Horno HPLC Elite La Chrom modelo L2300
- Autosampler HPLC Elite La Chrom modelo L2200
- Detector DAD Elite La Chrom modelo L2455
- Estación de trabajo con software de integración de datos EZChrom Elite Versión 3.2.1, Build 3.2.1.31.

Las condiciones Cromatográficas para el análisis de muestras se implementó según lo siguiente:

Fase móvil A: Acetonitrilo grado HPLC

Fase móvil B: Ácido oxálico 0,01 M en Agua grado HPLC: Por cada 100 mL de solución, pesar 0,126 g de ácido oxálico dihidratado y luego terminar de aforar con agua HPLC. Agitar y sonicar hasta disolver completamente.

Fase móvil C: Metanol grado HPLC.

➤ Gradiente de fases móviles:

Tiempo (minutos)	% Acetonitrilo	% Acido Oxálico 0.01 M en Agua HPLC	% Metanol
0	10	85	5
1	10	85	5
5	25	45	30
6	10	85	5
12	10	85	5

- Flujo: 1mL/min
- Columna: Symmetry C18 5 µm x 4,6 x 250 mm, WATERS.
- Detector DAD (“*Diode Array Detector*”), utilizándolo con doble lectura a las siguientes longitudes de onda:
 - Longitud de onda para Oxitetraciclina: 360 nm.
 - Longitud de onda para Florfenicol: 224 nm.
- Volumen de inyección: 100 µL.

Criterios de confirmación para muestras positivas y controles de calidad interno:

Para la aceptación de resultados de cada batch analizado, se realizaron los siguientes controles de calidad internos:

- Blanco reactivo, sin presencia de interferentes al tiempo de retención de los analitos.
- Tiempos de retención de los analitos en las muestras, no debe superar un 5% respecto al tiempo de retención de los estándares certificados en el batch de muestras.
- Espectro de las muestras, debe tener una similitud mayor o igual a un 90% respecto a los espectros de librería del instrumento.

Parámetros de validación Oxitetraciclina y Florfenicol

Los Parámetros a evaluar son los siguientes:

1. **Tiempo de retención del analito:** Se analizan 6 repeticiones de estándar certificado para evaluar tiempos de retención.
2. **Especificidad:** Se analizan 20 muestras de blancos reactivos para evaluar interferencia en la región de interés en la cual se espera la elución del analito.
3. **Límite de Detección:** Se analizan 20 muestras de estándar puro certificado a la cual se presente una relación señal ruido (rsr) de al menos 3:1. El Coeficiente de Variación % no debe superar un 25%.
4. **Límite de Cuantificación:** Al Límite de Detección seleccionado se le suma 1.64 veces la desviación estándar de los resultados obtenidos en las 20 muestras de estándar puro analizadas previamente.
5. **Linealidad de la Curva de Calibración:** Se analizan 3 curvas de calibración en estándar certificado, con cinco puntos cada una. Se aceptan si el Coeficiente de Correlación R^2 es mayor o igual a 0.95.
6. **Precisión (Repetitividad y Reproducibilidad):** La precisión se calcula mediante la evaluación de la repetitividad y reproducibilidad intralaboratorio, mediante 6 curvas de estándar certificado con tres puntos de calibración para cada parámetro calculando la concentración media de cada punto. Se acepta el parámetro cuando el coeficiente de variación (CV%) de cada punto de la curva en la repetitividad, son iguales o menores al coeficiente de variación de la reproducibilidad medida.
7. **Robustez:** Se seleccionan factores que pueden influir en el resultado final, y mediante un análisis fraccional incompleto mediante el método de Youden se determina el factor que más afecte al método analítico.
8. **Incertidumbre:** Se calcula la incertidumbre expandida del método analítico, mediante análisis estadístico multifactorial de los elementos que más afectan al resultado final.

Tabla 1. Resumen validación de método analítico para oxitetraciclina.

RESUMEN		VALIDACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
1.	TIEMPO DE RETENCIÓN (tr)	4.75 min	CV: 5% variación
2.	ESPECIFICIDAD	No hay interferentes en el tr del analito	tr sin interferencias
3.	LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)	30 ng/g	Cumple rsr 3:1; CV de las 20 repe. ≤ 25%
4.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)	37 ng/g	Cumple rsr mínimo: 10:1
5.	LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	$R^2 > 0,98$	Condiciones de Linealidad: CD (R^2) ≥ 0,95 ; CV de las pendientes ≤ 25%
7.	PRECISIÓN (intralaboratorio)	DS = 0,00071 (mg/Kg)	DS de la reproducibilidad intralab. (precisión)
7.a	REPETITIVIDAD (CV%)	30 ng/g: 13,5% ; 60 ng/g: 17,3% ; 90 ng/g: 4,6%	CV a la mitad o igual al CV de la reproducibilidad
7.b	REPRODUCIBILIDAD INTRALAB. (CV%)	30 ng/g: 15,1% ; 60 ng/g: 16,4% ; 90 ng/g: 5,2%	1-10µg/Kg: CV ≤ 35% ; 100µg/Kg: CV 23% ; 1.000µg/Kg: CV 16%
8.	ROBUSTEZ. Factor que más afecta la robustez del método	DS = 0,0000003 Método robusto. Medidas precautorias: centrifugado a 5000 rpm.	Método robusto: DS robustez < DS reproducibilidad. Buscar factor del método que más afecta la robustez
9.	INCERTIDUMBRE	30 ng/g: 19,1% ; 60 ng/g: 11.0% ; 90 ng/g: 8,5%	Menor a un 35%

Tabla 2. Resumen validación de método analítico para florfenicol.

RESUMEN		VALIDACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
1.	TIEMPO DE RETENCIÓN (tr)	5.790 min	CV: 5% variación
2.	ESPECIFICIDAD	No hay interferentes en el tr del analito	tr sin interferencias
3.	LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)	10 ng/g	rsr 2:1 o 3:1; CV de las 20 repe. ≤ 25%
4.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)	13 ng/g	rsr mínimo: 10:1
5.	LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	$R^2 > 0,98$	Condiciones de Linealidad: CD (R^2) ≥ 0,95 ; CV de las pendientes ≤ 25%
7.	PRECISIÓN (intralaboratorio)	DS = 0,00079 (mg/Kg)	DS de la reproducibilidad intralab. (precisión)
7.a	REPETITIVIDAD (CV%)	10 ng/g: 13,5% ; 20 ng/g: 17,3% ; 30 ng/g: 4,6%	CV a la mitad o igual al CV de la reproducibilidad
7.b	REPRODUCIBILIDAD INTRALAB. (CV%)	10 ng/g: 15,1% ; 20 ng/g: 16,4% ; 30 ng/g: 5,2%	1-10µg/Kg: CV ≤ 35% ; 100µg/Kg: CV 23% ; 1.000µg/Kg: CV 16%
8.	ROBUSTEZ. Factor que más afecta la robustez del método	DS = 0,0000003 Método robusto. Medidas precautorias: centrifugado a 5000 rpm.	Método robusto: DS robustez < DS reproducibilidad. Buscar factor del método que más afecta la robustez
9.	INCERTIDUMBRE U	10 ng/g: 21.7% ; 20 ng/g: 14.3% ; 30 ng/g: 7.9%	Menor a un 35%.

Obtención de las muestras:

- ✓ Se contrató dos profesionales de terreno, Sra. Berta Contreras y Sr. Jorge Ponce, para obtener las muestras desde diferentes plantas de proceso de alimento medicado o de la industria farmacéutica.
- ✓ Las muestras recolectadas correspondieron a diferentes lotes. De cada lote se tomaron 20 g y se envasaron en bolsas de polietileno debidamente selladas. Cada bolsa venía con su identificación de lote, nombre del antibiótico correspondiente y pureza declarada. *Se omitió el nombre de la industria farmacéutica con el fin de no sesgar los resultados del estudio.*
- ✓ Las muestras fueron almacenadas en una sala a temperatura ambiente, fresca y seca. Sólo estas muestras fueron guardadas en dicho lugar, para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada.
- ✓ Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) utilizando HPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos. Las metodologías analíticas validadas para verificar la pureza del antibiótico fueron las señaladas anteriormente.

Número de muestras

Florfenicol	: 20
Oxitetraciclina	: 8

Cada muestra fue analizada por triplicado.

Número de análisis: 84

Tratamiento de la muestra: Para cada premezcla se prepararon concentraciones de 1mg/ml utilizando como solvente metanol. Para calcular la cantidad necesaria de premezcla, se consideró el porcentaje de pureza declarada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \text{Concentracion} \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * \text{Volumen de aforo (mL)} / \left(\% \frac{\text{Pureza}}{100} \right)$$

Donde:

Peso (mg) = Cantidad de Premezcla o estándar certificado a pesar.

Concentración mg/mL = 1 mg/mL como valor constante.

Volumen de Aforo= 0.01 L como valor constante.

% Pureza= % de pureza declarada para cada Premezcla o estándar certificado.

En forma paralela se trabajó con el estándar certificado. Tanto las pre mezclas como los estándares, se analizaron por triplicado de forma independiente.

c) Verificación de la estabilidad, concentración y homogeneidad de florfenicol y oxitetraciclina en los alimentos medicados

Unidad Ejecutora: Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET), Universidad de Chile.

1. DESCRIPCION DEL METODO ANALITICO

1.1 Introducción:

La validación del método analítico se realizó siguiendo las siguientes recomendaciones:

- Unión Europea, Decisión de la Comisión 2002/657/CE
- FDA, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology
- NCh-ISO 17025.Of.2005

1.2. Equipamiento

- a. Balanza analítica
- b. Agitador Vortex
- c. Sonicator
- d. Centrifuga
- e. Tubos de propileno de 50 mL
- f. Bandejas de pesaje desechables.
- g. Paletas de madera para procedimientos clínicos.
- h. Filtros Millex de 0.25 μm .
- i. Viales de inyección de vidrio, ambar.
- j. Insertos desechables para viales (250 μL)
- k. Jeringas 1 mL
- l. Pizeta de 500 mL
- m. Pipeta aforada de 50 mL
- n. Micropipeta 100-1000 μL
- o. Micropipeta 10-100 μL

1.3. Reactivos y Soluciones

- p. Agua HPLC
- q. Acetonitrilo HPLC
- r. Ácido Oxálico grado P.A.
- s. Metanol HPLC

Fase Móvil pH 4.5 ± 0.2

Fase móvil A: Acetonitrilo grado HPLC

Fase móvil B: Ácido oxálico 0,01 M en Agua grado HPLC: Por cada 100 mL de solución, pesar 0,126 g de ácido oxálico dihidratado y luego terminar de aforar con agua HPLC. Agitar y sonicar hasta disolver completamente.

Fase móvil C: Metanol grado HPLC.

1.4 Estándares

1.4.1. Procedencia:

- Oxitetraciclina (Dr. Ehrenstorfer, Sigma o similar). Pureza certificada: 95.6% U±1.0%
- Florfenicol (Dr. Ehrenstorfer, Sigma o similar). Pureza certificada: 99.0% ± 1.0%

1.4.2. Forma de Preparación

Para realizar la validación, se debe seleccionar matriz blanco para la adición de estándar de Florfenicol y Oxitetraciclina.

Las soluciones stock (S.S.) de cada antibiótico se señalan a continuación:

Solución Stock OTC	10 mg/mL
Solución Stock FF	10 mg/mL

A partir de las soluciones stock, se preparan las siguientes concentraciones de trabajo en la matriz (alimento sin antibiótico)

Conc OTC y FF mg/mL	Pesaje matriz (g)	Alicuota OTC (µL)	Alicuota FF (µL)
0,1	0,5	50	50
0,4	0,5	200	200
0,8	0,5	400	400
1,2	0,5	600	600
1,6	0,5	800	800

1.5. Procedimiento de preparación de muestra.

- 1) Pesar 500 mg en un tubo falcón de 50 mL.
- 2) Añadir 50 mL de solución de extracción de Acido oxálico dihidratado 0,01 M en Agua/Metanol 1:1 mediante una pipeta aforada de 50 mL.
- 3) Agitar 10 min, sonicar 20 min y centrifuga 5 min a 5000 rpm.
- 4) Traspasar 300 µL a un vial de inyección con inserto plástico mediante filtro millex.
- 5) Inyectar en equipo HPLC-DAD.

1.6 Análisis Instrumental

1.6.1 Condiciones instrumentales para el método analítico

Para el análisis de las muestras, se utilizó un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de arreglo de diodos de marca Elite LaChrom, el cual se subdivide en los siguientes módulos:

- Bomba HPLC Elite La Chrom modelo L2130
- Horno HPLC Elite La Chrom modelo L2300
- Autosampler HPLC Elite La Chrom modelo L2200
- Detector DAD Elite La Chrom modelo L2455
- Estación de trabajo con software de integración de datos EZChrom Elite Versión 3.2.1, Build 3.2.1.31.

Las condiciones cromatográficas para el análisis de muestras se implementó según lo siguiente:

Fase móvil A: Acetonitrilo grado HPLC

Fase móvil B: Ácido oxálico 0,01 M en Agua grado HPLC: Por cada 100 mL de solución, pesar 0,126 g de ácido oxálico dihidratado y luego terminar de aforar con agua HPLC. Agitar y sonicar hasta disolver completamente.

Fase móvil C: Metanol grado HPLC.

➤ Gradiente de fases móviles:

Tiempo (minutos)	% Acetonitrilo	% Acido Oxálico 0.01 M en Agua HPLC	% Metanol
0	10	85	5
1	10	85	5
5	25	45	30
6	10	85	5
12	10	85	5

- Flujo: 1mL/min
- Columna: Symmetry C18 5 µm x 4,6 x 250 mm, WATERS.
- Detector DAD ("*Diode Array Detector*"), utilizándolo con doble lectura a las siguientes longitudes de onda:
 - Longitud de onda para Oxitetraciclina: 360 nm.
 - Longitud de onda para Florfenicol: 224 nm.
- Volumen de inyección: 20 µL.

1.7. Resultados:

Los resultados en el alimento serán expresados en kg/Tonelada.

1.8. Criterios de confirmación para muestras positivas y controles de calidad interno:

Para la aceptación de resultados de cada batch analizado, se realizaron los siguientes controles de calidad internos:

- Blanco matriz, sin presencia de interferentes al tiempo de retención de los analitos.
- Controles fortificados al nivel del punto 1 de la curva a 0.1 mg/mL. Los controles deben tener una recuperación de un 80 a 120 %.
- Curva de calibración de 5 puntos, la que debe tener un R^2 mayor o igual a 0.95.
- Tiempos de retención de los analitos en las muestras, no debe superar un 5% respecto al tiempo de retención de los estándares certificados en el batch de muestras.
- Espectro de las muestras, debe tener una similitud mayor o igual a un 90% respecto a los espectros de librería del instrumento.

1.9. Parámetros de validación Oxitetraciclina y Florfenicol

La validación del método analítico se realizó siguiendo las siguientes recomendaciones:

- Unión Europea, Decisión de la Comisión 2002/657/CE
- FDA, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology
- NCh-ISO 17025.Of.2005

Los Parámetros a evaluar son los siguientes:

- **Tiempo de retención del analito:** Se analizan 6 repeticiones de estándar certificado para evaluar tiempos de retención.
- **Especificidad:** Se analizan 20 muestras de alimentos blancos para evaluar interferencia en la región de interés en la cual se espera la elución del analito.
- **Límite de Detección:** Se fortifican 20 muestras de alimentos blancos a concentraciones definidas para cada analito donde se presente una relación señal ruido (rsr) de al menos 3:1. El Coeficiente de Variación % no debe superar un 25%..
-
- **Límite de Cuantificación:** Al Límite de Detección seleccionado se le suma 1.64 veces la desviación estándar de los resultados obtenidos en las 20 muestras de alimentos blancos fortificados analizados previamente.
- **Linealidad de la Curva de Calibración:** Se analizan 3 curvas de calibración en matriz fortificada, con cinco puntos cada una. Se aceptan si el Coeficiente de Correlación R^2 es mayor o igual a 0.95.

- **Precisión (Repetitividad y Reproducibilidad):** La precisión se calcula mediante la evaluación de la repetitividad y reproducibilidad intralaboratorio, mediante 6 curvas de matriz fortificada con tres puntos de calibración para cada parámetro calculando la concentración media de cada punto. Se acepta el parámetro cuando el coeficiente de variación (CV%) de cada punto de la curva en la repetitividad, son iguales o menores al coeficiente de variación de la reproducibilidad medida.
- **Recuperación:** Se calcula comparando curvas de estándar puro certificado, con curvas en matriz fortificada al mismo nivel de fortificación.
- **Robustez:** Se seleccionan factores que pueden influir en el resultado final, y mediante un análisis fraccional incompleto mediante el método de Youden se determina el factor que más afecte al método analítico.
- **Incertidumbre:** Se calcula la incertidumbre expandida del método analítico, mediante análisis estadístico multifactorial de los elementos que más afectan al resultado final.

Tabla 1. Resumen validación de método analítico para oxitetraciclina en alimento medicado.

RESUMEN		VALIDACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
1.	TIEMPO DE RETENCIÓN (tr)	6.813 min	CV: 5% variación
2.	ESPECIFICIDAD	No hay interferentes en el tr del analito	tr sin interferencias
3.	LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)	0.1 mg/g	Cumple rsr 3:1; CV de las 20 repe. ≤ 25%
4.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)	0.11 mg/g	Cumple rsr mínimo: 10:1
5.	LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	R ² > 0,99	Condiciones de Linealidad: CD (R ²) ≥ 0,95; CV de las pendientes ≤ 25%
7.	PRECISIÓN (intralaboratorio)	DS = 0,00000045 (mg/g)	DS de la reproducibilidad intralab. (precisión)
7.a	REPETITIVIDAD (CV%)	0.100 mg/g: 12,1% ; 0.2 mg/g: 13,1% ; 0.4 mg/g: 3,1%	CV a la mitad o igual al CV de la reproducibilidad
7.b	REPRODUCIBILIDAD INTRALAB. (CV%)	0.1 mg/g: 17,1% ; 0.2 mg/g: 18,7% ; 0.4 mg/g: 7.2%	1-10 mg/g: CV ≤ 35% ; 100 mg/g: CV 23% ; 1.000 mg/g: CV 16%
8.	ROBUSTEZ. Factor que más afecta la robustez del método	DS = 0,00000004 Método robusto. Medidas precautorias: centrifugado a 5000 rpm.	Método robusto: DS robustez < DS reproducibilidad. Buscar factor del método que más afecta la robustez
9.	INCERTIDUMBRE	0.1 mg/g: 17,9% ; 0.2 mg/g: 13.8% ; 0.4 mg/g: 6,5%	Menor a un 35%

Tabla 2. Resumen validación de método analítico para florfenicol en alimento medicado.

RESUMEN		VALIDACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
1.	TIEMPO DE RETENCIÓN (tr)	9.600 min	CV: 5% variación
2.	ESPECIFICIDAD	No hay interferentes en el tr del analito	tr sin interferencias
3.	LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)	0.1 mg/g	rsr 2:1 o 3:1; CV de las 20 repe. ≤ 25%
4.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)	0.112 mg/g	rsr mínimo: 10:1
5.	LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	$R^2 > 0,98$	Condiciones de Linealidad: CD (R^2) ≥ 0,95 ; CV de las pendientes ≤ 25%
7.	PRECISIÓN (intralaboratorio)	DS = 0,0000032 (mg/g)	DS de la reproducibilidad intralab. (precisión)
7.a	REPETITIVIDAD (CV%)	0.1 mg/g: 13,2% ; 0.2 mg/g: 14,7% ; 0.4 mg/g: 4,6%	CV a la mitad o igual al CV de la reproducibilidad
7.b	REPRODUCIBILIDAD INTRALAB. (CV%)	0.1 mg/g: 19,5% ; 0.2 mg/g: 19,1% ; 0.4 mg/g: 8.4%	1-10 mg/g: CV ≤ 35% ; 100 mg/g: CV 23% ; 1.000 mg/g: CV 16%
8.	ROBUSTEZ. Factor que más afecta la robustez del método	DS = 0,00000002 Método robusto. Medidas precautorias: centrifugado a 5000 rpm.	Método robusto: DS robustez < DS reproducibilidad. Buscar factor del método que más afecta la robustez
9.	INCERTIDUMBRE U	0.1 mg/g: 14.7% ; 0.2 mg/g: 10.1% ; 0.4 mg/g: 7,2%	Menor a un 35%.

Verificación de estabilidad

1.- Se realizaron estudios de estabilidad acelerada considerando que:

- ✓ Un alimento medicado se prepara en respuesta a una Prescripción Médica Veterinaria (PMV)
- ✓ Un lote de alimento medicado no debería almacenarse más de tres meses, considerando que la cantidad solicitada en una PMV solo debe utilizarse para un tratamiento

2.- Se siguieron las recomendaciones de la Guía para la realización y presentación de estudios de estabilidad para productos Farmacológicos de uso veterinario (SAG, 2014)

3.- Las condiciones experimentales durante todo el estudio fueron a 40°C ± 2°C y 75% ± 5% de humedad relativa

4.- Los tiempos de muestreo fueron a los 0 – 1 – 2 – 3 y 4 meses

5.- Se analizaron 7 lotes diferentes de alimento con oxitetraciclina y 7 de florfenicol

7.- Cada lote se analizó por cuadruplicado en cada tiempo de muestreo.

Verificación de concentración y homogeneidad

- ✓ Se contrató dos profesionales de terreno, Sra. Berta Contreras y Sr. Jorge Ponce, para obtener las muestras desde diferentes plantas de proceso de alimento medicado o de centros de cultivos.
- ✓ Las muestras recolectadas correspondieron a diferentes lotes de alimento medicado.
- ✓ De cada lote se tomaron 200 a 400 g de alimento medicado y se envasaron en bolsas de polietileno debidamente selladas. Cada bolsa venía con su identificación de lote, nombre del antibiótico correspondiente y cantidad de antibiótico/tonelada de alimento declarada por la empresa. *Se omitió el nombre de la empresa de alimento con el fin de no sesgar los resultados del estudio.*

Número de muestras de alimento medicado: Se obtuvieron 47 muestras de alimento de diferentes calibres. De cada lote se tomaron seis sub-muestras, las que se procesaron y analizaron de forma independiente.

Las muestras fueron las siguientes:

➤ Florfenicol calibre 12 mm	: 10
➤ Florfenicol calibre 9 mm	: 23
➤ Florfenicol calibre 6,4 y 4,1 mm	: 7
➤ Oxitetraciclina calibre 4.1 mm	: <u>7</u>
Total	47

Verificación de la cantidad declarada y evaluación de la homogeneidad: Cada muestra se analizó por sextuplicado: $47 \times 6 = 282$ análisis

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

1.- Verificación de la cantidad de antibiótico declarada:

- El promedio de las seis repeticiones (cantidad real), se comparó con el valor declarado en la etiqueta
- La diferencia entre la cantidad declarada en la etiqueta y la cantidad real se expresó en porcentaje

2.- Evaluación de la homogeneidad

- Se calculó la dispersión entre las seis repeticiones a través del CV

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

d) Propuesta de elaboración de alimentos con concentraciones preestablecidas de antimicrobianos

Se realizó una revisión bibliográfica, recopilando información de las plantas de alimentos medicados de la zona sur del país, para evaluar de qué forma de elaboran y solicitan los alimentos medicados para salmónidos en el país.

OBJETIVO 3: COMPARAR Y EVALUAR MEDIANTE ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD LA RELACIÓN ENTRE LA LIBERACIÓN Y DISOLUCIÓN DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL A NIVEL INTESTINAL CON LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LOS DIFERENTES ALIMENTOS MEDICADOS, ETAPA 1: DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE FLORFENICOL Y OXITETRACICLINA DESDE ALIMENTOS MEDICADOS PARA PECES

Unidad Ejecutora: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la cinética y mecanismo de liberación de florfenicol y oxitetraciclina desde alimentos medicados para peces, utilizando medios de disolución que consideren características biorrelevantes.

Objetivos específicos

a.- Evaluar la influencia en la liberación de florfenicol y oxitetraciclina desde alimentos medicados:

a.1.- Del pH

a.2.- La tensión superficial

a.3.- La temperatura

b.- Identificar las cinéticas y mecanismos y que describan el proceso de disolución.

c.- Establecer las diferencias en la liberación de los fármacos entre las diferentes formulaciones y entre las diferentes condiciones experimentales.

Materiales y métodos

Muestras analizadas e informadas en este avance: alimentos medicados proporcionados por las empresas productoras, codificados según se presenta en la siguiente tabla.

Código	Principio Activo	Tipo de Muestra	Concentración Teórica
01C	Florfenicol 50%	Alimento	2,7 Kg/ Tonelada
04B	Florfenicol 50%	Alimento	3,53 Kg/Tonelada
06B	Florfenicol 50%	Alimento	5,3 Kg/Tonelada

Código	Principio Activo	Tipo de Muestra	Concentración determinada experimentalmente
OTC M1 020	Oxitetraciclina	Alimento	18.440 ppm

Equipo de disolución

Aparato 2 de la USP (paleta) a 50 rpm

900 ml de medio de disolución

Temperatura de los ensayos de disolución

10 °C

Composición de Medios de disolución (g/L)

pH 2	pH 4	pH 7,4	pH 7,4 + LSS*
3,73 g KCl 5,3 mL HCl 2 N	2,08 g Acetato de sodio*3H ₂ O 42,4 mL Ácido acético 2N	6,8 g de KH ₂ PO ₄ 11,5 mL NaOH 2 M	6,8 g de KH ₂ PO ₄ 11,5 mL NaOH 2 M *Lauril sulfato de sodio 1 g/l

Agregar a cada medio por cada litro: 27,2 g NaCl – 10,75 g MgCl₂*6H₂O -1,2 g de CaCl₂ para simular composición y fuerza iónica del agua de mar. Se ajustó con NaCl para obtener una concentración equivalente de 32,6 ‰. Las sales de calcio y magnesio no fueron incluidas en el medio que contiene LSS por incompatibilidad.

Análisis de las muestras

La cantidad de fármaco disuelto fue determinado por el método desarrollado y validado para cuantificar la cantidad de fármaco en los alimentos (HPLC).

Tiempos de muestreo

0,25 - 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 y 9 horas.

Tratamiento de los resultados de disolución

Los perfiles de disolución fueron tratados matemáticamente para identificar cuál de los siguientes modelos describe de forma adecuada su comportamiento:

- a. Modelo difusional de Higuchi
- b. Cinética de orden cero
- c. Cinética de orden uno
- d. Modelo de la raíz cúbica

También se exploró la comparación de los resultados utilizando el factor de similitud f_2 , un método que es modelo independiente, siempre y cuando la variabilidad de los resultados permita aplicar el método.

OBJETIVO 4: VERIFICACIÓN DE LAS DOSIS Y RITMO HORARIO DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL QUE ASEGURE LA EFICACIA CLÍNICA DE ESTOS FÁRMACOS, UTILIZANDO EL MODELO FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO (PK/PD). ETAPA 1.

- a) **Administración de florfenicol 50%, por vía oral, a salmón del atlántico (*Salmo salar*) en distintas pautas horarias**

Unidad Ejecutora: Aquainnovo S.A.

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.

Programa de operaciones fase clínica.

A continuación, la Tabla 1 indica las actividades que fueron ejecutadas durante el estudio, con un total de 33 días desde iniciada la aclimatación y hasta el término de la recolección de muestras de sangre posteriores al tratamiento.

Tabla 1. Carta gantt.

Hitos	Diciembre											Enero													
	Días	15	19	26	28	29	4	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	20	23	24	25	26	27	30	31
Screening sanitario de animales de estudio		█																							
Muestreo exploratorio de peso ejemplares			█																						
Selección y pesaje inicial de ejemplares (conformación estanques)				█	█	█	█	█	█																
Aclimatación				█	█	█	█	█	█																
Fabricación alimento medicado					█	█																			
Recepción alimento medicado						█	█																		
Estimación de concentración del fármaco en alimento							█	█																	
Inicio administración tratamiento medicado pauta horaria 1 y 2									█	█															
Toma de muestras de sangre T0									█	█															
Toma de muestras de sangre T1 (30 minutos pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T2 (1 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T3 (2 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T4 (4 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T5 (6 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T6 (9 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T7 (12 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T8 (24 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T9 (30 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T10 (36 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T11 (48 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T12 (54 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T13 (62 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T14 (72 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T15 (80 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T16 (96 horas pt)									█	█															
Toma de muestras de sangre T17 (100 horas pt)									█	█															
Envío de muestras para análisis																									
Inicio administración tratamiento medicado pauta horaria 3 y 4																									
Toma de muestras de sangre T0																									
Toma de muestras de sangre T1 (30 minutos pt)																									
Toma de muestras de sangre T2 (1 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T3 (2 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T4 (4 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T5 (6 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T6 (9 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T7 (12 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T8 (24 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T9 (30 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T10 (36 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T11 (48 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T12 (54 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T13 (62 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T14 (72 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T15 (80 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T16 (96 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T17 (100 horas pt)																									
Envío de muestras para análisis																									
Inicio administración tratamiento medicado pauta horaria 5 y 6																									
Toma de muestras de sangre T0																									
Toma de muestras de sangre T1 (30 minutos pt)																									
Toma de muestras de sangre T2 (1 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T3 (2 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T4 (4 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T5 (6 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T6 (9 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T7 (12 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T8 (24 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T9 (30 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T10 (36 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T11 (48 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T12 (54 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T13 (62 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T14 (72 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T15 (80 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T16 (96 horas pt)																									
Toma de muestras de sangre T17 (100 horas pt)																									
Término del estudio																									
Envío de muestras para análisis																									
Informe final																									

Diseño general del Estudio.

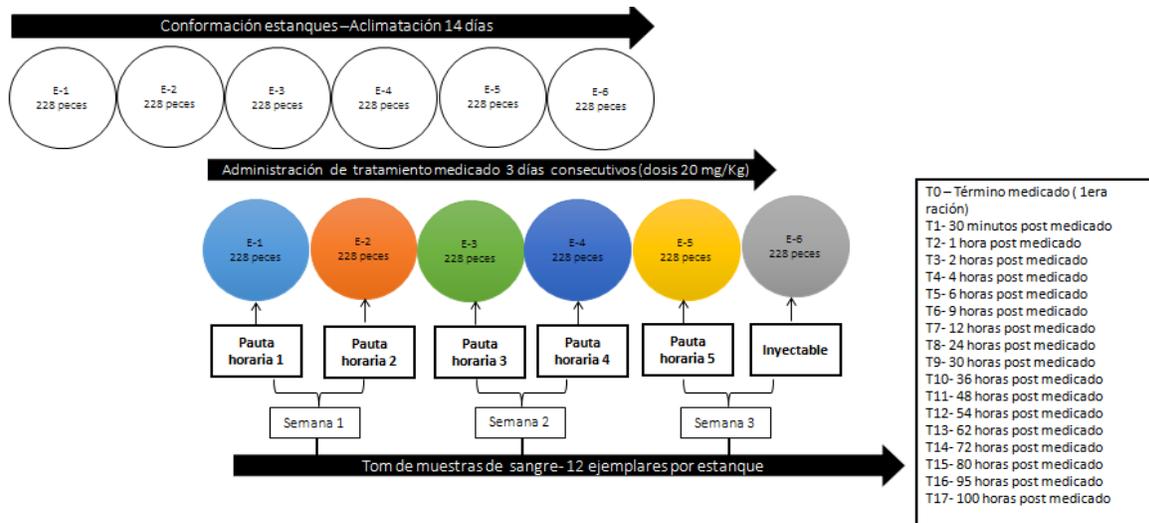
Un total de 1368 ejemplares de la especie Salmon del Atlántico (*Salmo salar*), con peso promedio de 350-450 gramos, fueron distribuidos y mantenidos en 6 estanques de 5 m³, para una aclimatación mínima de 14 días en agua de mar.

Posteriormente, se administró el fármaco por vía oral en dosis de 20 mg de Florfenicol/kg de peso vivo, considerando 5 regímenes de pauta horaria (correspondiente a matriz alimento comercial con el medicamento). Adicionalmente, el fármaco fue administrado a un grupo de ejemplares, a razón de 20 mg de Florfenicol/ Kg de peso vivo, en dosis única por vía inyectable que sirvió como grupo control. La dosis seleccionada corresponde a la dosis más utilizada por los Médicos Veterinarios en terreno, de acuerdo al Informe sobre Diagnóstico sobre el consumo de antimicrobianos en los centros de cultivo de salmones a nivel nacional (años 2011-2015), realizado por el Laboratorio de Farmacología Veterinaria, Universidad de Chile, para el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

La administración del tratamiento oral se realizó a 5 estanques con 228 peces cada uno, para cada pauta horaria (Fig. 1) y uno de los estanques recibió el tratamiento por vía inyectable. La entrega oral fue a razón de 1- 1.5 % SFR de alimento medicado, por 3 días consecutivos (dosis repetida).

Una vez finalizado el tratamiento, 12 peces por grupo de tratamiento, fueron eutanasiados aleatoriamente a los tiempos 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 62, 72, 80, 96 y 100 horas post tratamiento, a partir de los cuales se tomarán muestras de sangre (≥ 3 mL) con anticoagulante (EDTA) para la obtención de plasma. Los salmones fueron eutanasiados mediante contusión, de acuerdo a las condiciones de bienestar animal que recomienda la Agencia Europea de Evaluación de Productos Medicinales (EMA, 2009) y la Directiva 2010/63/EU (Unión Europea, 2010). Las muestras fueron centrifugadas y el plasma obtenido fue depositado en tubos eppendorff previamente rotulados con el grupo de tratamiento, número de estanque, fecha y tiempo de muestreo. Las muestras fueron congeladas a -20 °C y posteriormente derivadas al laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, Santiago., para su análisis. Luego del último tiempo de muestreo (100 horas post tratamiento) se dio por terminado el ensayo.

Figura 1. Diseño Experimental del bioensayo



Producto veterinario.

A continuación, la Tabla 2 describe el producto veterinario utilizado en el estudio.

Tabla 2. Especificación del producto veterinario

Nombre comercial	Principio activo	Forma Farmacéutica	Dosis recomendada
Veterin 50 %	Florfenicol	Polvo oral	10 mg/Kg peso vivo

Animales de estudio.

Se utilizaron 1368 Salmon del Atlántico (*Salmo salar*) con peso promedio general de 390 a 400 g al iniciar la aclimatación y que tuvieron un peso aproximado de 420 gramos al iniciar la administración del medicado. No obstante, se dispuso de peces adicionales (n=1500) para lograr un coeficiente de variación menor o igual al 15 % al administrar el tratamiento. Los peces se obtuvieron 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, ingresados en el mes de mayo del 2016.

Condición sanitaria de animales de estudio.

Antes de iniciar el estudio, la condición sanitaria fue aprobada por el Médico Veterinario responsable a través de la inspección visual de los ejemplares e historial sanitario del grupo. Así mismo, realizó la toma de muestras de ejemplares que fueron analizados mediante la técnica de biología molecular (RT-PCR) para virus IPN, SRS y BKD. Finalmente, se realizaron análisis para descartar la presencia del fármaco en plasma y músculo/piel previo al inicio de la administración de tratamientos.

Criterio de inclusión de animales de estudio.

El criterio de inclusión correspondió a aquellos animales que cumplieran con un peso promedio general de 390-400 gramos al iniciar la aclimatación, clínicamente sanos y que no habían 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 que indicaba que no se habían administrado fármacos durante los últimos 90 días en el grupo de peces.

Criterio de exclusión de animales.

Se excluyó de este estudio cualquier animal que mostrara 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, 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 con 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, 1368 peces fueron distribuidos en 6 estanques de 5 m³, 228 peces/tk, donde permanecieron por al menos 14 días en aclimatación, en sistema de recirculación y agua de mar. En la mantención se tuvo una tasa de recambio de agua de 1.5/hora, temperatura de 13°C (\pm 1°C), niveles de oxígeno disuelto en el agua en rango de 80-120% saturación, salinidad de (30 a 35‰) y los valores de pH (entre 7.0 y 8.0). Finalmente, la densidad no superó los 30 kg/m³ de biomasa durante el estudio.

Alimentación.

Durante el período de climatización, los peces fueron alimentados con una dieta comercial (libre de medicación) para salmónidos, en calibre de pellet de 6mm y a una tasa de 1.0 a 1.5 % PC / día. El alimento durante esta etapa se suministró de forma manual, entregando el 60 % de la ración durante la mañana y el 40 % en la tarde.

Alimento medicado.

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 presentó un 10 % de variación en relación al nivel intentado (20 mg/Kg). El alimento medicado necesario para llevar a cabo el estudio, fue ingresado al centro experimental 1 día antes de iniciar el tratamiento.

Tratamientos durante el estudio.

Durante el estudio no se aplicó ningún tipo de tratamiento al grupo de peces, específicamente, antibióticos, anestésicos y químicos en general.

Parámetros ambientales.

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. Los rangos para estos parámetros se establecen la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros ambientales durante el estudio.

Etapa	Temperatura	pH	Salinidad	Oxígeno
Aclimatación	13°± 1°C	7 - 8	30-35 ppt.	80-120% sat.
Tratamientos	13°± 1°C	7 - 8	30-35 ppt.	80-120% sat.

Aplicación de tratamiento medicado.

Se realizó la administración del medicado bajo 5 regímenes de pauta horaria, por 3 días consecutivos y con un desfase de una semana por cada 2 tratamientos, es decir, se trataron 2 estanques la primera semana, 2 en la segunda semana y la tercera los 2 estanques restantes (Tabla 5). El alimento se entregó en forma manual y automática, en base al consumo real que tuvieron los peces durante la etapa de aclimatación (1.0 a 1,5 % SFR) y fue ajustado diariamente según crecimiento esperado para la especie.

Para la ejecución, cada grupo de tratamiento fue alimentado con la ración según pauta horaria especificada en la Tabla 5. En el caso del tratamiento 6, el fármaco fue administrado por vía intraperitoneal, en ejemplares previamente anestesiados, por una vez y en igual dosis que el tratamiento oral (20 mg/ Kg).

Finalizada la entrega de la primera ración del día se procedió a la toma de muestras de sangre correspondiente al t0 y se continuó con el plan de muestreo indicado en el punto 6.

Previo a la administración del tratamiento (aclimatación) y durante esta, se estimó el consumo real de alimento /día, en todos los estanques de prueba, mediante la recolección del alimento no consumido desde las cajas decantadoras (sedimentador) que posee cada estanque. Previo al inicio de la alimentación, se tomó una muestra de 100 pellets en triplicado, para registrar el peso seco. Durante la alimentación y a partir del alimento recolectado se pesaron 30 pellets húmedos. Con estos datos se determinó la relación de pellet seco v/s pellet húmedo, obteniendo de esta forma la curva de humedad, que permitió aplicar el factor de correlación para la obtención del alimento real consumido para cada estanque.

Tabla 5. Pauta horaria de tratamiento medicado.

Pauta horaria	Hora entrega (*)	N° peces	Dosis medicado	Días Trat.	% SFR (**)	Ración día	Semana administración
Dosis del fármaco 1 ración / día	9:00 13:00	228	20 mg/Kg	3	1-1.5%	100%	1
Dosis del fármaco en 2 raciones / día	9:00 12:30 14:00 17:00	228	20 mg/Kg	3	1-1.5%	60% 40%	
Dosis del fármaco en 3 raciones/ día	9:00 10:30 12:30 14:30 16:30 18:30	228	20 mg/Kg	3	1-1.5%	33% 33% 33%	2
Dosis del fármaco en micro-raciones	9:00 16:30	228	20 mg/Kg	3	1-1.5%	100% (70 pulsos)	
3 Dosis del fármaco cada 8 horas	9:00 13:00 21:00 1:30 9:30 14:00	228	20 mg/Kg	3	1-1.5%	100% 100% 100%	3
Dosis por vía inyectable	·	228	20 mg/Kg	1	·	·	

(*) El tiempo de entrega del alimento medicado podría tener variación de acuerdo a la velocidad de consumo de cada uno de los estanques de prueba.

(**) % SFR estipulado es de referencia, se ajustó al consumo que tengas los grupos durante la aclimatación

Mortalidad.

No existió mortalidad durante el estudio.

Plan de Muestreo.

Una vez finalizada la primera administración de alimento medicado, se sacrificaron 12 ejemplares de cada estanque mediante golpe en la cabeza sin uso de anestesia, según los tiempos indicados en la Tabla 6. Se tomaron las muestras de sangre, mediante venipuntura caudal, utilizando jeringas de 5- 10 ml. 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 (grupo). Posterior a depositar la sangre en el tubo,

este fue agitado muy suavemente para asegurar el contacto con el anticoagulante. Luego los tubos fueron centrifugados a 4500 Rpm x 10 minutos para la obtención de plasma. Este fue separado y recolectado en 2 tubos eppendorf de 2 mL (muestra y contra muestra), previamente rotulados con el tiempo de muestreo, N° de pez, grupo, estanque y fecha de obtención de la muestra, verificando que coincidiera exactamente 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. Cabe señalar que la toma de muestras de sangre, fue ejecutada por 2 personas, demorando un tiempo aproximado de 1-2 minutos por cada muestra.

Tabla 6. Tiempo de muestreo para estudio de pauta horaria de Florfenicol, administrado por vía oral.

Muestras	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂	T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	T ₁₆	T ₁₇
Horas post-tratamiento	0	0,5	1	2	4	6	9	12	24	30	36	48	54	62	72	80	95	100
N° de animales/Tk	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
N° animales/tratamiento	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Tiempo de inicio en la toma de muestras de sangre.

Se aceptó un margen de 10 minutos de variación en el inicio del horario de la toma de muestra.

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.

Cada vez que se realizó la toma de muestras, los peces y sus restos fueron eliminados mediante el sistema de ensilaje que posee las instalaciones del centro experimental de Aquainnovo.

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 la estación experimental de Aquainnovo S.A, al Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile Santiago, bajo condiciones que permitieran mantener la cadena de frío del total de las muestras. Se utilizaron recipientes isotérmicos, cerrados y mantenidos con hielo seco o gel-packs para evitar la pérdida de la temperatura de congelación durante el transporte. El despacho fue programado en 3 envíos, correspondiente a cada lunes posterior al término de cada tanda de tratamiento.

Desvíos y/ o modificaciones del protocolo.

No hubo desvíos ni modificaciones durante el ensayo.

Validación del ensayo.

A continuación, se detallan los criterios que se establecieron para determinar cómo satisfactorio el ensayo:

- a) Que el alimento medicado alcanzara la dosis a utilizar en el estudio (Florfenicol a 20 mg/Kg) con un máximo del 10 % de variación en relación al nivel intentado.
- b) El grupo de peces a utilizar durante todo el estudio, presentaran óptimas condiciones sanitarias libres de enfermedades, antibióticos, fármacos en general y dentro del rango de peso establecido.
- c) Que los peces durante el periodo de aclimatación, tuvieran un consumo mínimo de alimento del 1 % SFR.
- d) No debió existir aplicación de químicos (desinfectantes, anestésicos, fármacos u otros) durante todo el estudio.
- e) Se debieron obtener 10 muestras como mínimo de cada grupo en todos los puntos de muestreos definidos en el presente estudio.

Registros.

Con el fin de llevar registro del estudio y de las observaciones realizadas, así como la trazabilidad del mismo, se dejó por escrito las evaluaciones y mediciones realizadas. Para esto, se utilizaron planillas diseñadas para este propósito. Todos los documentos asociados al estudio fueron archivados en la carpeta del estudio.

Informe final.

Al finalizar el estudio se elaboró un informe final que siguió el formato del presente protocolo, incluyendo las desviaciones y/o las modificaciones al protocolo, si las hubiera, resumen de registros de parámetros ambientales, mortalidad y alimentación. Este fue enviado a la empresa contratante 21 días hábiles posterior al término del ensayo.

Instrucción para el equipo de Investigación.

Sobre la base de este protocolo de estudio, fue explicado al personal que participó en la ejecución, quedando registro de un entendimiento y comprensión clara de cada uno de los ítems descritos en el presente protocolo.

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 (BPC) aplicando los principales procedimientos y prácticas mencionadas en la guía. Además, se llevó a cabo el estudio de acuerdo a las condiciones de bienestar animal que recomienda la Agencia Europea de Evaluación de Productos Medicinales (EMA, 2009) y la Directiva 2010/63/EU (Unión Europea, 2010).

b) Validación para la determinación de la concentración de florfenicol y florfenicolamina en plasma de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

Unidad Ejecutora: Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET), Universidad de Chile.

Introducción

La validación del método analítico se realizó siguiendo las siguientes recomendaciones:

- Unión Europea, Decisión de la Comisión 2002/657/CE
- FDA, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology
- NCh-ISO 17025.Of.2005

Equipamiento

- a. Balanza analítica
- b. Agitador Vortex
- c. Sonificador
- d. Centrifuga
- e. Tubos de propileno de 50 mL
- f. Bandejas de pesaje desechables.
- g. Paletas de madera para procedimientos clínicos.
- h. Filtros Millex de 0.25 μm .
- i. Viales de inyección de vidrio, ambar.
- j. Insertos desechables para viales (250 μL)
- k. Jeringas 1 mL
- l. Pizeta de 500 mL
- m. Pipeta aforada de 50 mL
- n. Micropipeta 100-1000 μL
- o. Micropipeta 10-100 μL

Reactivos y Soluciones

- p. Agua HPLC
- q. Acetonitrilo HPLC
- r. Ácido Oxálico grado P.A.
- s. Metanol HPLC

Fase Móvil: pH 4.5 \pm 0.2

Fase móvil A: Acetonitrilo grado HPLC

Fase móvil B: Ácido oxálico 0,01 M en Agua grado HPLC: Por cada 100 mL de solución, pesar 0,126 g de ácido oxálico dihidratado y luego terminar de aforar con agua HPLC. Agitar y sonicar hasta disolver completamente.

Fase móvil C: Metanol grado HPLC.

Estándares

➤ **Procedencia:**

Florfenicol (Dr. Ehrenstorfer Sigma o similar). Pureza certificada: 99.0% ± 1.0%

➤ **Forma de Preparación**

Para realizar la validación, se debe seleccionar matriz blanco para la adición de estándar de Florfenicol.

Las soluciones stock (S.S.) de florfenicol se realizó a una concentración de 10 mg/mL.

A partir de la solución stock, se prepararon las siguientes concentraciones de trabajo en la matriz (plasma sin florfenicol).

Concentración FF mg/mL	Pesaje matriz (g)	Alicuota FF (µL)
0,1	0,5	50
0,4	0,5	200
0,8	0,5	400
1,2	0,5	600
1,6	0,5	800

Procedimiento de preparación de muestra.

Por cada muestra se tomó 250 µL de plasma y se le agregó 500 µL de agua y 2 mL de acetona. Se agitó, se sonicó y se centrifugó por 3 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante era traspasado a un nuevo tubo, se le agregaban 2 mL de diclorometano y se volvía a agitar, sonicar y centrifugar durante 3 minutos a 5000 rpm. Luego, se descartaba la fase superior (agua) y la fase restante era evaporada bajo flujo de nitrógeno a un rango de temperatura de 40 a 50°C. Posteriormente, se reconstituía con 1 mL de una solución de fosfato monosódico 0,01M/metanol 80:20 y 1 mL de hexano. Finalmente, era agitada, sonicada y centrifugada durante 3 minutos a 5000 rpm, para tomar 300 µL de la fase inferior y traspasarlos a un vial de inyección.

Análisis Instrumental

➤ Condiciones instrumentales para el método analítico

Para el análisis de las muestras, se utilizó un Cromatógrafo líquido acoplado a un detector de arreglo de diodos de marca Elite LaChrom, el cual se subdivide en los siguientes módulos:

- Bomba HPLC Elite La Chrom modelo L2130
- Horno HPLC Elite La Chrom modelo L2300
- Autosampler HPLC Elite La Chrom modelo L2200
- Detector DAD Elite La Chrom modelo L2455
- Estación de trabajo con software de integración de datos EZChrom Elite Versión 3.2.1, Build 3.2.1.31.

Las condiciones Cromatográficas para el análisis de muestras se implementó según lo siguiente:

Fase móvil A: Acetonitrilo grado HPLC

Fase móvil B: Ácido oxálico 0,01 M en Agua grado HPLC: Por cada 100 mL de solución, pesar 0,126 g de ácido oxálico dihidratado y luego terminar de aforar con agua HPLC. Agitar y sonicar hasta disolver completamente.

Fase móvil C: Metanol grado HPLC.

Gradiente de fases móviles:

Tiempo (minutos)	% Acetonitrilo	% Acido Oxálico 0.01 M en Agua HPLC	% Metanol
0	10	85	5
1	10	85	5
5	25	45	30
6	10	85	5
12	10	85	5

- Flujo: 1mL/min
- Columna: Symmetry C18 5 µm x 4,6 x 250 mm, WATERS.
- Detector DAD (“*Diode Array Detector*”) con una longitud de onda para de 224 nm.
- Volumen de inyección: 20 uL.

Resultados:

Los resultados en plasma serán expresados en µg/mL.

Criterios de confirmación para muestras positivas y controles de calidad interno:

Para la aceptación de resultados de cada batch analizado, se realizaron los siguientes controles de calidad internos:

- Blanco matriz, sin presencia de interferentes al tiempo de retención de los analitos.
- Controles fortificados al nivel del punto 1 de la curva a 0.1 mg/mL. Los controles deben tener una recuperación de un 80 a 120 %.
- Curva de calibración de 5 puntos, la que debe tener un R^2 mayor o igual a 0.95.
- Tiempos de retención de los analitos en las muestras, no debe superar un 5% respecto al tiempo de retención de los estándares certificados en el batch de muestras.
- Espectro de las muestras, debe tener una similitud mayor o igual a un 90% respecto a los espectros de librería del instrumento.

Parámetros de validación de florfenicol

1. **Tiempo de retención del analito:** Se analizan 6 repeticiones de estándar certificado para evaluar tiempos de retención.
2. **Especificidad:** Se analizan 20 muestras de alimentos blancos para evaluar interferencia en la región de interés en la cual se espera la elución del analito.
3. **Límite de Detección:** Se fortifican 20 muestras de alimentos blancos a concentraciones definidas para cada analito donde se presente una relación señal ruido (rsr) de al menos 3:1. El Coeficiente de Variación % no debe superar un 25%.
4. **Límite de Cuantificación:** Al Límite de Detección seleccionado se le suma 1,64 veces la desviación estándar de los resultados obtenidos en las 20 muestras de alimentos blancos fortificados analizados previamente.
5. **Linealidad de la Curva de Calibración:** Se analizan 3 curvas de calibración en matriz fortificada, con cinco puntos cada una. Se aceptan si el Coeficiente de Correlación R^2 es mayor o igual a 0.95.
6. **Precisión (Repetitividad y Reproducibilidad):** La precisión se calcula mediante la evaluación de la repetitividad y reproducibilidad intralaboratorio, mediante 6 curvas de matriz fortificada con tres puntos de calibración para cada parámetro calculando la concentración media de cada punto. Se acepta el parámetro cuando el coeficiente de variación (CV%) de cada punto de la curva en la repetitividad, son iguales o menores al coeficiente de variación de la reproducibilidad medida.
7. **Recuperación:** Se calcula comparando curvas de estándar puro certificado, con curvas en matriz fortificada al mismo nivel de fortificación.
8. **Robustez:** Se seleccionan factores que pueden influir en el resultado final, y mediante un análisis fraccional incompleto mediante el método de Youden se determina el factor que más afecte al método analítico.

9. **Incertidumbre:** Se calcula la incertidumbre expandida del método analítico, mediante análisis estadístico multifactorial de los elementos que más afectan al resultado final.

Tabla 1. Resumen validación de método analítico para florfenicol en plasma.

RESUMEN		VALIDACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
1.	TIEMPO DE RETENCIÓN (tr)	9.600 min	CV: 5% variación
2.	ESPECIFICIDAD	No hay interferentes en el tr del analito	tr sin interferencias
3.	LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)	0.1 mg/g	rsr 2:1 o 3:1; CV de las 20 repe. \leq 25%
4.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)	0.112 mg/g	rsr mínimo: 10:1
5.	LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	$R^2 > 0,98$	Condiciones de Linealidad: CD (R^2) $\geq 0,95$; CV de las pendientes $\leq 25\%$
7.	PRECISIÓN (intralaboratorio)	DS = 0,0000032 (mg/g)	DS de la reproducibilidad intralab. (precisión)
7.a.	REPETITIVIDAD (CV%)	0.1 mg/g: 13,2% ; 0.2 mg/g: 14,7% ; 0.4 mg/g: 4,6%	CV a la mitad o igual al CV de la reproducibilidad
7.b.	REPRODUCIBILIDAD INTRALAB. (CV%)	0.1 mg/g: 19,5% ; 0.2 mg/g: 19,1% ; 0.4 mg/g: 8.4%	1-10 mg/g: CV $\leq 35\%$; 100 mg/g: CV 23% ; 1.000 mg/g: CV 16%
8.	ROBUSTEZ. Factor que más afecta la robustez del método	DS = 0,00000002 Método robusto. Medidas precautorias: centrifugado a 5000 rpm.	Método robusto: DS robustez < DS reproducibilidad. Buscar factor del método que más afecta la robustez
9.	INCERTIDUMBRE U	0.1 mg/g: 14.7% ; 0.2 mg/g: 10.1% ; 0.4 mg/g: 7,2%	Menor a un 35%.

c) Determinación de las concentraciones plasmáticas de florfenicol administrado vía alimento

Unidad Ejecutora: Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET), Universidad de Chile.

Análisis de las Muestras:

Las muestras fueron 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. Se analizó florfenicol + florfenicol amina (metabolito activo).

Análisis estadístico

1. Para cada tiempo de muestreo se calculó 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.
2. Mediante un análisis de varianzas (ANDEVA) se determinó si existían diferencias significativas del comportamiento de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo en los diferentes grupos.
3. Los parámetros farmacocinéticos C_{max} y ABC se calcularon utilizando el programa computacional WinNonlin (Version 6.3; Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).
4. El parámetro farmacodinámico utilizado fue la CMI clínica. Para determinar la CMI clínica se utilizó un gráfico de barra agrupando los valores de la MIC individual de 87 cepas de *P. salmonis*. De acuerdo a las recomendaciones del EUCAST (2017) la CMI clínica se definió a dos diluciones inmediatamente inferior a la CMI obtenida experimentalmente.
5. Se determinaron los Índices de Eficacia mediante las siguientes relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD): ABC/CMI y $\text{T}>\text{CMI}$.

RESULTADOS

OBJETIVO 1: DEFINIR LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA 90 (MIC90) DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL FRENTE A *P. salmonis*.

a) Establecimiento de una colección de aislados de *Piscirickettsia salmonis*, agente causal de la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS)

Identificación bacteriana.

La identificación bacteriana se realizó mediante la tinción Gram (Whitman, 2004), Inmunofluorescencia para *Piscirickettsia salmonis* (ETECMA-PT-IN-02) y reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para *Piscirickettsia salmonis* (Corbeil *et al.*, 2003).

Distribución geográfica e información epidemiológica general.

La tabla 1 muestra la información de los aislados de *Piscirickettsia salmonis* consideradas en el marco de este proyecto. Las filas resaltadas en rojo corresponden a cepas que fueron despachadas y recepcionadas en el Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Chile.

Tabla 1. Número de aislados, número de caso, especie de aislamiento, año de aislamiento, tipo de agua, región, área y barrio de aislados de *Piscirickettsia salmonis* consideradas en el proyecto.

Número	Número de caso	Especie de aislamiento	Año de aislamiento	Tipo de agua	Región	Área	Barrio
1	9386	Salmón del Atlántico	2012	Mar	X	Chiloé	8
2	9734	Trucha arcoíris	2013	Mar	X	Chiloé	12A
3	5289	Salmón del Atlántico	2014	Mar	XI	Melinka	22B
4	5348	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Puerto Montt	1
5	5463	Salmón del Atlántico	2014	Mar	XI	Melinka	21B
6	5503	Trucha arcoíris	2014	Mar	XI	Melinka	17B
7	5595	Salmón del Atlántico	2014	Mar	XI	Melinka	18C
8	5593	Salmón del Atlántico	2014	Mar	XI	Puerto Aysen	26B
9	5636	Salmón del Atlántico	2014	Mar	XI	Melinka	31B
10	6055	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Chiloé	2
11	6220	Salmón coho	2014	Estuario	X	E. Reloncaví	No aplica
12	6253	Trucha arcoíris	2014	Estuario	X	E. Reloncaví	1
13	6439	Salmón coho	2014	Estuario	X	E. Reloncaví	1
14	6808	Trucha arcoíris	2014	Mar	X	E. Reloncaví	1
15	6858	Salmón coho	2014	Mar	X	Calbuco	2
16	4699	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Calbuco	2
17	11808	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Chiloé	9A
18	11531	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Chiloé	9A
19	6896	Salmón del Atlántico	2014	Mar	XI	Melinka	18D
20	12371	Salmón del Atlántico	2014	Mar	XI	Melinka	21B
21	12564	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Chiloé	3B
22	12565	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Chiloé	15

23	12601	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Melinka	18D
24	7398	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Puerto Montt	3B
25	5449	Salmón del Atlántico	2014	Mar	X	Chiloé	9A
26	9108	Salmón del Atlántico	2015	Piscicultura	X	Puerto Montt	No aplica
27	842	Trucha arcoíris	2015	Mar	X	Chiloé	9A
28	860	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Chiloé	11
29	815	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Chiloé	11
30	9268	Salmón coho	2015	Mar	X	Calbuco	3A
31	9178	Trucha arcoíris	2015	Mar	XI	Melinka	21C
32	9004	Salmón coho	2015	Mar	X	Calbuco	2
33	8942	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Calbuco	3B
34	10267	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Calbuco	2
35	10113	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Puerto Aysén	27
36	10114	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Chiloé	9C
37	10135	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Calbuco	2
38	10255	Salmón del Atlántico	2015	Mar	XI	Puerto Aysén	15
39	10462	Salmón del Atlántico	2015	Mar	XI	Melinka	21B
40	10054	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Puerto Montt	2
41	10246	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Chiloé	7
42	10197	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Puerto Montt	2
43	10002	Salmón del Atlántico	2015	Mar	X	Chiloé	10A
44	10309	Salmón coho	2015	Mar	X	Puerto Montt	3B
45	10143	Trucha arcoíris	2015	Mar	XI	Puerto Aysén	18B
46	10693	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aysén	28C
47	10514	Salmón del Atlántico	2016	Mar	X	Chiloé	10A

48	10329	Salmón coho	2016	Mar	X	Chiloé	10A
49	15986	Salmón del Atlántico	2016	Mar	X	Puerto Montt	2
50	PA2492	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aysén	26B
51	PA2493	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aysén	26B
52	PA2494	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aysén	26B
53	11152	Salmón coho	2016	Mar	X	Hornopiren	1
54	11209	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aguirre	33
55	11210	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aguirre	33
56	PA2855	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aysén	28A
57	PA2920	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aysen	28A
58	PA2273	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Melinka	21B
59	PA2192	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Melinka	21B
60	17738	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Melinka	21B
61	11236	Salmón coho	2016	Mar	X	Calbuco	2
62	11216	Salmón coho	2016	Mar	X	Chiloé	7
63	11330	Salmón coho	2016	Mar	X	Chiloé	11
64	11259	Salmón coho	2016	Mar	X	Hornopiren	17B
65	11297	Salmón coho	2016	Mar	X	Hornopiren	17B
66	PA3045	Salmón del Atlántico	2016	Mar	XI	Puerto Aysén	26B

Continuación Tabla 1.

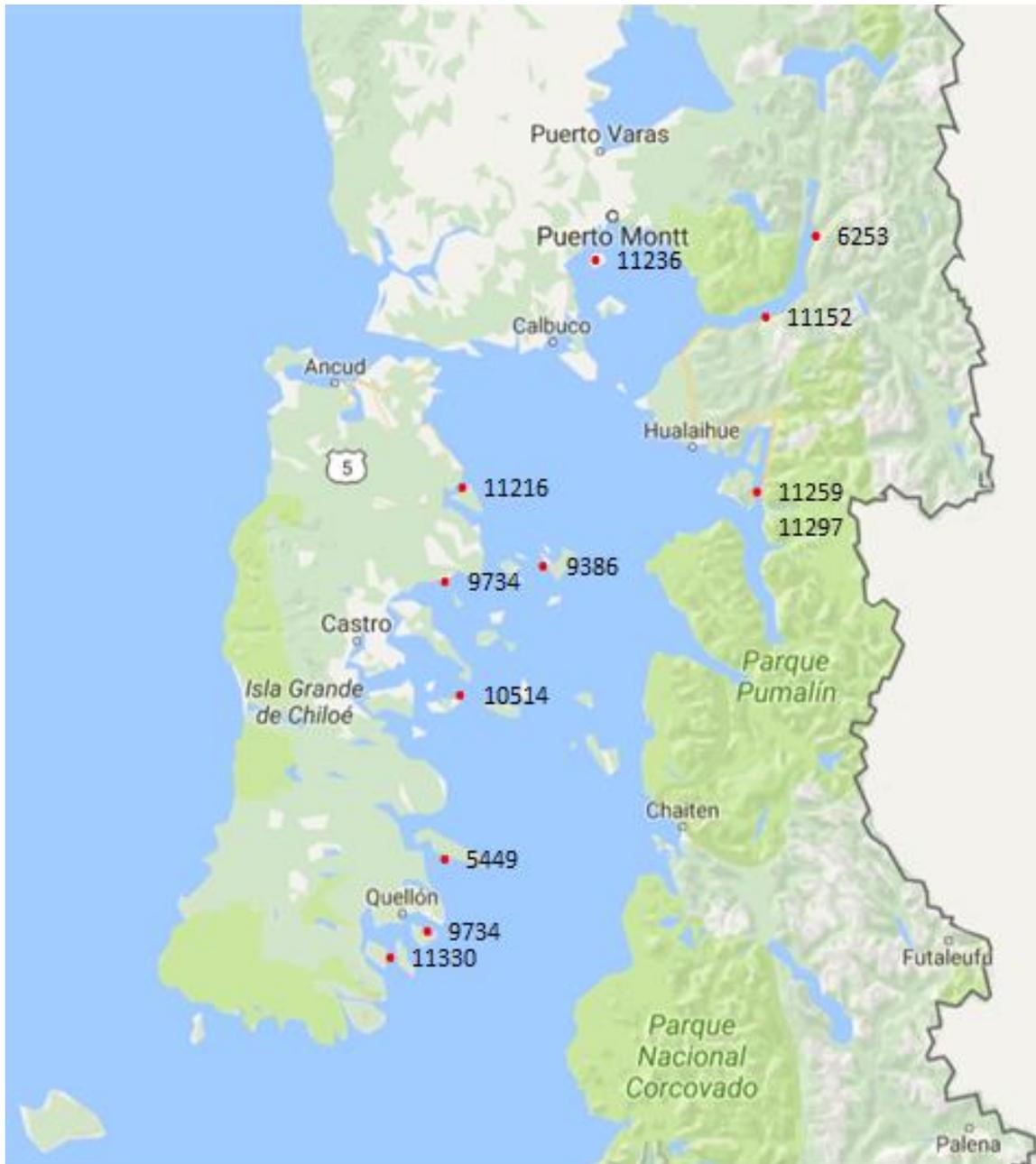


Figura 1. Ubicación geográfica de las cepas de *Piscirickettsia salmonis* pertenecientes a la región de Los Lagos, consideradas en el marco del proyecto, de aislamiento y reactivación enviadas a la fecha al Laboratorio de Farmacología Veterinaria FARMAVET - Universidad de Chile.



Figura 2. Ubicación geográfica de las cepas de *Piscirickettsia salmonis* perteneciente a la región de Aysén, consideradas en el marco del proyecto, de aislamiento y reactivación enviadas a la fecha al Laboratorio de Farmacología Veterinaria FARMAVET - Universidad de Chile.

b) Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *Piscirickettsia salmonis* genotipificadas frente a Oxitetraciclina y Florfenicol

1.- Resultados de la concentración mínima inhibitoria de la Cepa *E. coli* ATCC 22925 como control del Método:

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de la cepa *E. coli* ATCC 22925 para oxitetraciclina y florfenicol.

CMI Oxitetraciclina (ug/ml)		CMI Florfenicol (ug/ml)	
Macrodilución	Microdilución	Macrodilución	Microdilución
2	2	8	8

Nota: La CMI de *E. coli* ATCC 22925 para oxitetraciclina fue 2 µg/ml y para florfenicol 8 µg/ml.

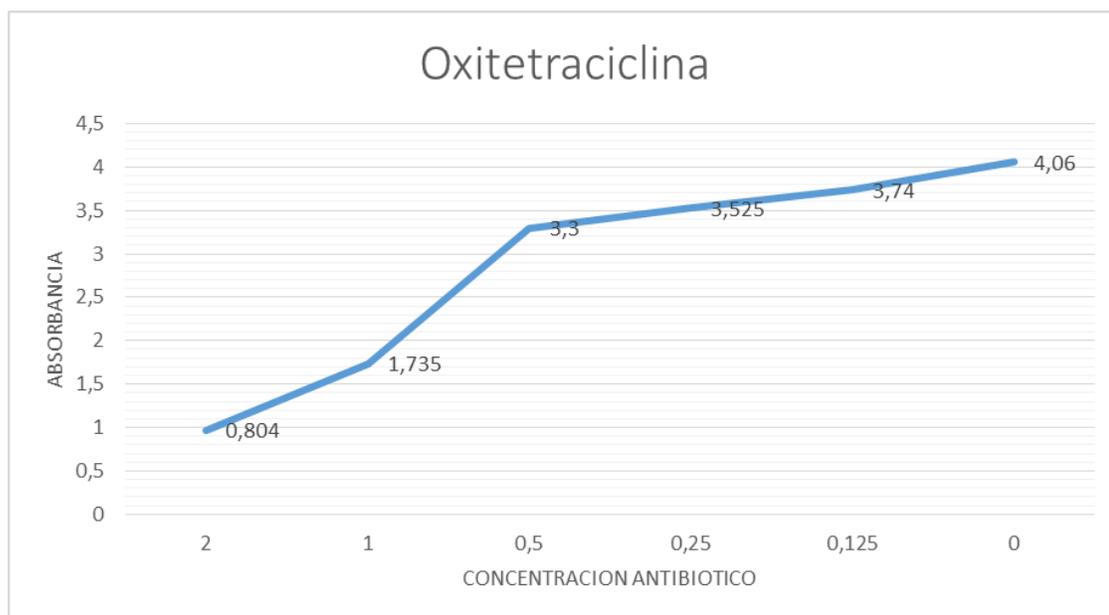


Gráfico 1: Absorbancia versus concentración de oxitetraciclina de la cepa *E. coli* ATCC. Concentración de antibiótico en µg/ml.

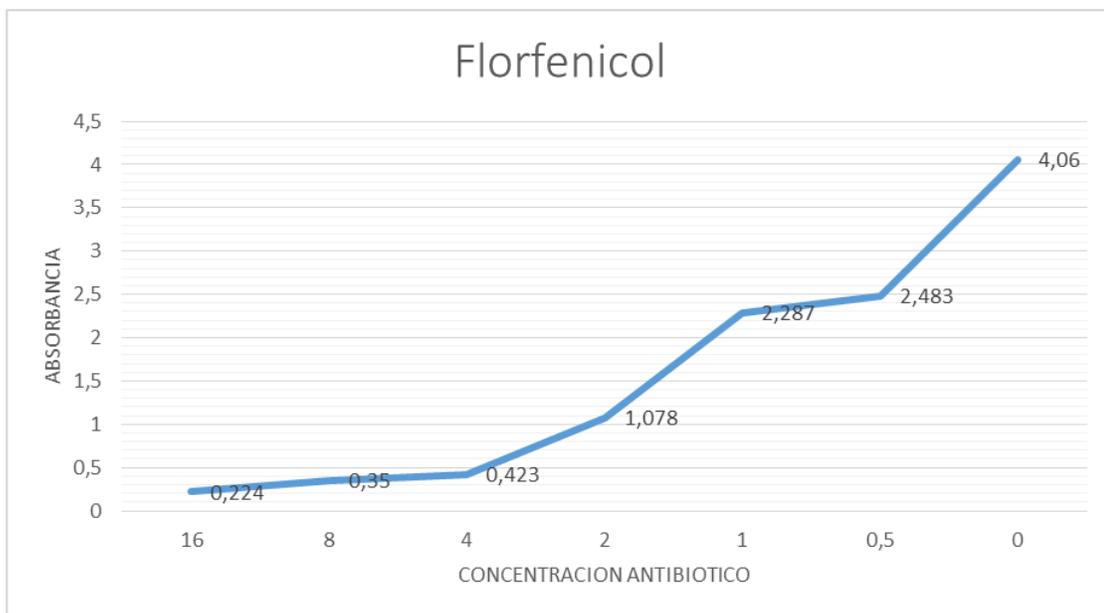


Gráfico 2. Absorbancia versus concentración de florfenicol de la cepa *E. coli* ATCC. Concentración de antibiótico en $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 2. Curva de Crecimiento *E. coli* ATCC 25922. Se detallan las horas de incubación y la absorbancia obtenida en cada medición y su promedio.

Horas de incubación	Absorbancia a 600		Promedio
0	0,06	0,056	0,058
1	0,082	0,095	0,0885
2	0,174	0,167	0,1705
3	0,289	0,291	0,29
4	0,460	0,439	0,4495
5	0,934	0,891	0,9125
6	2,023	1,809	1,916
10	4,023	4,102	4,102
12	4,071	4,094	4,0825
24	4,060	4,026	4,043

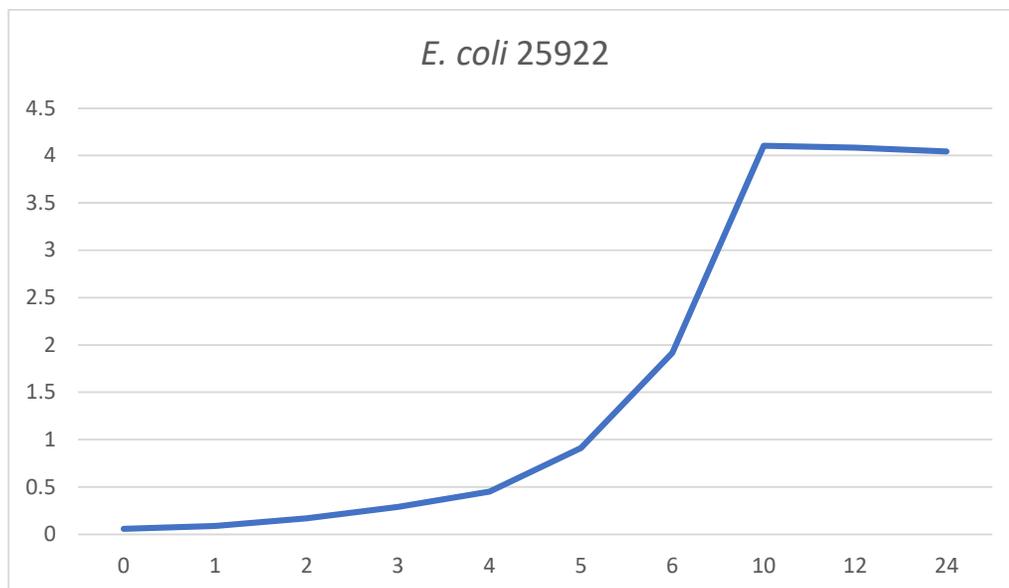


Grafico 3. Absorbancia (eje Y) versus horas (eje X) para el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 3. Curva de Crecimiento para cepa de *P. salmonis* L89. Se detallan los días de incubación y la absorbancia obtenida en cada medición y su promedio.

Días de incubación	Absorbancia a 600		Promedio
0	0,056	0,06	0,058
2	0,06	0,064	0,062
4	0,116	0,123	0,1195
6	0,206	0,198	0,202
8	0,309	0,287	0,298
10	0,389	0,369	0,379
12	0,416	0,432	0,424
14	0,445	0,471	0,458
16	0,598	0,536	0,567

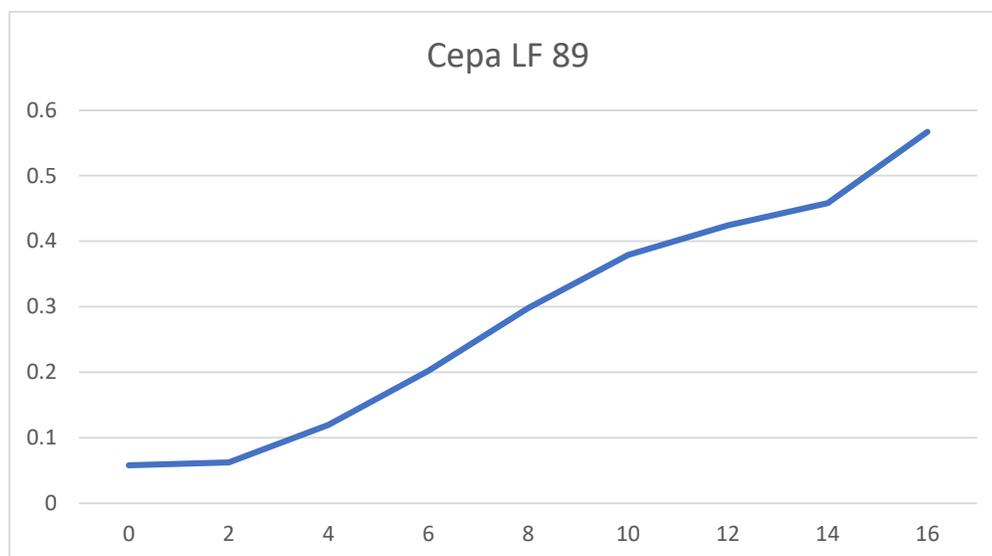


Grafico 4. Absorbancia (eje Y) versus días (eje X) de crecimiento de la cepa L89.

2.- Resultados de las absorbancias de la cepa de *P. salmonis* L89 LVV.

Tabla 4. Absorbancias obtenidas para distintas concentraciones de oxitetraciclina.

Oxitetraciclina	<i>Cepa LF-89 LVV</i>		
Concentración Antibiótico (µg/ml)	Absorbancias al día 14 de incubación		media
128	0,000	0,000	0,000
64	0,000	0,000	0,000
32	0,000	0,000	0,000
16	0,000	0,000	0,000
8	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000
1	0,000	0,000	0,000
0,5	0,000	0,000	0,000
0,25	0,000	0,000	0,000
0,125	0,000	0,000	0,000
0,06	0,000	0,000	0,000
0,03	0,499	0,501	0,500
0,0125	0,513	0,521	0,517
0	0,556	0,561	0,559

Tabla 5. Absorbancias obtenidas para distintas concentraciones de florfenicol.

Florfenicol Concentración Antibiótico (µg/ml)	Cepa <i>LF-89 LVV</i>		
	Absorbancias a los 14 días		media
128	0,000	0,000	0,000
64	0,000	0,000	0,000
32	0,000	0,000	0,000
16	0,000	0,000	0,000
8	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000
1	0,000	0,000	0,000
0,5	0,000	0,000	0,000
0,25	0,000	0,000	0,000
0,125	0,000	0,000	0,000
0,06	0,000	0,000	0,000
0,03	0,498	0,0486	0,492
0,0125	0,522	0,526	0,524
0	0,567	0,569	0,568

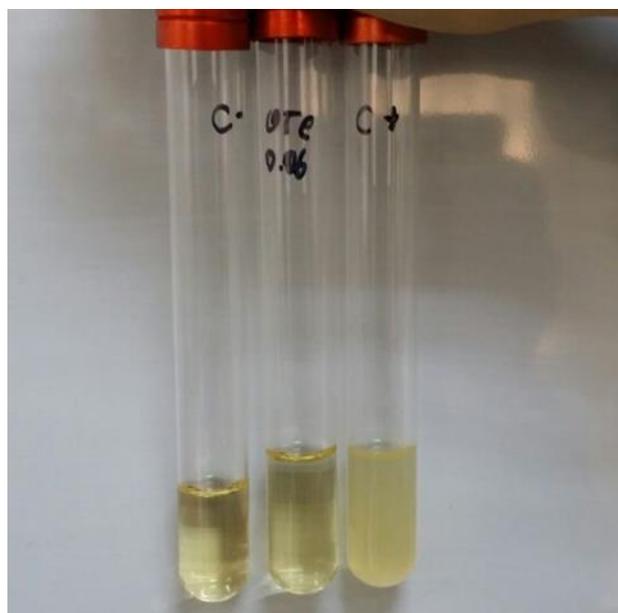


Figura 1. Foto de evaluación visual de la CMI por método de macrodilución de la cepa *P. salmonis* L89 LVV frente a las distintas concentraciones de oxitetraciclina: **C-: control negativo, OTC 0.06: tubo con concentración de oxitetraciclina de 0,06 µg/ml, C+: tubo control positivo.**

3.- Resultados de absorbancia obtenidos en las cepas de *Piscirickettsia salmonis* CRG1, CRG2, INTA y LF89 light, donadas por el INTA.

Tabla 6. Absorbancias obtenidas para distintas concentraciones de oxitetraciclina.

Oxitetraciclina	Cepa: CRG1	CRG2	INTA	LF-89 light
Concentración Antibiótico (µg/ml)	Absorbancias a los 14 días			
128	0	0	0	0
64	0	0	0	0
32	0	0	0	0
16	0	0	0	0
8	0	0	0	0
4	0	0	0	0
2	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0
0,03	0,602	0,521	0,997	0,994
0,0125	0,648	0,538	1,028	1,000
0	0,657	0,565	1,084	1,026

Tabla 7. Absorbancias obtenidas para distintas concentraciones de florfenicol.

Florfenicol	Cepa: CRG1	CRG2	INTA	LF-89 light
Concentración antibiótico (µg/ml)	Absorbancias a los 14 días			
128	0	0	0	0
64	0	0	0	0
32	0	0	0	0
16	0	0	0	0
8	0	0	0	0
4	0	0	0	0
2	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0
0,03	0,603	0,616	0,901	0,723
0	0,628	0,642	0,938	0,777

4.- Resultados obtenidos en las cepas de *Psirickettsia salmonis* EM-90, TGIM-11, SGIM-12, LF-89 ATCC donadas por la Universidad de Valparaíso.

Tabla 8. Absorbancias obtenidas para distintas concentraciones de oxitetraciclina.

Oxitetraciclina	Cepa: EM-90	TGIM-11	SGIM-12	LF-89
Concentración Antibiótico (µg/ml)	Absorbancias a los 14 días			
128	0	0	0	0
64	0	0	0	0
32	0	0	0	0
16	0	0	0	0
8	0	0	0	0
4	0	0	0	0
2	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0
0,03	1,624	0,496	1,106	1,098
0,0125	1,689	0,521	1,200	1,189
0	1,773	0,596	1,264	1,250

Tabla 9. Absorbancias obtenidas para distintas concentraciones de florfenicol.

Florfenicol	Cepas: EM-90	TGIM-11	SGIM-12	LF-89
Concentración Antibiótico (µg/ml)	Absorbancias a los 14 días			
128	0	0	0	0
64	0	0	0	0
32	0	0	0	0
16	0	0	0	0
8	0	0	0	0
4	0	0	0	0
2	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0
0,03	1,698	1,389	1,267	1,497
0	1,772	1,438	1,312	1,533

Tabla 10. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) frente a drogas de referencia de oxitetraciclina y florfenicol obtenidas para cada una de las distintas cepas de *P. salmonis* analizadas.

Resumen de Resultados		
Código del Aislado	Antimicrobianos	CMI (µg/ml)
CRG1	Oxitetraciclina	0,06
CRG1	Florfenicol	0,06
CRG2	Oxitetraciclina	0,06
CRG2	Florfenicol	0,06
INTA	Oxitetraciclina	0,06
INTA	Florfenicol	0,06
L89 LIGHT	Oxitetraciclina	0,06
L89 LIGHT	Florfenicol	0,06
EM90	Oxitetraciclina	0,06
EM90	Florfenicol	0,06
TGIM11	Oxitetraciclina	0,06
TGIM11	Florfenicol	0,06
SGIM12	Oxitetraciclina	0,06
SGIM12	Florfenicol	0,06
LF89	Oxitetraciclina	0,06
LF89	Florfenicol	0,06
L89 LVV	Oxitetraciclina	0,06
L89 LVV	Florfenicol	0,06

c) **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) clínica de aislados de *P. salmonis* frente a Oxitetraciclina y Florfenicol**

De acuerdo a las recomendaciones del EUCAST la Concentración Mínima Inhibitoria Clínica definida para *Piscirickettsia salmonis* frente a oxitetraciclina es $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ y para florfenicol $\leq 1 \mu\text{g/ml}$. Los puntos de corte para la CMI Clínica se definieron 2 diluciones inferiores a la última concentración definida experimentalmente (Figuras 1 y 2).

En las figuras 1 y 2 también se señala la distribución de los diferentes valores de CMI. En estas figuras se puede observar que la distribución cumple los requerimientos del EUCAST, ya que abarca 3 y 4 diluciones para florfenicol y oxitetraciclina, respectivamente.

En el Anexo 2 se señala CMI obtenida para cada cepa.

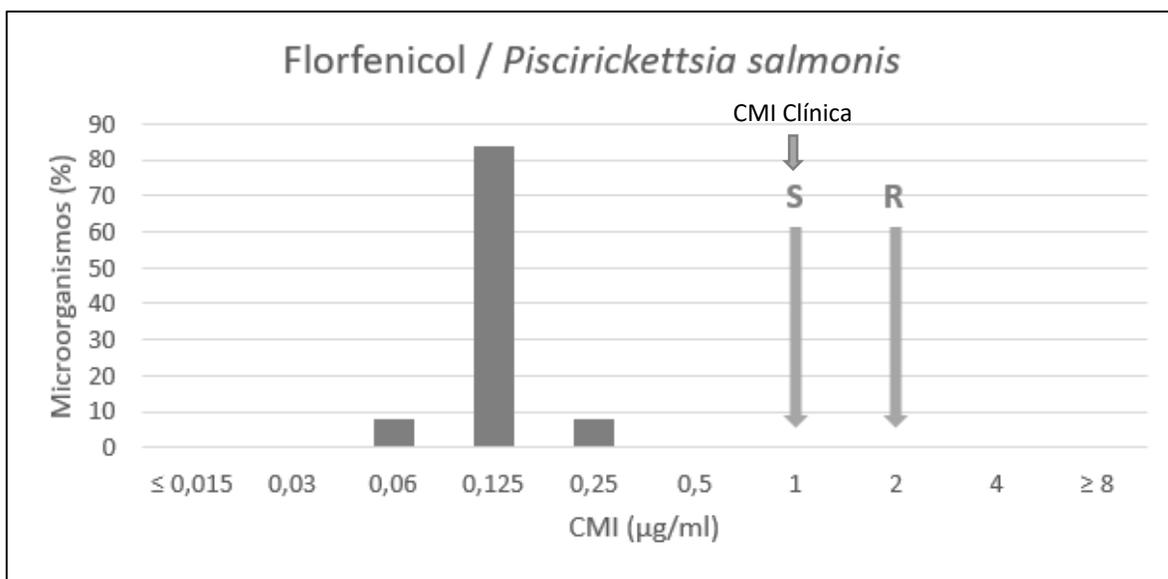


Figura 1. CMI Clínica para florfenicol frente a *P. salmonis*.

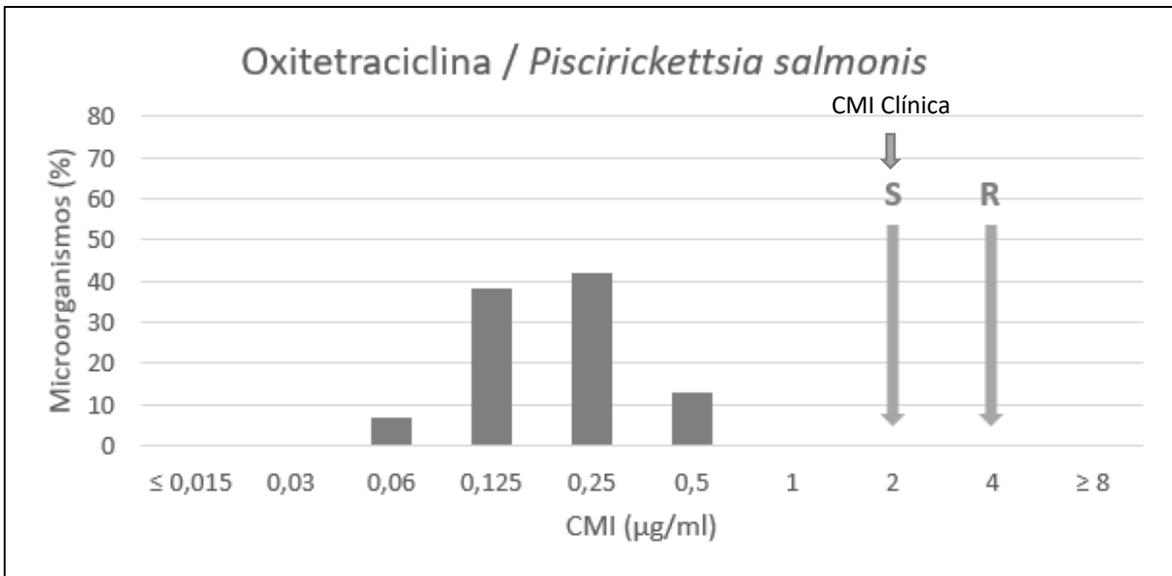


Figura 2. CMI Clínica para oxitetraciclina frente a *P. salmonis*.

OBJETIVO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LOS ALIMENTOS MEDICADOS SOBRE LAS DIFERENTES PREMEZCLAS DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL

a) Evaluación de la potencia microbiológica de premezclas de Oxitetraciclina y Florfenicol frente a *Piscirickettsia salmonis*

Para el cálculo de potencia del antibiótico en la premezcla, se consideró la absorbancia de la concentración más alta en la que se observa crecimiento bacteriano.

De acuerdo a esto se utiliza la siguiente formula:

$$X = \frac{A \times B}{C}$$

Donde:

X= potencia del antibiótico en la premezcla

A= Absorbancia del antibiótico de referencia

B= 100

C= Absorbancia de la premezcla.

Concentración Mínima Inhibitoria para la cepa *E. coli* ATCC 25922 para macro y microdilución frente a oxitetraciclina y florfenicol, como antibióticos de referencia (drogas certificadas):

- CMI Oxitetraciclina: 2 ug/mL.
- CMI Florfenicol: 8 ug/mL.

Concentración Mínima Inhibitoria para la cepa *P. salmonis* L89 para macro y microdilución frente a oxitetraciclina y florfenicol, como antibióticos de referencia (drogas certificadas):

- CMI Oxitetraciclina: 0,06 ug/mL.
- CMI Florfenicol: 0,06 ug/mL.

1.- Resultados de los promedios de las absorbancias obtenidas para el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y *P. salmonis* L89 frente a distintas concentraciones de los antibióticos de referencia:

Tabla 1: Absorbancias de *E. coli* ATCC 25922 frente a oxitetraciclina de referencia.

Concentraciones (µg/ml) Antibiótico de referencia	Absorbancia
4	0,284
2	0,29
1	0,632
0,5	1,996
0,25	3,294
0,125	3,532
0,06	3,742
0	4,06

Tabla 2: Absorbancias de *E. coli* ATCC 25922 frente a florfenicol de referencia.

Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) Antibiótico de referencia	Absorbancia
4	0,646
2	0,722
1	1,856
0,5	2,716
0,25	2,92
0,125	2,934
0,06	3,186
0	4,06

Tabla 3: Absorbancias de *P. salmonis* L89 frente a oxitetraciclina de referencia.

Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) Antibiótico de referencia	Absorbancia
1	0,0
0,5	0,0
0,25	0,0
0,125	0,0
0,06	0,0
0,03	0,510
0,0125	0,517
0	0,728

Tabla 4: Absorbancias frente a florfenicol de referencia.

Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) Antibiótico de referencia	Absorbancia
1	0,0
0,5	0,0
0,25	0,0
0,125	0,0
0,06	0,0
0,03	0,490
0,0125	0,524
0	0,701

2.- Resultados de los promedios de las absorbancias obtenidas para el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y *P. salmonis* L89 frente a las 13 premezclas de antibióticos (PM).

Tabla 5: Absorbancias de *E. coli* ATCC 25922 frente a las premezclas de oxitetraciclina.

Concentración (µg/ml)	Absorbancias para cada Premezcla de oxitetraciclina					
	03 a	Cto1	Otc2	Otc4	Otc5	Otc6
0	4,06	4,06	4,06	4,02	4,06	4,02
0,06	4,1	3,6	3,8	4,1	3,9	3,9
0,125	3,9	3,4	3,7	3,8	3,6	3,7
0,250	3,8	3,2	3,2	3,8	3,4	3,1
0,5	3,7	2,3	2,8	3,6	2,7	2,8
1	2,2	0,9	1,0	2,1	2,0	2,0
2	0,9	0,4	0,5	0,8	0,9	0,9
4	0,3	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3

Tabla 6. Absorbancias de *E. coli* ATCC 25922 frente a las premezclas de florfenicol.

Concentración (µg/ml)	Absorbancias para cada Premezcla de florfenicol													
	01 a	02 a	04 a	06 a	07 a	08 a	09 a	Ff1	Ff2	Ff3	Ff4	Ff5	Ff6	Ff7
0	4,06	4,06	4,06	4,06	4,06	4,06	4,06	4,06	4,06	4,06	4,05	4,06	4,06	4,06
0,06	3,9	3,9	4,0	3,5	3,9	3,9	3,3	4,1	3,7	3,1	3,7	3,4	3,9	4,0
0,125	3,8	3,8	3,5	3,2	3,4	3,9	3,3	3,7	3,5	3,1	3,7	3,2	3,5	3,5
0,250	3,7	3,7	3,4	3,1	2,8	3,5	3,1	3,2	3,4	3,1	3,6	3,0	3,5	3,2
0,5	3,5	3,5	3,4	3,1	2,6	2,9	2,3	3,1	2,9	2,7	3,4	3,0	2,9	3,1
1	2,8	2,8	2,4	2,1	1,7	1,6	1,6	2,3	2,1	1,6	2,7	2,1	1,7	2,3
2	1,2	1,2	1,4	1,2	1,5	1,4	1,4	1,9	0,6	0,6	1,2	1,2	1,4	1,9
4	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6

Tabla 7: Absorbancias de *P. salmonis* L89 frente a las premezclas de oxitetraciclina.

Concentración (µg/ml)	Absorbancias para cada Premezcla de oxitetraciclina					
	03 a	Cto1	Otc2	Otc4	Otc5	Otc6
0	0,728	0,728	0,728	0,723	0,728	0,728
0,03	0,728	0,708	0,719	0,723	0,706	0,718
0,06	0,017	0,023	0,017	0,018	0,023	0,018
0,125	0,006	0,003	0,005	0,06	0,003	0,05
0,250	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,01
0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 8: Absorbancias de *P. salmonis* L89 frente a las premezclas de florfenicol.

Conc. (µg/ml)	Absorbancias para cada Premezcla de florfenicol													
	01 a	02 a	04 a	06 a	07 a	08 a	09 a	Ff1	Ff2	Ff3	Ff4	Ff5	Ff6	Ff7
0	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701
0,03	0,571	0,561	0,552	0,531	0,522	0,532	0,533	0,532	0,531	0,530	0,571	0,530	0,530	0,552
0,06	0,012	0,019	0,015	0,021	0,013	0,013	0,014	0,024	0,008	0,008	0,019	0,021	0,013	0,024
0,125	0,005	0,004	0,002	0,003	0,007	0,007	0,007	0,004	0,001	0,002	0,004	0,002	0,007	0,004
0,250	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002
0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

3.- Resultados de la potencia microbiológica de los antibióticos de las diferentes premezclas expresados como porcentaje del antibiótico de referencia frente a *E. coli* ATCC 25922 y *P. salmonis* L89.

Se analizaron 14 premezclas de florfenicol y 6 de oxitetraciclina de diferentes lotes y laboratorios.

Para el caso de florfenicol la potencia microbiológica frente a las dos bacterias analizadas fueron iguales o superiores al 85% (Tabla 9).

Para el caso de oxitetraciclina la potencia microbiológica frente a las dos bacterias analizadas estuvo entre un 70 y un 75% (Tabla 10).

Tabla 9. Potencia microbiológica de Florfenicol

Código Premezcla	Potencia microbiológica	Potencia microbiológica
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. salmonis</i> L89
01a	86,5%	85%
02a	88,4%	86%
04a	89%	89%
06a	96%	92%
07a	100%	93%
08a	100%	92%
09a	100%	92%
Ff1	100%	95%
Ff2	100%	92%
Ff3	100%	96%
Ff4	88,3%	86%
Ff5	96%	92%
Ff6	100%	92%
Ff7	100%	95%

Tabla 10. Potencia microbiológica de Oxitetraciclina

Código Premezcla	Potencia microbiológica	Potencia microbiológica
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. salmonis</i> L89
03a	75,5%	70%
Cto1	75,5%	72%
Otc2	75,5%	71%
Otc4	76,1%	70%
Otc5	75,7%	74,7%
Otc6	75%	72%

ANÁLISIS DE RESULTADOS

- ✓ Ambas metodologías entregan los mismos valores de CIM tanto para *E. coli* ATCC 25922 como para *P. salmonis* L89.
- ✓ La CMI puede variar un valor, mayor o menor, con respecto a las drogas certificadas, por lo que las variaciones entre las premezclas evaluadas, en el caso de *E. coli* ATCC 25922, están dentro de lo esperado. Se puede concluir que en el caso de *E. coli* ATCC25922 en las condiciones del estudio, tanto para oxitetraciclina como para florfenicol, las premezclas estarían bien formuladas.
- ✓ Para el caso de la inhibición de los antibióticos frente a *P. salmonis* L89, 2 de las premezclas compuestas por oxitetraciclina y 1 de las compuestas por florfenicol aumentaron sus valores de CMI respecto de las drogas certificadas, indicando que existe un problema en la formulación donde existe menor concentración del antibiótico.

b) Verificación del porcentaje de pureza de oxitetraciclina y florfenicol declarado en las premezclas

Para definir la pureza se consideró el área bajo la curva del peak cromatográfico (entregado por el software de integración) de cada muestra.

Para obtener los resultados se siguen los siguientes pasos:

1. El área obtenida de cada repetición de una premezcla, se comparó con el promedio de las áreas cromatográficas obtenidas del estándar certificado.
2. Se obtiene el % de pureza considerando que todas las muestras se encuentran a una concentración equivalente (1 mg/mL), es decir, teóricamente todas poseen una pureza cercana al 100%. Para esto se utilizó la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{Pureza equivalente a 1 mg/mL} \\ & = 100 * \text{Area muestra} / \text{Promedio Areas Estandar Certificado} \end{aligned}$$

3. Se corrige la pureza en relación al porcentaje declarado en cada premezcla, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza Real \%} = (\text{Pureza declarada (\%)} * \text{Pureza equivalente a 1 mg/mL}) / 100$$

En la tabla 1 y 2, se señalan los porcentajes de pureza declarada y calculada en las premezclas de oxitetraciclina y florfenicol respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de pureza declarada y calculada para las premezclas de oxitetraciclina.

% de pureza declarada	Muestra	Pureza Calculada % n = 1	Pureza Calculada % n=2	Pureza Calculada % n=3	% de pureza calculada (promedio)	Desviación de la pureza entre la concentración declarada y calculada (%)
80%	08 A	69.52	68.28	69.87	69.22	-13.4
80%	07 A	77.96	75.83	71.11	74.96	-6.3
80%	03 A	78.46	74.08	70.28	74.27	-7.16
80%	17 A	82.87	73.71	73.43	76.67	-4.16
80%	24 A	80.30	80.20	80.10	80.20	+0.25
80%	07 B	77.98	77.80	78.10	77.96	-2.55
80%	09 A	68.60	68.60	68.60	68.60	-14.25
80%	6 A	83.40	83.30	83.20	83.30	+4.12

Tabla 2. Porcentaje de pureza declarada y calculada para las premezclas de florfenicol.

% de pureza declarada	Muestra	Pureza Calculada % n = 1	Pureza Calculada % n=2	Pureza Calculada % n=3	% de pureza calculada (promedio)	Desviación de la pureza entre la concentración declarada y calculada (%)
50%	22 ^a	49.92	49.13	48.86	49.30	-1.4
50%	19 ^a	47.77	46.97	47.51	47.41	-5.18
50%	18 ^a	53.78	49.63	52.15	51.86	+3.72
50%	12 ^a	49.70	50.14	49.56	49.80	-0.4
50%	11 ^a	47.20	47.37	48.57	47.71	-4.58
50%	10 ^a	50.39	52.94	48.36	50.56	+1.12
50%	09 ^a	49.76	48.58	48.81	49.05	-1.9
50%	06 ^a	49.46	48.35	47.78	48.53	-2.94
50%	04 ^a	50.86	51.21	50.93	51.00	+2.00
50%	02 ^a	54.92	53.54	57.86	55.44	+10.88
50%	07 ^a	49.70	49.60	49.70	49.60	-0.8
50%	08 ^a	50.76	50.20	50.60	50.52	+1.04
50%	09 ^a	47.20	47.30	47.30	47.26	-5.48
50%	13B	49.00	48.70	48.90	48.86	-2.28
50%	14B	50.20	50.10	50.10	50.13	+0.26
50%	15B	53.60	53.50	53.50	53.53	+7.06
50%	16B	53.50	53.40	53.40	53.43	+6.86
50%	17B	49.20	49.10	49.20	48.16	-3.68
50%	18B	49.60	49.50	49.60	49.56	-0.88
50%	19B	47.80	47.90	47.90	47.86	-4.28

En el gráfico 1 se muestra el porcentaje pureza declarado y el porcentaje de pureza calculado para las premezclas de oxitetraciclina.

En el grafico 2 se muestra el porcentaje de pureza declarado y el porcentaje de pureza calculado para las premezclas de florfenicol.

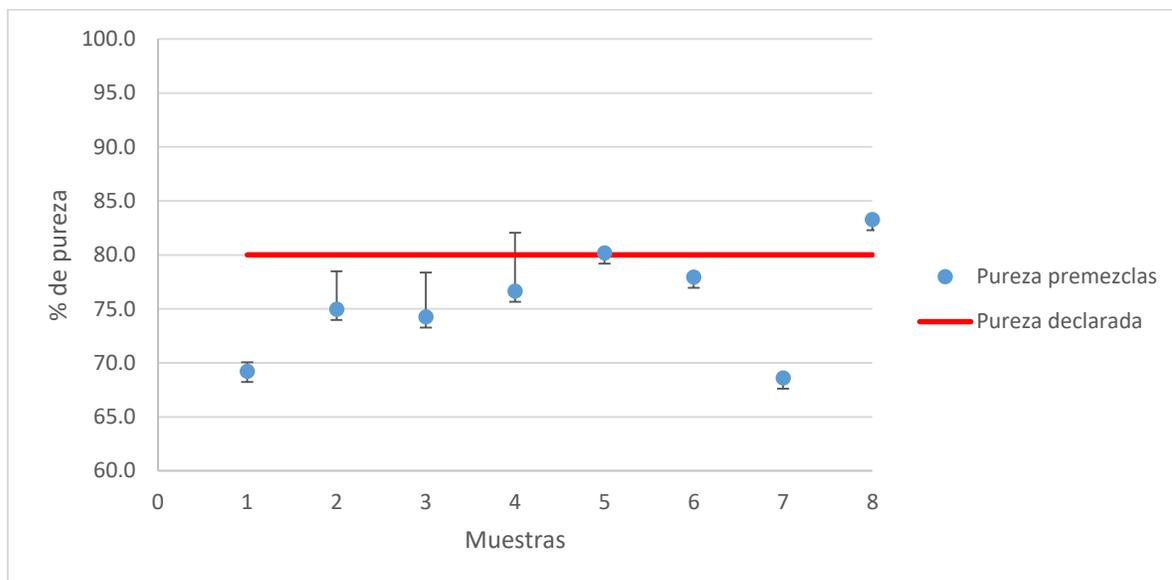


Gráfico 1. Comparativa de porcentaje promedio de purezas declaradas y calculadas para Oxitetraciclina, con su respectiva DE.

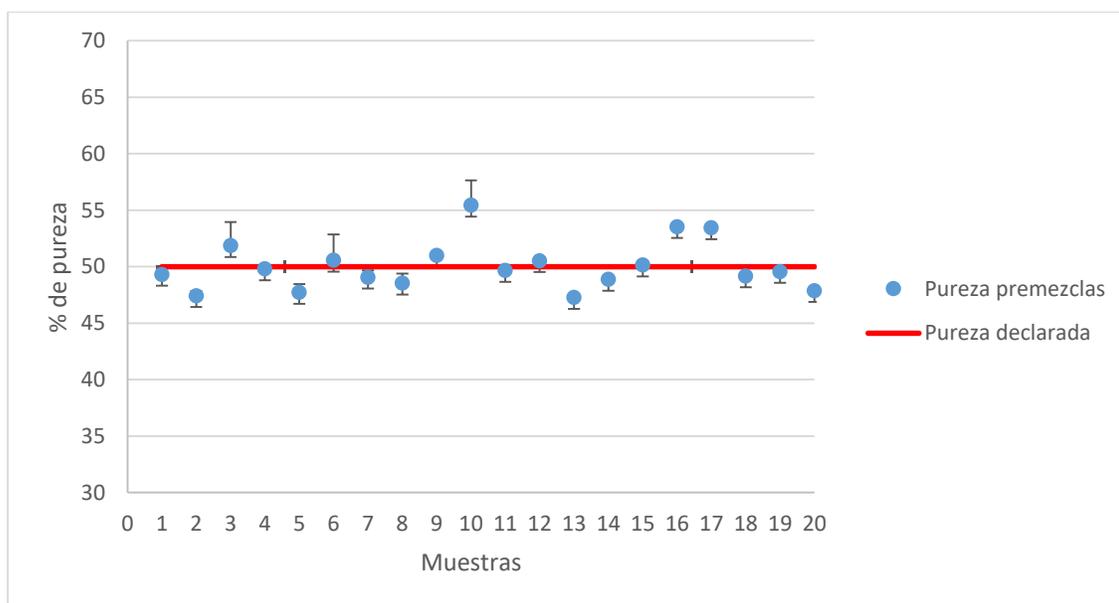


Gráfico 2. Comparativa de porcentaje promedio de purezas declaradas y calculadas para Florfenicol, con su respectiva DE.

Análisis de los resultados

Para el caso de las premezclas de oxitetraciclina, solo un 50% de las muestras están dentro de los rangos de aceptabilidad (la diferencia entre el valor declarado y el calculado es menor al 5%). Por el contrario, un 50% de las muestras se salen del rango de aceptabilidad, declarando purezas menores al declarado.

Para el caso de las premezclas de florfenicol, un 75% de las muestras están dentro del rango de aceptabilidad.

En las premezclas cuyos valores de pureza están fuera de los rangos de aceptabilidad, la pureza evaluada por el laboratorio, fue mayor a la declarada en el caso de florfenicol y menor a la declarada en el caso de oxitetraciclina.

c) Verificación de la estabilidad, concentración y homogeneidad de florfenicol y oxitetraciclina en los alimentos medicados

➤ **Resultados de la estabilidad de alimento medicado con florfenicol u oxitetraciclina**

En las Tablas 1 y 2 se muestran los resultados de estabilidad de cada lote de alimento medicado con florfenicol y oxitetraciclina respectivamente. En estos se puede observar que el CV entre los resultados de cada tiempo de muestreo no superó el 7%.

Tabla 1. Estabilidad de florfenicol en el alimento.

Código Muestra	Concentraciones Promedio en Diferentes Tiempos de Muestreo (mg/g)					Promedio	D.E.	C.V. (%)
	Tiempo 0 (promedio n=3)	Tiempo 1 (promedio n=3)	Tiempo 2 (promedio n=3)	Tiempo 3 (promedio n=3)	Tiempo 4 (promedio n=3)			
28A	2,1	2,4	2,3	2,1	2,2	2,22	0,13	5,87
74B	1,5	1,5	1,3	1,5	1,5	1,46	0,09	6,13
54A	2,6	2,9	2,8	3	2,9	2,84	0,15	5,34
77A	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,62	0,04	2,76
135A	2,8	2,8	3,1	2,9	2,7	2,86	0,15	5,30
145A	2,6	2,8	2,7	3	2,7	2,76	0,15	5,49
68A	6,7	6,5	6,3	6,8	6,9	6,64	0,24	3,63

Tabla 2. Estabilidad de oxitetraciclina en el alimento.

Código Muestra	Concentraciones Promedio en Diferentes Tiempos de Muestreo (mg/g)					Promedio	D.E.	C.V. (%)
	Tiempo 0 (promedio n=3)	Tiempo 1 (promedio n=3)	Tiempo 2 (promedio n=3)	Tiempo 3 (promedio n=3)	Tiempo 4 (promedio n=3)			
33A	6,49	6,34	7,00	6,3	6,12	6,314	0,13	2,09
17B	8,79	5,97	5,95	5,95	5,83	6,098	0,39	6,41
49A	8,19	8,20	7,29	7,23	7,2	7,622	0,52	6,88
50A	8,00	7,99	8,07	7,92	7,91	7,978	0,07	0,82
67A	9,31	9,60	9,84	9,25	9,21	9,442	0,27	2,86
68A	9,02	9,31	9,33	9,24	9,05	9,19	0,15	1,59
27A	11,96	11,57	11,56	11,25	11,36	11,54	0,27	2,35

➤ **Resultados de concentración y homogeneidad de florfenicol y oxitetraciclina en alimentos medicados**

Alimentos medicados con florfenicol

1.- Diferencia entre la cantidad declarada y la real

Del total de muestras analizadas e independiente del calibre del pellet, 32 presentaron cantidades inferiores a las declaradas y 8 cantidades superiores a las declaradas.

De las 8 muestras **con cantidades superiores a las declaradas**, en 3 de ellas la diferencia fue menor al 10% y en 5 la diferencia fluctuó entre un 11 y un 18.5%.

De las 32 muestras **con cantidades inferiores a las declaradas** las diferencias por número de muestras fueron las siguientes:

- Diferencia menor al 10% : 14 muestras
- Diferencia entre un 10 y un 15% : 3 muestras
- Diferencia entre un 15 a un 21% : 15 muestras

De acuerdo a lo señalado, del total de muestras de alimento con florfenicol (40) la distribución de las muestras entre el valor declarado y el real es el siguiente:

- ✓ **En un 42.5% de las muestras hubo una diferencia entre el valor declarado y el real menor o igual a 10%.**
- ✓ **En un 12.5% de las muestras con cantidades superiores a las declaradas la diferencia fue mayor al 10%**
- ✓ **En un 45% de las muestras con cantidades inferiores a las declarada la diferencia fue mayor al 10%**

2.- Homogeneidad

En todas las muestras el CV fue menor al 8%

En las Tablas 1 – 2 y 3 se muestran los resultados de florfenicol.

Alimentos medicados con oxitetraciclina

1.- Diferencia entre la cantidad declarada y la real

Del total de muestras analizadas los resultados fueron los siguientes:

- ✓ **4 muestras presentaron cantidades menores a las declaradas. Las diferencias encontradas fluctuaron entre un 9 y un 18%.**
- ✓ **3 muestras presentaron cantidades mayores a las declaradas. Las diferencias encontradas fluctuaron entre un 16 y un 20%.**

2.- Homogeneidad

En todas las muestras el CV fue menor al 7%

En la Tabla 4 se muestran los resultados de oxitetraciclina.

Tabla 1. Diferencia (%) entre la cantidad declarada y la cantidad real y homogeneidad de florfenicol en los alimentos medicados calibre 12.

Código muestra	Calibre	Cantidad declarada (kg/Tn)	Cantidad real (kg/Tn)	% Diferencia	Homogeneidad CV%
24A	12	5,00	3,9	-20,1	4,9
34A	12	3,94	3,1	-19,3	5,5
37A	12	4,00	3,2	-20,0	4,4
73A	12	4,10	3,5	-14,6	7,1
76A	12	3,28	3,2	-2,4	4,9
91A	12	3,91	3,2	-18,2	5,3
95A	12	3,91	3,1	-20,7	4,0
100A	12	2,63	2,5	-4,9	3,6
63A	12	3,70	3,0	-18,9	5,6
70A	12	3,69	3,5	-5,2	3,4

Tabla 2. Diferencia (%) entre la cantidad declarada y la cantidad real y homogeneidad de florfenicol en los alimentos medicados calibre 9.

Código muestra	Calibre	Cantidad declarada (kg/Tn)	Cantidad real (kg/Tn)	% Diferencia	Homogeneidad CV%
25A	9	2,35	2,1	-10,6	2,1
29A	9	2,66	2,5	-6,0	2,2
30A	9	2,59	2,5	-3,5	0,6
32A	9	2,66	2,5	-6,0	2,7
35A	9	2,66	2,6	-2,3	5,9
36A	9	1,89	2,2	16,4	1,7
39A	9	4,09	3,9	-4,6	1,2
40A	9	2,59	2,2	-15,1	4,7
42A	9	2,59	2,4	-7,3	6,2
43A	9	2,61	2,5	-4,2	3,4
44A	9	2,61	2,4	-8,0	4,8
78A	9	4,12	3,2	-22,3	7,3
79A	9	2,35	2,4	2,1	2,4
80A	9	4,99	5,2	4,2	0,5
90A	9	2,59	2,6	0,4	2,0
92A	9	1,81	2,1	16,0	3,2
97A	9	2,60	2,3	-11,5	5,1
99A	9	2,59	2,2	-15,1	2,3
59A	9	2,65	2,4	-9,4	1,5
60A	9	2,67	2,5	-6,4	1,1
62A	9	4,99	4,2	-15,8	6,7
71A	9	2,64	2,6	-1,5	2,4
72A	9	3,49	2,9	-16,9	3,9

Tabla 3. Diferencia (%) entre la cantidad declarada y la cantidad real y homogeneidad de florfenicol en los alimentos medicados calibre 6,4 y 4,1 mm.

Código muestra	Calibre	Cantidad declarada (kg/Tn)	Cantidad real (kg/Tn)	Diferencia (%)	Homogeneidad CV%
28A	6,4	1,89	2,1	11,1	1,3
74A	6,4	1,32	1,5	13,6	1,4
54A	4,1	3,54	2,9	-18,1	0,7
77A	4,1	1,35	1,6	18,5	3
135A	4,1	3,4	2,8	-17,6	0,9
145A	4,1	3,4	2,7	-20,6	0,7
68A	4,1	8,07	6,5	-19,5	5,3

Tabla 4. Diferencia (%) entre la cantidad declarada y la cantidad real y homogeneidad de oxitetraciclina en los alimentos medicados calibres 4,1 mm (n=7).

Código	Calibre	Cantidad declarada (kg/Tn)	Cantidad real (kg/Tn)	Diferencia (%)	Homogeneidad CV%
17B	4,1	10	8,2	-18,0	5,1
49A	4,1	8,07	8	-0,9	6,4
50A	4,1	8,07	8	-0,9	0,5
67A	4,1	8,07	9,5	17,7	2,7
68A	4,1	8,07	9,4	16,5	3,4
27A	4,1	13,51	11,7	-13,4	1,7
33A	4,1	5,1	6,1	19,6	4,5

Para analizar los resultados se tomó como referencia el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la fabricación, la comercialización y el uso de piensos medicados. Este reglamento, coge las recomendaciones de la FAO, organismo intergubernamental que además solicita a todos los países armonizar al respecto y señala:

1.- Que se acepta una tolerancia del 10% en la dispersión de la cantidad de antimicrobiano/tonelada de alimento declarado en la etiqueta.

2.- Los fabricantes deben garantizar la distribución homogénea del medicamento veterinario en el pienso, con el fin de asegurar la eficacia de los tratamientos. Señala además que se deben establecer criterios para la incorporación homogénea de los medicamentos, dejando abierto las reglamentaciones para evaluar la homogeneidad de los antibióticos en los piensos medicados.

Al respecto, actualmente en Chile como en otros países, las empresas que elaboran pienso deben realizar test de homogeneidad después de determinado el proceso de mezclado de los ingredientes de la formulación. El objetivo es asegurarse una adecuada homogeneidad de los nutrientes, con el fin de garantizar una absorción completa de estos. En este test se acepta una dispersión de un 5 a un 15% (CV).

En el caso de las empresas elaboradoras de alimento medicado, el antibiótico lo incorporan en la etapa de aceitado, razón por la cual el test de homogeneidad realizado después del proceso de mezclado, no avala la homogeneidad del antibiótico en el alimento. Es por eso que se hace necesario incorporar a la brevedad posible un criterio de aceptación de homogeneidad, el cual también podría tener una dispersión de un 5% a un 15%.

3.- Para los antimicrobianos, se recomienda como límite máximo de transferencia un 1% del principio activo del último lote medicado.

4.- Los piensos medicados, deben estar sometidos a un control regular, incluida el control mediante pruebas de laboratorio, para comprobar que cumplen con lo establecido por los organismos reguladores correspondientes.

d) Propuesta de elaboración de alimentos con concentraciones pre establecidas de antimicrobianos: Alimentos medicados prefabricados a concentraciones fijas y su uso en la industria en fase de engorda en mar

Al abordar el informe sobre uso de antimicrobianos del 2016 podemos evidenciar que la Regiones X y XI presentan el mayor consumo de antibióticos (94.6%) correspondiendo a un 32.4% para la X Región y 62.2% para la XI región. En ambas regiones piscirickettsiosis corresponde a la principal causa de uso de estos fármacos.

Si abordamos la ubicación de las plantas que producen los alimentos medicados, estas se sitúan desde la X Región hacia el norte, lo que claramente limita los tiempos de despacho de productos hacia las regiones australes. Importante consideración que se debe tener si vemos que la región de Aysén representó un 62.2% del consumo de antibióticos el año 2016.

Ubicación de plantas productoras de alimento para salmones:

EWOS: Coronel, VIII Región.

Desde Coronel el alimento se traslada hasta Puerto Montt (Región de Los Lagos). A través de los puertos Detroit y en menor medida Oxcean, son repartidos en los centros de engorda.

SKREETING: Osorno, X Región

Desde Osorno se despachan a Puerto Montt al terminal portuario Pargua de Skretting.

BIOMAR: Castro y Pargua, X Región.

Desde Pargua y Castro el alimento es trasladado hasta los puntos de embarque que son los puertos comerciales en Puerto Montt, Calbuco, Dalcahue y Quellón. Desde estos puertos vía marítima se trasladan a los distintos centros de cultivo.

SALMOFOOD: Castro, X Región.

Para los alimentos de engorda, utilizan puertos de embarques como Cabo Froward en Calbuco, Empormontt en Castro y el Muelle SPQ en Quellón. Todos ubicados en la Región de Los Lagos.

Considerando que *P. salmonis* representa un problema para las Regiones X y XI debido a su alta patogenicidad, debe ser afrontada de forma rápida frente a un diagnóstico positivo, lo que incluye iniciar lo antes posible la terapia antimicrobiana. Dentro de este contexto lo más importante es la llegada oportuna del alimento medicado.

De acuerdo a lo señalado por los Médicos veterinarios, en promedio la llegada de un alimento medicado a un centro de cultivo va de 7 a 10 días desde la emisión de la Prescripción Médico Veterinaria, sin considerar contratiempos como son principalmente las condiciones climáticas que muchas veces pueden retrasar el despacho y arribo del alimento medicado. Estos tiempos se acortan entre 3 a 5 días promedio si consideramos utilizar un producto prefabricado y

disponible para despacho inmediato.

Por otro lado, el Servicio Nacional de Pesca emitió en el año 2015 la resolución exenta N°8228 que “Aprueba Programa Sanitario General Para Uso De Antimicrobianos En La Salmonicultura y Otros Peces De Cultivo”. Esta resolución tiene como objetivo, “definir los lineamientos y las medidas para mejorar la eficacia de los tratamientos y reducir los riesgos asociados a la emergencia de resistencia de microorganismos a los antimicrobianos, con el fin de proteger la sanidad y el bienestar animal, junto con garantizar la inocuidad de los alimentos derivados de la salmonicultura y otros peces de cultivo.”

Buscando mejorar la eficacia, en la resolución se autoriza a las plantas de alimento elaborar y mantener stock de alimento medicado, siempre que cumplan con ciertas condiciones:

- La elaboración deberá estar respaldada por una prescripción médico veterinaria (PMV) emitida por un médico veterinario perteneciente a la planta o a la empresa de cultivo. La planta deberá informar a Sernapesca el nombre y RUT de los médicos veterinarios habilitados.
- El alimento se deberá almacenar en instalaciones acondicionadas para ello, de uso único o compartido, cuya ubicación deberá ser informada al Servicio.
- La planta deberá mantener un control de stock actualizado disponible para inspecciones de Sernapesca. El rotulado del alimento medicado deberá incluir la fecha de caducidad del mismo, teniendo en consideración antecedentes de estabilidad del producto.
- La planta podrá liberar y distribuir el alimento ante la presentación de una PMV emitida por el médico veterinario de la empresa de cultivo, en conformidad a lo señalado en la normativa.

Dentro de este contexto, diferentes plantas cuentan con stock de alimentos medicados con diferentes niveles de inclusión de los antibióticos en relación a los calibres de los pellets.

De acuerdo a la opinión de los Médicos Veterinarios, estos alimentos medicados con niveles de inclusión de antibióticos preestablecidos, no siempre se pueden adaptar en relación a los SFR que ellos deben considerar en relación al peso de los peces en el momento de iniciar un tratamiento.

Así también los Médicos Veterinarios señalan que los stocks de alimento medicado con inclusiones de antibiótico preestablecidas, deben realizarse en concordancia con la empresa salmonera que adquiere el producto, ya que de la forma en que está establecido en la actualidad, la selección del antibiótico queda a criterio de la empresa de alimento medicado.

La forma en la que el Médico Veterinario adapta la cantidad de alimento a administrar a los peces de manera de cumplir con las concentraciones adecuadas es mediante el SFR a administrar. Esto se puede profundizar mediante un ejemplo:

Requerimos realizar un tratamiento con urgencia y la planta de alimento nos informa que cuenta con un alimento medicado en base a una dieta que llamaremos SALAR FLOR que utilizó florfenicol al 50% y el antibiótico se adquirió al laboratorio FARMACHILE que se encuentra con

una tasa de inclusión de 6 kg/tonelada.

$$6\text{kg/ton (florfenicol al 50\%)} = 3000 \text{ mg de producto activo/Kg alimento}$$

Si mi intención es administrar una dosis de 20mg/kg de florfenicol, requiero realizar el siguiente calculo:

$$\text{(Dosis de producto a administrar (mg/kg) / Tasa de inclusión producto activo (mg/kg)) * 100 = tasa de consumo SFR}$$

$$\text{(20 (mg/kg) / 3000 (mg/kg)) * 100 = 0.67\% (SFR)}$$

Con este dato de SFR puedo dirigirme a mi tabla Excel y calcular el tratamiento para la dosis y tasa de inclusión indicada.

Dado el crecimiento de los peces y los desafíos que se presentan en las distintas épocas del año y en base a lo visto anteriormente, sería recomendable establecer que al menos respecto a los calibres de alimentos que se administran para los pesos sobre el kilo, si o si se deberían existir alimentos medicados prefabricados donde se observa la mayor problemática.

Como podemos ver la autorización dada por el Servicio Nacional de Pesca para poder contar con alimentos medicados prefabricados es una buena herramienta. Sin embargo, para poder obtener el máximo beneficio se requiere que cada empresa de alimento pueda reunirse con las empresas productoras en forma periódica para poder establecer criterios que fortalecen la uniformidad y la discusión de cómo se administran los tratamientos. Establecer un 2% a 3% como base de alimentos prefabricados es un valor prudente pensando en la diversidad de criterios que cada profesional tiene a la hora de administrar un tratamiento.

Finalmente, respecto al producto farmacéutico que se administra, por el momento solo florfenicol sería el adecuado para considerar en dietas prefabricadas debido a lo antes expuesto. Mientras no exista un medicamento que asegure tiempos de liberación acotados y que pueda ser utilizado sobre el kilo de peso solo será necesario considerar este producto para dietas prefabricadas.

OBJETIVO 3: COMPARAR Y EVALUAR MEDIANTE ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD LA RELACIÓN ENTRE LA LIBERACIÓN Y DISOLUCIÓN DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL A NIVEL INTESTINAL CON LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LOS DIFERENTES ALIMENTOS MEDICADOS, ETAPA 1: DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE FLORFENICOL Y OXITETRACICLINA DESDE ALIMENTOS MEDICADOS PARA PECES.

3.1. Influencia de las características del medio de disolución en la liberación de florfenicol

3.1.1. Muestra 04 B

Las tablas siguientes muestran los perfiles de disolución en los 4 medios de disolución ensayados y los correspondientes análisis de los modelos de disolución.

Tabla 1. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 04B a pH 2.

Muestra 04B	pH 2									
Temperatura	10 °C									
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)	
	% disuelto									
0,25	17,62	12,34	20,35	15,46	18,99	22,62	17,90	3,6455	20,37	
0,5	23,09	20,97	24,79	16,86	22,77	25,36	22,31	3,0911	13,86	
1	34,29	30,00	29,18	21,53	28,96	31,86	29,30	4,3015	14,68	
2	57,81	51,14	40,54	31,23	38,53	41,61	43,48	9,4935	21,84	
3	77,72	69,09	48,93	36,80	49,58	51,79	55,65	14,9674	26,89	
4	91,46	84,23	56,75	41,77	46,42	42,79	60,57	21,9035	36,16	
5	107,18	96,45	65,51	31,18	45,66	49,33	65,88	30,0899	45,67	
6	118,59	107,19	66,42	55,94	56,33	65,79	78,38	27,3435	34,89	
7	125,10	91,62	76,70	57,94	63,64	75,92	81,82	24,2127	29,59	
9	148,19	142,33	79,69	64,13	77,63	81,51	98,91	36,4651	36,87	

Tabla 2. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 04B a pH 2.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	53,711	0,996	15,199	0,970	0,232	0,837	0,303	0,893
Muestra 2	48,133	0,958	13,641	0,936	0,240	0,800	0,297	0,864
Muestra 3	25,288	0,990	7,116	0,955	0,154	0,876	0,182	0,907
Muestra 4	19,418	0,894	5,591	0,902	0,159	0,858	0,171	0,880
Muestra 5	20,991	0,941	6,013	0,939	0,142	0,869	0,163	0,901
Muestra 6	22,861	0,912	6,623	0,931	0,140	0,893	0,167	0,913
Promedio	31,734	0,948	9,031	0,939	0,178	0,855	0,214	0,893
DS	15,095	0,041	4,236	0,023	0,046	0,033	0,067	0,018
CV (%)	47,57	4,35	46,90	2,47	25,76	3,84	31,40	2,05

Tabla 3. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 04B a pH 4.

Muestra 04B	pH 4									
Temperatura	10 °C									
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)	
	% disuelto									
0,25	2,61	2,51	2,15	2,73	2,65	2,29	2,49	0,2246	9,02	
0,5	3,58	3,62	3,08	3,29	3,34	3,05	3,33	0,2428	7,30	
1	5,87	5,95	5,05	5,13	6,13	4,84	5,49	0,5495	10,00	
2	8,27	8,76	7,54	7,21	9,30	6,96	8,01	0,9213	11,51	
3	9,79	12,94	10,19	8,25	12,25	8,47	10,32	1,9265	18,67	
4	9,79	14,87	11,30	10,06	14,11	10,82	11,82	2,1460	18,15	
5	12,18	16,01	13,34	12,61	16,95	12,20	13,88	2,0784	14,97	
6	13,95	18,27	14,83	13,30	19,71	13,96	15,67	2,6551	16,94	
7	14,41	20,47	14,35	15,03	21,28	14,98	16,75	3,2148	19,19	
9	16,86	23,34	18,07	16,51	24,17	16,93	19,31	3,4895	18,07	

Tabla 4. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 04B a pH 4.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	5,554	0,988	1,564	0,954	0,188	0,810	0,124	0,869
Muestra 2	8,478	0,995	2,396	0,967	0,234	0,818	0,164	0,881
Muestra 3	6,314	0,991	1,772	0,950	0,218	0,801	0,142	0,863
Muestra 4	5,723	0,989	1,627	0,973	0,199	0,865	0,131	0,912
Muestra 5	8,910	0,994	2,531	0,976	0,240	0,831	0,170	0,895
Muestra 6	6,036	0,995	1,711	0,973	0,215	0,845	0,139	0,900
Promedio	6,836	0,992	1,934	0,966	0,215	0,828	0,145	0,887
DS	1,469	0,003	0,419	0,011	0,020	0,024	0,018	0,019
CV (%)	21,49	0,32	21,66	1,14	9,18	2,85	12,52	2,13

Tabla 5. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 04B a pH 7,4.

Muestra 04B	pH 7,4								
Temperatura	10 °C								
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)
	% disuelto								
0,25	3,40	3,44	4,13	4,01	3,91	3,89	3,80	0,3042	8,01
0,5	5,90	5,23	7,37	7,15	7,05	6,76	6,58	0,8338	12,68
1	8,83	8,34	10,67	10,54	10,76	10,25	9,90	1,0449	10,56
2	13,32	13,18	16,86	16,26	16,93	17,85	15,73	1,9874	12,63
3	16,91	15,42	21,30	20,40	19,83	20,64	19,08	2,3552	12,34
4	18,83	17,95	24,49	23,40	24,11	23,34	22,02	2,8565	12,97
5	20,56	19,28	27,11	25,53	26,62	25,49	24,10	3,3225	13,79
6	21,55	19,94	29,92	28,17	29,15	28,37	26,18	4,2899	16,38
7	22,24	20,28	31,98	35,71	30,95	29,69	28,47	5,9721	20,97
9	25,64	22,94	36,07	33,84	36,26	33,65	31,40	5,6770	18,08

Tabla 6. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 04B a pH 7,4.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	8,809	0,984	2,417	0,902	0,193	0,735	0,146	0,800
Muestra 2	7,912	0,971	2,152	0,873	0,186	0,722	0,137	0,778
Muestra 3	12,848	0,998	3,580	0,943	0,212	0,773	0,176	0,843
Muestra 4	12,705	0,978	3,549	0,929	0,214	0,778	0,177	0,844
Muestra 5	12,795	0,998	3,554	0,950	0,215	0,772	0,177	0,846
Muestra 6	11,902	0,990	3,289	0,920	0,209	0,744	0,170	0,813
Promedio	11,162	0,986	3,090	0,919	0,205	0,754	0,164	0,821
DS	2,215	0,011	0,639	0,028	0,012	0,024	0,018	0,028
CV (%)	19,85	1,12	20,66	3,10	6,02	3,12	10,91	3,44

Tabla 7. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 04B a pH 7,4 + LSS.

Muestra 04B	pH 7,4 LSS								
Temperatura	10 °C								
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)
	% disuelto								
0,25	3,01	3,12	3,61	4,14	3,81	3,76	3,58	0,4315	12,07
0,5	5,71	4,25	4,52	6,01	5,39	7,23	5,52	1,0809	19,59
1	7,04	8,23	7,43	10,73	8,07	9,43	8,49	1,3671	16,11
2	11,84	10,91	9,71	15,63	14,91	13,73	12,79	2,3396	18,29
3	18,11	13,49	12,63	17,13	14,41	16,30	15,34	2,1660	14,12
4	19,53	17,85	12,98	19,80	16,01	18,14	17,38	2,5518	14,68
5	18,52	19,04	16,31	20,96	17,12	19,32	18,54	1,6558	8,93
6	20,07	21,04	14,97	30,92	21,59	21,37	21,66	5,1670	23,86
7	25,04	20,79	14,74	24,70	23,37	22,31	21,83	3,8086	17,45
9	26,39	24,09	15,99	26,96	25,50	24,70	23,94	4,0325	16,84

Tabla 8. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 04B a pH 7,4 + LSS.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	9,448	0,964	2,620	0,903	0,213	0,756	0,159	0,816
Muestra 2	8,666	0,986	2,404	0,924	0,211	0,771	0,154	0,832
Muestra 3	5,323	0,919	1,423	0,799	0,154	0,706	0,106	0,742
Muestra 4	9,927	0,914	2,720	0,835	0,191	0,731	0,151	0,780
Muestra 5	8,609	0,970	2,412	0,926	0,192	0,783	0,145	0,841
Muestra 6	8,130	0,986	2,236	0,909	0,174	0,735	0,133	0,803
Promedio	8,350	0,956	2,303	0,883	0,189	0,747	0,141	0,802
DS	1,617	0,032	0,464	0,053	0,022	0,029	0,019	0,037
CV (%)	19,36	3,37	20,14	5,96	11,80	3,82	13,75	4,56

Tabla 9. Valores promedio de los perfiles de disolución de la muestra 04B en los cuatro medios de disolución.

Muestra 04B				
Temperatura	10°C			
Tiempo (h)	pH 2	pH 4	pH 7,4	pH 7,4 +LSS
	% disuelto			
0,25	17,90	2,49	3,80	3,58
0,5	22,31	3,33	6,58	5,52
1	29,30	5,49	9,90	8,49
2	43,48	8,01	15,73	12,79
3	55,65	10,32	19,08	15,34
4	60,57	11,82	22,02	17,38
5	65,88	13,88	24,10	18,54
6	78,38	15,67	26,18	21,66
7	81,82	16,75	28,47	21,83
9	98,91	19,31	31,40	23,94

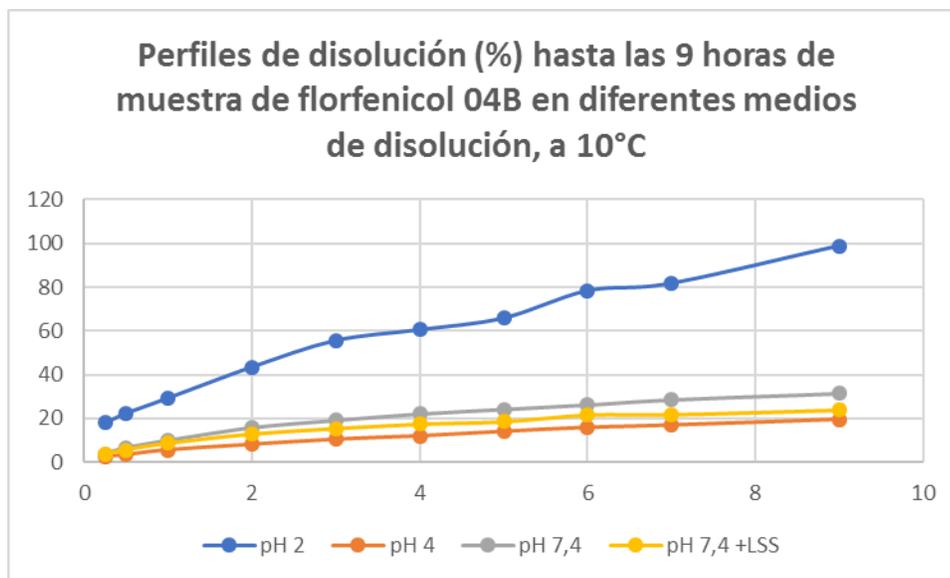


Figura 1.

El modelo que mejor describe el comportamiento frente a la disolución en todos los casos es el modelo difusional de Higuchi, lo que está de acuerdo con el tipo de liberación observado experimentalmente. Este modelo considera que el producto es una matriz cuya porosidad y tortuosidad de los poros son factores que impactan en forma positiva y negativa respectivamente, en la liberación del fármaco. El comportamiento observado en el producto es de poca erosión y al final del experimento permanece en una forma de esponja porosa.

El análisis estadístico de la constante de velocidad del modelo de Higuchi arrojó diferencias estadísticamente significativas entre la cinética a pH 2 y todas las otras condiciones ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras a pH 4, 7,4 y 7,4 + LSS.

La aplicación del factor de similitud f_2 no fue posible porque, a diferencia de los otros modelos probados, trabaja con el promedio de los valores para cada tiempo de disolución, por lo que establece una variabilidad máxima que no puede sobrepasarse (CV máximo de 15% en los tiempos tempranos y 10% en los otros tiempos), situación que no se cumple en este caso (ver CV en las tablas 1,3, 5 y 7).

3.1.2. Muestra 06 B

Las tablas siguientes muestran los perfiles de disolución en los 3 medios de disolución ensayados y los correspondientes análisis de los modelos de disolución.

Tabla 10. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 06B a pH 2.

MUESTRA 06B	pH2									
Temperatura	10°C									
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)	
	% disuelto									
0,25	1,89	1,30	1,19	1,33	1,21	0,70	1,27	0,380	29,91	
0,5	2,90	2,03	2,62	1,99	1,91	1,44	2,15	0,524	24,40	
1	4,13	3,56	3,90	3,71	3,45	2,35	3,51	0,622	17,71	
2	7,29	7,02	6,69	5,90	5,14	4,51	6,09	1,102	18,09	
3	10,30	7,87	8,14	7,28	7,40	5,68	7,78	1,505	19,35	
4	12,84	8,54	10,12	9,77	10,21	6,40	9,65	2,126	22,03	
5	14,21	11,56	12,06	10,24	10,54	8,11	11,12	2,039	18,34	
6	12,00	11,20	12,07	12,27	11,51	9,36	11,40	1,076	9,44	
7	16,30	11,33	12,04	12,86	12,01	10,82	12,56	1,960	15,61	
9	15,80	12,74	17,16	15,70	13,12	11,46	14,33	2,202	15,36	

Tabla 11. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 06B a pH 2.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	6,1689	0,9451	1,6951	0,8684	0,2257	0,7553	0,143	0,8031
Muestra 2	4,8328	0,9642	1,3253	0,8805	0,2305	0,7223	0,1331	0,7848
Muestra 3	5,86	0,9751	1,6574	0,9493	0,2467	0,7635	0,1491	0,8488
Muestra 4	5,7177	0,993	1,6236	0,9744	0,2536	0,808	0,1512	0,8816
Muestra 5	5,1784	0,9795	1,4363	0,917	0,2491	0,7679	0,1437	0,8307
Muestra 6	4,514	0,9888	1,2801	0,9677	0,2798	0,7825	0,1478	0,8686
Promedio	5,379	0,974	1,503	0,926	0,248	0,767	0,145	0,836
DS	0,641	0,018	0,179	0,045	0,019	0,029	0,006	0,038
CV (%)	11,92	1,80	11,94	4,85	7,77	3,72	4,48	4,49

Tabla 12. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 06B a pH 4.

Muestra 06B	pH 4									
Temperatura	10 °C									
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	PROMEDIO	DESV. EST.	CV (%)	
0,25	0,91	1,21	1,13	0,79	1,05	0,04	0,85	0,4249	49,76	
0,5	1,63	1,95	1,96	1,50	1,64	0,71	1,57	0,4574	29,21	
1	3,11	3,20	3,16	2,22	2,88	1,95	2,75	0,5348	19,44	
2	5,07	5,31	5,07	4,59	4,13	4,09	4,71	0,5192	11,03	
3	6,67	7,08	6,53	5,47	6,14	5,90	6,30	0,5753	9,13	
4	7,89	8,74	7,68	5,89	7,71	6,83	7,46	0,9801	13,14	
5	9,02	9,97	8,60	8,72	8,85	8,17	8,89	0,6020	6,77	
6	10,21	11,47	9,47	10,16	10,02	0,13	8,58	4,1890	48,83	
7	11,05	12,46	10,50	11,48	10,63	8,04	10,69	1,4780	13,82	
9	12,88	13,92	12,28	14,09	13,50	9,25	12,65	1,7988	14,22	

Tabla 13. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 06B a pH 4.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	4,8245	0,9995	1,359	0,9659	0,2622	0,7706	0,145	0,8548
Muestra 2	5,309	0,9966	1,5	0,9681	0,2547	0,8075	0,1478	0,8776
Muestra 3	4,42	0,9992	1,246	0,966	0,2364	0,7896	0,1325	0,8648
Muestra 4	5,197	0,9628	1,51	0,989	0,294	0,8407	0,1611	0,92
Muestra 5	4,901	0,9878	1,403	0,9852	0,2644	0,8329	0,1479	0,9039
Muestra 6	3,906	0,961	1,053	0,8592	0,4093	0,498	0,1623	0,6719
Promedio	4,760	0,984	1,345	0,956	0,287	0,757	0,149	0,849
DS	0,522	0,018	0,173	0,048	0,063	0,129	0,011	0,090
CV (%)	10,96	1,83	12,87	5,05	21,90	17,10	7,41	10,61

Tabla 14. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 06B a pH 7,4 + LSS.

Muestra 06B	pH 7,4 LSS							
Temperatura	10 °C							
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Prom	DS	CV(%)
	% disuelto							
0,25	1,84	1,90	2,62	1,77	2,38	2,10	0,3760	17,87
0,5	3,38	3,08	5,93	3,24	3,85	3,90	1,1735	30,10
1	5,73	4,99	9,87	5,93	7,39	6,78	1,9313	28,47
2	8,46	7,54	14,94	8,90	10,52	10,07	2,9294	29,08
3	10,43	9,29	17,50	10,29	14,13	12,33	3,4299	27,82
4	11,82	11,26	20,12	10,90	16,78	14,17	4,0896	28,85
5	12,92	11,73	21,96	12,81	16,46	15,18	4,1887	27,60
6	13,29	12,65	22,96	14,06	18,02	16,19	4,3207	26,68
7	14,03	12,96	25,61	14,81	19,05	17,29	5,1932	30,03
9	14,46	13,25	27,76	16,92	20,46	18,57	5,8292	31,39

Tabla 15. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 06B a pH 7,4 + LSS.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	5,287	0,96	1,425	0,8485	0,1945	0,6798	0,1225	0,7447
Muestra 2	4,921	0,9613	1,331	0,8552	0,1935	0,7111	0,1196	0,7671
Muestra 3	9,896	0,9843	2,716	0,9021	0,2113	0,686	0,1595	0,7718
Muestra 4	5,89	0,988	1,63	0,9213	0,2096	0,7191	0,1341	0,7988
Muestra 5	7,526	0,9679	2,046	0,8705	0,2096	0,7026	0,1449	0,7671
Promedio	6,704	0,972	1,830	0,880	0,204	0,700	0,136	0,770
DS	2,044	0,013	0,567	0,031	0,009	0,017	0,016	0,019
CV (%)	30,49	1,34	30,97	3,55	4,36	2,37	12,11	2,51

Tabla 16. Valores promedio de los perfiles de disolución de la muestra 04B en tres medios de disolución.

Muestra 06B			
Temperatura	10°C		
Tiempo (h)	pH 2	pH 4	pH 7,4 + LSS
	% disuelto	% disuelto	% disuelto
0,25	1,27	0,85	2,10
0,5	2,15	1,57	3,90
1	3,51	2,75	6,78
2	6,09	4,71	10,07
3	7,78	6,30	12,33
4	9,65	7,46	14,17
5	11,12	8,89	15,18
6	11,40	8,58	16,19
7	12,56	10,69	17,29
9	14,33	12,65	18,57

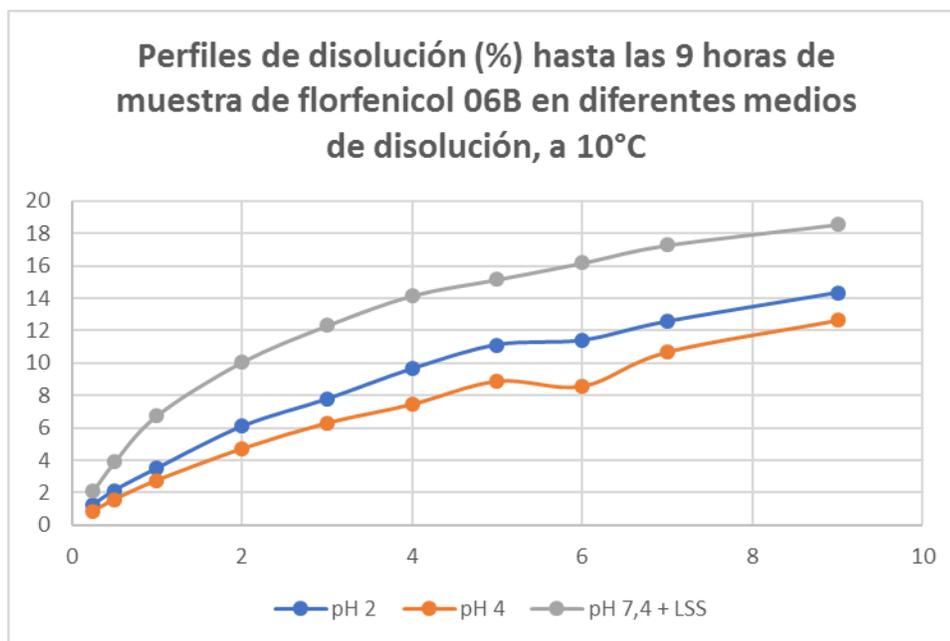


Figura 2.

Al igual que en el producto 04B, el modelo que mejor describe el comportamiento frente a la disolución en todos los casos es el modelo difusional de Higuchi, por las mismas razones mencionadas anteriormente.

El análisis estadístico de la constante de velocidad del modelo de Higuchi arrojó diferencias estadísticamente significativas entre la cinética a pH 7,4 + LSS y las otras dos condiciones ($p < 0,05$).

La aplicación del factor de similitud f_2 tampoco fue posible en este caso, por no cumplir con los requisitos de variabilidad para la aplicación del método (ver CV tablas 10,12 y 14) .

3.1.3. Muestra 01C

Las tablas siguientes muestran los perfiles de disolución en los 3 medios de disolución ensayados y los correspondientes análisis de los modelos de disolución.

Tabla 17. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 01C a pH 4.

Muestra 01 C	pH 4								
Temperatura	10 °C								
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)
	% disuelto								
0,25	0,00	0,00	12,89	0,00	0,00	0,00	2,15	5,262	244,95
0,5	15,85	16,56	13,68	15,99	14,71	13,09	14,98	1,387	9,26
1	18,07	19,11	15,33	18,60	17,47	16,03	17,43	1,482	8,50
2	20,50	23,58	22,06	22,95	25,42	17,95	22,08	2,595	11,75
3	22,77	24,75	24,12	29,05	26,39	24,23	25,22	2,210	8,76
4	28,69	31,70	30,20	32,08	31,48	23,48	29,61	3,249	10,97
5	28,12	31,32	29,62	38,82	34,03	28,08	31,66	4,158	13,13
6	30,83	39,57	33,35	42,89	39,87	31,01	36,25	5,168	14,25
7	36,22	39,83	35,03	42,34	40,04	32,97	37,74	3,554	9,42
9	38,49	41,70	38,90	42,49	39,45	37,32	39,73	1,982	4,99

Tabla 18. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R^2), a la muestra 01C a pH 4.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	10,114	0,9613	2,731	0,9721	0,105	0,9485	0,103	0,9595
Muestra 2	11,93	0,9568	3,178	0,9413	0,112	0,9115	0,113	0,9246
Muestra 3	11,319	0,9846	2,976	0,9439	0,12	0,873	0,116	0,8999
Muestra 4	13,571	0,9511	3,536	0,8953	0,122	0,8576	0,124	0,8732
Muestra 5	12,195	0,9542	3,157	0,8868	1,117	0,8286	0,116	0,8516
Muestra 6	10,565	0,9766	2,843	0,9745	0,119	0,9264	0,113	0,9465
Promedio	11,616	0,9641	3,070	0,9357	0,283	0,8909	0,114	0,9092
DS	1,2413	0,0135	0,287	0,0373	0,409	0,0454	0,007	0,0421
CV (%)	10,69	1,40	9,35	3,99	144,73	5,10	5,95	4,63

Tabla 19. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 01C a pH 7,4.

Muestra 01 C	pH 7,4									
Temperatura	10 °C									
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)	
	% disuelto									
0,25	10,40	9,64	8,36	9,27	0,00	0,00	6,28	4,907	78,16	
0,5	13,29	11,81	7,89	12,25	0,00	8,65	8,98	4,884	54,37	
1	18,45	15,35	14,83	15,96	15,97	16,18	16,12	1,243	7,71	
2	29,78	24,03	22,28	24,67	26,05	26,16	25,50	2,539	9,96	
3	31,47	27,31	23,04	28,33	36,67	29,87	29,45	4,546	15,44	
4	35,54	31,82	31,44	32,28	41,02	25,59	32,95	5,100	15,48	
5	38,27	35,18	34,36	32,29	41,85	34,03	35,99	3,477	9,66	
6	40,00	39,35	37,25	34,72	36,84	40,63	38,13	2,248	5,89	
7	41,78	42,17	42,01	36,31	36,44	41,43	40,02	2,836	7,09	
9	44,29	40,87	42,83	45,12	42,37	43,41	43,15	1,493	3,46	

Tabla 20. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 01C a pH 7,4.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	14,114	0,9621	3,824	0,8603	0,149	0,7449	0,145	0,7858
Muestra 2	14,188	0,9756	3,912	0,9017	0,163	0,8092	0,155	0,8451
Muestra 3	15,32	0,9805	4,282	0,9312	0,192	0,81	0,178	0,8588
Muestra 4	13,411	0,9771	3,732	0,9213	0,157	0,8032	0,148	0,8485
Muestra 5	11,349	0,6714	2,542	0,5467	0,089	0,5216	0,091	0,5319
Muestra 6	14,903	0,9305	3,866	0,8617	0,156	0,7284	0,149	0,7836
Promedio	13,881	0,9162	3,693	0,8372	0,151	0,7362	0,144	0,7756
DS	1,4068	0,1213	0,5947	0,1453	0,0339	0,1109	0,0287	0,1238
CV (%)	10,13	13,24	16,10	17,36	22,43	15,06	19,91	15,96

Tabla 21. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol 01C a pH 7,4 + LSS.

Muestra 01 C	pH 7,4 + LSS								
Temperatura	10 °C								
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)
	% disuelto								
0,25	1,43	1,66	1,45	8,59	1,71	1,36	2,70	2,890	107,07
0,5	7,04	1,68	7,27	1,46	1,73	1,38	3,43	2,894	84,48
1	19,21	7,84	7,19	9,20	15,95	14,08	12,25	4,896	39,98
2	22,64	14,03	17,97	16,40	20,43	19,36	18,47	3,042	16,47
3	26,30	30,89	23,42	30,00	21,58		26,44	4,040	15,28
4	34,06	38,01	24,37	33,03	31,87	24,49	30,97	5,473	17,67
5	37,55	38,64	28,73	36,10	33,95	24,22	33,20	5,623	16,94
6	44,61	47,06	31,23	42,66	33,01	29,38	37,99	7,647	20,13
7	46,70	48,81	35,32	40,84	44,60	25,18	40,24	8,782	21,82
9	49,76	57,50	38,38	47,12	45,60	36,41	45,79	7,717	16,85

Tabla 22. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra 01C a pH 7,4 + LSS.

Modelo	Higuchi		Orden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	19,311	0,9767	5,349	0,912	0,286	0,5875	0,235	0,7269
Muestra 2	24,177	0,9772	6,808	0,9431	0,394	0,7306	0,3121	0,8258
Muestra 3	14,87	0,9832	4,132	0,9241	0,2815	0,6548	0,216	0,7738
Muestra 4	18,688	0,9471	5,222	0,8999	0,292	0,6268	0,239	0,7551
Muestra 5	18,03	0,9573	5,017	0,9022	0,3298	0,6203	0,251	0,7303
Muestra 6	12,721	0,9112	3,507	0,8363	0,315	0,5865	0,216	0,6739
Promedio	17,966	0,959	5,006	0,903	0,316	0,634	0,245	0,7476
DS	3,9498	0,0271	1,1334	0,0363	0,0423	0,0537	0,0357	0,0510
CV (%)	21,98	2,82	22,64	4,02	13,37	8,47	14,56	6,82

Tabla 23. Valores promedio de los perfiles de disolución de la muestra 01C en tres medios de disolución.

Muestra 01C			
Temperatura	10°C		
Tiempo (h)	pH 4	pH 7,4	pH 7,4 + LSS
	% disuelto	% disuelto	% disuelto
0,25	2,15	6,28	2,70
0,5	14,98	8,98	3,43
1	17,43	16,12	12,25
2	22,08	25,50	18,47
3	25,22	29,45	26,44
4	29,61	32,95	30,97
5	31,66	35,99	33,20
6	36,25	38,13	37,99
7	37,74	40,02	40,24
9	39,73	43,15	45,79

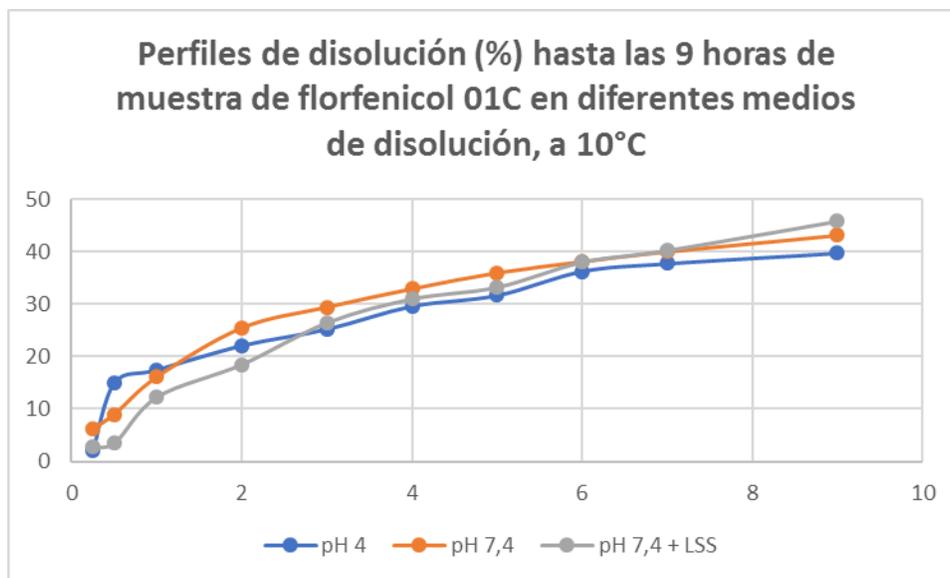


Figura 3.

El modelo que mejor describe el comportamiento frente a la disolución en todos los casos es el modelo difusional de Higuchi, por las mismas razones mencionadas anteriormente.

El análisis estadístico de la constante de velocidad del modelo de Higuchi arrojó diferencias estadísticamente significativas entre todas las cinéticas ($p < 0,05$).

La aplicación del factor de similitud f_2 tampoco fue posible en este caso, por no cumplir con los requisitos de variabilidad para la aplicación del método (ver CV tablas 17,19 y 21)

No es posible identificar una tendencia general en la liberación de florfenicol desde las muestras enfrentadas a diferentes medios de disolución. En la muestra 04B se observa una fuerte influencia del medio ácido, situación que no se replica en la muestra 06B. Una situación semejante ocurre con la inclusión de laurilsulfato de sodio en el medio de disolución.

3.2. Influencia de las características del medio de disolución en la liberación de oxitetraciclina.

Muestra OTC M1 020 (en las tablas y figuras OTCM1)

Las tablas siguientes muestran los perfiles de disolución en los 3 medios de disolución ensayados y los correspondientes análisis de los modelos de disolución.

Tabla 24. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol OTC M1 020 a pH 4.

OTCM1	pH 4									
Temperatura	10 °C									
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)	
	% disuelto									
0,25	3,42	3,42	3,42	3,42	3,42	2,93	3,34	0,199	5,97	
0,5	9,80	10,29	10,29	10,78	9,80	10,77	10,29	0,435	4,23	
1	22,56	19,64	22,57	23,55	23,05	23,06	22,40	1,404	6,27	
2	49,54	49,51	50,52	50,04	48,09	52,48	50,03	1,450	2,90	
3	70,34	67,41	70,84	70,84	65,93	71,84	69,53	2,316	3,33	
4	84,24	82,74	82,78	85,70	78,33	85,23	83,17	2,667	3,21	
5	84,39	91,20	91,69	94,65	87,25	96,11	90,88	4,420	4,86	
6	100,01	97,64	99,60	100,61	100,53	103,55	100,32	1,917	1,91	
7	103,60	103,57	104,08	105,07	95,79	108,51	103,44	4,179	4,04	
9	110,95	107,05	110,96	109,02	100,62	110,03	108,11	3,949	3,65	

Tabla 25. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra OTC M1 020 a pH 4.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	46,030	0,976	12,810	0,894	0,325	0,660	0,343	0,760
Muestra 2	46,432	0,971	12,697	0,883	0,326	0,661	0,344	0,760
Muestra 3	47,650	0,976	12,880	0,890	0,323	0,657	0,343	0,757
Muestra 4	47,084	0,968	12,831	0,875	0,320	0,649	0,341	0,748
Muestra 5	43,777	0,962	11,906	0,866	0,316	0,648	0,330	0,743
Muestra 6	48,158	0,968	13,118	0,874	0,330	0,637	0,348	0,742
Promedio	46,522	0,9701	12,707	0,8803	0,323	0,6520	0,342	0,7516
DS	1,5524	0,0055	0,4163	0,0105	0,0048	0,0093	0,0062	0,0083
CV (%)	3,34	0,56	3,28	1,19	1,48	1,42	1,81	1,10

Tabla 26. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol OTC M1 020 a pH 7,4.

OTCM1	pH 7 fosfato								
Temperatura	10 °C								
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)
	% disuelto								
0,25	2,44	3,42	3,42	2,93	2,44	0,98	2,60	0,909	34,91
0,5	7,35	8,34	8,34	7,35	7,35	3,43	7,02	1,827	26,01
1	20,09	19,13	20,59	18,14	18,63	10,78	17,89	3,603	20,14
2	40,73	37,30	38,79	37,29	37,30	30,38	36,97	3,499	9,46
3	55,11	48,73	56,56	52,64	52,64	48,66	52,39	3,232	6,17
4	61,13	58,13	62,12	56,71	57,68	56,18	58,66	2,420	4,13
5		61,16	65,60	63,10	102,15	103,11	79,02	21,612	27,35
6	104,98	101,21	97,85	101,72	105,57	105,59	102,82	3,112	3,03
7	101,71	99,71	96,74	95,81	98,77	106,10	99,81	3,732	3,74
9	100,68	99,20	96,72	101,59	107,00		101,04	3,805	3,77

Tabla 27. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra OTC M1 020 a pH 7,4.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	45,213	0,9608	12,513	0,9109	0,349	0,6785	0,354	0,7958
Muestra 2	42,895	0,946	12,139	0,9221	0,332	0,7361	0,344	0,8365
Muestra 3	41,833	0,9628	11,678	0,9131	0,325	0,7038	0,334	0,8043
Muestra 4	43,318	0,9544	12,238	0,9271	0,346	0,7225	0,352	0,8284
Muestra 5	48,045	0,9385	13,441	0,894	0,367	0,705	0,375	0,8099
Muestra 6	55,15	0,9358	17,534	0,9572	0,601	0,7792	0,548	0,8995
Promedio	46,076	0,9497	13,257	0,9207	0,387	0,7209	0,384	0,8291
DS	4,9535	0,0114	2,1754	0,0212	0,1061	0,0346	0,0813	0,0377
CV (%)	10,75	1,20	16,41	2,30	27,45	4,80	21,16	4,55

Tabla 28. Perfiles de disolución (%) de la muestra de florfenicol OTC M1 020 a pH 7,4 + LSS.

OTCM1	pH 7,4 + LSS								
Temperatura	10 °C								
Tiempo (h)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Prom	DS	CV(%)
	% disuelto								
0,25	4,88	4,39	4,39	4,88	4,88	3,90	4,56	0,399	8,75
0,5	11,28	10,79	9,81	11,77	11,28	9,80	10,79	0,821	7,61
1	23,55	22,08	19,63	23,56	21,60	18,17	21,43	2,162	10,09
2	46,14	46,12	42,68	48,09	45,14	39,73	44,65	2,984	6,68
3	59,57	61,03	56,60	63,00	61,02	55,10	59,39	2,987	5,03
4	68,99	72,42	66,51	70,98	71,44	61,62	68,66	4,039	5,88
5	74,95	77,42	73,45	76,43	78,88	67,54	74,78	4,017	5,37
6	78,92	82,85	77,43	82,35	82,86	72,00	79,40	4,276	5,38
7	81,40	86,32	79,92	84,85	85,84	76,93	82,54	3,746	4,54
9	84,84	89,78	83,85	86,83	88,80	79,91	85,67	3,609	4,21

Tabla 29. Resultados de la aplicación de los modelos cinéticos, expresados como constantes de velocidad de disolución (K) y coeficiente de determinación (R²), a la muestra OTC M1 020 a pH 7,4 + LSS.

Modelo	Higuchi		Oden cero		Orden uno		Raíz cúbica	
	K (%/h ^{1/2})	R ²	K (%/h)	R ²	K (1/h)	R ²	K (% ^{1/3} /h)	R ²
Muestra 1	34,884	0,9562	9,405	0,8459	0,268	0,6481	0,278	0,7277
Muestra 2	37,548	0,9624	10,173	0,8598	0,284	0,6564	0,296	0,7399
Muestra 3	35,151	0,9627	9,534	0,862	0,284	0,6688	0,290	0,7475
Muestra 4	36,063	0,9518	9,706	0,839	0,269	0,6438	0,282	0,7228
Muestra 5	37,302	0,9603	10,105	0,8577	0,278	0,6679	0,292	0,7461
Muestra 6	33,263	0,967	9,047	0,8706	0,286	0,6672	0,285	0,7508
Promedio	35,702	0,9601	9,662	0,8558	0,278	0,6587	0,287	0,7391
DS	1,6137	0,0054	0,4290	0,0115	0,0081	0,0109	0,0066	0,0114
CV (%)	4,52	0,56	4,44	1,34	2,92	1,66	2,32	1,55

Tabla 30. Valores promedio de los perfiles de disolución de la muestra OTC M1 020 en tres medios de disolución.

OTCM1			
Temperatura	10°C		
Tiempo (h)	pH 4	pH 7,4	pH 7,4 + LSS
	% disuelto	% disuelto	% disuelto
0,25	3,34	2,60	4,56
0,5	10,29	7,02	10,79
1	22,40	17,89	21,43
2	50,03	36,97	44,65
3	69,53	52,39	59,39
4	83,17	58,66	68,66
5	90,88	79,02	74,78
6	100,32	102,82	79,40
7	103,44	99,81	82,54
9	108,11	101,04	85,67

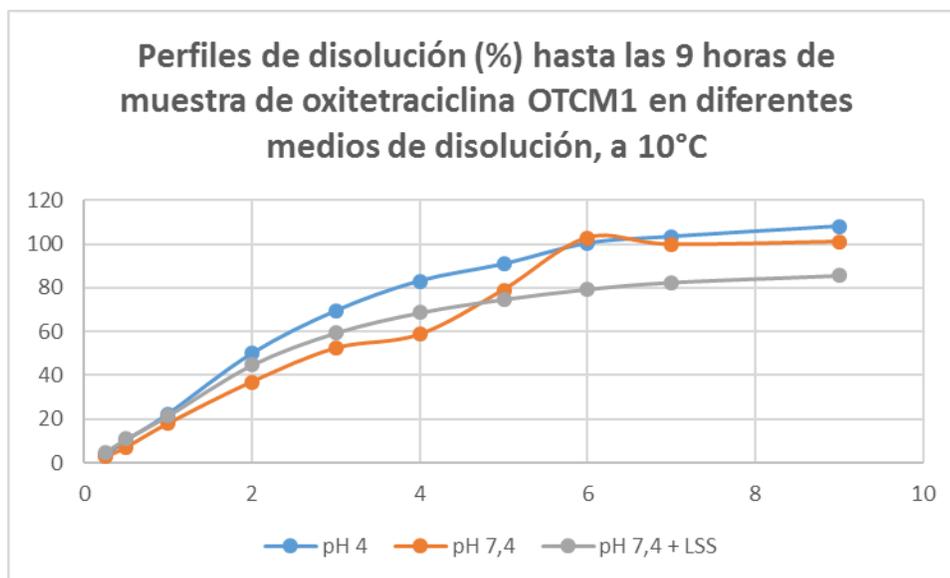


Figura 4.

El modelo que mejor describe el comportamiento frente a la disolución en todos los casos es el modelo difusional de Higuchi, lo que está de acuerdo con un tipo de liberación desde un sistema matricial.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras a pH 4 y 7,4. Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras a pH 7,4 + LSS y las otras dos ($p < 005$).

La aplicación del factor de similitud f_2 no fue posible porque, a diferencia de los otros modelos probados, trabaja con el promedio de los valores para cada tiempo de disolución, por lo que establece una variabilidad máxima que no puede sobrepasarse (CV máximo de 15% en los tiempos tempranos y 10% en los otros tiempos), situación que en este caso estuvo cerca de cumplirse, pero no en todas las condiciones experimentales, lo que hizo inviable su aplicación (ver CV en la tabla 26).

Hasta este momento se tiene una muestra de oxitetraciclina procesada bajo 3 de las 4 condiciones de medios de disolución, por lo que aún no es posible obtener alguna conclusión de tipo general.

OBJETIVO 4: VERIFICAR LAS DOSIS Y RITMO HORARIO DE OXITETRACICLINA Y FLORFENICOL QUE ASEGURE LA EFICACIA CLÍNICA DE ESTOS FÁRMACOS, UTILIZANDO EL MODELO FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO (PK/PD). ETAPA 1.

Al analizar las concentraciones plasmáticas en función del tiempo, se puede observar que en los grupos en el cual el antibiótico se administró en una, dos o tres raciones al día, las concentraciones plasmáticas de florfenicol + florfenicol amina se mantuvieron en concentraciones entre 5 a 10 µg/ml durante los tres días de estudio. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. Situación semejante ocurrió cuando florfenicol se administró vía intraperitoneal (inyectable) en dosis única.

No ocurrió lo mismo cuando florfenicol se administró en micro raciones, ya que a las 4 horas después de finalizada la terapia del primer día (T 4), las concentraciones plasmáticas superaron los 15µg/ml. Estas concentraciones se mantuvieron hasta las 6 horas después de finalizado el último día de tratamiento (T 12), bajando a niveles cercanos a 5 µg/ml veinticuatro horas después de finalizado el último tratamiento (T14).

En la figura1, se muestra el comportamiento de florfenicol (FF) + florfenicol amina (FFA) a nivel plasmático de todos los grupos experimentales

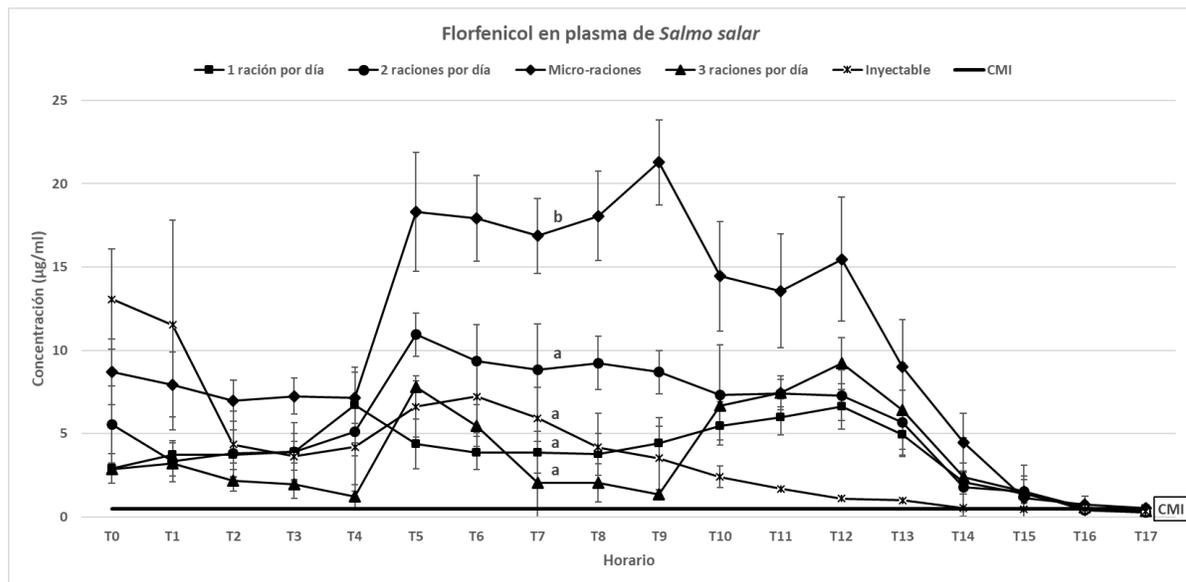


Figura 1. Concentraciones plasmáticas de FF+FFA a diferentes pautas horarias.

Para definir los Índices de eficacia se consideró:

- El ABC
- Una CMI clínica de 1 µg/ml
- Tiempo en que las concentraciones plasmáticas se encuentran sobre la CMI

En la Figura 2 se muestra, se muestra el comportamiento de florfenicol + florfenicol amina a nivel plasmático hasta las 24 horas después de haber administrado la última dosis de alimento medicado.

En el Cuadro N°1 se señalan los Índices de eficacia para cada grupo experimental.

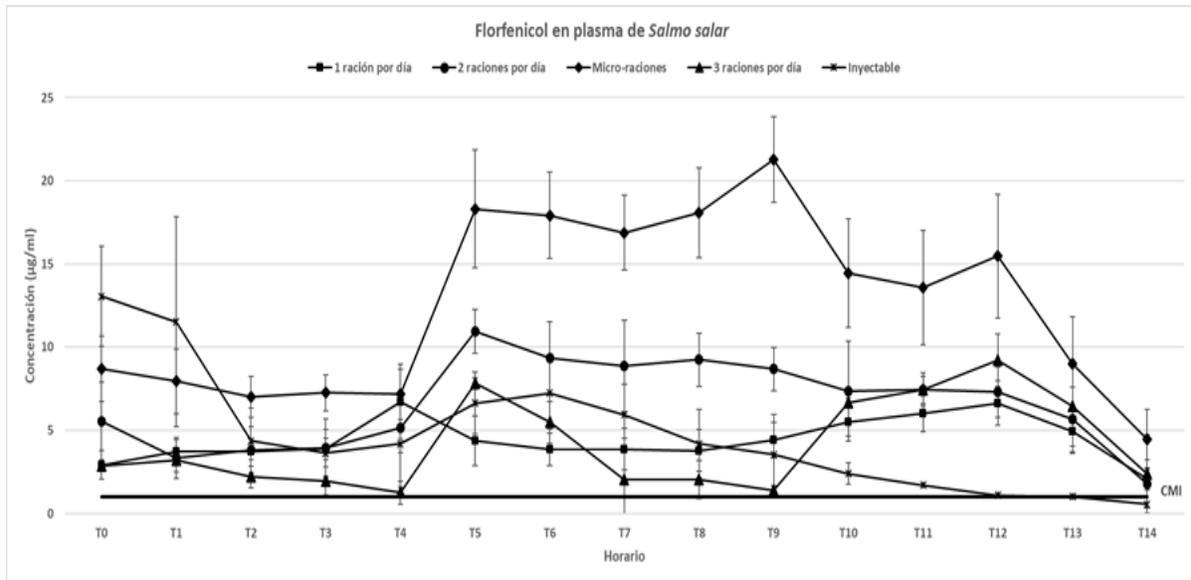


Figura 2. Concentraciones plasmáticas de FF+FFA a diferentes pautas horarias hasta las 24 horas después de haber administrado la última dosis de alimento medicado.

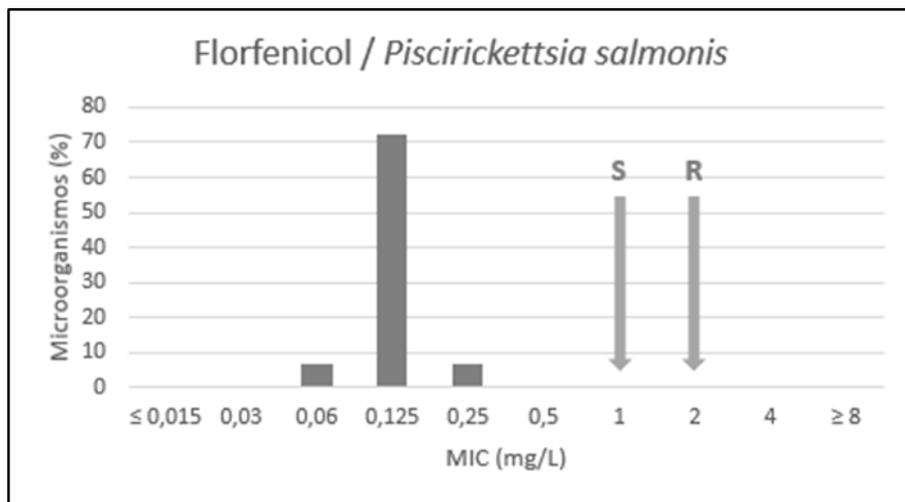


Figura 3. Concentraciones Mínimas Inhibitorias de florfenicol frente a *P. salmonis*.

Cuadro N° 1. Índices de eficacia para florfenicol administrado en diferentes pautas horarias.

Pauta de Administración	Índice de Eficacia	
	ABC _{96h} / MIC	T > CMI
Dosis en 1 ración al día	342.22 h	100 %
Dosis en 2 raciones al día	478.64 h	100 %
Dosis en 3 raciones al día	348.40 h	100 %
Dosis en micro-rationes	1016.70 h	100 %
Dosis inyectable	205.17 h	89,6 %

Si se analizan los índices de eficacia en todos los grupos experimentales, aun cuando todos están sobre los valores señaladores en la literatura, estos Índices son significativamente mayores cuando el alimento medicado se administra en micro-rationes.

Por otro lado, podríamos señalar que florfenicol administrado vía inyectable, no muestra diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas si se comparan los grupos experimentales con una, dos y tres raciones al día.

Análisis de los resultados:

Considerando que el objetivo central de este proyecto es “Establecer las Bases para el buen uso de antimicrobianos en la salmonicultura” **con el fin de disminuir el uso de antibióticos, pero sin disminuir o arriesgar la eficacia de estos fármacos**, podríamos señalar que la forma y pauta de administración de un antibiótico a una misma dosis y vía de administración, influye considerablemente en la Biodisponibilidad de estos fármacos, **siendo las micro-rationes la forma más adecuada de administrar alimento medicado con florfenicol.**

Esto podría explicarse debido a que en el caso de los peces, el tiempo de vaciado gástrico es una función directa del nivel de consumo de alimento, aumentando exponencialmente la evacuación gástrica cuando la ingesta de alimento aumenta.

Lo expuesto, nos permite señalar que la dosis de florfenicol podría ser menor a 20mg/Kg cuando el alimento medicado se administra en forma de micro-rationes.

CONCLUSIONES

Objetivo 1

- ✓ Los estudios PK/PD para definir las dosis de oxitetraciclina o florfenicol a través de los Índices de Eficacia deberían usar los valores de la CMI Clínica señalada en este proyecto.
- ✓ La CMI Clínica para oxitetraciclina es $\leq 2 \mu\text{g/ml}$.
- ✓ La CMI Clínica para florfenicol es $\leq 1 \mu\text{g/ml}$.
- ✓ Los laboratorios que realizan estudios de sensibilidad deberían considerar además estos puntos de corte para las bacterias sensibles. Las bacterias resistentes deberían definirse en concentraciones $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ para florfenicol y $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ para oxitetraciclina.

Objetivo 2

- ✓ Para el caso de las premezclas de florfenicol y oxitetraciclina, la mayoría de las premezclas cumplirían con la potencia microbiológica esperada.
- ✓ De acuerdo a los resultados, se puede concluir que un porcentaje de premezclas no cumplen con la pureza declarada, siendo estas mayores a la declarada para florfenicol y menores a la declarada para oxitetraciclina.
- ✓ Las empresas de alimento al no conocer esta dispersión de la pureza de antibiótico declarado en la premezcla, involuntariamente están colocando mayor cantidad de estos fármacos en los alimentos, en relación a lo solicitado por los Médicos veterinarios en la prescripción.
- ✓ La sobredosificación puede ser un riesgo para la salud pública, ya que aun cuando los Médicos Veterinarios respeten los períodos de resguardo correspondientes, los peces destinados para consumo humano pueden tener concentraciones de fármaco sobre los niveles máximos permitidos. Debido a esto, se favorece el impacto negativo sobre el medio ambiente, ya que el alimento medicado no ingerido por los peces es eliminado al medio acuático.
- ✓ En condiciones extremas de temperatura y humedad los alimentos medicados mantuvieron la cantidad de principio activo dentro de un margen aceptable (sobre el 90%).
- ✓ De acuerdo a los resultados, se puede concluir que un porcentaje alto de alimentos medicados no cumplen con las cantidades de antibiótico/tonelada de alimentos declarados en la etiqueta.
- ✓ Los Médicos Veterinarios al no conocer la dispersión entre la cantidad de antibiótico declarado en el alimento y la cantidad real, pueden estar involuntariamente sub-dosificando o sobre-dosificando a los peces en una terapia antimicrobiana.
- ✓ La sub-dosificación puede generar principalmente fracaso terapéutico. Por otro lado, la sobredosificación puede ser un riesgo para la salud pública, ya que aun cuando los Médicos Veterinarios respeten los períodos de resguardo correspondientes, los peces destinados para consumo humano pueden tener concentraciones de fármaco sobre los niveles máximos permitidos.

- ✓ La sub-dosificación o sobre-dosificación con antibióticos de forma involuntaria por parte de los Médicos veterinarios, puede ser una de las causas de la generación de bacterias resistentes.
- ✓ La elaboración de alimento medicado con inclusión de antibiótico en cantidades preestablecidas, es una solución para disminuir el tiempo de llegada del alimento medicado a los centros de cultivos.
- ✓ El estado debería definir los criterios de inclusión en alimentos premedicados.
- ✓ La selección del antibiótico es responsabilidad del Médico Veterinario del centro de cultivo. Actualmente la planta de alimento es quien compra el antibiótico apoyado con una PMV. Esta situación no cumple con la finalidad de una PMV.

Objetivo 3

Florfenicol

- ✓ El modelo que mejor describe el comportamiento frente a la disolución en todos los casos es el modelo difusional de Higuchi, lo que está de acuerdo con el tipo de liberación observado experimentalmente.
- ✓ El análisis estadístico de la constante de velocidad del modelo de Higuchi arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para la muestra 04B entre la cinética a pH 2 y todas las otras condiciones; para la muestra 06B entre la cinética a pH 7,4 + LSS y las otras dos condiciones; y para la muestra 01C entre todas las cinéticas.

Oxitetraciclina

- ✓ El modelo que mejor describe el comportamiento frente a la disolución en todos los casos es el modelo difusional de Higuchi, lo que está de acuerdo con un tipo de liberación desde un sistema matricial.

Objetivo 4

- ✓ Disminuir la dosis de florfenicol cuando se administra en el alimento en forma de micro-rationes.
- ✓ Realizar estudios que permitan determinar la dosis más adecuada de florfenicol cuando se administra en el alimento en forma de micro-rationes.
- ✓ Realizar estudios PK/PD con alimento medicando con oxitetraciclina administrado en forma de micro raciones.

RECOMENDACIONES

- ✓ Incrementar los controles de potencia microbiológica en los lotes que se van a comercializar
- ✓ Incrementar los controles en las diferentes etapas de elaboración de las premezclas
- ✓ Solicitar estudios de estabilidad de las premezclas a diferentes temperaturas
- ✓ Realizar controles regulares de las premezclas por parte de los organismos reguladores.
- ✓ Solicitar a la industria farmacéutica la tolerancia real de la pureza controlada por lote.
- ✓ Mejorar las reglamentaciones nacionales sobre los alimentos medicados, específicamente en relación a la tolerancia permitida en la cantidad de antibiótico declarado en los alimentos.
- ✓ Realizar controles regulares de los alimentos medicados por parte de los organismos reguladores.
- ✓ Solicitar a las empresas elaboradoras de alimento declarar la cantidad real de antibiótico en la etiqueta, avalada por controles internos. Esto permitiría al médico veterinario adaptar sus dosis.
- ✓ Incorporar un criterio de aceptación de homogeneidad del alimento medicado, el cual podría tener una dispersión de un 5% a un 15%.
- ✓ Para los antimicrobianos, se recomienda como límite máximo de transferencia un 1% del principio activo del último lote medicado.
- ✓ Los piensos medicados, deben estar sometidos a un control regular, incluida el control mediante pruebas de laboratorio, para comprobar que cumplen con lo establecido por los organismos reguladores correspondientes.

REFERENCIAS

Aqua. 2016a. Salmonicultura: Alimentos para una nutrición inteligente. Disponible en: https://issuu.com/revistamch/docs/aqua_192.

Aqua. 2016b. Salmonicultura: Avances y mejoras en la logística del alimento. Disponible en: <http://www.aqua.cl/reportajes/salmonicultura-avances-y-mejoras-en-la-logistica-del-alimento/>

Biomar. 2017. Contacto. Disponible en: <http://biomar.dk/es-cl/chile/contacto/#elige-tu-pa%c3%ads-16344>.

Branson, E. J., & DIAZ-MUNOZ, D. N. (1991). Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *Journal of Fish Diseases*, 14(2), 147-156.

Birrell, J., Mitchell, S., & Bruno, D. W. (2003). *Piscirickettsia salmonis* in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* in Scotland. *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 23(5), 213-218.

Canut Blasco, Aguilar Alfaro, Cobo Reinoso, Giménez Mestre, Rodríguez-Gascón. 2015. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;33:48-57 - DOI: 10.1016/j.eimc.2013.04.023.

Corbeil, S., McColl, K. A., & Crane, M. S. J. (2003). Development of a TaqMan quantitative PCR assay for the identification of *Piscirickettsia salmonis*. *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 23(3), 95-101.

Cusack, R. R., Groman, D. B., & Jones, S. R. (2002). *Rickettsial* infection in farmed Atlantic salmon in eastern Canada. *Canadian veterinary journal*, 43(6), 435-440.

EMA (European Agency for the Evaluation of Medical Products). (2009) Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: Marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods. *EMEA/CVMP/VICH/463199/2009-CONSULTATION*,1-12.

ETECMA-PT-IN-02, 2016. Procedimiento técnico, detección de *Piscirickettsia salmonis*, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFAT).

EU (European Union). (2010) Directive 2010/63/EU of the Parliament and the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities* L27, 33-79.

Ewos. 2016. Empresas. Disponible en: <http://www.ewos.com/wps/wcm/connect/ewos-content-chile/ewos-chile/operations/factories/>.

Lannan, C. N., & Fryer, J. L. (1993). *Piscirickettsia salmonis*, a major pathogen of salmonid fish in Chile. *Fisheries Research*, 17(1), 115-121.

Larenas, J., Hidalgo, L. V., Garcés, H., Fryer, J. L., & Smith, P. (1995). Piscirickettsiosis: lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 10(1).

Mikalsen, J., Skjærvik, O., Wiik-Nielsen, J., Wasmuth, M. A., & Colquhoun, D. J. (2008). Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 43-47.

Olsen, A. B., Melby, H. P., Speilberg, L., Evensen, Ø., & Håstein, T. (1997). *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway--epidemiological, pathological and microbiological findings. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31(1), 35-48.

Rozas M. & Enriquez R. (2014) Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of Fish Diseases* 37, 163–188

SalmonExpert. 2017. Análisis de los costos por la utilización de quimioterapéuticos y vacunas en la salmonicultura. Disponible en: <http://www.salmonexpert.cl/noticias/anlisis-de-los-costos-por-la-utilizacin-de-quimioterpicos-y-vacunasa-en-la-salmonicultura/>

Salmofood. 2017. Compañía. Disponible en: <https://www.salmofood.cl/compania.html>

Sernapesca. 2016. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional año 2015. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/presentaciones/Comunicaciones/Informe_Sobre_Uso_de_Antimicrobianos_2015.pdf

Sernapesca. 2017. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional año 2016. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/presentaciones/Comunicaciones/Informe_Sobre_Uso_de_Antimicrobianos-2016.pdf

Skretting. 2017. Pharma Feed. Disponible en: <http://www.skretting.com/es-CL/productos/pharma-feed/852724>.

Skretting Informa. 2017. Terminal Portuario Parga: Skretting alcanza hito de 1,5 millón de toneladas embarcadas. Disponible en: <http://skrettinginforma.cl/terminal-portuario-pargua-skretting-alcanza-hito-15-millon-toneladas-embarcadas/>.

Whitman, K. A. (2004). *Finfish and shellfish bacteriology manual: techniques and procedures*. Iowa State Press.

ANEXOS

ANEXO 1: PROGRAMA PILOTO DE PRESCRIPCIONES MÉDICO VETERINARIAS EN LÍNEA PARA TERAPIAS ANTIMICROBIANAS EN AGUA DE MAR

Introducción.

La Prescripción Médico Veterinaria (PMV) es una orden suscrita por un Médico Veterinario, con el fin de que una cantidad de cualquier medicamento o mezcla de ellos sea dispensada conforme a lo señalado por el profesional que la extiende.

Numerosos estudios indican que existen frecuentes errores de prescripción que atentan contra el restablecimiento de la salud de los animales, siendo algunos de los más habituales recetar una dosis inapropiada y la duración inadecuada del tratamiento.

En el ámbito de la salmonicultura nacional no existe un formato uniforme para las PMVs emitidas por los Médicos Veterinarios, ni tampoco se tiene la seguridad de que la información contenida en ellas sea transcrita por los mismos profesionales al Sistema de Información para la Fiscalización de Acuicultura (SIFA) de SERNAPESCA. Esta situación incrementa el riesgo de cometer errores en el registro oficial de la información y además mantiene como incógnitas las variables y valores considerados para el cálculo de dosis de los fármacos administradas a los peces.

Por otro lado, no existe un control de venta de antimicrobianos por parte de la industria farmacéutica que pueda ser contrastado con las PMVs emitidas, dificultando la trazabilidad en la cadena de prescripción de estos fármacos y el aseguramiento de las Buenas Prácticas en el Uso de Medicamentos Veterinarios.

Objetivos.

- Implementar un formato oficial para la generación online de PMVs de antimicrobianos en acuicultura.
- Integrar la generación de las PMVs y el registro oficial de la información contenida en ellas, en un solo proceso de entrega de datos.
- Obtener información relevante sobre las terapias antimicrobianas utilizadas, en un lapso de tiempo que permita corregir los problemas de manera oportuna.
- Facilitar la trazabilidad del uso de antimicrobianos en la salmonicultura.
- Obtener información histórica de las terapias antimicrobianas utilizadas, para poder realizar análisis de las prácticas terapéuticas empleadas por los MV.

Metodología.

Se elaboró la plataforma online PMV ANTIMICROBIANOS AGUA SALADA, a la que se puede acceder mediante la dirección web “pmv.sernapesca.cl”. Una vez creada, se realizaron modificaciones en base a solicitudes de SERNAPESCA y considerando además las sugerencias hechas por 36 Médicos Veterinarios pertenecientes a las industrias salmoneras, farmacéuticas y elaboradoras de alimentos medicado.

Tras varias reuniones con los diferentes actores involucrados en la prescripción de antimicrobianos en la salmonicultura, se llegó a la versión actual de la plataforma, que recaba los datos utilizados para la elaboración de las PMVs, junto con información relevante para realizar un completo análisis sobre el uso de estos fármacos en la acuicultura.

ANEXO 2: OBJETIVO 1 - CMI OBTENIDA PARA CADA CEPA ANALIZADA.

Nº Muestra	CIM Oxitetraciclina	CIM Florfenicol
22	0,25	0,125
222	0,25	0,125
888	0,25	0,125
891	0,25	0,125
898	0,25	0,125
908	0,25	0,125
1224	0,125	0,125
1278	0,25	0,125
1279	0,06	0,25
1280	0,25	0,125
1281	0,25	0,125
1282	0,5	0,125
1287	0,06	0,06
1303	0,25	0,125
1315	0,125	0,125
1316	0,25	0,125
1317	0,5	0,125
1318	0,5	0,125
1319	0,25	0,125
1320	0,25	0,125
1321	0,5	0,125
1363	0,125	0,125
2192	0,125	0,125
2493	0,125	0,125
2494	0,25	0,125
2855	0,125	0,125
3045	0,25	0,125
5289	0,25	0,125
5449	0,25	0,125
5463	0,5	0,125
5549	0,25	0,125
6253	0,5	0,125
9386	0,25	0,125
9484	0,25	0,125
9734	0,125	0,125
10002	0,125	0,125
10197	0,25	0,125
10255-1	0,125	0,125
10255-2	0,125	0,125
10514	0,5	0,125
10534	0,5	0,125
10693	0,25	0,125
11152	0,25	0,125

Nº Muestra	CIM Oxitetraciclina	CIM Florfenicol
11210	0,125	0,125
11216	0,5	0,125
11252	0,5	0,125
11259	0,25	0,125
11297	0,25	0,125
11330	0,125	0,125
11337	0,06	0,06
11531	0,25	0,125
11570	0,06	0,125
11608	0,125	0,125
11618	0,125	0,125
11742	0,125	0,125
11744	0,125	0,125
11755	0,125	0,125
11808	0,5	0,125
11942	0,125	0,125
11944	0,125	0,125
12093	0,125	0,125
12157	0,125	0,125
12181	0,06	0,06
12182	0,125	0,25
12282	0,125	0,06
12564	0,125	0,125
12565	0,25	0,125
12655	0,25	0,25
13287	0,25	0,125
14650	0,125	0,06
15677	0,125	0,125
17083	0,125	0,06
17139	0,25	0,125
17490	0,25	0,125
18059	0,125	0,125
18157	0,06	0,06
18380	0,25	0,125
18460	0,125	0,125
18446	0,125	0,125
18545	0,125	0,125
18627	0,25	0,125
18729	0,125	0,125
18756	0,25	0,25
18757	0,25	0,25
18874	0,25	0,25
18766	0,125	0,25