



Programa Sanitario General para la Vigilancia de la Susceptibilidad a Antimicrobianos en la Salmonicultura

NORMA TÉCNICA Nº4

Procedimiento de toma de muestras para aislamiento de *Piscirickettsia salmonis* y análisis para determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI), mediante microdilución en caldo

DEPARTAMENTO DE SALUD ANIMAL
SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA
CHILE

CONTENIDO

I.	<i>Objetivos</i>	3
II.	<i>Alcance</i>	3
III.	<i>Definiciones</i>	4
IV.	<i>Personal</i>	5
V.	<i>Materiales para muestreo</i>	5
VI.	<i>Bioseguridad</i>	6
VII.	<i>Procedimientos de necropsia y muestreo</i>	6
VIII.	<i>Materiales y equipos para análisis de determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI), mediante microdilución en caldo</i>	7
IX.	<i>Procedimiento para análisis de determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI), mediante microdilución en caldo</i>	9
	1) <i>Preparación de solución stock de antimicrobianos</i>	9
	2) <i>Preparación de las microplacas</i>	11
	3) <i>Preparación del inóculo bacteriano</i>	12
	4) <i>Lectura de placas e interpretación de los resultados</i>	13
	5) <i>Control de calidad</i>	14
	6) <i>Contenido mínimo de los informes de laboratorio</i>	15
X.	<i>Bibliografía</i>	16

I. OBJETIVOS

Establecer procedimientos estandarizados para el muestreo y aislamiento de *Piscirickettsia salmonis* desde salmones de cultivo y determinación de susceptibilidad in vitro frente a antimicrobianos.

II. ALCANCE

Los procedimientos estandarizados que se establecen en la presente norma técnica, serán aplicables a los muestreos que se realicen en centros de cultivo de salmones para el aislamiento de *Piscirickettsia salmonis* con el fin de determinar la susceptibilidad frente a oxitetraciclina y florfenicol, así como a los laboratorios de diagnóstico que realicen dicha determinación mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria (CIM) por medio de microdilución en caldo, en el marco del Programa Sanitario General para la Vigilancia de la Susceptibilidad a Antimicrobianos en la Salmonicultura (Res. Ex. N° 386, de 2021), establecido en conformidad con el D.S. N° 319, de 2001 y sus modificaciones, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, actualmente Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.

III. DEFINICIONES

- a) **Certificador de la Condición Sanitaria:** médico veterinario incorporado en el registro establecido en conformidad con el artículo 122 letra K de la Ley General de Pesca y Acuicultura, acreditado para certificar la condición sanitaria de las especies hidrobiológicas en el marco del Reglamento y los Programas Sanitarios Generales y Específicos.
- b) **Reglamento o RESA:** Reglamento de Medidas de Protección, Control y Erradicación de Enfermedades de Alto Riesgo para las Especies Hidrobiológicas, aprobado por el D.S. N° 319, de 2001, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, hoy Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.
- c) **Resistencia a los antimicrobianos (RAM):** fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era susceptible. Es consecuencia de la capacidad de ciertos microorganismos (por ejemplo, bacterias y virus) de neutralizar el efecto de los medicamentos, como los antibióticos. La resistencia surge por la mutación del microorganismo o por la adquisición del gen de resistencia.
- d) **Evaluación de susceptibilidad:** procedimiento *in vitro* para determinar la susceptibilidad de una bacteria a un determinado agente antimicrobiano.
- e) **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):** concentración más baja de un agente antimicrobiano, que es capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo, mediante un test de susceptibilidad *in vitro*.
- f) **Servicio o Sernapesca:** Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

IV. PERSONAL

Los procedimientos descritos en la presente norma deberán ser aplicados por Certificadores de la Condición Sanitaria (CCS) y los médicos veterinarios de los centros de cultivo para efectos del muestreo, y por el personal de los laboratorios de diagnóstico registrados para efectos de la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos, cuando la normativa así lo considere.

Para fines del muestreo, la empresa de cultivo será responsable de que el personal que realice los muestreos cuente con indumentaria adecuada, la que considerará, a lo menos, delantal limpio o desechable, botas limpias y desinfectadas y guantes desechables de primer uso. Tal indumentaria deberá ser proporcionada por la empresa de cultivo; si así no fuere, se utilizará indumentaria propia que cumpla las condiciones antes indicadas.

Para fines del análisis, el laboratorio es responsable de la implementación de este procedimiento. Para ello podrá designar un encargado de supervisar su correcta ejecución, revisar los resultados, revisar y/o elaborar el informe final de los resultados y supervisar el envío de los informes vía correo electrónico u otra vía quien solicita dicho análisis al laboratorio.

V. MATERIALES PARA MUESTREO

El muestreador deberá contar con los materiales necesarios para la extracción de las muestras, Entre los cuales pueden incluir:

- Papel tipo Kraft o Jumbo.
- Material quirúrgico estéril.
- Algodón.
- Tómulas.
- Asas de siembra desechables estériles.
- Placas con agar para cultivo de *Piscirickettsia salmonis*.
- Cajas isotérmicas.
- Guantes.
- Ictiómetro o regla.
- Aspersores.
- Cámara fotográfica.
- Lápiz marcador indeleble.
- Alcohol 70° (para desinfectar)
- Desinfectante en aerosol

VI. BIOSEGURIDAD

Al momento de realizar un muestreo, el personal responsable deberá respetar todos los filtros sanitarios dispuestos por los centros de cultivo y exigir el cumplimiento de todas las medidas de bioseguridad entre una y otra jaula o unidad de cultivo, tales como desinfección de quiñes, lances, buzos, quechas, entre otros.

Si en el centro de cultivo se solicita como medida de bioseguridad que en la toma de muestras no se utilicen materiales externos al centro (bolsas, hielera, etc.), se deberá acceder a tal petición, siempre y cuando éste proporcione los materiales adecuados.

Los certificadores o personal de laboratorio que realicen procedimientos en un centro positivo a una enfermedad infecciosa para la cual se haya establecido un programa específico de control, no podrán realizar muestreos en otros centros de cultivo con especies susceptibles a esta, sino una vez que haya transcurrido un periodo mínimo de 24 horas.

VII. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

- a) Todo muestreo contemplará la extracción de, al menos 15 peces de la mortalidad fresca (menos de 12 horas) o moribundos, provenientes de una o varias unidades de cultivo consideradas como sospechosas o causantes de algún aumento de mortalidad asociada a *P. salmonis*. Estas no deberán encontrarse bajo tratamiento antimicrobiano oral al momento de muestreo y bajo ninguna circunstancia deben encontrarse bajo tratamiento inyectable. Para estos fines, el muestreo debe programarse para antes de la ejecución del tratamiento antimicrobiano. Si el número final de ejemplares no se completa con peces en tales condiciones, se deberá completar la muestra con peces elegidos al azar.
- b) Previo a la toma de muestras, realizar limpieza y desinfección del ambiente y superficies, con detergente, abundante alcohol de 70° y desinfectante en aerosol.
- c) Sobre el mesón, extender un trozo de papel y seleccionar el material quirúrgico (pinzas, mango de bisturí, tijeras), previamente desinfectado.

- d) Seleccionar aquellos peces con una signología clínica más marcada y distribuir sobre el papel absorbente desechable, limpio, seco y antideslizante.
- e) Realizar un corte en la zona lateral, paralela a la línea media ventral desde craneal a caudal, y luego, un segundo corte desde las branquias hacia la línea media ventral.
- f) Los órganos a muestrear, en orden de prioridad, incluyen hígado, bazo, riñón y lesiones limpias.
- g) Tomar una placa de agar y rotular con la fecha, N° correlativo de pez, jaula y órgano a sembrar. Para efectos del aislamiento en terreno, el tipo de agar a utilizar será de acuerdo al criterio del laboratorio de diagnóstico donde se realizará el análisis. Debe sembrarse un órgano por cada placa, para evitar abrir la placa en más de una ocasión, completando un total de al menos 15 placas para el envío al laboratorio.
- h) Tomar el asa de siembra desechable estéril, pinchar el órgano seleccionado (previamente despejado) y luego, manteniendo la placa con la tapa hacia arriba, abrirla parcialmente para evitar contaminación ambiental, cargar el asa con la muestra sobre el agar haciendo estrías paralelas en una sola porción del agar, sin devolverse y manteniendo la tapa semi-abierta, sin sacarla. Una vez sembradas las placas se deben sellar con Parafilm o similar.
- i) El transporte de las muestras deberá realizarse en condiciones que garanticen su integridad, embalados de modo que cualquier contaminación exterior resulte imposible (recipientes sólidos y perfectamente sellados, cajas o contenedores protectores sólidos y perfectamente cerrados), material absorbente en cantidad suficiente y etiquetados con al menos la siguiente información: código del centro de cultivo, fecha de muestreo y números o códigos que identifiquen los grupos muestreados.
- j) Las muestras sembradas en placas de agar, deberán ser mantenidas y enviadas a temperatura ambiente, evitando grandes variaciones de temperatura.
- k) En aquellos casos en los cuales el tiempo de traslado de las muestras sea de 24 horas o menos, se podrá hacer envío de los peces enteros para el aislamiento de *P. salmonis* en laboratorio. En este caso, los peces deben ser introducidos en bolsas, rotulados, sellados y transportados en cajas isotérmicas en condiciones de refrigeración (4-10°C \pm 0.5°C, privilegiando temperaturas lo más cercanas posibles a los 4°C) agregando una

cantidad suficiente de hielo o de bloques refrigerantes en contenedores adecuados que cuenten con un sistema de registro de temperatura, que permita garantizar la mantención de la cadena de frío y cumpliendo con las mismas consideraciones señaladas en la letra j) del presente numeral. Además, a su llegada al laboratorio deberán ser minuciosamente revisados, especialmente en lo referente a la temperatura interior.

VIII. MATERIALES Y EQUIPOS PARA ANÁLISIS DE DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI), MEDIANTE MICRODILUCIÓN EN CALDO.

El laboratorio deberá contar con los materiales y equipos necesarios para la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en caldo, entre los cuales se incluyen:

Materiales:

- Microplacas de 96 pocillos con fondo redondo.
- Tubos de vidrio de 10 o 15 mL.
- Tubos plásticos de 1,5 o 2 mL.
- Tubos plásticos de 15 mL.
- Matraz aforado de 10 o 25 ml.
- Gradillas para tubos.
- Tórulas estériles.
- Micropipetas calibradas p1000, p200, p10 y adaptador multicanal.
- Micropipeta multicanal p200 (8 canales).
- Puntas con filtro de 1000 μ L, 200 μ L y 10 μ L.
- Vaso precipitado para desechos.
- Lápiz marcador indeleble.
- Parafilm.
- Papel aluminio.
- Alcohol 70°.
- Metanol 100% calidad para análisis.
- Etanol 95% calidad para análisis.
- Estándar 0,5 de la escala de McFarland (certificada su fecha de vencimiento).

Equipos:

- Refrigerador.
- Estufa de cultivo
- Cámara de bioseguridad.
- Balanza analítica.
- Vórtex.
- Autoclave.
- Congelador.

Antibióticos

- Florfenicol con certificado de pureza.
- Oxitetraciclina dihidrato con certificado de pureza.

Bacterias ATCC

- *Escherichia coli* ATCC 25922

IX. PROCEDIMIENTO PARA ANÁLISIS DE DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI), MEDIANTE MICRODILUCIÓN EN CALDO.

- Una vez recibidas en el laboratorio, poner las placas sembradas en estufa de incubación, que debe permanecer a 18°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) de temperatura.
- Revisar las placas sembradas cada 24 horas, hasta observar la presencia de colonias características de *P. salmonis*.
- Una vez observadas las colonias, se deben traspasar a una nueva placa de agar para su aislamiento e incubar nuevamente a 18°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) hasta su crecimiento (7 a 10 días).
- Una vez que crezcan los nuevos aislados, realizar tinción de Gram para verificar pureza y PCR, o el procedimiento que utilice el laboratorio para identificación.

1) Preparación de solución stock de antimicrobianos:

- Preparar una solución stock de cada antimicrobiano a una concentración de 5120 µg/mL.
- Para el correcto pesaje del antimicrobiano se debe obtener el certificado de análisis del producto a evaluar (de acuerdo al número de lote), desde donde se obtienen los siguientes datos:
 - Porcentaje de pureza.
 - Porcentaje de contenido de agua.
 - Fracción activa.

Pesar el antimicrobiano de acuerdo a la siguiente fórmula: $\text{Potencia} = (\text{pureza}) \times (\text{fracción activa}) \times (1 - \text{contenido de agua})$.

$$\text{Luego: } \text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen final a preparar (mL)} \times \text{Concentración (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mg)}}$$

A modo de ejemplo, para preparar 5 mL de Oxitetraciclina Dihidrato a una concentración de 5120 µg/mL:

- Porcentaje de pureza = 99,3% (varía de acuerdo al lote del producto).
- Porcentaje de contenido de agua = 7,257% (de acuerdo al peso molecular de las 2 moléculas de agua en relación al peso molecular del producto final).
- Fracción activa = 100%

$$\text{Potencia} = (993) \times (1) \times (1 - 0,073)$$

$$\text{Potencia} = 993 \times 1 \times 0,927$$

$$\text{Potencia} = 920,5 \mu\text{g/mg}$$

$$\text{Luego: } \text{Peso (mg)} = \frac{5 \text{ (mL)} \times 5120 \text{ (}\mu\text{g/mL)}}{920,5 \text{ (}\mu\text{g/mg)}}$$

Peso = 27,8 mg (cantidad a pesar para un volumen final de 5 mL).

- Realizar el mismo procedimiento con todos los antimicrobianos a evaluar.
- Una vez realizado el pesaje de los antimicrobianos a evaluar, se deben disolver y diluir, según Tabla 1.

Tabla 1. Solventes y diluyentes para la preparación de soluciones stock de antimicrobianos (CLSI, 2020b).

Antimicrobiano	Solvente	Diluyente
Florfenicol	Etanol 95%	Agua destilada estéril
Oxitetraciclina	Metanol 100%	Agua destilada estéril

- Disolver cada antimicrobiano con la mínima cantidad posible de solvente, idealmente, no más del 50% del volumen final a preparar (por ejemplo, para un volumen final de 5 mL, no agregar más de 2,5 mL de solvente).
- Agregar volúmenes conocidos del solvente (ejemplo de 500 μ L) y agitar mediante vortex. De ser necesario, seguir incorporando solvente, hasta que el antimicrobiano esté completamente diluido (sin cristales, sin turbiedad).
- Para el caso de florfenicol, se puede aplicar calor (sumergiendo el tubo en agua tibia a no más de 50°C) para terminar de disolver los cristales. Para oxitetraciclina se puede utilizar HCl 1N (100 o 200 μ L) para disolver completamente el antimicrobiano (debe descontarse del volumen final).
- Verificar que el antimicrobiano se encuentre completamente diluido antes de completar el volumen final con el diluyente.
- Almacenar la solución stock preparada, en pequeñas alícuotas (ejemplo de 700 μ L) bien selladas, a -20°C al menos, idealmente a -85°C, hasta su uso.

2) Preparación de las microplacas:

- Bajo cámara de bioseguridad abrir 2 microplacas de 96 pocillos con fondo redondo, rotular una placa como N°1 y otra como N°2, y agregar 100 μ L de caldo (según bacteria a evaluar, Tabla 2), en cada uno de los pocillos de la placa N°1 y desde el pocillo A1 al H8 de la placa N°2. Cabe mencionar que la placa N°2, corresponderá a

una continuación de la placa N°1.

A modo de ejemplo:

Esquema de Microplaca N°1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aislado 1	A	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
	B	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
	C	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Aislado 2	D	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
	E	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
	F	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<i>E. coli</i>	G	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
	H	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

Esquema de Microplaca N°2

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aislado 1	A	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019	C (+)	C (-)	-	-	-	-
	B	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019	C (+)	C (-)	-	-	-	-
	C	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019	C (+)	C (-)	-	-	-	-
Aislado 2	D	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019	C (+)	C (-)	-	-	-	-
	E	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019	C (+)	C (-)	-	-	-	-
	F	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019	C (+)	C (-)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	G	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019	C (+)	C (-)	-	-	-	-
	H	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019	C (+)	C (-)	-	-	-	-

- Si la solución stock del antimicrobiano se encuentra congelada, se debe descongelar a temperatura ambiente y luego verificar que ésta se encuentre completamente disuelta en el tubo, observando que el contenido del tubo sea transparente. En caso de observar un precipitado del antimicrobiano (turbidez del líquido o cristales del antimicrobiano), homogenizar mediante vórtex. En caso de que persista el precipitado, sumergir el tubo en un recipiente con agua tibia (50°C como máximo), y homogenizar nuevamente hasta que la solución de antimicrobiano se disuelva (el contenido del tubo se debe observar transparente).
- Tomar la solución stock del antimicrobiano a utilizar, que tiene una concentración de 5120 µg/mL y diluirla hasta una concentración de 512 µg/mL. Para llegar a esta concentración se toman, por ejemplo, 100 µL del stock y se diluyen en un tubo con 900 µL de caldo (según bacteria a evaluar, Tabla 2).
- De la dilución preparada en el punto anterior, se toman 100 µL y se depositan en cada pocillo de la columna 1 de la placa rotulada como N°1 (desde A1 a H1). Como ya contenían 100 µL de caldo, la concentración final de estos pocillos será de 256 µg/mL.

- Luego, mediante micropipeta multicanal, se toman 100 μ L de los pocillos de la columna 1, recién preparados y se traspasan a la columna 2, homogenizando con los 100 μ L de caldo que ya contenía el pocillo y así sucesivamente con todas las columnas de la placa N°1 y hasta la columna 6 de la placa N°2. Luego se descartan los 100 μ L contenidos en las puntas de la micropipeta multicanal. De esta forma cada pocillo contendrá la mitad de la concentración del pocillo que lo antecede.
- Las columnas 7 y 8 de la placa N°2, serán utilizados como control positivo y control negativo respectivamente.
- Con los pasos anteriores, las placas quedan listas para ser inoculadas.

3) Preparación del inóculo bacteriano:

- Seleccionar las colonias de la bacteria a evaluar, desde un cultivo fresco en placa de agar.
- Tocar la superficie de cada colonia con una tórula estéril y transferirlo a un tubo que contenga de 4 a 5 mL de caldo (según bacteria a evaluar, Tabla 2), y ajustar la suspensión hasta que alcance la turbidez del estándar 0,5 de la escala McFarland cuando se usa escala colorimétrica; una absorbancia de 0,08 – 0,13 a 625nm cuando se usa un espectrofotómetro; o 30 - 70NTU cuando se usa un turbidímetro.
- La suspensión preparada contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL.
- Una vez obtenido el inóculo bacteriano, se debe inocular en las microplacas, dentro de los 15 minutos de haber sido preparado, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación.
- En cada pocillo se inoculan 10 μ L del inóculo bacteriano previamente preparado. Para el ensayo de 1 aislado en triplicado, se inoculan las filas A, B y C de la placa N°1 completas y las filas A, B y C, hasta la columna 7 de la placa N°2 (ésta última columna, no contiene antimicrobiano por lo tanto al inocularla quedará como control positivo, mientras que la columna 8 corresponde a los controles negativos, por lo que no debe ser inoculada).

- Para inocular un segundo aislado en triplicado, realizar el paso anterior de la misma manera, pero con las filas D, E y F.
- La cepa de referencia ATCC, puede ser inoculada solo en duplicado, de manera de optimizar la microplaca. Para inocular la cepa de referencia ATCC, realizar el paso de la misma manera, pero con las filas G y H.
- Al finalizar la inoculación, se debe sellar cada microplaca mediante Parafilm o similar, e incubar a la temperatura y tiempo que corresponda, de acuerdo a la bacteria a evaluar (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de cultivo según bacteria a evaluar

Bacteria	Medio de cultivo	Incubación
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Caldo IFOP-PsM11 (Contreras-Lynch et. al, 2017)	18°C, por 7 a 10 días
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Caldo Mueller Hinton con cationes ajustados, diluido (CLSI, 2020a)	18°C, por 96 horas

4) Lectura de placas e interpretación de los resultados:

- Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada pocillo con el pocillo control de crecimiento (positivo). El ensayo se considera válido si en el pocillo control positivo se observa un botón de crecimiento ≥ 2 mm de diámetro.
- Anotar los resultados en el registro de resultados.

5) Control de calidad:

- Se debe incluir la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo Müeller-Hinton (cationes ajustados), diluido, como control de calidad del proceso.
- El análisis de la cepa ATCC, se realiza siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito.
- Anotar los resultados de la cepa ATCC, en el registro de resultados.
- Los resultados del análisis de CMI de la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922,

obtenidos por el laboratorio, deben encontrarse dentro de los rangos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Tabla 3). En caso de que se obtengan resultados fuera de este rango, se invalida el análisis y debe repetirse.

Tabla 3. Rangos aceptables para el análisis de *E. coli* ATCC 25922 en caldo Müller Hinton con cationes ajustados diluido, a 18°C ± 2°C, por 96 horas (CLSI, 2020b)

Agente antimicrobiano	Rangos aceptables de CMI (µg/mL)
Florfenicol	4 - 32
Oxitetraciclina	0,125 - 1

6) Contenido mínimo de los informes de laboratorio:

El informe de resultados de análisis de CMI deberá estar disponible a solicitud del Servicio, y deberá contener al menos la siguiente información:

- Número de informe de análisis.
- Fecha de emisión.
- Nombre del laboratorio de diagnóstico y sede, cuando corresponda.
- Solicitante de los análisis.
- Programa Sernapesca (PSGVSA).
- Nombre y código del centro de cultivo de origen.
- Número de jaula de las muestras analizadas.
- Especie
- Peso promedio
- Número de muestras e identificación.
- Fecha y hora del muestreo
- Fecha y hora de recepción de las muestras
- Fecha y hora de la obtención de los resultados de análisis
- Análisis realizados.
- Medio de cultivo.
- Resultados de los análisis.
- Metodología empleada
- Firmas autorizadas

X. BIBLIOGRAFÍA

1. CLSI (2020a). Methods for antimicrobial broth dilution and disk diffusion susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. 2nd ed. CLSI guideline VET03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. CLSI (2020b). Performance for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. 3rd ed. CLSI supplement VET04. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
3. Contreras-Lynch, S., Smith, P., Olmos, P., Loy, M. E., Finnegan, W., & Miranda, C. D. (2017). A novel and validated protocol for performing MIC tests to determine the susceptibility of *Piscirickettsia salmonis* isolates to florfenicol and oxytetracycline. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1255.
4. Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-PISCIRICKETTSIOSIS) aprobado mediante Res. Ex. N° 3174/2012.