

RESUMEN

Se realizó un estudio retrospectivo sobre la susceptibilidad antibiótica de *Flavobacterium psychrophilum* frente a diversos antibióticos de uso común en acuicultura, para ello se recopiló información “*in vitro*” de los casos clínicos en los cuales se aisló esta bacteria en ADL Diagnostic Chile Ltda. entre los años 2000 al 2002, obteniéndose de esta forma 227 aislamientos, cuyas sensibilidades fue determinada a través del método Kirby-Bauer.

Los datos recopilados se relacionaron con los siguientes factores: zonas geográfica de origen, cuerpo de agua, especie salmonídea, peso corporal y estación del año, con la finalidad de determinar, a través de estadística descriptiva, si existe diferencia en la susceptibilidad antibiótica de la bacteria con los factores mencionados.

Se determinó diferencias en la susceptibilidad de *F. psychrophilum* provenientes de distintas áreas geográficas frente a Amoxicilina, Acido Oxolínico y Flumequina. Por otra parte, no se advirtió diferencia de susceptibilidad de la bacteria para los factores de cuerpo de agua, especie salmonídea y peso corporal, en cuanto al factor estación del año no fue posible concluir, debido a falta de información.

SUMMARY

Was carried out a retrospective study about the antibiotic susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* in front of diverse antibiotics of common use in aquaculture, for it was gathered it information *in vitro* of the clinical cases in those which you isolates this bacteria in ADL Diagnostic Chile Ltda. among the years 2000 at the 2002, being obtained in this way 227 isolates, whose sensibilities were determined through the method Kirby-Bauer.

The gathered data were related with the following factors: geographical areas of origin, body of water, species salmonídea, corporal weight and station of the year, with the purpose of determining, through descriptive statistic, if difference exists in the antibiotic susceptibility of the bacteria with the mentioned factors.

It was determined differences in the susceptibility of *F. psychrophilum* coming from different geographical areas in front of Amoxicillin, acid Oxolínico and Flumequina. On the other hand, difference of susceptibility of the bacteria was not noticed for the factors of body of water, species salmonídea and corporal weight, as for the factor station of the year it was not possible to conclude, due to lack of information.

1.-INTRODUCCION

En nuestro país la industria salmonera, se inició a principios de la década de los años 80 y desde entonces ha mostrado un gran crecimiento dentro del sector de los cultivos de recursos hidrobiológicos (Méndez, 1998), basando su actividad en el cultivo de cinco especies, de las cuales cuatro son salmones del Pacífico: salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), salmón rey (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmón massou (*Oncorhynchus massou*), y la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). La quinta especie, es el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Suárez, 1997).

Debido al gran impacto económico que se produce con la presentación de enfermedades en la salmonicultura producto del costo por pérdida de biomasa, del fármaco y deficiencia en la conversión alimenticia, es importante considerar la epidemiología relacionado en este tema como forma de rentabilizar al máximo la producción intensiva de peces que se basa, entre otros puntos claves, en lograr un adecuado control sanitario (Ortega y col., 1998). Ya que la enfermedad no es un proceso de carácter monofactorial sino multifactorial, nos lleva a contemplarla como un proceso dependiente de todo el entorno del pez, la relación entre estos elementos definirá el estado de salud y enfermedad, además condicionará las medidas a aplicar (Thrusfield, 1995). Dentro de los factores dependientes del medio ambiente, las características del agua constituyen el elemento fundamental, que creará un ambiente adecuado o inadecuado para la vida del pez, así como para la multiplicación de los agentes patógenos (Thrusfield, 1995). De esta forma, el agua sobre todo cuando contiene un exceso de materia orgánica, es un medio ideal para

el crecimiento de muchos géneros de bacterias, siendo las enfermedades bacterianas responsables de altas mortalidades tanto en peces en estado libre como en cautividad (Roberts, 1981), provocando las mayores pérdidas económicas. Al respecto a nivel nacional se ha estimado que el 42% de las pérdidas totales son originadas por patógenos bacterianos (San Martín, 1996).

Esta situación ha llevado necesariamente a la industria nacional de cultivos de salmones a incrementar el empleo de antimicrobianos, ya que la prevención, control y erradicación de enfermedades bacterianas se pueden abordar tan solo por dos caminos; control profiláctico, mediante el empleo de vacunas y la utilización de antibióticos (San Martín, 1996).

Existen bacterias que son patógenos obligados, y otros oportunistas; dentro de esta última categoría se encuentra *Flavobacterium psychrophilum*, que es un importante patógeno de peces que afecta a salmónidos (Crump y col., 2000) provocando enfermedades con altas mortalidades y cuyo control se realiza básicamente con terapia antibiótica.

Con frecuencia no es posible predecir la sensibilidad de las bacterias frente a los antibióticos, ya que están dotadas de diversos mecanismos para adquirir resistencia y por ende aumentar las posibilidades de un fracaso terapéutico (San Martín, 1996)

Al respecto es importante recordar que la principal causa de que las bacterias cambien su patrón de sensibilidad es la administración de dosis

subterapéuticas o intermitentes de las drogas, ya que actúan como una fuerte presión de selección; por esta razón, es que después de un empleo indiscriminado de algún antibiótico comiencen a presentarse fracasos frente a una terapia tradicional ya que se ve favorecida la aparición de cepas que han adquirido resistencia ya sea por mutaciones cromosómicas o bien por adquisición de plásmidos. (San Martín, 1996)

Flavobacterium psychrophilum, posee plásmidos que son moléculas de ADN, de forma circular o lineal, que varían en tamaño e incluso presentan algunos cientos de miles de pares de base (kpb), pueden estar constituidos por cadena doble o simple de ADN y juegan un importante rol en la adaptación de las bacterias y su evolución (Brooks y col.,1998; Snyder y Champness, 1997). Rangdale (1995), reporta que en un estudio de 48 aislados, se observaron 4 diferentes perfiles plasmidiales, los cuales fluctuaron entre 2.0 kb y 2.9 kb, y que la presencia de plásmidos en algunas cepas de *F. psychrophilum* determina la resistencia a ciertos antibióticos.

Debido a la importancia que reviste las enfermedades provocadas por *F. psychrophilum* dentro de las patologías que afectan a la industria salmonícola en nuestro país y a los cambios de sensibilidad que ha presentado, frente a los quimioterápeuticos utilizados para su control, es que en el presente estudio retrospectivo se analizarán los datos de susceptibilidad *in vitro* (a través del método Kirby-Bauer) para esta bacteria a los antibióticos que se usan comúnmente para su control en Chile, relacionándolos con específicos factores -especie, peso corporal, cuerpo de agua, estación del año y zona geográfica - para determinar si existe

relación entre la susceptibilidad antibiótica y los factores mencionados, con el fin de utilizar esta información como herramienta de gestión sanitaria, en la elaboración de estrategias de tratamiento y control de flavobacteriosis, causadas por este agente.

2.-ANTECEDENTES

2.1- Generalidades de *F. psychrophilum*

Flavobacterium psychrophilum (Bernardet y col., 1996), fue denominada anteriormente como *Flexibacter psychrophilus* (Bernardet, 1989) y *Cytophaga psychrophila* (Baudin-Laurencin y col., 1989), siendo un importante patógeno de agua dulce, para los cultivos de salmónidos, extendidos a lo largo del mundo (Baudin-Laurencin y col., 1989; Bernardet y Kerouault, 1989). Esta bacteria fue aislada inicialmente desde salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) en Estados Unidos y Canadá (Bullock, 1972). Desde 1984, aparece también en varios países europeos como Gran Bretaña (Bruno, 1992; Santos y col., 1992; Rangdale, 1994), Finlandia, Alemania y Suiza (Rangdale, 1994) y España (Toranzo y col., 1993), provocando elevados porcentajes de pérdidas (Mudarris y Austin, 1988; Hansen y col.; Bustos y col., 1995). Las pérdidas atribuidas a este agente son comúnmente alrededor del 10 al 30% del stock de alevines, pudiendo alcanzar niveles de hasta 70%(Scott, 1989). Desde el momento que se produce el brote, los porcentajes aumentan y su persistencia se mantiene por más tiempo (Santos y col., 1992).

2.2.- Denominaciones del cuadro clínico

Según la forma de presentación, el cuadro clínico recibe distintas denominaciones; una de ellas es la “Enfermedad del Pedúnculo” debido a que *F. psychrophilum* se aisló en 1941 desde una enfermedad fatal en juveniles de *O. mykiss*, en donde la enfermedad producía lesiones abiertas cerca del pedúnculo, la cual fue descrita por primera vez por Davis (1946). Borg (1948), se refirió por primera vez a *Cytophaga psychrophila* en infecciones de salmón coho como “Enfermedad de baja temperatura” ó “Enfermedad del agua fría” (CWD) y Holt y col., (1989) la denominó como “Enfermedad bacteriana del agua fría” porque se presentaba cuando la temperatura del agua fluctuaba entre 4-10 °C y usualmente antes que el promedio de temperatura haya alcanzado los 12 °C. De ahí viene su nombre ya que *psychrophilum* proviene de las palabras griegas *psychros* que significa frío y *filo* que significa aficionado (Rangdale, 1998). Sin embargo Holt et al. (1987) reporta ocasionalmente brotes de BCWD cuando la temperatura del agua sobrepasa los 15 °C. Rangale en 1996 la denominó como “Síndrome del alevín de la trucha arco iris”(Rainbow Trout Fry Síndrome, RTFS) la cual ha sido diagnosticada en truchas arco iris en incubadoras y balsas jaulas en los lagos de Chile desde 1993, presentando las mismas alteraciones que se describieron en RTFS en Europa, con dificultad terapéutica y alta mortalidad (Bustos y col., 1995).

2.3.- Transmisión

Se han recuperado aislados de *F. psychrophilum* desde fluido ovárico (Holt, 1987, Rangdale y col., 1996) y desde la superficie de ovas recién desovadas (Ekman y col., 1999). Brown y col. en 1997, aislaron la bacteria desde el interior de ovas recién fertilizadas, ovas con ojo y alevines eclosionados, reportando el primer aislamiento de *F. psychrophilum* desde el interior de ovas desinfectadas en su superficie, demostrando que la bacteria puede ser transmitida verticalmente.

Madetoja y col., (2000) reporta que la tasa de eliminación de bacteria desde peces inoculados vía subcutánea está relacionado con la temperatura, además que el número de *F. psychrophilum* liberados desde peces muertos es mayor que la liberada por peces vivos. *F. psychrophilum*, ingresa a los peces probablemente vía branquial, a través de la piel y por vía oral (Dalsgaard, 1993).

2.4.- Características clínicas y anatomopatológicas

En los peces juveniles de salmón coho y trucha arco iris, la infección por esta bacteria causa septicemia aguda, provocando lesiones en riñón, bazo, corazón y peritoneo, principalmente en invierno-primavera, cuando el rango de temperatura del agua varía entre los 4 y 10 °C (Inglis y col., 1993).

Los peces afectados por esta enfermedad muestran letargia, natación superficial, oscurecimiento de la piel y exoftalmia bilateral (Bruno, 1992; Santos y col., 1992; Sarti y col., 1992; Bustos y col., 1995). Microscópicamente, se ha

observado necrosis ulcerativa de la piel y compromiso de los principales órganos internos (Bruno, 1992; Santos y col., 1992; Sarti y col., 1992; Bustos y col., 1995), palidez branquial con hemorragia, exoftalmia bilateral, hemorragia en la base de las aletas y en casos crónicos ascitis, incluso ulceraciones ventrales con perforación de la pared abdominal y evisceración parcial (Bustos y col., 1995). Otros autores han observado abultamiento abdominal, palidez branquial y hemorragias en la base del pedúnculo (Bruno, 1992; Toranzo y Barja, 1993)

En los órganos internos se observa esplenomegalia (Baudin-Laurencin y col., 1989; Bruno, 1992; Santos y col., 1992), petequias y/o palidez en hígado y riñón, gastrodilatación, gastroenteritis, petequias en ciegos pilóricos y grasa visceral (Bustos y col., 1995) y ascitis (Santos y col., 1992). El bazo puede presentar desde petequias (Sarti y col., 1992, Bustos y col., 1995) hasta necrosis purulenta (Sarti y col., 1992).

2.5.- Morfología y características de las colonias

F. psychrophilum, es un microorganismo Gram negativo, aerobio estricto, bacilo delgado y curvo. El tamaño promedio es de 0.75 μm de diámetro y de 1.5 a 7.5 μm de largo (Pacha, 1968; Dalsgaard, 1993), además presentan movimiento deslizante (Bernardet y Kerouault, 1989; Dalsgaard, 1993 Schmidke y Carson, 1995). Para su aislamiento, los medios de cultivos que se utilizan son: agar MAO, agar Cytophaga, agar Shieh y TYES, y la temperatura óptima de incubación sería de 15 °C (Holt y col., 1993). Desarrolla colonias convexas, circulares y solevantadas, con diámetro de 1-5 mm y pigmentación amarilla, presenta motilidad y no está

capacitado para metabolizar carbohidratos (Pacha, 1968; Bernardet y Kerouault, 1989), sin embargo, es fuertemente proteolítico. Según Dalsgaard (1993), esta naturaleza proteolítica juega un importante rol en la patogenicidad de las cepas. La virulencia será mayor en aquellas que poseen la capacidad de degradar la elastina (Madsen y Dalsgaard, 1999).

2.6.- Flavobacteriosis en Chile

Es difícil determinar el primer brote de Flavobacteriosis en Chile debido a lo complejo del aislamiento e identificación del agente causal, a la insuficiente información y la sobrestimación de la resistencia de la trucha arco iris (*O. mykiss*) a esta enfermedad. Presumiblemente, la enfermedad se introdujo al país mediante ovas de truchas infectadas provenientes de países europeos (Bustos y col., 1995)

La mayoría de los casos de flavobacteriosis en Chile fueron inicialmente observados en agua dulce, en la isla de Chiloé y zonas cercanas a Puerto Montt (Bustos y col., 1995). En la actualidad se encuentran diseminados en prácticamente todas las áreas de cultivo de agua dulce del país y estuarinas (Bustos P., com. pers.).

2.7.- Sensibilidad a antibióticos

Los métodos habitualmente utilizados para determinar la sensibilidad “in vitro” de las bacterias frente a diferentes quimioterápicos son la prueba de sensibilidad de las diluciones y Kirby Bauer (San Martín; 1996).

El método de Kirby-Bauer o de difusión consiste en un disco de papel filtro impregnado con una concentración determinada del fármaco sobre un medio sólido, sembrado con un inóculo de microorganismos. Después de la incubación, el diámetro de la zona clara de inhibición que rodea al fármaco depositado se toma como medida de la potencia inhibidora del fármaco contra el microorganismo, a partir del disco se produce por difusión un gradiente de concentración del antibiótico del medio (Sumano, 1997).

La interpretación de la susceptibilidad significa que la infección causada por ese microorganismo puede ser aproximadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado. La resistencia significa que el microorganismo no sería inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismos de resistencia contra ese determinado antibiótico (Sumano, 1997).

Rangdale (1995), en un estudio realizado en Escocia, determinó *in vitro* la susceptibilidad de 48 aislados de *Flavobacterium psychrophilum*, dando como resultado que el 100% de ellos fue sensible a enrofloxacino, florfenicol y ciprofloxacino; entre 90-96% a doxicilina, amoxicilina, estreptomina; el 85% a sarafloxacino; 70-78% a oxolinato de sodio, cloramfenicol y tiamfenicol,

observándose una resistencia del 100% a sulfadiazina, 84% a neomicina y furazolidona y 50% a oxitetraciclina.

En la salmonicultura chilena los antimicrobianos comúnmente utilizados son flumequina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, sulfatrimetropin y eritromicina además de amoxicilina y florfenicol (San Martín, 1996).

Bovet (1995), menciona que de 34 cepas de *Cytophaga sp.* y *Flexibacter sp.*, aisladas en Chile y sometidas a pruebas de sensibilidad en placas con agar Cytophaga y sensidiscos, 91% presentó resistencia a sulfametoxasol con trimetoprin; 100% de sensibilidad a cloramfenicol; 97% a eritromicina; 94% a flumequina; 91% a ácido oxolínico; 62% a oxitetraciclina y solo 50% a ampicilina.

Oxitetraciclina es considerado el antimicrobiano de elección para el control de infecciones producidas por *Flavobacterium psychrophilum* en salmón coho, siendo el agente terapéutico más comúnmente utilizado durante brotes de CWD y RTFS (Holt y col. ,1993). Se ha descrito buenos resultados al usar oxitetraciclina vía oral, en dosis de 50-75 mg/kg pez/ día por 10 días han reducido considerablemente las pérdidas atribuidas a RTFS (Holt y col., 1993). Sin embargo, se ha detectado que con el tiempo, se ha originado resistencia a estos compuestos (Rangdale, 1995).

Florfenicol ha demostrado ser muy efectivo en reducir mortalidades causadas por *F. psychrophilum*. Así mismo, Flumequina ha sido la más efectiva en el control de RTFS en Alemania (Rangadale, 1998).

Las sulfonamidas y ácido oxolínico han evidenciado un reducido efecto terapéutico y generalmente se ha abandonado su uso en el tratamiento de RTFS y CWD (Rangdale, 1998).

La eficacia de los antimicrobianos contra patógenos bacterianos acuáticos es frecuentemente comprometida por la rápida emergencia de resistencia bacteriana. Así, numerosos antibiogramas indican la aparición de resistencia de *Flavobacterium psychrophilum* frente a sulfatrimetropin (Lorenzen, 1994; Schmidtke y Carson, 1995; Bovet, 1995; Bustos y col., 1995), fosfatina y penicilina (Bustos y col., 1995) y una considerable variación en la eficacia potencial de oxitetraciclina y ácido oxolínico (Lorenzen, 1994) y ampicilina (Schmidtke y Carson, 1995.) Mientras que Rangdale y col., (1998), indican que en los últimos años los brotes de RTFS en el Reino Unido han aumentado en frecuencia, respondiendo en forma reducida a los tratamientos efectuados. En el caso Chileno, la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos esta disminuyendo en tanto que están aumentando progresivamente, dado que esta patología es enzoótica en las aguas Chilenas y ha sido muy insistente el uso de antibióticos (Bustos P. com. pers.).

Por otra parte, se ha promovido el uso de vacunas comerciales (bacterinas) para el control de RTFS y de las flavobacteriosis tegumentarias y branquiales, sin embargo esta práctica no está totalmente difundida ya que la eficacia ha sido en general cuestionada. Una de las razones de este fenómeno, es probablemente porque los peces en general son inmunizados a bajo peso, cuando el sistema inmune no está aún suficiente desarrollado. Sin embargo, es claro que se requieren mayor investigación para optimizar la eficacia vaccinal (Bustos P., com. pers.).

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general:

- Analizar retrospectivamente la información disponible en ADL Diagnostic Chile Ltda. respecto de la susceptibilidad de diferentes antibióticos para el control de *Flavobacterium psychrophilum* en salmónidos, en la temporada 2000-2002, con la finalidad de utilizar esta información como herramienta de gestión sanitaria.

3.2.- Objetivos específicos:

- Determinar si existe diferencia en la susceptibilidad antibiótica de *Flavobacterium psychrophilum* en casos clínicos proveniente de distintas áreas geográficas.
- Determinar si existe diferencia en la susceptibilidad antibiótica de *Flavobacterium psychrophilum* en casos clínicos provenientes de diversos cuerpos de agua.
- Determinar si existe diferencia en la susceptibilidad antimicrobiana de *Flavobacterium psychrophilum* en casos clínicos presentes en diferentes especies salmonídeas.
- Determinar si existe diferencia en la susceptibilidad de *Flavobacterium psychrophilum* en casos clínicos en relación al peso de la especie salmonídea.
- Determinar si existe diferencia en la susceptibilidad antibiótica de *Flavobacterium psychrophilum* en los casos clínicos registrados en las distintas estaciones del año.

4.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Materiales

- Un computador.
- Información histórica almacenada en ADL Diagnostic Chile Ltda. entre el período 2000-2002.
- Mapa y subdivisiones por zonas geográficas.
- Normativas de SERNAPESCA.

4.2.- Métodos

A continuación, se explicará la forma de diagnóstico y la metodología del antibiograma realizado en el laboratorio ADL, entre los años 2000-2002, período desde el cual se extrajo la información con la finalidad de realizar el presente trabajo.

4.2.1.- Forma de diagnostico

El diagnóstico en ADL se determina por un conjunto de antecedentes epidemiológicos y pruebas de laboratorio, como son el historial clínico del centro, observación e inspección del Médico Veterinario que asiste a terreno, datos de mortalidad, características ambientales generales, manejos efectuados, condición de cultivo de los peces, terapias previas, infraestructura de cultivo, entre otros, además de los diversos exámenes de laboratorio: necropsia, cultivos

bacteriológicos, tinción Gram, características de la colonia, análisis enzimático (APY ZYM, marca Merck).

4.2.2.- Antibiograma

El antibiograma se realizó por medio del método de difusión en Agar Anacker y Ordal modificado (MAOA), incubándose por 48 horas a 17°C. Para la evaluación de la susceptibilidad de la bacteria se usaron los siguientes agentes antimicrobianos: amoxicilina, ácido oxolínico, enrofloxacino, florfenicol flumequina y oxitetraciclina, utilizándose para ello sensidiscos de marca Benton Dickinson (entre los años 2000-2001) y Oxoid (durante el año 2002).

La concentración de antibiótico de los sensidiscos, se presenta a continuación:

Tabla N°1: Concentración ($\mu\text{g/ml}$) de antibiótico de los sensidiscos.

ANTIBIOTICO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)
Amoxicilina	25
A. oxolínico	2
Enrofloxacino	5
Florfenicol	30
Flumequina	30
Oxitetraciclina	30

La lectura de los milímetros de los halos de inhibición en: **Sensible**, **Intermedio** y **Resistente**, se efectuó según la siguiente tabla de referencia humana indicado por el Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) entregado por el proveedor de sensidiscos (Benton Dickinson).

Tabla Nº 2: Interpretación de antibiogramas según halos de inhibición, indicados por NCCLS.

ANTIBIOTICO	RESISTENTE (mm)	INTERMEDIO (mm)	SENSIBLE (mm)
Amoxicilina	<=16	–	>=17
A. oxolínico	<=10	–	>=11
Enrofloxacino	<=17	18 a 21	>=22
Florfenicol	<=16	17 a 21	>=21
Flumequina	<=21	21 a 25	>=25
Oxitetraciclina	<=10	11 a 18	>=19

Con la información *in vitro* y clínica que ha sido almacenada en el laboratorio ADL, se diseñó una base de datos con los casos en los cuales se aisló *F. psychrophilum* entre los años 2000 a 2002.

En dicha planilla se recopiló, para cada aislamiento, los siguientes datos:

- Peso de la especie salmonídea
- Especie salmonídea en la cual se aisló la bacteria (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*, cuyos nombres comunes son: trucha, coho y salar, respectivamente)
- Cuerpo de agua (Piscicultura, Lago, Estuario)
- Área geográfica de origen de la especie salmonídea
- Estación del año
- Lectura del antibiograma de antibióticos (Amoxicilina, Ácido Oxolínico, Florfenicol, Enrofloxacino, Flumequina y Oxitetraciclina)

Posteriormente, se ubicó geográficamente los centros de cultivo positivos a *F. psychrophilum*, los cuales comprenden desde la IX hasta la XII región del país, y se dispusieron en zonas, según la división realizada por el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) para el “Programa de Vigilancia Pasiva” (Anexo 1), con la finalidad de realizar un adecuado análisis de susceptibilidad antibiótica, según área geográfica.

4.2.3.- Análisis estadístico

Para el análisis de los datos de susceptibilidad, se consideró los aislamientos de *F. psychrophilum* sensibles frente a los diversos antibióticos en estudio, aplicándose estadística descriptiva para los siguientes factores: zona de origen, cuerpo de agua, especie salmonídea, estación del año y peso corporal.

La estadística descriptiva formula reglas y procedimientos para la presentación de una masa de datos en una forma más útil y significativa, además establece normas para la representación gráfica de los datos, empleándose con el objetivo de tener una representación visual de la información. De esta manera los datos del trabajo de investigación fueron ordenados, resumidos y clasificados en tablas de frecuencias absolutas y relativas, además se utilizaron gráficos de barras y torta, indicados para variables cualitativas nominales, presentando así los datos en forma de dibujo para percibir fácilmente los hechos esenciales y compararlos (Zar; 2000).

Para analizar el factor peso de la especie salmonídea, se realizó una estratificación de los datos, de esta forma se dividieron los 227 aislamientos en tres grupos con frecuencias homogéneas, criterio práctico y útil para poder compararlos.

La estratificación originó tres intervalos, que se detallan a continuación:

- Peces con peso entre 0.15 y 1.5 g
- Peces con peso entre 1.6 y 9.3 g
- Peces con peso entre 10.3 y 303 g

Esta división tiene su correspondencia tanto en el estado de desarrollo de los salmones como en el cuerpo de agua en se cultivan, como indica la siguiente tabla:

Tabla N° 3: Estado de desarrollo y cuerpo de agua en que se cultivan los salmónidos, según el peso.

Rango de peso	Estado de Desarrollo	Cuerpo de agua	N°
0.15 y 1.5gr.	Alevín	Piscicultura	76
1.6 y 9.3gr.	Alevín Alevín-parr	Piscicultura Lago	76
10.3 y 303gr.	Pre-smolt Smolt	Lago Estuario	75

5.- RESULTADOS

5.1.- Mapa de distribución geográfica.

El estudio retrospectivo realizado permitió determinar la existencia de 227 aislamientos de *F. psychrophilum*, distribuidos geográficamente como se indica:

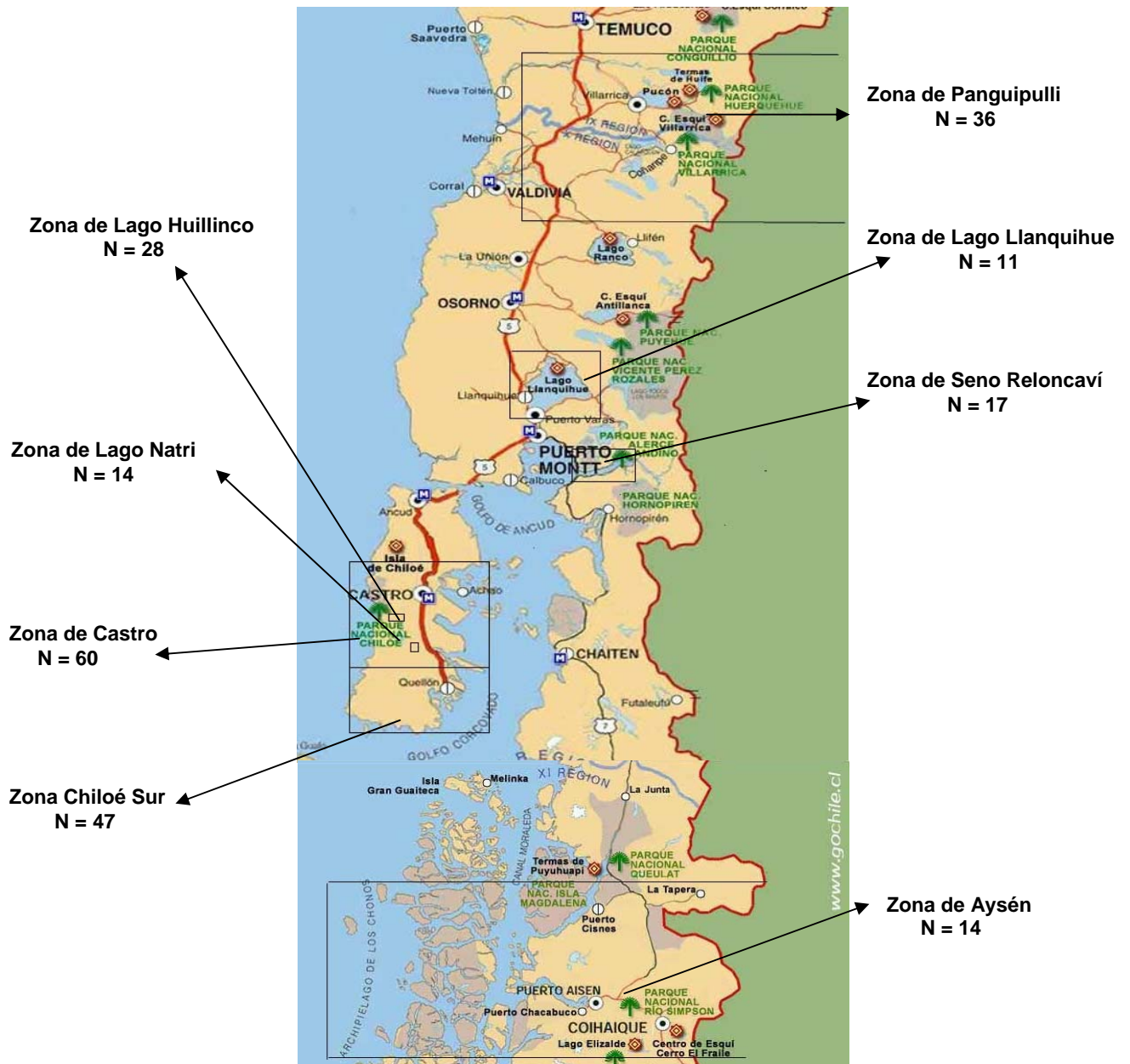


Figura N° 1: Distribución geográfica de los aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum*.

5.2.- Análisis descriptivo.

5.2.1- Distribución por zona de origen.

La distribución de los datos en ocho zonas geográficas, se presenta en el siguiente gráfico:

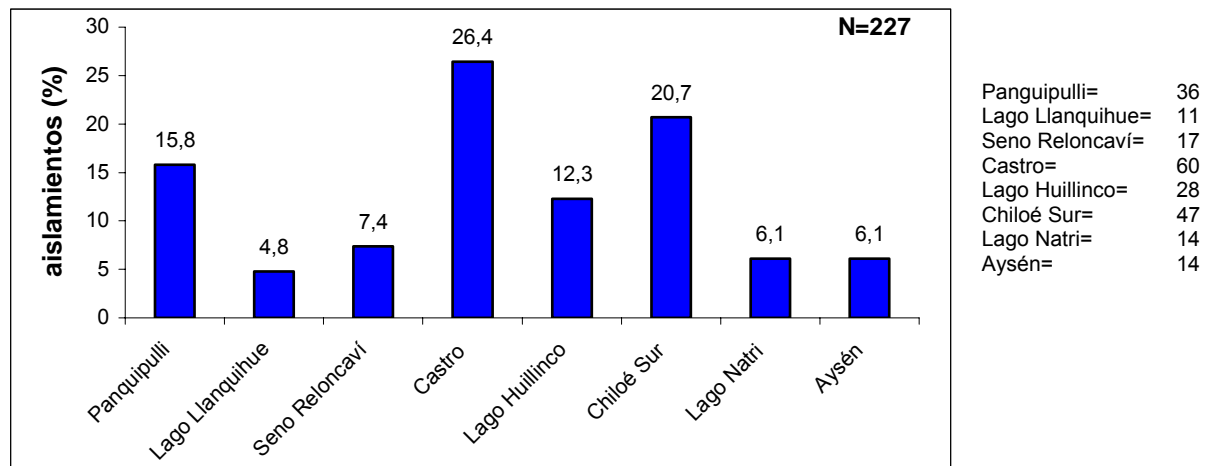


Gráfico Nº 1: Distribución porcentual de los aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* según zona de origen, entre los años 2000-2002.

Se observa claramente que la mayor concentración de los aislamientos se produjo en la zona de Castro con un 26.4%, seguido de la zona Chiloé Sur (20.7%) y la zona de Panguipulli (15.8%), en tanto en las zonas de lago Huillinco, Seno Reloncaví y lago Llanquihue se obtuvo un 12.3%, 7.4% y 4.8%, respectivamente. Por su parte, las zonas de Natri y Aysén poseen un 6.1%.

5.2.2- Distribución por cuerpo de agua.

En el gráfico N° 2 se presenta la distribución de los aislamientos de *F. psychrophilum* en tres cuerpos de agua: Piscicultura, Lago y Estuario.

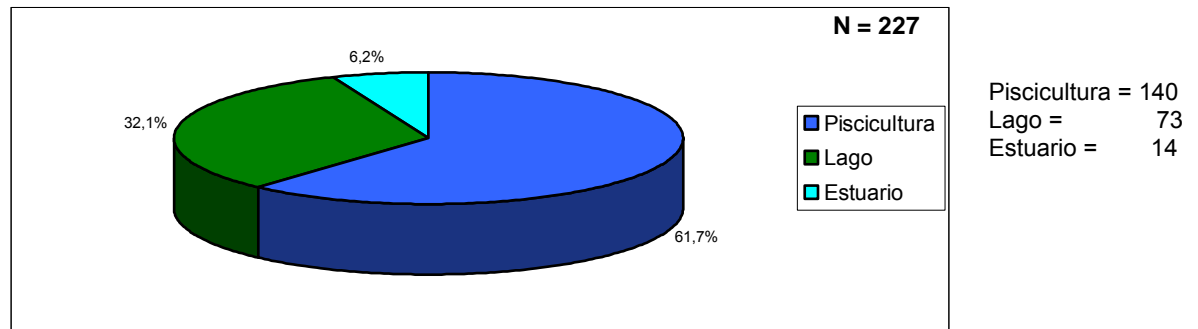


Gráfico N° 2: Distribución porcentual de los aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* según cuerpo de agua, entre los años 2000-2002.

Destaca que la mayor cantidad de los aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* provienen desde Piscicultura constituyendo el 61.7%, seguido por Lago con un 32.1% y el menor porcentaje lo aporta el Estuario con tan solo el 6.2% del total de aislamientos en estudio.

5.2.3- Distribución por especie salmonídea.

En el gráfico N° 3 se observa la disposición de los aislamientos según las tres especies salmonídeas en estudio: trucha arco iris, salar y coho.

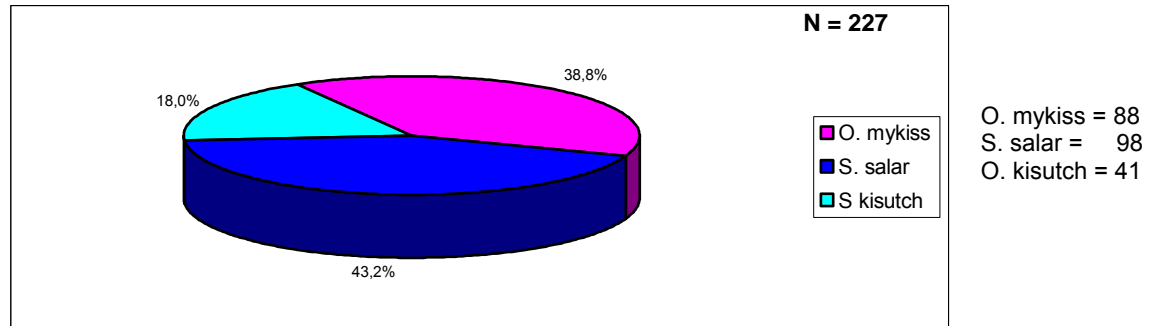


Gráfico N° 3: Distribución porcentual de los aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* según especie salmonídea, entre los años 2000-2002.

Se aprecia que la mayor cantidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* se distribuyen entre las especies salar y trucha, con un 43.2% y 38.8% respectivamente y en menor proporción se presenta la especie coho, con solo un 18.0%.

5.2.4.- Distribución por estación del año.

Se presenta en el siguiente gráfico la distribución de los aislamientos de *F. psychrophilum* por estación del año.

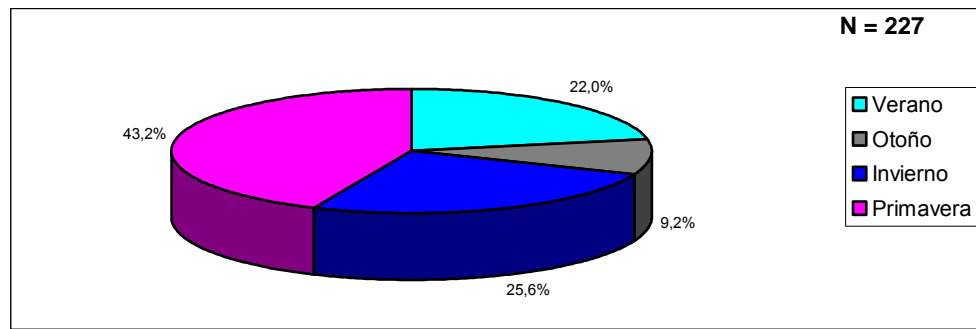
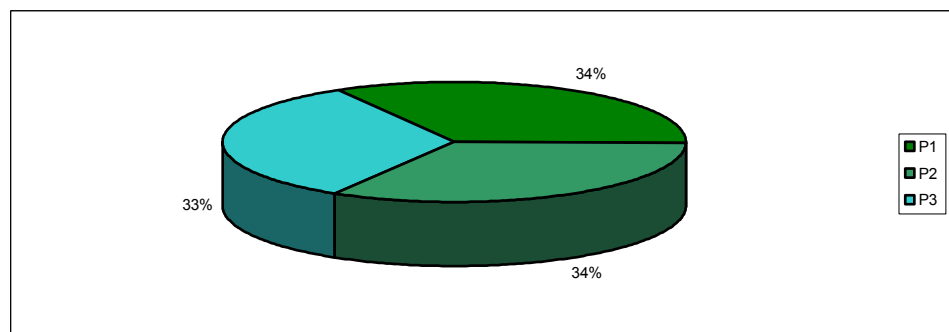


Gráfico N° 4: Distribución porcentual de los aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* según estación del año, entre el 2000- 2002.

Se observa un mayor porcentaje de aislamientos en Primavera (43.2%), un porcentaje similar entre las estaciones de Verano e Invierno, (22.0% y 25.6% respectivamente) y un valor muy bajo en Otoño (9.2%).

5.2.5.- Distribución por peso.

A continuación se presenta la distribución de los aislamientos con respecto a tres categorías, según peso.



P 1= Peces entre 0.15g - 1.5g P 2= Peces entre 1.6g - 9.3g P 3= Peces entre 10.3g - 303g

Gráfico N° 5: Distribución porcentual de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* según peso de la especie salmonídea, entre los años 2000-2002.

Se observa que la división de los aislamientos realizada bajo el criterio peso, arrojó tres rangos de peso con idéntica cantidad de aislamientos en Peso 1 y Peso 2, constituyendo el 34% cada uno de ellos y el Peso 3 conforma el 33% del total de los aislamientos.

5.2.6- Sensibilidad a antibióticos.

5.2.6.1.- Antibiograma.

En la tabla N° 4 se presenta la sensibilidad “in vitro” determinada mediante difusión en agar Anacker y Ordal modificado (MAOA), de los aislamientos de *F. psychrophilum* frente a los seis antibióticos analizados en este estudio.

Del total de 227 aislamientos de *F. psychrophilum*, el 98% fue sensible al menos a un antibiótico.

Tabla N° 4: Sensibilidad “in vitro” de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a seis antibióticos.

Antibiótico	Total aislamientos	N° sensibles	Sensibles (%)
Amoxicilina	195	115	58.9
Acido Oxolínico	226	117	51.7
Florfenicol	218	174	79.8
Enrofloxacino	218	151	69.2
Flumequina	222	140	63.0
Oxitetraciclina	205	163	79.5

En este estudio *F. psychrophilum* presento frente a Florfenicol y Oxitetraciclina las mayores sensibilidades en este estudio, con un 79.8% y 79.5% respectivamente. Por el contrario, frente a Enrofloxacino y Flumequina evidencio menor porcentaje de sensibilidad (69.2% y 63.0%), en tanto, frente a los antibióticos Amoxicilina y Acido Oxolínico, mostró las sensibilidades más bajas con tan solo un 58.9% y 51.7% respectivamente.

5.2.6.2.- Sensibilidad por zona de origen.

A continuación se presentan en forma gráfica la sensibilidad de aislamientos de *F. psychrophilum* frente a los seis antibióticos en estudio.

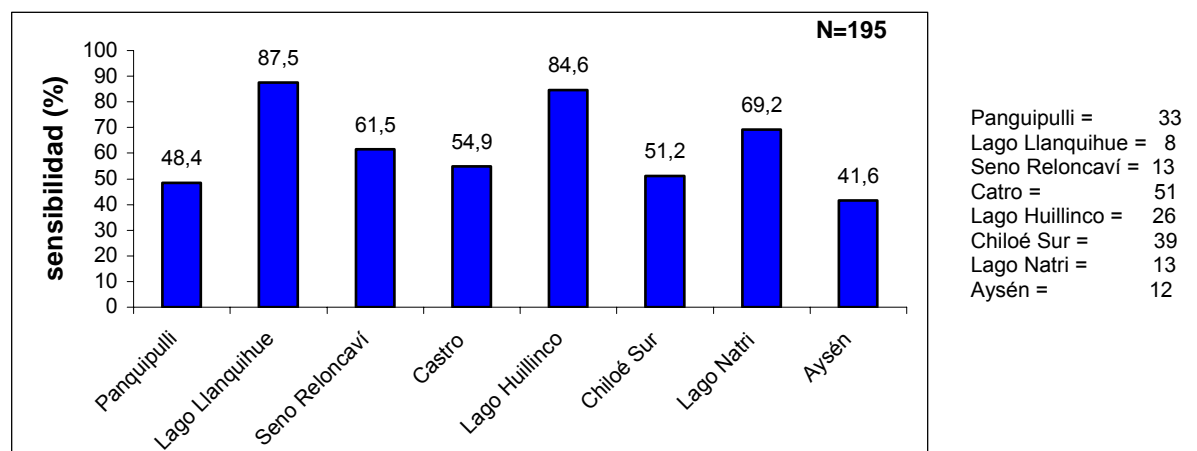


Gráfico Nº 6: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a Amoxicilina.

La sensibilidad que presenta *F. psychrophilum* frente a Amoxicilina es variable con respecto a la zona de origen, así los mayores porcentajes de

sensibilidad se observan en las zonas de Lago Llanquihue y Lago Huillinco con un 87.5% y un 84.6%, respectivamente, seguido por la zona de Lago Natri (69.2%), Seno Reloncaví (61.5%) y Castro (54.9%). Las zonas, en donde la bacteria presentó los menores porcentajes de sensibilidad, fueron Chiloé Sur (51.2%), Panquipulli (48.4%) y Aysén con solo un 41.6%.

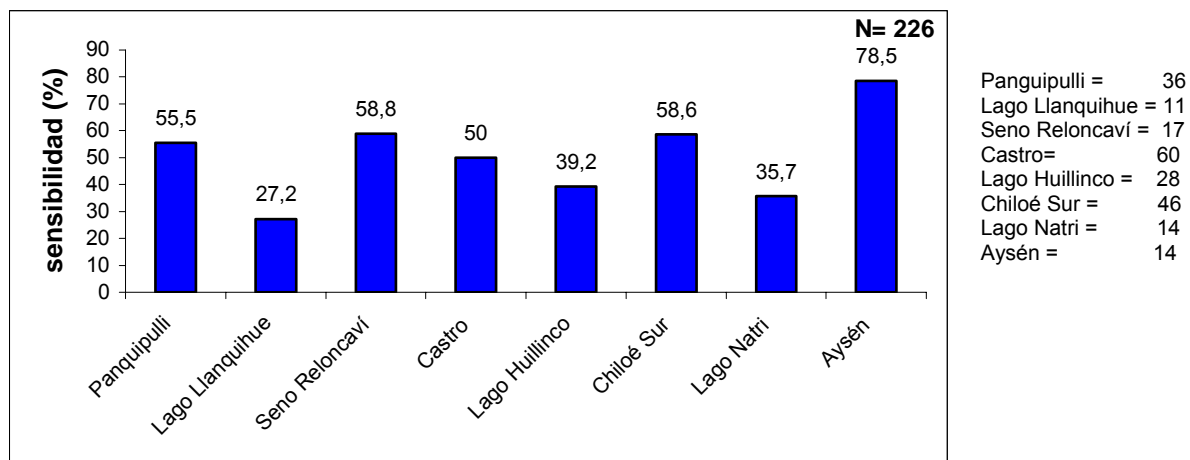


Gráfico Nº 7: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a Acido Oxolínico.

El antimicrobiano Acido Oxolínico presenta muy baja sensibilidad en la zona Lago Llanquihue (27.2%), Lago Natri (35.7%) y Lago Hullinco (39.2%), aumentando en la zona de Castro, Chiloé Sur y Seno Reloncaví (50% a 58.8%), finalmente la zona en que la bacteria presentó la mayor sensibilidad fue Aysén, con un 78.5%.

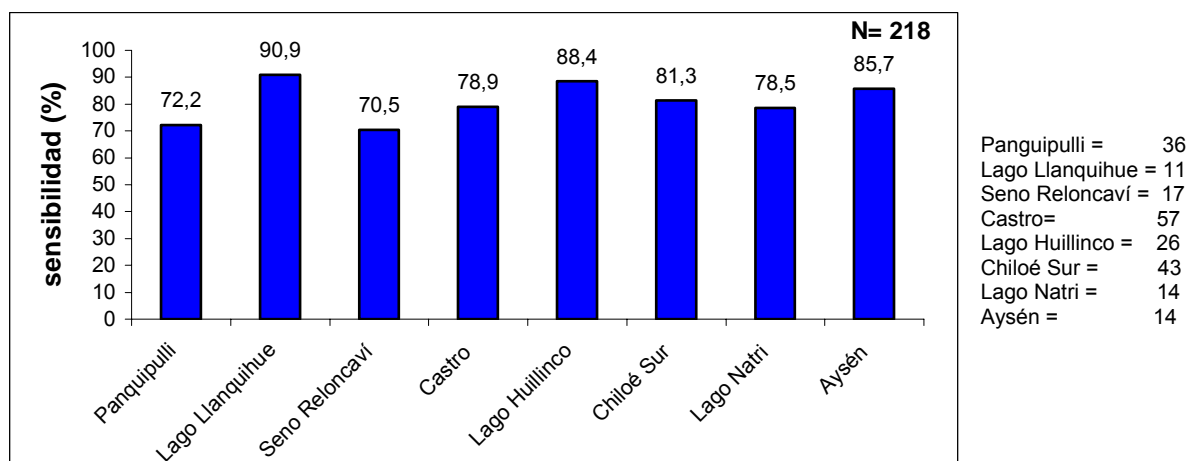


Gráfico N° 8: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a Florfenicol.

Se observa que los aislamientos de *F. psychrophilum* presentan una buena sensibilidad frente a Florfenicol en todas las zonas, así los mayores porcentajes se obtuvieron en el Lago Llanquihue, Lago Huillinco, Aysén y Chiloé Sur, oscilando entre 90.9% y 81.3% de sensibilidad, seguido por Castro (78.9%) y Lago Natri (78.5%). Los menores porcentajes de sensibilidad se presentaron en las zonas de Panguipulli y Seno Reloncaví, con un 72.2% y 70.5%, respectivamente.

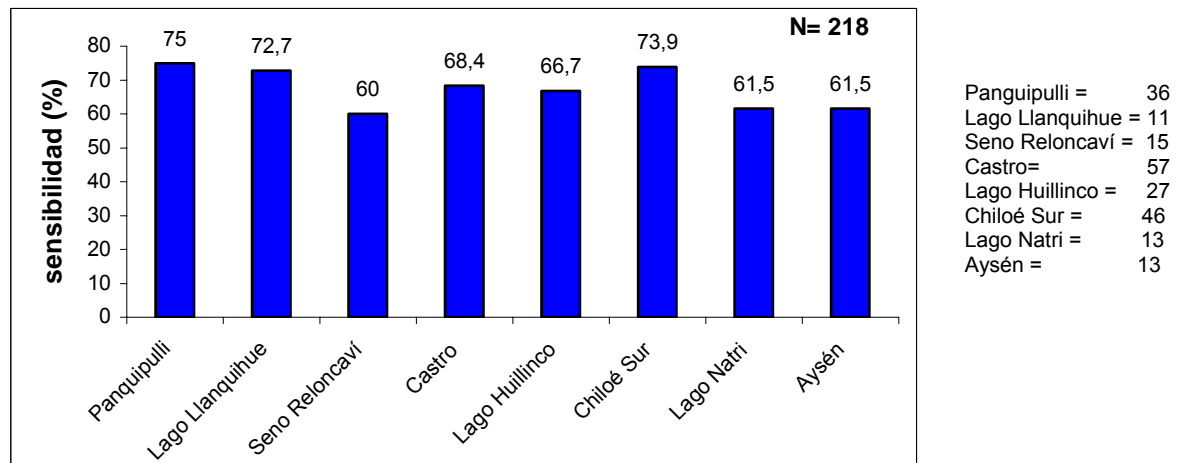


Gráfico N° 9: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a Enrofloxacino.

La sensibilidad que presenta *F. psychrophilum* frente a Enrofloxacino es homogénea en relación a las zonas geográficas de origen, de esta forma se observa que las zonas en que la bacteria muestra mayor sensibilidad frente a este antibiótico, lo constituyen Panguipulli (75.0%), Chiloé Sur (73.9%), Lago Llanquihue (72.7%), seguido por Castro (68.4%) y Lago Huillinco (66.7%). Las zonas en que la bacteria presento menores porcentajes de sensibilidad lo conforman Lago Natri, Aysén y Seno Reloncaví, oscilando entre un 60% y 61.5%.

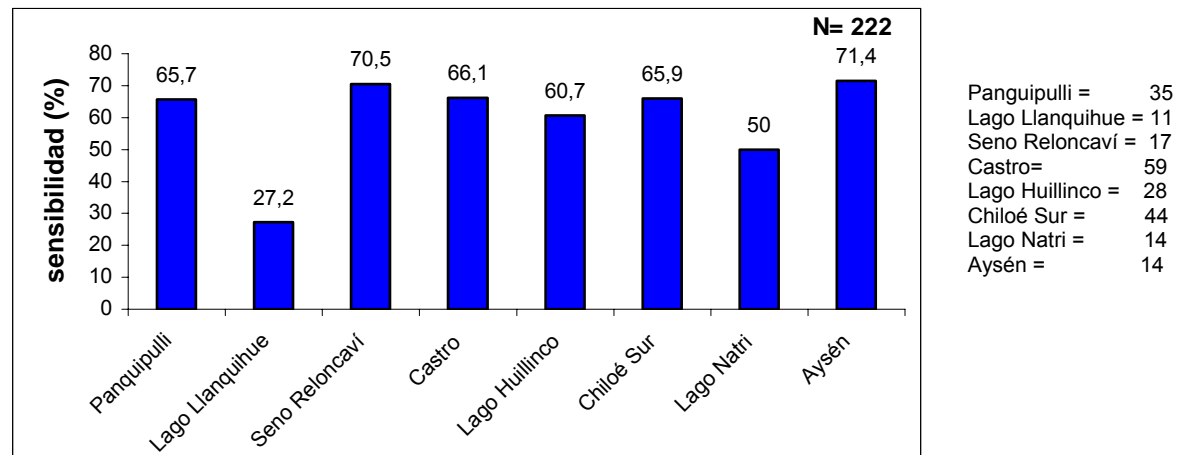


Gráfico N° 10: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a Flumequina.

F. psychrophilum presenta una sensibilidad homogénea frente a Flumequina en seis de las ocho zonas geográficas estudiadas, de esta forma Aysén, Seno Reloncaví, Castro, Chiloé Sur, Panguipulli y Lago Huillinco, los porcentajes de sensibilidad fluctuaron entre un 60.7% y un 71.4%. En tanto Lago Natri y Lago Llanquihue presentaron los menores porcentajes, con un 50% y 27.2% respectivamente.

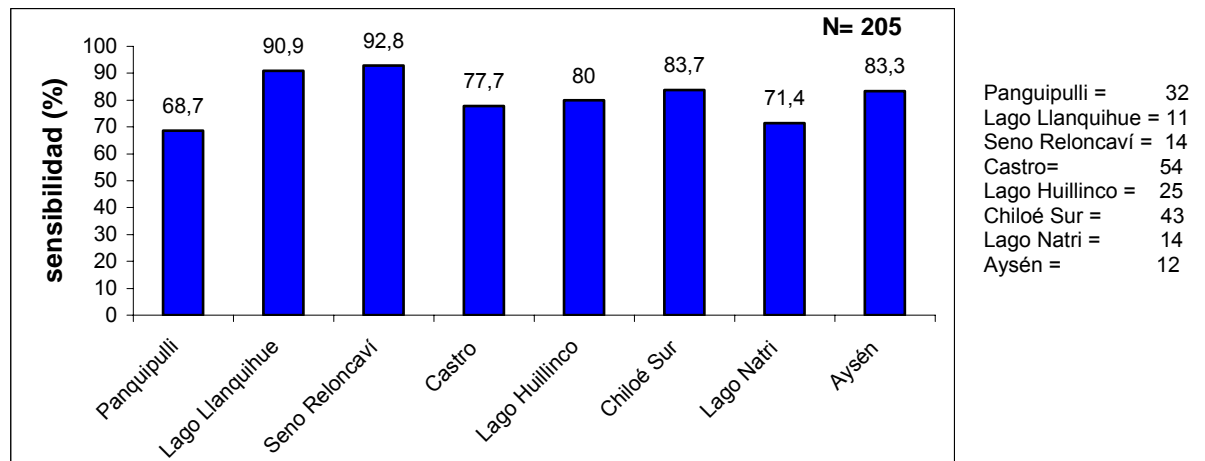


Gráfico Nº 11: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a Oxitetraciclina.

Se observa que los aislamientos de *F. psychrophilum* presentan una buena sensibilidad frente a Oxitetraciclina, constituyendo Seno Reloncaví y Lago Llanquihue las zonas en que la bacteria exhibe con mayores porcentajes de sensibilidad, con un 92.8% y 90.9% respectivamente, en tanto en las zonas de Chiloé Sur, Aysén, Lago Huillinco y Castro el porcentaje de sensibilidad oscilaron entre un 83.7% y 77.7%, menor proporción presentan las zonas de Lago Natri (71.4%) y Panguipulli (68.7%).

5.2.6.3.- Sensibilidad por cuerpo de agua.

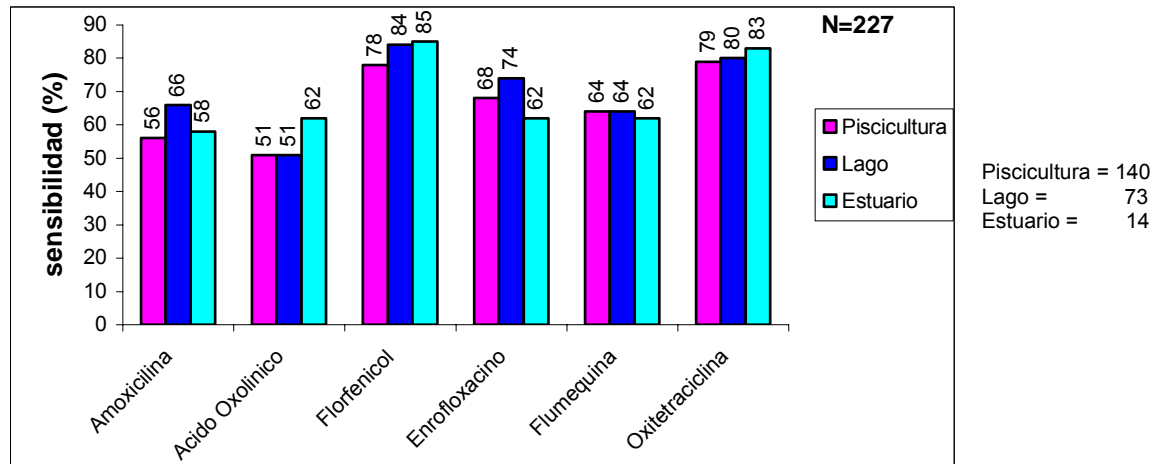


Gráfico N° 12: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a seis antibióticos, según cuerpo de agua.

La sensibilidad de aislamientos de *F. psychrophilum* provenientes de diversos cuerpos de agua frente a Florfenicol, Oxitetraciclina y Flumequina, fluctuó entre un 78% y 85%; 79% y 83%; 64% y 62%, respectivamente. En tanto en Enrofloxacino y Amoxicilina se observa un porcentaje levemente mayor en lago, con respecto a piscicultura y estuario. Por otra parte frente a Acido Oxolínico la bacteria presenta un 62% de sensibilidad en estuario, porcentaje levemente mayor en comparación con el 51% observado en piscicultura y lago.

5.2.6.4.- Sensibilidad por especie salmonídea.

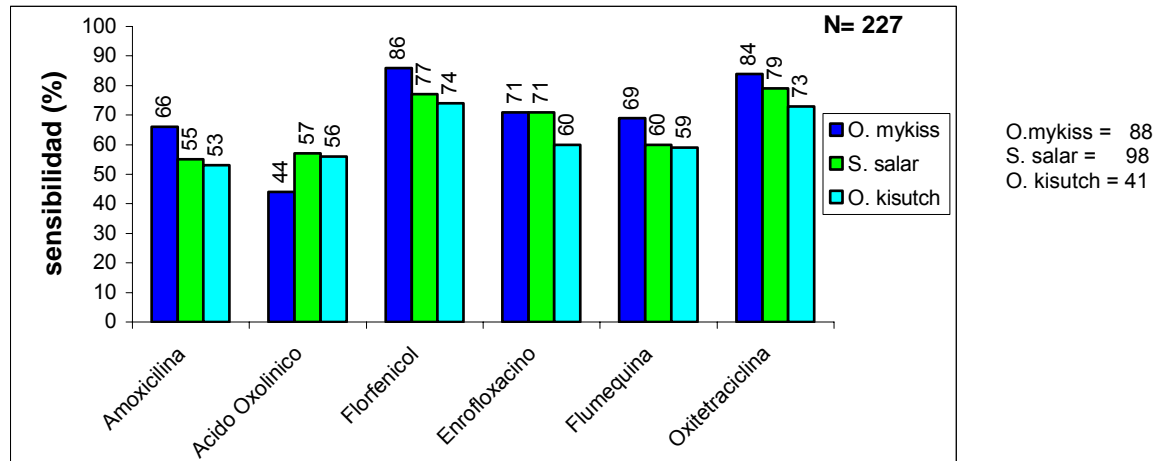


Gráfico Nº 13: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a seis antibióticos, según especie salmonídea.

En cuanto a la sensibilidad antibiótica de los aislamientos de *F. psychrophilum* provenientes de distintas especies salmonídeas, se observa que en las tres especies estudiadas la bacteria mostró la mayores sensibilidades frente Florfenicol y Oxitetraciclina, en tanto Amoxicilina y Acido Oxolínico mostraron las sensibilidades más bajas.

En general se aprecia una cierta homogeneidad en los porcentajes de sensibilidad antibiótica entre las especies.

5.2.6.5.- Sensibilidad según estación del año.

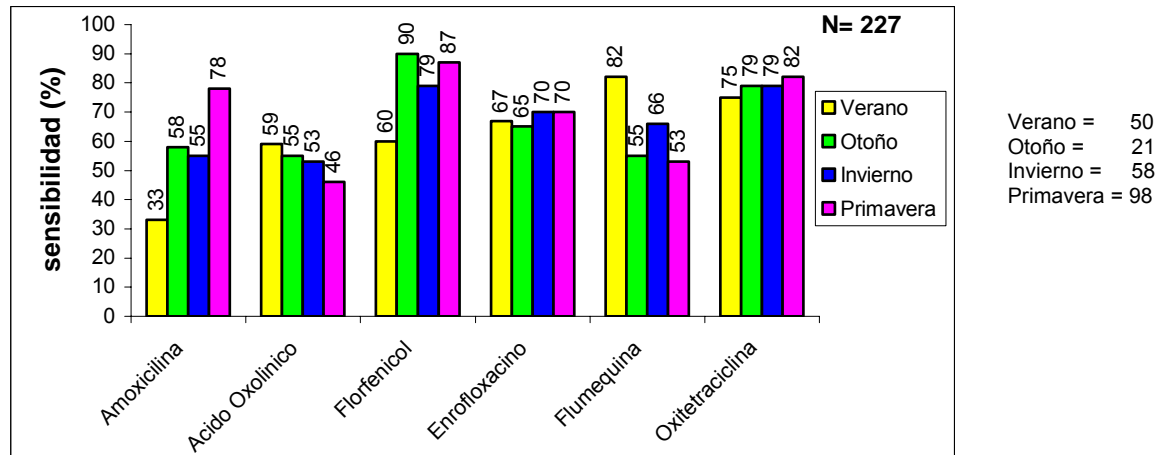


Gráfico Nº 14: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a seis antibióticos, según estación del año.

Se observa que en las estaciones de Otoño, Invierno y Primavera la bacteria frente a Florfenicol y Oxitetraciclina presentó los mayores porcentajes de sensibilidad y frente a Acido Oxolínico las más bajas. En la estación de Verano la bacteria mostró frente a Flumequina y Oxitetraciclina los mayores porcentajes de sensibilidad y frente a Amoxicilina la menor sensibilidad.

5.2.6.6.- Sensibilidad según peso.

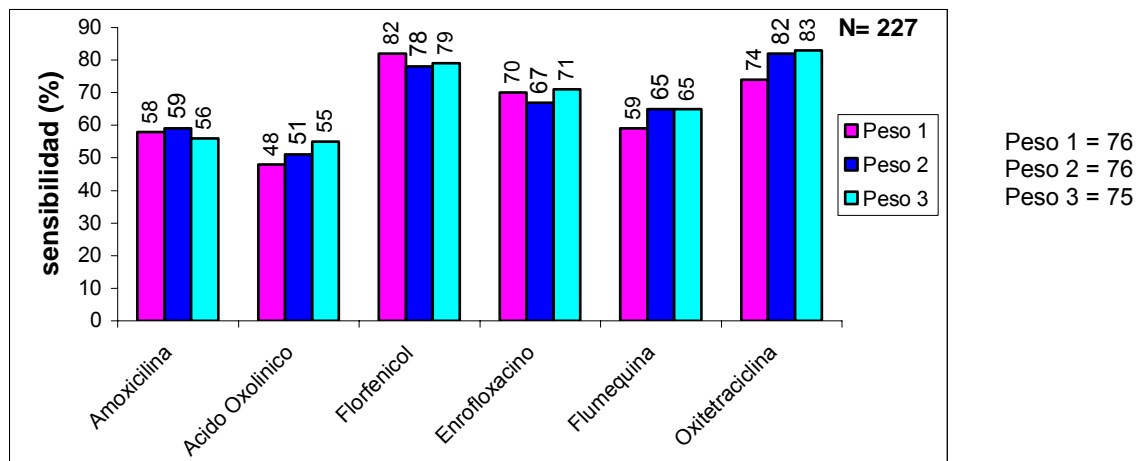


Gráfico Nº 15: Porcentaje de sensibilidad de aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* frente a seis antibióticos, según peso de especie salmonídea.

Se aprecia homogeneidad en la sensibilidad antibiótica en los tres rangos de peso estudiados, evidenciando que la bacteria frente a Oxitetraciclina, Florfenicol y Enrofloxacino presentó los mejores porcentajes de sensibilidad antibiótica, y que frente a Amoxicilina y Acido Oxolínico las sensibilidades más bajas.

6.- DISCUSION

La distribución de los aislamientos de *Flavobacterium psychrophilum* según zona de origen presentó una mayor concentración en Castro y Chiloé Sur (gráfico N° 1), dicha situación se debería a que el laboratorio del cual se extrajo la información se ubica en la ciudad de Castro (Chiloé), esto podría explicar que desde las zonas geográficamente cercanas a él exista una mayor cantidad de casuística desde los cuales se realizaron los aislamientos y que las zonas más alejadas de Castro la cantidad de estos sea menor.

La distribución de los aislamientos según cuerpo de agua (gráfico N° 2) presentó el mayor porcentaje en Piscicultura (61.7%) seguido por Lago (32.1%) y en una proporción mucho menor en Estuario (6.2%). Dicha distribución es esperable, debido a que en la práctica clínica la mayor cantidad de aislamientos se dan en Pisciculturas, que es en donde usualmente se crían las fases de alevines y juveniles, siendo los estados de desarrollo más susceptibles (Silva R., com. pers.), y a temperaturas del agua entre 4° C y 10° C (Dalsgaard, 1993) coincidiendo con Rangadale (1998) que menciona temperaturas inferiores a 10° C (Rangadale, 1998). Aunque en la práctica clínica en Chile esto a variado mucho y se detectan a menudo cuadros producidos por *F. psychrophilum* a temperaturas entre 13 y 16° C (Guzmán O., com. pers.)

F. psychrophilum carece de un huésped específico, ya que ha sido aislado desde distintas especies de peces (Wakabayashi, 1992). Dentro de las especies

salmonídeas *S. salar* posee una de las mayores susceptibilidades a la infección por esta bacteria, seguido por trucha y coho (Bustos P. com. pers.) lo que coincide con lo observado en este estudio (gráfico N° 3). Cabe mencionar que la especie *salar*, es la especie más cultivada en Chile, produciendo 142.314 toneladas durante el año 2004 (Fuente: Informe estadístico y de Mercado de SalmonChile, 2004), esto potencia la mayor casuística.

La distribución de los aislamientos de *F. psychrophilum* según estación del año, muestra que el mayor porcentaje se presentó en Primavera, seguido por las estaciones de Invierno, Verano y un valor muy bajo en Otoño (gráfico N° 4). Esto se debería en parte por el ciclo de vida del salmón de origen nacional, el cual predomina actualmente en Chile. En términos generales se produce el desove y fecundación durante la estación de Otoño, la etapa de absorción de saco vitelino y primera alimentación en Invierno, en Primavera los individuos están en el estado de desarrollo de alevín y parr, en tanto en Verano los peces se encuentran en estado de pre-smolt y smolt. (Guzmán O., com. pers.). En caso de peces importados, el ciclo difiere pero lejos, el predominio es de las cepas chilenas, sobre las cuales fundamentalmente descansa lo expuesto en el párrafo anterior (Bustos P., com. Pers.).

De esta forma se explicaría que la mayor cantidad de aislamientos se hayan concentrados en las estaciones de Primavera e Invierno, ya que los individuos se encuentran en estados de desarrollo en que generalmente se presenta los brotes de flavobacteriosis. Al respecto, se ha reportado en Estados Unidos que *F.*

psychrophilum afecta principalmente a alevines con saco (Holt, 1987), y en Europa se ha aislado frecuentemente desde alevines pequeños (Sarti y Giorgetti, 1996).

Las menores cantidades de aislamientos se produjeron en Otoño y Verano, estaciones del año en que los salmónidos se encuentran en estados de desarrollo muy inicial o más bien avanzado, respectivamente. Al respecto, Evensen y Lorenzen (1996) indican que en alevines de mayor tamaño y en individuos más grandes, generalmente los signos clínicos son menos obvios.

Con respecto a la distribución de los aislamientos según peso corporal, que se representa en el gráfico N° 5, se observa una división de los datos en tres grupos con una frecuencia homogénea entre ellas. Esta división tiene su correspondencia tanto en el estado de desarrollo de los salmones (alevín, pre-smolt y smolt) como en el cuerpo de agua en que se cultivan (piscicultura, lago y estuario), tal como se indica en la tabla N° 3.

En el presente estudio se obtuvo una alta sensibilidad de los aislamientos de *F. psychrophilum* frente a los antibióticos Florfenicol y Oxitetraciclina, moderada frente a Enrofloxacino y Flumequina y más baja frente a Amoxicilina y a Acido Oxolínico (Tabla N° 4). Estos datos, en general, concuerdan con la práctica clínica, en referencia a los resultados de eficiencia terapéutica en brotes de flavobacteriosis visceral en Chile, en los últimos años (Guzmán O., com. pers.).

Al confrontar la sensibilidad obtenida en la presente investigación respecto a la literatura científica, se observa una menor sensibilidad de los aislamientos frente

a los antibióticos en estudio, excepto Acido Oxolínico el cual presenta un porcentaje similar con lo descrito. Así, Florfenicol a pesar de constituir el quimioterápico con mejor sensibilidad en el estudio (79.8%), este porcentaje es menor con respecto a lo reportado por Rangdale (1995), quien en un estudio realizado en Escocia determinó un 100% de sensibilidad in vitro; similar observación hace Ortiz (2002), reportando un 95% de sensibilidad frente al mencionado antibiótico en aislamientos nacionales de *F. psychrophilum*. Florfenicol ha sido utilizado en ensayos clínicos de laboratorio y terreno reportando ser muy efectivo vía oral, en reducir las mortalidades causadas por *F. psychrophilum* en cuadros de flavobacteriosis visceral (Rangdale, 1998).

Se describen buenos resultados en el control de infecciones originadas por *F. psychrophilum* mediante la utilización de Oxitetraciclina (Lorenzen y col., 1991), considerándose el antimicrobiano de elección (Holt y col. ,1993). Respecto a la sensibilidad obtenida en esta investigación (79.5%), ésta fue mayor que el 62% reportado por Bovet (1995) en un estudio basado en aislamientos de *Cytophaga sp.*, pero menor que el 97.8% descrito por Riofrío (2000) y el 95% reportado por Ortiz (2002).

En relación a Flumequina, Ortiz (2002) reportó un 94% de sensibilidad, bastante más alto al 64.6% observado en el presente estudio. Bustos y col. (1995) también describen susceptibilidad de cepas chilenas de *F. psychrophilum* frente a este antimicrobiano. Además, se ha descrito como efectiva en el control de brotes de RTFS en Alemania (Weis, 1987).

En relación a la sensibilidad de *F. psychrophilum* frente a Enrofloxacino (69.2%) Riofrío (2000) y Ortiz (2002) reportaron una mayor sensibilidad con un 100% y 97% respectivamente en cepas chilenas.

A diferencia de lo observado en el presente estudio con respecto a la sensibilidad frente a Amoxicilina (58.9%), Dalsgaard y Madsen (2000) y Riofrío (2000) describen un 100% de sensibilidad en aislamientos nacionales de *F. psychrophilum* frente a dicho antibiótico, sin embargo Rangdale (1994) menciona que ha encontrado aislamientos de *F. psychrophilum* resistente a Amoxicilina en lugares donde este antimicrobiano ha sido utilizado extensamente por largos períodos (sobre tres años), así Schmidt y col (2000) en un estudio realizado en Dinamarca, determinaron un 100% de resistencia a este antibiótico. Alderman (1998) menciona la emergencia de resistencia de *F. psychrophilum* a Amoxicilina, debido a su excesivo uso en terapias, disminuyendo la sensibilidad a la droga con el transcurso del tiempo. Cabe destacar que en Chile, Amoxicilina fue bastante efectivo durante los primeros años de uso, luego fue progresivamente perdiendo eficacia por las razones expuestas en las citas bibliográficas precedentes (Bustos P., com. Pers.).

En relación con Acido Oxolínico, Bovet (1995) y Bustos y col. (1995), reportaron sensibilidad "*in vitro*" en aislamientos nacionales frente a este antibiótico, por su parte Riofrío (2000) constató sólo un 51.1% de sensibilidad, concordando con el 51.7 % observado en este estudio. Del mismo modo, Dalsgaard y Madsen (2000) indican un 48% de sensibilidad frente a este antibiótico y Skarmeta (1996) evidenció resistencia en 10 de sus 11 cepas españolas. Acido Oxolínico ha

evidenciado un reducido efecto terapéutico y se ha abandonado su uso en el tratamiento de cuadros clínicos provocados por *F. psychrophilum* (Rangdale, 1998); Por esta razón este antibiótico nunca fue muy usado en los casos de flavobacteriosis (Silva R., com. pers.)

El hecho que cinco de los seis antibióticos analizados muestren una menor sensibilidad a lo descrito en literatura, podría deberse a que los aislamientos de cepas de *F. psychrophilum* en el estudio fueron realizados varios años después a los analizados en la literatura. Al respecto Bruun y col (2000), reportan un incremento significativo en la resistencia de *F. psychrophilum* a Amoxicilina en Dinamarca, considerando que mientras en 1994 no existían cepas resistentes, en 1998 un 36% de las cepas analizadas fueron resistentes a este antimicrobiano, siendo en este país la Amoxicilina utilizada desde 1993.

De este modo, durante este lapso de tiempo las bacterias podrían haber sufrido cambios por diversos factores, algunos de los cuales se analizarán a continuación:

Un factor importante sería la excesiva utilización de los antibióticos en la industria salmonera, ya que según San Martín (1996), la principal causa de que las bacterias cambien su patrón de sensibilidad es el empleo indiscriminado de antibióticos, comenzando a presentarse fracasos frente a una terapia tradicional ya que se ve favorecida la aparición de cepas que han adquirido resistencia ya sea por mutaciones cromosómicas o bien por adquisición de plásmidos.

Flavobacterium psychrophilum adquiere resistencia frente a los antibióticos por la presencia de plásmidos (Rangdale, 1995). Ortiz (2002) pudo establecer en su estudio con 21 aislamientos nacionales, cierta relación entre resistencia bacteriana y plasmidios. Es así, como para el Acido Oxolínico determinó resistencia en 7 plasmidotipos , siendo los tamaños observados entre 2.1 kb y 3.7 kb, similar a lo que ocurrió para flumequina. En cuanto a Amoxicilina, en 5 plasmidotipos se estableció resistencia y el tamaño de los plásmidos encontrados vario desde 2.8 kb a 4.8 kb y para Oxitetraciclina observo en 2 plasmidotipos cuyos pesos fluctuaron entre 2.1 kb y 4.8 kb.

En cuanto a la relación entre uso indiscriminado de antibiótico y resistencia bacteriana, es necesario mencionar la excesiva utilización de antibióticos por parte de la industria acuícola chilena, ya que para producir una tonelada de salmón, se usa 75 veces más antibiótico que en la industria Noruega (Cabello, 2003), utilizándose para estimular el crecimiento de los peces, prevenir enfermedades bacterianas y para el tratamiento de estas mismas (Burka y col. 1997), McPherson y col. (1991) determinaron resistencia de bacterias Gram negativas frente a varios antibióticos, dichas bacterias fueron obtenidas desde el tracto intestinal, agua y sedimento de estanques de pisciculturas y ríos del sureste de Estados Unidos, la resistencia fue asociada a la realización de tratamientos con estos agentes microbianos. Spanggaard y col. (1993) señalan que existe aumento de la resistencia a Oxitetraciclina y Acido Oxolínico en bacterias presentes en zonas de cultivos de salmones en Dinamarca y que la resistencia a Acido Oxolínico se debe al excesivo uso que se la ha dado a este agente antimicrobiano en la producción de salmones.

La presencia de antibióticos residuales también influiría en la aparición de resistencia bacteriana, al respecto estudios han comprobado que los antibióticos permanecen en el ambiente acuático de los recintos de acuicultura por períodos prolongados de tiempo, esto se produce porque estas sustancias son adicionadas en masa al alimento, el cual no es consumido totalmente, permaneciendo en el ambiente con la habilidad de seleccionar bacterias resistentes a los antibióticos (Hektoen y col. 1995). Se ha reportado que la acumulación de alimento para peces con antibióticos en el medio ambiente sería la causa de los niveles de resistencia de Acido Oxolínico en bacterias presentes en zonas de cultivos de salmones en Dinamarca (Vaughan y col. 1996). Nygaard y col. (1992) mencionan que los posibles impactos a causa de los residuos de agentes antibacterianos en el sedimento de las pisciculturas son cambios en la cantidad y calidad de la flora bacteriana del sedimento, originando modificaciones orgánicas en los niveles de degradación, efectos tóxicos sobre la fauna silvestre y desarrollo de la resistencia bacteriana.

Hektoen y col. (1995) señalan la persistencia de algunos antibióticos como Oxitetraciclina, Acido Oxolínico y Flumequina, por más de 180 días en las capas más profundas del sedimento, mientras que en las capas superficiales es menor, principalmente por el mayor arrastre y redistribución de ellos que por degradación. Finalmente, la concentración de Florfenicol disminuyó rápidamente, calculándose una vida media de 4.5 días. Cabe destacar que en la medida que se avanza en el desarrollo tecnológico y la presión del consumidor, los equipos de detección de residuos antibióticos son más sofisticados y hoy en día, se detectan mayor residualidad en el mismo período de tiempo (Bustos P., com. Pers.).

Otro factor que pudo haber influido en los bajos porcentajes de sensibilidad obtenidos, podría deberse al aislamiento de cepas silvestres ya que uno de los efectos del uso de antibióticos en acuicultura es la selección de bacterias resistentes, tanto en la flora normal de los recintos acuícolas y alrededor de ellos como entre los patógenos causantes de enfermedades de peces (Alderman y col. 1998), al respecto Miranda y col. (2002) reportó la presencia de bacterias con resistencia múltiple a antibióticos en el entorno acuático que rodea a varios recintos de acuicultura del salmón en Chile. (Miranda y Zemelman, 2002).

En cuanto al porcentaje de sensibilidad de los aislamientos de *F. psychrophilum* provenientes de distintas áreas geográficas frente a los seis antibióticos en estudio, se observó que frente a Florfenicol (gráfico N° 8), Enrofloxacino (gráfico N° 9) y Oxitetraciclina (gráfico N° 11) presentaron porcentajes de sensibilidad homogéneos entre las distintas zonas geográficas, además dichos porcentajes fueron similares al determinado con la totalidad de los aislamientos (Tabla N° 4), lo que concuerda con lo observado por Riofrío (2000), quien determinó en su estudio con cepas chilenas provenientes desde diversas áreas geográficas, una estrecha similitud en sus características morfológicas y bioquímicas, confirmando la homogeneidad existente entre cepas de esta bacteria. En tanto, Chakroun y col. (1998), analizaron diferentes cepas de *F. psychrophilum*, provenientes de diferentes áreas geográficas, no observando ninguna correlación entre ribotipos y el origen geográfico de los aislamientos.

Por el contrario, la bacteria frente a Amoxicilina (gráfico N° 6), Acido Oxolínico (gráfico N° 7), y Flumequina (gráfico N° 10), no presentaron porcentajes

de sensibilidad homogéneas entre las distintas zonas geográficas. Precisamente, estos antibióticos son los que presentaron las menores sensibilidades en el estudio, situación que se explicaría por que Amoxicilina adquiere fácilmente resistencia, debido presumiblemente a su mecanismo de acción, ya que actúa sobre la pared al impedir su transpeptidación (Sumano, 1997), en tanto el sitio de acción de Acido Oxolínico y Flumequina es sobre DNAgirasa, lo que no facilita el desarrollo de resistencia, pero lamentablemente esto se ha producido por el excesivo uso luego de los buenos resultados iniciales (Luders C., com. pers.).

Con los mencionados antecedentes, se podría inferir que la heterogeneidad de la sensibilidad de la bacteria frente a las drogas en cuestión con respecto a las zonas, se debería al excesivo uso en aquellas en que se observa mayor resistencia, observándose entre Acido Oxolínico y Flumequina resistencia cruzada debido a que ambas pertenecen al grupo de las quinolonas (Luders C., com. pers.). Esto se evidencia en la zona Lago Llanquihue y Lago Natri, que presentaron porcentajes de sensibilidad mucho más bajos tanto para Acido Oxolínico como para Flumequina.

En cuanto a la susceptibilidad antibiótica de *F. psychrophilum* provenientes de diversos cuerpos de agua (gráfico N° 12), de diferentes especie salmonídea (gráfico N° 13) y de distintos pesos de la especie salmonídea (gráfico N° 15), presentaron porcentajes de sensibilidad similares a lo observado en la totalidad de los aislamientos (Tabla N° 4), es decir, en general siguen un mismo patrón, concordando con lo descrito en la literatura. Al respecto, tanto Riofrío (2000) como Ortiz (2002) en estudios con aislamientos nacionales de *F. psychrophilum*, se observó que los porcentajes de sensibilidad de cepas provenientes de distintas especies salmonídeas y de cepas procedentes de diversos cuerpos de agua,

presentaron el mismo patrón de sensibilidad que se presentó en la totalidad de los aislamientos. Con respecto a la variable peso no existe antecedentes descritos ni publicados para confrontar los resultados obtenidos en este estudio. A partir de lo anteriormente mencionado y a los resultados obtenidos en este estudio, podría inferirse que no existe relación entre la sensibilidad antibiótica de *F. psychrophilum* con respecto a las variables de especie salmonídeas y cuerpos de agua.

En relación al porcentaje de sensibilidad de los aislamientos de *F. psychrophilum* provenientes desde las estaciones del año (gráfico N° 14), se observó que la sensibilidad frente a Oxitetraciclina y Enrofloxacino en las cuatro estaciones son similares a los porcentajes de la totalidad de los aislamientos (Tabla N° 4) y que junto con Florfenicol siguen mostrando los mayores porcentajes de sensibilidad. En cuanto a Acido Oxolínico, tal como en los porcentajes de la totalidad de los aislamientos (Tabla N° 4), constituye el antibiótico en que la bacteria presentó los menores porcentajes de sensibilidad en tres estaciones del año, en tanto, en Verano la menor sensibilidad la constituyo frente a Amoxicilina. Se observa que los antibióticos que presentaron menor sensibilidad (Amoxicilina y Flumequina) mostraron mayor heterogeneidad en cuanto al porcentaje de sensibilidad entre las estaciones del año, además en la estación de Verano, se observó variaciones al comparar las sensibilidades frente a Florfenicol, Amoxicilina y Flumequina con respecto al porcentaje de sensibilidad que obtuvieron con la totalidad de los aislamientos. Situación que no necesariamente se adjudicaría a altas temperaturas en esta estación, debido a que en muchas pisciculturas se manejan la temperatura, más bien, este efecto es fortuito y derivado de la casuística que no permite

comparaciones apropiadas, existiendo riesgo de interpretación equivocada (Bustos P., com. pers.)

En el presente estudio se analizaron los datos de sensibilidad *in vitro* de *F. psychrophilum* a través de antibiograma, el cual constituye una referencia acerca de los antibióticos que tendrían una buena eficacia terapéutica. Sin embargo, para tomar la mejor decisión en la elección de la droga a utilizar para el tratamiento de un brote determinado, existen otros factores claves que evaluar del producto químico terapéutico, entre ellos: si es un bacteriostático o bactericida, la concentración mínima inhibitoria y como se relaciona con la concentración plasmática, biodisponibilidad de la droga, entre otros.

7.- CONCLUSIONES

- ✚ Existe diferencia en la susceptibilidad antibiótica de *Flavobacterium psychrophilum* en casos clínicos proveniente de distintas áreas geográficas frente a Amoxicilina, Acido Oxolínico y Flumequina. Esto podría deberse al mayor o menor uso de la droga.

- ✚ No se encontró diferencia en la susceptibilidad antibiótica de *Flavobacterium psychrophilum* en casos clínicos provenientes de diversos cuerpos de agua.

- ✚ No se encontró diferencia en la susceptibilidad antimicrobiana de *Flavobacterium psychrophilum* en casos clínicos presentes en diferentes especies salmonídeas.

- ✚ No se encontró diferencia en la susceptibilidad de *Flavobacterium psychrophilum* en casos clínicos en relación al peso de la especie salmonídea.

- ✚ No se puede concluir si existe diferencia en la susceptibilidad antibiótica de *Flavobacterium psychrophilum* en los casos clínicos registrados en las distintas estaciones del año, debido a falta de información.

8.- BIBLIOGRAFIA

ALDERMANN, D.J. 1988. Fisheries chemotherapy : a review. En : J.F. Muir y R.J. Roberts (ed.). Recent advances in aquaculture. Croom Helm Ltda, London, pp. 3.

BAUDIN-LAURENCIN, F., J.C. CASTRIC., M. VIGNEULLE., G. TIXERANT.1989.La myxobactériose viscérale de la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri* R: une forme nouvelle de la maladie de leau froide a *Cytophaga psychrophila* .Bull. Acad. Vet. Fr. 62: 147-157

BERNARDET, J.F., B. KEROUAULT.1989 Phenotypic and genomic studies of "Cytophaga psychrophila" isolates from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. Appl. Environ..Microbiol. 55:1796-1800.

BERNARDET, J.F., P. SEGERS., M.VANCANNEYT., F. BERTHE., K, KERSTERS., P. VANDAME. 1996.Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. Nov. (basinm, *Cytophaga aquatilis*, Strohl and Tait 1978). Int. J. Syst. Bacteriol.46:128-148.

BORG,A.F. 1948. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes.phD. Thesis.University of Washinton.Seattle.

BOVET, P. 1995.Caracterización bioquímica y electroforética de bacterias de la familia Cytophagaceae aisladas desde salmónidos. Tesis de Grado, Escuela de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

BROOKS, P. (1993). *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*, Borg), histopathology associated with mortalities among farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* in the U.K. Fish Pathol. 12 (6): 215-216.

BRUNO, D. W. (1992). *Cytophaga psychrophila* ("Flexibacter psychrophilus") (Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in the UK.

BRUUN, M.S., A.S. SCHMIDT., L.MADSEN., I. DALSGAARD. 2000. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. Aquaculture. 187:201-212.

BULLOCK, G.L.1972.Studies on selected myxobacteria pathogenic for fishes and bacterial gill diseases in the hatchery-reared salmonids.U.S.Fish and Wildlife Service.Technical papers N°60, Washington, D.C.pp.30.

BUSTOS P.A., J. CALBUYAHUE; J. MONTAÑA; B. PAZO; P. ENTRALA Y R. SOLERVICENS(1995). First Isolation of *Flexibacter psychrophilum*, as Agent of Rainbow Trout Fry Síndrome (RTFS), Producing Rainbow Trout Mortality in Chile. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 15 (5): 162-164.

CHAKROUN, CH., GRIMONT, F., URDACI, M., BERNARDET, J. (1998). Fingerprinting of *Flavobacterium psychrophilum* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *Dis. Aquat. Org.* 33: 167-177.

CRUMP, C, MALCOLM B. PERRY, SHARON C. CLOUTHIER, and WILLIAM W.KAY, 2001. Antigenic Characterization of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ. Microbiol.* 67:750-759.

DALSGAARD, I. (1993). Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga* – like bacteria pathogenic for fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3:127 – 144.

DALSGAARD, I., MADSEN. 2000. Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *J. Fish Dis.* 23: 199-209.

DALSGAARD, I., L. MADSEN. 2000. Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *J. Fish Dis.* 23: 199-209.

DAVIS, H.S. 1946. Care and diseases of trout. US Dept. Of the Interior Research Report N° 12 US Government Printing Office, Washinton DC. pp.98.

EKMAN, E., H. BORJESON., N. JOHANSSON. 1999. *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Dis. Aquat. Org.* 37: 159-163.

EVENSEN, O., E. LORENZEN. 1996. An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilum* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Dis. Aquat. Org.* 25: 53-61.

HEKTOEN, H.; J. A. BERGE; V. HORMAZABAL; M. YNDESTAD (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133: 175-184.

HENRÍQUEZ, A. 2003. Chile lidera suministro de salmón a EE.UU. *Salmonoticias*. 113:12.

HOLT, R.A. 1987. *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. Ph.D. Thesis, Oregon State University, Corvallis.

HOLT, R.A., J.S. ROHOVEC., J. L. FRYER. (1993). Bacterial cold – water disease. En: Inglis, V, R.J. Roberts; N.R. Bromage (ed.). *Bacterial diseases of fish*. Blackwell Scientific Publication, Oxford. Pp. 3 – 22.

HOLT, R.A. AMANDI., J.S. ROHOVEC., J.L. FRYER. 1989. Relation of water temperature to bacterial cold-water disease in coho salmon, chinook salmon, and rainbow trout. *J. Aquat. Anim Health.* 1:94-101.

INGLIS, V.; R. Robert and N. BROMAGE (1993). Bacterial cold-water disease (Cap.1) and Columnaris disease (Cap. 2). *Bacterial diseases of fish*: 3-39.

LORENZEN, E., 1994. Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS) .PhD. Thesis. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.

LORENZEN, E., I. DALSGAARD., J. FROM., E.M. HANSEN., V. HOLYCK., H. KORSHOLM., S. MELLERGAARD., N. J. OLESEN. 1991. Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11:77-79.

MADETOJA, J., P. NYMAN., T. WIKLUND. 2000. *Flavobacterium psychrophilum* invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org. 43: 27-38.

MADSEN, L and I. DALSGAARD (1999). Reproducible methods for experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.

MADSEN, L., I. DALSGAARD. 1998. Characterization of *Flavobacterium psychrophilum* comparison of proteolytic activity and virulence of isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). En: Barnes, A.C., G.A. Davidson., M.P. Hiney., D. McIntosh (ed.). Methodology in Fish Diseases Research. Aberdeen Fisheries Research Services. Pp. 45-52.

McPHEARSON, R. M.; A. DePAOLA; S. R. ZYWNO; M. L. MOTES Jr.; A. GUARINO (1991). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. Aquaculture 99: 203-211.

MENDEZ, R. 1998. La acuicultura en Chile un buen balance. Aquanoticias 10: 12-21.

MUDARRIS.M and B. AUSTIN (1988) Quantitative and cualitative studies of the bacterial microflora of turbot, *Scophalmus maximus* L.,gills.Journal of Fish Biology 32:223-229.

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

ORTIZ, E. (2002). Caracterización molecular de *Flavobacterium psychrophilum* mediante análisis de ADN plasmidial. Tesis de Magíster en Ciencias Veterinarias, mención en Patología animal. Universidad Austral de Chile.

ORTEGA, C., MURQUIZ, J.L., ALONSO, J.L., FERNANDEZ, A.B., RUIZ, I. Estudio Epidemiológico de Factores de Riesgo en Acuicultura. Revista AquaTIC, 1998; 5.

PACHA, R., S. PORTER. (1968). Characteristics of myxobacteria isolated from the surface of freshwater fish. Appl. Microbil. 16: 1901 – 1906.

RIOFRIO, P. A (2002) Caracterización de cepas chilenas de *Flavobacterium psychrophilum* y sensibilidad a antimicrobianos. Tesis de Magíster en Ciencias Veterinarias, mención en Patología animal. Universidad Austral de Chile.

RANGDALE, R.E. (1995). Studies on rainbow trout fry síndrome (RTFS). PhD. Thesis, University of Stirling, Stirling.

RANGDALE, R.E. (1998). Bringing *F. psychrophilum* infectious under control. Fish Farmer. Mayo-Junio. pp 52-53.

RANGDALE, R.E., R.H.RICHARDS., D.J.ALDERMAN.1996.Isolation of *Cytophaga psychrophila*, causal agent of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).Bull .Eur. Ass.Fish Pathol. 17:108-111.

RANGDALE,R.E.1994.Research update on the rainbow trout fry syndrome project. Trout News. 18:23-26.

ROBERTS, I (1981). Patología de los Peces. Madrid. España 333 pp.

SAN MARTÍN, B.1996.Conceptos generales en la selección de un antibiótico o sulfa en la terapia de salmónidos, TecnoVet.2:27-30.

SANTOS, Y., P.J. HUNTLY., A. TURNBULL., T.S. HASTINGS. (1992). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in the United Kingdom, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12: 209 – 210.

SANTOS, Y.; P.J. HUNTLY; A. TURNBULL and T.S. HASTINGS (1992).Isolation of *Cytophaga psychrophilum* (*Flexibacter psychrophilus*).in association with rainbow trout mortality in the United Kingdom. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 12:53.

SARTI, M., G. GIORGETTI. 1996. A survey of flexibacteriosis (or *Cytophaga* L.B. diseases) on trout farms. Bull. Eur. Ass.Fish Pathol. 12: 53-54.

SARTI, M., G. GIORGETTI., A. MANFRIN (1992) Method for the rapid diagnosis of visceral myxobacteriosis in reared trout in Italy. Bull. Eur. Ass: Fish Pathol. 12: 53 – 54.

SCHMIDT, A. S., M.S. BRUUN., I. DALSGAARD., K. PEDERSEN., J.L. LARSEN. 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. App. Environ. Microbiol. 66: 4908-4915.

SCHMIDTKE, L.M., J. CARSON. (1995). Characteristics of *Flexibacter psychrophilus* isolated from Atlantic salmon in Australia. Dis. Aquat. Org. 21: 157 – 161.

SCOTT, P (1989). Therapy in aquaculture. In: Aquaculture for Veterinarians, fish husbandry and medicine. Ed. By L. Brown, Pergamon Press, Oxford, U.K.:131-152.

SKARMETA, A.M. 1996. Caracterización bioquímica, sexológica y molecular del patógeno de peces *Flexibacter psychrophilus*. PhD. Tesis. Universidad de Santiago de Compostela, España.

SNYDER, L., CHAMPNESS, W (1997). Molecular Genetics of Bacteria. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, DC. Capítulo 4, pp 105-127.

SPANGGARD, B.; F. JORGENSEN; L. GRAM; H. HUSS (1993). Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture* 115: 195-207.

SUAREZ, D. A. 1997. Caracterización clínica y patológica de la leucemia linfoblástica en salmones y truchas de cultivo. Tesis, MV. Universidad Austral de Chile, Facultad Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

SUMANO, L. 1997. Farmacología Veterinaria. Mexico 678pp.

THRUSFIELD, M. 1995. Veterinary Epidemiology. Ed. Blackwell Science Ltd, Oxford-London. UK.

TORANZO, A.E. and J.L. BARJA (1993). Fry mortality syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*. *Fish. Pathol.* 12(6):209-210.

UDDIN, N., H. WAKABAYASHI. 1997. Effects of temperature on growth and protease production of *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.* 15: 25-30.

VAUGHAN, S., R. COYNE., P. SMITH (1996). The critical importance of sample site in the determination of frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a fresh water fish farm. *Aquaculture* 139: 47-54.

WAKABAYASHI, H., K. SAWADA., J. M. BERTOLINI., J.S. ROHOVEC. 1992. Outbreaks of cold-water disease in ayu. Abstracts for the meeting of the Japanese Society of Fish Pathology, Marzo. pp. 5.

WEIS, J. VON. 1987. Über das vorkommen einer kaltwasserkrankheit bei Regenbogenforellen, *Salmo gairdneri*. *Tierarztl. Umschau.* 42: 575-577.

ZAR, J.H (2000). Biostatistical Analysis. 3ra edición Editorial Prentice Hall. New Jersey.

8.- ANEXOS

Anexo N° 1= Áreas y sus referencias geográficas, según división realizada por SERNAPESCA.

Zona	Límites y referencias geográficas
Maule	Lmte. Norte: Pta. Curaumilla Lmte. Sur: 36° L.S.
Concepción/ Nehuentué	Lmte. Norte: 36° L.S. Lmte. Sur: 39° L.S.
Valdivia	Lmte. Norte: 39° L.S. Lmte. Sur: 40° 20' L.S. Lmte. Este: 73° W
Panguipulli	Lmte. Norte: 39°L.S. Lmte. Sur: 40° 20'L.S. Lmte. Oeste:73°W- Incluye Lagos Ranco, Panguipulli, Riñihue, Maihue
Lago Rupanco	
Lago Llanquihue	
Lago Chapo	
Osorno	Lmte. Norte: 40°20' L.S. Lmte. Sur: Pta. Puga hasta Límite con Argentina - Excepto Lagos Puyehue, Rupanco, Llanquihue, Chapo.
Estero Reloncaví	
Seno Reloncaví	Incluye Puerto Montt, Chiquihue, Ilque, Huenquillahue, Huelmo, Pta. Guatral, Isla Guar, Bahía Lenca, Contao, La Poza, Aulen.
Fiordo Comau	Lmte. Oeste: 73°W hasta Pta. Chulao – Incluye Canal Llancahue, Canal Cholgo, Canal Hornopirén
Calbuco / Chiloé Insular Norte	Lmte. Sur: 42° L.S. Lmte. Este: 73° W - Incluye Calbuco, IslaTautil, Canal Huito, Isla Tabón, Bahía Manao, Bahía Linao, Bahía de Ancud.
Castro	Lmte. Norte: 42° L.S. Lmte. Sur: 43° L.S. Lmte. Este: 73° W
Lago Huillinco	Incluye Lago Cucao

Chaitén	Lmte. Norte: Pta. Chulao Lmte. Sur: 43° L.S. Lmte. Oeste: 73° W
Chiloé Sur	Lmte. Norte: 43° L.S. Lmte. Sur: 43° 40' L.S. Incluye Lagos Tarahuin y Tepuhueco
Lago Natri	
Cisnes	Lmte. Norte: 43° 40' L.S. Lmte. Sur: 44° 58' L.S.
Aysén	Lmte. Norte: 44° 58' L.S. Lmte. Sur: 46° L.S.
Natales	Lmte. Norte: 51° L.S. Lmte Sur: 52ª L.S.
Punta Arenas	Lmte. Norte: 52° L.S. Lmte. Sur: 54° L.S.