



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Elaboración de un manual de protocolos de técnicas de laboratorio
estandarizadas para la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos
en bacterias aisladas desde animales productores de alimentos**

Arantxa Asun Pinar

Memoria para optar al Título Profesional de
Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Inserto en el Proyecto APEC CTI 24 2017A

SANTIAGO, CHILE

2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Elaboración de un manual de protocolos de técnicas de laboratorio
estandarizadas para la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos
en bacterias aisladas desde animales productores de alimentos**

Arantxa Asun Pinar

Memoria para optar al Título Profesional de
Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	LISETTE LAPIERRE A.
PROFESOR CORRECTOR:	JAVIERA CORNEJO K.
PROFESOR CORRECTOR:	DANIELA IRAGÜEN C.

SANTIAGO, CHILE

2019

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN	12
2. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN	13
3. DISEÑO Y ELABORACIÓN DEL MANUAL Y DE LOS ELEMENTOS GRÁFICOS	14
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	18
ANEXOS	19
ANEXO 1. TABLA PARA SELECCIONAR LAS TÉCNICAS A DESARROLLAR EN EL MANUAL	19
BIBLIOGRAFÍA	1

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es un problema mundial tanto para la salud pública como para la salud animal, amenazando nuestros estilos de vida, los de nuestros animales de compañía y los sistemas de producción animal actuales, por lo que debe ser abordado con el enfoque “Una Salud”. Hoy una gran proporción del consumo de antimicrobianos mundial es para uso animal, lo que pone al rubro veterinario y al sector agropecuario en el centro de la lucha contra la resistencia. En la actualidad en Chile no existen programas de monitoreo de la resistencia en animales productores de alimentos y no existe un laboratorio oficial que realice evaluación de susceptibilidad a los antibióticos en cepas aisladas desde animales. Por esta razón cada laboratorio puede utilizar diferentes protocolos para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos en bacterias aisladas desde animales productores de alimentos ya que no existen protocolos estandarizados por ningún organismo nacional, por lo tanto, no se dispone de una guía sobre los métodos a utilizar para llevar a cabo pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. El objetivo de esta memoria de título es elaborar un manual de laboratorio en el que se describan técnicas estándares disponibles para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos en bacterias aisladas desde animales productores de alimentos, que sirva como consulta y de instrucción.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana, antimicrobianos, antibióticos, técnicas de susceptibilidad antimicrobiana, manual de laboratorio, sistemas de vigilancia antimicrobiana.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a global issue, not just for public health but also for animal health, threatening our lifestyles, our companion animals' and contemporary livestock systems, therefore this problem must be approached with a "One Health" focus. Nowadays, a large amount of global antimicrobial consumption is destined for animal use, which puts the veterinary and agricultural field in the center of the fight against resistance. Currently in Chile, an antimicrobial resistance surveillance program in food producing animals does not exist, and laboratories may use different protocols to assess antimicrobial susceptibility in bacteria isolated from food producing animals, since protocols are not standardized by a national body. Therefore, a guide on the methods to use in antimicrobial susceptibility does not exist. The objective of this document is to develop a laboratory manual in which the available standardized techniques to assess antimicrobial susceptibility from bacteria isolated from food producing animals are described.

Keywords: antimicrobial resistance, antibiotics, antimicrobial susceptibility techniques, laboratory manual, antimicrobial surveillance systems.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y la introducción de los antimicrobianos a la medicina clínica fue uno de los mayores triunfos del siglo XX, revolucionando los tratamientos de enfermedades infecciosas. La disponibilidad de antimicrobianos para tratar estas enfermedades mejoró la salud, el bienestar y la expectativa de vida de humanos y animales, pero, así como nos ha traído muchos beneficios, el uso no adecuado y el abuso de los antimicrobianos hoy, ha favorecido la emergencia gradual de poblaciones de bacterias patógenas resistentes a antibióticos, volviéndolas una gran preocupación para la salud mundial.

Los antibióticos se han vuelto esenciales en el resguardo de la salud de las sociedades humanas actuales, siendo utilizados de distintas formas como profilácticamente para evitar infecciones iatrogénicas en cirugías, nacimientos por cesárea y en pacientes con cáncer, entre otros padecimientos (Smith y Coast, 2013). Desde la era de la penicilina los antibióticos han sido vistos como medicamentos extraordinarios que pueden ser prescritos sin miedo al daño que puedan producir, a pesar de las advertencias tempranas sobre la resistencia y sus efectos secundarios. El poco entendimiento de las características únicas de estos fármacos y el riesgo de la resistencia ha pavimentado el camino a la actual epidemia que existe en el mundo (Laxminarayan, *et al.* 2013).

La resistencia antimicrobiana es un problema mundial tanto para la salud pública como para la salud animal, amenazando nuestros estilos de vida, los de nuestros animales de compañía y los sistemas de producción animal actuales, por lo que debe ser abordado con el enfoque “Una Salud”. La raíz del creciente aumento en la resistencia tiene muchas aristas e involucra a distintos participantes de diferentes sectores, sin embargo, hoy una gran proporción del consumo de antimicrobianos mundial es para uso animal, lo que pone al rubro veterinario y el sector agropecuario en el centro de la lucha contra la resistencia (Mattar, *et al.* 2016).

Otra de las razones por la que la veterinaria cumple un rol protagónico en la lucha contra la resistencia antimicrobiana radica en que gran parte de los antibióticos utilizados en animales de abasto también se utilizan en humanos, por lo que controlar los residuos de antibióticos y asegurarse de cumplir con los periodos de resguardo es de suma importancia para evitar que bacterias resistentes lleguen al suministro alimentario y así lograr un control de la transmisión a humanos desde animales o desde el ambiente.

Históricamente, médicos humanos y veterinarios han seleccionado antimicrobianos para tratar infecciones bacterianas basándose solo en la experiencia clínica antes de poder acceder a resultados de un antibiograma, pero con el aumento de la resistencia antimicrobiana el seleccionar empíricamente el antibiótico más apropiado se ha vuelto dificultoso para los profesionales de la salud. Como resultado, las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in-vitro* eficientes se han convertido en la actualidad en una herramienta indispensable para realizar terapias efectivas. Por esta razón es de suma importancia tener a nivel nacional laboratorios capacitados para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana utilizando métodos estandarizados en los que se obtengan resultados válidos y comparables con otros laboratorios dentro y fuera del país.

En este contexto, el objetivo de esta memoria de título es elaborar un manual de laboratorio en el que se describan las distintas técnicas estándares disponibles para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos en bacterias aisladas desde animales productores de alimentos, y así construir un protocolo estándar que sirva de base para la armonización de los resultados entre laboratorios en Chile y como consulta para los que deseen aplicar estas técnicas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La disponibilidad y el uso de antimicrobianos han transformado la práctica de medicina humana y animal. Enfermedades que alguna vez fueron letales ahora son curables, y el uso de antimicrobianos ha ayudado a avanzar en materias de salud pública, salud animal y seguridad alimentaria. Sin embargo, el mal uso y abuso de los fármacos antimicrobianos ha contribuido dramáticamente en la emergencia y propagación de organismos resistentes a los antibióticos, lo que se vuelve una gran amenaza para la salud humana, animal y el ecosistema mundial (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2016).

La resistencia antimicrobiana es la condición en que microorganismos como bacterias, virus, hongos o parásitos cambian de tal forma que los medicamentos que se utilizan para curar las infecciones que estos provocan se vuelven inefectivos. “Resistencia antimicrobiana” es un término amplio que abarca la resistencia a fármacos que tratan infecciones causadas por todos los organismos mencionados anteriormente, a diferencia de “resistencia a antibióticos” que define exclusivamente a bacterias resistentes a antibacterianos (WHO, 2017). Este no es un fenómeno nuevo ni inesperado en un ambiente en el que potentes agentes antimicrobianos son usados. La diversidad de microorganismos y la actividad relativamente específica de nuestros fármacos antimicrobianos virtualmente asegura la resistencia diseminada entre bacterias. (Patel y Richter, 2015).

La resistencia puede generarse a través de una mutación genética o mediante la adquisición de determinantes genéticos exógenos (Rice, 2012), y esto les permite a los microorganismos adquirir distintos mecanismos de resistencia. Aún más preocupante son los casos en que poblaciones de bacterias que eran inicialmente susceptibles adquieren resistencia, la que es favorecida por la presión selectiva al usar un agente antibacteriano específico (Tenover, 2006).

La necesidad de utilizar medicamentos antimicrobianos en la práctica veterinaria está fuertemente influenciada por las prácticas de cría y el vínculo directo con la salud animal. En Estados Unidos, 16% de todos los bovinos de leche reciben terapia antimicrobiana para mastitis clínica cada año; 15% de los novillos de carne que entran a *feedlot* reciben antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades respiratorias y 10% de novillos aparentemente sanos reciben la misma dosis de antimicrobianos de manera profiláctica o metafiláctica (Rushton, *et al.* 2014). En bovinos de leche se ha vuelto una práctica común utilizar pomos intramamarios antimicrobianos al final de un periodo de lactancia, no para tratar una

infección específica sino para reducir el riesgo de una mientras la vaca se encuentra en el periodo de secado (Rushton, *et al.* 2014). Así, dentro de la práctica veterinaria en diversos países existen distintos manejos profilácticos con antimicrobianos, los que se encuentran actualmente bajo cuestionamiento y prácticas alternativas están siendo estudiadas y empleadas.

En 2009 en Estados Unidos, se estimaba que de los antimicrobianos vendidos para humanos y animales casi el 80% estaba reservado para ganado y aves de corral (Rushton, *et al.* 2014). En 2012 en Dinamarca se utilizaron 103 toneladas de antibióticos en animales y 50 toneladas en humanos, contrastando con Suecia, donde se usaron 64 toneladas de antibióticos en humanos y solo 12 toneladas en animales. Este relativamente poco uso de antibióticos en animales de Suecia está relacionado con las inversiones en sistemas de bioseguridad y bienestar animal, lo que reduce la necesidad de utilizar antibióticos (Rushton, *et al.* 2014).

La resistencia antimicrobiana trae consigo costos que no están limitados solo a tratamientos adicionales por una infección primaria, sino que también se deben abarcar los costos relacionados a perder la asistencia médica y veterinaria moderna. En el ámbito humano la resistencia no es solo un problema de enfermedades infecciosas, es un problema quirúrgico, de neoplasias y de todo el sistema de salud (Smith y Coast, 2013) y en el ámbito pecuario enfrentamos problemas de baja en la eficiencia alimentaria y disminución del rendimiento de todo el sistema productivo (Rushton, *et al.* 2014).

Existen tres rutas potenciales para que la resistencia antimicrobiana pueda diseminarse desde la industria pecuaria: i) a través del sistema de alimentación, ii) contacto directo entre humanos y animales, iii) a través de contaminación ambiental (Rushton, *et al.* 2014), por esta razón, para tratar el problema de la resistencia antimicrobiana se necesita hacer un esfuerzo conjunto, con un enfoque de “Una Salud”. El concepto de una salud es una estrategia mundial para la expansión de colaboraciones interdisciplinarias y comunicaciones en todos los aspectos de los cuidados sanitarios para humanos, animales y el medioambiente. Reconociendo que la salud humana, animal y del ecosistema están inextricablemente vinculadas, este concepto busca promover, mejorar y defender la salud y el bienestar de todas las especies, mejorando la cooperación y colaboración entre médicos humanos, médicos veterinarios, otros profesionales de la salud y del medioambiente (*One Health Initiative*, 2018).

En el mundo existen diferentes normas para evaluar susceptibilidad antimicrobiana y frecuentemente tienen distintos puntos de corte para reportar resultados de las distintas pruebas de susceptibilidad, por lo

que un microorganismo puede ser calificado como susceptible o resistente dependiendo de las normas y protocolos que se sigan en los distintos laboratorios. Incluso algunos laboratorios podrían usar puntos de corte de pacientes humanos para clasificar cepas aisladas desde animales. El aumento de la resistencia en bacterias zoonóticas ha generado la creación de varios programas de monitoreo de resistencia antimicrobiana en Europa, Estados Unidos y otras partes del mundo y se ha propuesto que estos programas de monitoreo dependan de datos reportados de distintos laboratorios de diagnóstico, razón por la cual métodos estandarizados son necesarios para la comparación de los resultados entre laboratorios (Petersen, *et al.*, 2003).

En Estados Unidos existe el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como organización encargada de publicar y actualizar periódicamente información relevante para realizar pruebas de susceptibilidad. En Europa se encuentra el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), que nació como un acuerdo entre distintos laboratorios europeos para estandarizar y armonizar las técnicas de susceptibilidad y los puntos de corte para interpretar y reportar resultados.

Para llevar a cabo estos procedimientos técnicos de manera precisa y segura es necesario asegurar el buen funcionamiento de los laboratorios, lo que se puede lograr a través de la gestión de calidad de los procesos que se realizan dentro del laboratorio, lo que puede o no finalizar en la acreditación. La acreditación determina la competencia técnica que el laboratorio posee en las diversas pruebas que se realizan, aportando un reconocimiento formal para las entidades que cumplan con las especificaciones del cuerpo que acredita.

La habilidad de los laboratorios para llevar a cabo pruebas correctas y reproducibles de susceptibilidad antimicrobiana es crítica para el tratamiento correcto de personas y animales enfermos, y por esta razón es de suma importancia para un país tener un sistema de vigilancia basado en estudios periódicos para evaluar la amenaza de la resistencia antimicrobiana para así asegurarse de tener detecciones tempranas y que el consumidor y los animales estén recibiendo tratamientos efectivos, alimentos seguros y también disminuir al mínimo posible la contaminación ambiental con antibióticos y bacterias resistentes.

En la actualidad en Chile no existen programas de monitoreo de la resistencia en animales productores de alimentos. Cada laboratorio puede utilizar diferentes protocolos para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos en bacterias aisladas desde animales productores de alimentos ya que tampoco estos protocolos se encuentran estandarizados por ningún organismo nacional. Por lo tanto, no existe una guía

sobre los métodos a utilizar para llevar a cabo pruebas de susceptibilidad, ni se exige específicamente alguna norma de alguno de los organismos reconocidos mundialmente. En consecuencia, se vuelve dificultoso comparar resultados entre laboratorios sin una estandarización de los métodos, los puntos de corte para la interpretación de resultados y el reporte de estos, lo que impide sacar conclusiones y realizar recomendaciones.

OBJETIVO GENERAL

Elaborar un manual de laboratorio de técnicas estandarizadas para evaluar susceptibilidad a antibióticos en bacterias aisladas desde animales productores de alimentos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar y seleccionar las técnicas de laboratorio estandarizadas que se realizan de rutina para evaluar susceptibilidad antimicrobiana en cepas aisladas desde animales productores de alimentos.
2. Describir las técnicas de laboratorio seleccionadas en el punto anterior, los materiales a utilizar y los procedimientos necesarios para llevarlas a cabo.
3. Diseñar el manual para un mejor entendimiento de los protocolos de las técnicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se reunió material pertinente a resistencia antimicrobiana, uso de antibióticos en humanos y la industria agropecuaria y la importancia e implicancia del uso, mal uso y abuso de antimicrobianos en la salud pública y animal. Luego se procedió a recopilar información respecto a las técnicas estandarizadas que existen para evaluar la susceptibilidad a antibióticos para poder seleccionar las técnicas que se profundizarían en el manual. Finalmente, luego de la selección de las técnicas se investigaron todos los materiales necesarios y los pasos a seguir de los distintos protocolos para elaborar un manual con métodos reproducibles que entregue resultados comparables entre laboratorios.

1. Levantamiento de Información

1.1 Búsqueda de información

A través de la biblioteca virtual de la Universidad de Chile, se accedió a bases de datos internacionales como *ISI – Web of Knowledge*, *Science Direct*, y *Wiley*, de igual forma se utilizaron libros sobre resistencia antimicrobiana y técnicas de susceptibilidad antimicrobiana. También se recopiló información sobre las técnicas desde organizaciones internacionales como el CLSI, EUCAST, OIE y OMS. También se consultó con el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) sobre los fármacos antibióticos de uso veterinario autorizados a la fecha para elaborar tablas del manual. Se utilizaron artículos científicos para información específica y también en la selección de las técnicas, de los cuales se excluyeron documentos con fecha anterior al año 2000.

1.2 Términos de búsqueda

Dentro de las palabras claves para este proyecto se utilizaron términos relevantes como: resistencia antimicrobiana, resistencia a antibióticos, susceptibilidad antimicrobiana, mecanismos de resistencia, una salud, técnicas de susceptibilidad, métodos de laboratorio, entre otros términos utilizados solos o en conjunto con algunos de los términos indicados anteriormente para definir mejor los resultados de la búsqueda. Se utilizaron operadores Booleanos dentro de los indexadores de artículos científicos para poder filtrar la información de una manera más efectiva.

2. Análisis de Información

2.1 Identificación y Selección de técnicas de susceptibilidad estandarizadas

Tras el levantamiento de la información desde las distintas fuentes consultadas, se identificó la difusión en disco, dilución en agar y microdilución en caldo como las técnicas más utilizadas en animales productores de alimentos. Para obtener estos resultados, en un principio se identificaron las técnicas de susceptibilidad antimicrobiana estandarizadas desde los libros “Manual de Microbiología Clínica” de Jorgensen *et al.*, “Manual de Susceptibilidad Antimicrobiana” de la *American Society for Microbiology* y el libro “Protocolos de Técnicas de Susceptibilidad Antimicrobiana” de Schwalbe *et al.* También se consultaron los organismos internacionales de estandarización en materia de resistencia antimicrobiana CLSI y EUCAST en conjunto con los programas de vigilancia de susceptibilidad antimicrobiana NARMS, CIPARS y DANMAP. Luego de identificar las técnicas estandarizadas, para seleccionar los métodos que se desarrollarían en el manual se levantó información desde treinta *papers* los cuales debían consistir en el análisis de susceptibilidad antimicrobiana desde muestras de animales productores de alimentos. Para organizar la información de los *papers* se elaboró una tabla en la que se ubicaron los criterios especie animal, tipo de muestra, especie bacteriana, prueba de susceptibilidad y criterio de interpretación de resultados (Anexo 1. Tabla para Seleccionar las Técnicas a Desarrollar en el Manual). Del análisis de la tabla se obtuvo que un 63% de las publicaciones utilizaron el método de difusión en disco, 23% utilizó microdilución en caldo 10% utilizó dilución en agar y luego se posicionaron los métodos comerciales como el E-test y los métodos automatizados. Ninguna de las publicaciones utilizó el método de macrodilución en caldo, por lo que se prefirió no describir esta técnica en el manual. Finalmente, se seleccionaron la difusión en disco, la microdilución en caldo y la dilución en caldo como las técnicas para desarrollar en el manual, adicionalmente, se decidió hacer una reseña de los métodos comerciales para el conocimiento de quien utilice el manual, ya que los países con programas de vigilancia antimicrobiana han optado por estos métodos en conjunto con los métodos manuales.

2.2 Descripción de técnicas de susceptibilidad estandarizadas

Tras identificar las técnicas a desarrollar en el manual, se procedió a redactar el manual describiendo cada una de las técnicas escogidas. Se redactaron los pasos y los materiales necesarios para llevar a cabo los métodos de una forma ordenada. También se redactó un apartado de métodos

comerciales y se adicionó un apartado de control de calidad. Además, para complementar la información del manual, se elaboró una tabla de criterios de interpretación veterinarios para diámetros de disco y concentración mínima inhibitoria con los antibióticos autorizados por el SAG, y así poder utilizar la tabla como referencia en conjunto con el manual. Esta tabla está basada en información del CLSI, ya que este organismo es el que maneja más información respecto a los puntos de corte de antibióticos en uso veterinario, de todas formas, no todos los antibióticos permitidos en Chile tienen puntos de corte registrados por el CLSI en uso veterinario o humano. La tabla estipula qué puntos de corte son de uso veterinario y cuáles de uso humano, como también cuáles no tiene punto de corte actualmente.

3. Diseño y Elaboración del Manual y de los Elementos Gráficos

Tras tener redactada la información de los protocolos, esta se organizó para darle un orden lógico y fluido. Junto con la organización del contenido del documento se evaluó qué elementos deberían ser ilustrados dentro de los pasos de cada una de las técnicas, qué posiciones utilizarían en el diseño del manual y qué anexos incluir para hacer el manual más entendible y completo.

3.1 Elaboración de un borrador

Teniendo toda la información y una idea de qué ilustraciones se llevarían a cabo, se realizó un borrador de lo que sería el manual, asignando una portada, índice, introducción y capítulos por cada una de las técnicas inicialmente. Se organizaron los pasos dentro de cada uno de los capítulos para dar un orden visual del manual y así ubicar los espacios para las ilustraciones y gráficos. Luego se organizó el capítulo final con el control de calidad, la página de abreviaturas y los anexos del manual.

3.2 Elaboración de ilustraciones y elementos gráficos

Para las ilustraciones se utilizó el programa *Clip Studio Paint*, en conjunto con *Adobe Photoshop CS6* con una tableta digitalizadora. Los diagramas, tablas y gráficos se llevaron a cabo en *Microsoft Office PowerPoint 365*. En total en manual cuenta con 23 ilustraciones originales, 2 diagramas traducidos y 3 tablas.

DISCUSIÓN

La evidencia de la relación entre uso no adecuado de antibióticos y la emergencia de la resistencia antimicrobiana existe desde hace muchos años y esta situación se ha vuelto una gran amenaza para la medicina. Una de las formas en las que este fenómeno comienza en las cepas animales sucede cuando bacterias comensales se ven afectadas por tratamientos con antibióticos, en los que las bacterias susceptibles son reemplazadas por bacterias resistentes, que luego se diseminan a través de fómites u otros vectores, así transfiriendo genes de resistencia a otras bacterias. De esta forma en los mataderos, bacterias entéricas comensales resistentes contaminan productos de la cadena alimentaria, asimismo, el estiércol utilizado como fertilizante en cultivos puede contaminar vegetales con bacterias resistentes de origen animal (Aidara-Kane *et al.*, 2013). Es importante conocer esta relación, ya que así podemos tener una imagen global de las implicancias de este problema, y poder entender el porqué es necesario abarcarlo con un enfoque de una salud.

No podemos ignorar la relevancia que tienen los animales productores de alimentos en la problemática de la resistencia antimicrobiana, a pesar de que actualmente la magnitud del impacto de los animales productores de alimentos es desconocida en comparación con el impacto del uso de antibióticos en humanos, es indiscutible que no es un problema ajeno (Aidara-Kane *et al.*, 2013). Se estima que anualmente el costo de la resistencia antimicrobiana en salud humana en Estados Unidos correspondería a 55 mil millones de dólares, de los cuales 20 mil millones se contemplan como costos de servicios médicos y los otros 35 mil millones serían pérdidas de producción. Sin embargo, los costos reales de la resistencia podrían ser mucho más altos que lo que las estimaciones sugieren (Smith y Coast, 2013). Por esta razón se han creado iniciativas como el AGISAR (“*Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance*” o Grupo Consultor en Sistemas de Resistencia Antimicrobiana) y el “*Global Action Plan*” (Plan de Acción Global) ambos de la OMS, los cuales buscan minimizar el impacto de la resistencia en medicina humana y la asociada a animales productores de alimentos.

Las consecuencias de la resistencia antimicrobiana pueden ser potencialmente fatales y soluciones inmediatas no son opciones factibles en la actualidad. Deben tomarse decisiones individuales y sociales alineadas respecto a la resistencia antimicrobiana; como por ejemplo cambiar el foco del uso de antibióticos como preventivo a exclusivamente terapéutico. Es por esto que, iniciativas desde organismos internacionales son necesarias, para tener opiniones expertas y experiencias que guíen a los países que se

encuentran atrasados en el avance científico y logístico para lograr llegar al nivel de países que realizan vigilancia integrada de la resistencia en la actualidad.

La creación de programas de vigilancia de resistencia antimicrobiana es en este momento una de las medidas más urgentes a tomar en la salud pública mundial, pues el avance de la resistencia y el estancamiento del desarrollo de nuevos antibióticos nos ha dictado un inminente final a la medicina como la conocemos. Para monitorear y desarrollar medidas de control para la resistencia antimicrobiana, países como Estados Unidos, Canadá y Dinamarca han establecido sistemas nacionales integrados de vigilancia como el NARMS, CIPARS y DANMAP respectivamente, los cuales tienen como eje principal el monitoreo de cambios en la susceptibilidad/resistencia a antibióticos de patógenos zoonóticos y bacterias comensales desde cepas aisladas desde animales productores de alimentos, productos cárnicos y cepas aisladas desde pacientes humanos (Donado-Godoy *et al.*, 2015). La elección de los microorganismos y fármacos a analizar en cada programa de vigilancia puede ser compleja, así como también la población a evaluar y el tamaño de la muestra. Un punto importante dentro de los sistemas de vigilancia es la elección y uso de métodos de susceptibilidad antimicrobiana, los que deben ser estandarizados e internacionalmente aceptados y deben contar con controles de aseguramiento de calidad incorporados en el sistema, ya que de este modo se asegura tener resultados correctos (Bax, *et al.*, 2001). La eficacia de estos programas en la contención del avance de la resistencia antimicrobiana ha sido demostrada en diversas ocasiones; por ejemplo, el DANMAP reportó reducciones drásticas de *Enterococcus faecium* vancomicina-resistente en muestras de pollos broiler y humanos luego de la prohibición del uso de avoparcina como promotor del crecimiento. Esta prohibición se pudo realizar debido a los datos recolectados desde el programa DANMAP (Donado-Godoy *et al.*, 2015).

A finales del año 2017, Chile elaboró el “Plan Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos”, el cual tiene como objetivo prevenir y combatir la resistencia a los antibióticos siguiendo las recomendaciones de la OMS, FAO y OIE, ya que pretende integrar el monitoreo de cepas aisladas desde alimentos dentro del plan, además de las cepas de origen humano. Lamentablemente, hasta la fecha no existe información sobre un posible plan piloto nacional o financiamiento dirigido hacia la investigación de formas de abordar la problemática, ni de la implementación de este plan. Por este motivo actualmente en Chile no existe un programa integrado para monitorear la resistencia antibiótica en animales productores de alimentos. En nuestro país existen programas pertenecientes al Ministerio de Salud, los que evalúan la resistencia en pacientes humanos en ciertos hospitales del país, y también el Instituto de Salud Pública (ISP) realiza la vigilancia de resistencia en algunas bacterias específicas que son derivadas

a dicho Instituto. El Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) cuenta con un informe anual sobre el uso de antimicrobianos en la cría de salmones a nivel nacional, el cual pone a disposición del público la información que empresas salmonicultoras declaran mensualmente. El SAG no cuenta con algún plan contra la resistencia antimicrobiana en la actualidad, pero sí presenta normativas respecto al uso de antibióticos de forma profiláctica y desde el año 2006 se prohíbe la inscripción de antibióticos como promotor del crecimiento. Es necesario notar que la legislación chilena sí permite el uso de antibióticos de manera metafiláctica (Ministerio de Agricultura, 2017).

Como en Chile no existe un laboratorio oficial que realice la evaluación de la susceptibilidad a antibióticos en cepas aisladas de animales productores de alimentos, ni programas de vigilancia integrados funcionando, no hay directrices oficiales nacionales de cómo se debe evaluar la susceptibilidad ni de cómo interpretar los resultados que cada laboratorio obtiene, por lo tanto, no existen datos oficiales de la susceptibilidad/resistencia de cepas aisladas desde animales productores de alimentos.

De esta necesidad de implementar un programa nacional integrado con protocolos de laboratorio armonizados para generar resultados comparables entre los diferentes laboratorios que hacen evaluación de susceptibilidad en Chile y el mundo, nace la preparación de esta memoria de título, que consistió en la elaboración de un manual de protocolos de técnicas estandarizadas para evaluar resistencia antimicrobiana desde muestras de animales productores de alimentos. La creación del manual se realizó en el marco del proyecto APEC del año 2018 titulado “*Building Competence in Antimicrobial Resistance Surveillance among APEC Economies*” o Creando Competencias en Resistencia Antimicrobiana entre las Economías APEC, teniendo por función ser un apoyo para la capacitación de profesionales internacionales para así lograr la armonización de los métodos dentro de las economías APEC. La esencia del manual es ser una herramienta concisa y fácil de entender, dirigida a personas que están iniciándose en el ámbito de la susceptibilidad a antibióticos. Las metodologías descritas en el manual son las técnicas más utilizadas en el ámbito pecuario para la evaluación de susceptibilidad a antibióticos, como se pudo demostrar a través del análisis de literatura.

A pesar de que los resultados del análisis de la literatura actual son representativos de los métodos utilizados rutinariamente en animales productores de alimentos, confirmado por los organismos internacionales y los programas de monitoreo internacionales que utilizan estos mismos métodos descritos en el manual, una de las limitaciones de esta selección de documentos fue la baja aleatoriedad y sistematización de la elección de los artículos a utilizar. Para una revisión futura, debe ser necesario utilizar metodologías que aseguren la aleatoriedad de los estudios escogidos y su representatividad de la muestra

utilizando metodologías como PRISMA (“*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*” o Reportaje Preferido de Ítems para Revisiones Sistemáticas y Metaanálisis), el cual determina un flujo y una lista con pasos para el proceso de selección de documentos para incluir en una revisión sistemática o metaanálisis.

CONCLUSIONES

Se logró elaborar un manual de protocolos con las diferentes técnicas para evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos que fuera fácil de utilizar y de ayuda a los laboratoristas. El manual consta con descripciones y diagramas que hacen más fácil su interpretación.

Con el Plan Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos se sentaron las bases para desarrollar en el futuro un sistema de vigilancia integrado, y ahora es necesario generar un programa piloto, basado en información levantada en nuestro país para determinar las necesidades específicas que tenemos en el marco de la resistencia antimicrobiana, y una vez que este programa piloto sea exitoso, ampliarlo para comenzar a edificar un programa robusto basado en información científica específica para nuestro contexto nacional.

Se espera que el manual elaborado en esta memoria sea una ayuda para en un futuro próximo sentar las bases técnicas de un programa integrado para la resistencia antimicrobiana en Chile, basado en los conceptos de una salud.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla para Seleccionar las Técnicas a Desarrollar en el Manual

N°	Especie	Muestra	Bacteria	Difusión en disco	Dilución en agar	Macrodilución en caldo	Microdilución en caldo	E-test	Automatizado	Interpretación
1	Bovino leche	Heces, ambiente	<i>C. difficile</i>				X			EUCAST
2	Bovino leche	Leche	<i>Staphylococcus spp.</i>	X						CLSI
3	Bovino leche	Heces	<i>Salmonella spp., E. coli</i>						X	CLSI, NARMS
4	Pollo	Carne	<i>C. jejuni</i>	X						CLSI
5	Porcino	Carne	<i>S. aureus</i>	X						CLSI
6	Bovino carne	Carne	<i>L. monocytogenes, S. aureus</i>	X						CLSI
7	Bovino leche	Parénquima mamario	<i>Staphylococcus spp.</i>	X						N/E
8	Porcino	Heces	<i>Salmonella spp.</i>				X			CLSI, NARMS
9	Ovinos, Caprinos	Hisopado nasal	<i>S. aureus</i>	X						N/E
10	Tilapia	Riñón, cerebro	<i>Streptococcus spp.</i>		X					CLSI
11	Bovino leche	Queso	<i>L. monocytogenes</i>	X			X	X		N/E
12	Pollo, Bovino	Carne, queso, leche	<i>Yersinia spp.</i>	X						CLSI
13	Peces	N/E	<i>F. columnare</i>				X			CLSI
14	Salmón	Bazo, riñón	<i>F. psychrophilum</i>				X			CLSI
15	Ostras	Macerado	<i>Vibrio spp.</i>	X						N/E
16	Pollo, pescado	Carne	<i>Aeromonas spp.</i>	X						CLSI
17	Pollo	Carne	<i>Campylobacter spp.</i>				X			EUCAST
18	Pollo	Hisopado cloacal	<i>Campylobacter jejuni</i>	X			X			CLSI, EUCAST
19	Pato	Carne, vísceras	<i>E. coli</i>	X						EUCAST
20	Bovino leche	Leche y subproductos, planta procesadora	<i>Arcobacter spp.</i>		X					CLSI, EUCAST
21	Pollo, bovino	Carne	<i>E. coli</i>	X						N/E
22	Ostión	Macerado	<i>Aeromonas spp.</i>	X						CLSI

23	Cerdos	Linfonodos mesentéricos, contenido intestinal, hisopado de hígados y carcasas	<i>Salmonella</i> spp.	X							CLSI
24	Bovino leche	Contenido rectal	<i>Campylobacter</i> spp.					X			CLSI, NARMS
25	Bisonte	Carcasa	<i>E. coli</i>						X		CLSI
26	Bovino leche	Leche y subproductos	<i>L. monocytogenes</i>	X							CLSI
27	Pavo	Heces	<i>Staphylococcus</i> spp.	X							CLSI
28	Bovino	Leche, tejidos	<i>A. pyogenes</i>		X						N/E
29	Trucha arcoíris	Hígado	<i>A. salmonicida</i>	X							Paper
30	Bovino, ovino, caprino	Leche	<i>S. aureus</i>	X							CLSI

Referencia DOI:

1. 10.1111/zph.12299
2. 10.1111/j.1365-2672.2007.03681.x
3. 10.1046/j.1472-765X.2003.01417.x
4. 10.1111/jfs.12600
5. 10.1111/jfs.12589
6. 10.1111/lam.12183
7. 10.1046/j.1439-0450.2000.00319.x
8. 10.1111/j.1472-765X.2008.02530.x
9. 10.1111/lam.12485
10. 10.1111/are.12764
11. 10.1016/j.femsle.2005.08.025
12. 10.1111/1750-3841.12911
13. 10.1111/j.1365-2761.2012.01410.x
14. 10.1577/H09-008.1
15. 10.1111/jfs.12490
16. 10.1111/j.1750-3841.2011.02303.x
17. 10.1111/zph.12208
18. 10.1111/1750-3841.13363
19. 10.1111/jfs.12189
20. 10.1111/jam.13538
21. 10.1111/j.1745-4565.2010.00295.x
22. 10.1111/jam.14106
23. 10.1111/1750-3841.13657
24. 10.1111/j.1365-2672.2006.03189.x
25. 10.1111/j.1365-2672.2007.03470.x
26. 10.1111/jfs.12208
27. 10.1046/j.1472-765X.2001.01015.x
28. 10.1046/j.1439-0450.2000.00315.x
29. 10.1046/j.1439-0450.2003.00671.x
30. 10.1111/j.1863-2378.2008.01220.x

BIBLIOGRAFÍA

AIDARA-KANE, A.; ANDREMONT, A.; COLLIGNON, P. 2013. Antimicrobial resistance in the food chain and the AGISAR initiative. *Journal of Infection and Public Health*. 6: 162-165.

BAX, R.; BYWATER, R.; CORNAGLIA, G.; GOOSSENS, H.; HUNTER, P.; ISHAM, V.; JARLIER, V.; JONES, R.; PHILLIPS, I.; SAHM, D.; SENN, S.; STRUELENS, M.; TAYLOR, D.; WHITE, A. 2001. Surveillance of Antimicrobial Resistance? What, How and Whither?. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 7: 316-325.

DONADO-GODOY, P.; CASTELLANOS, R.; LEÓN, M.; AREVALO, A.; CLAVIJO, V.; BERNAL, J.; LEÓN, D.; TAFUR, M.; BYRNE, A.; SMITH, W.; PEREZ-GUTIÉRREZ, E. 2015. The Establishment of the Colombian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (COIPARS): A Pilot Project on Poultry Farms, Slaughterhouses and Retail Market. *Zoonoses and Public Health*. 62: 58-69.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A.; WERTHEIM, H.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G.; GOULD, I.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; QUIZHPE, A.; QAMAR, F.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G.; BROWN, E.; CARS, O. 2013. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infectious Diseases Control*. 13: 1057-1098.

MATTAR, C.; ORE, A.; FAGERBERG, S.; RAMACHANDRAN, R.; TUN, W.; WILEY, E.; CHAPMAN, H. 2016. One Health and Antimicrobial Resistance. *World Medical Journal*. 62 (3): 108-111.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2016. The OiE strategy on antimicrobial resistance and the prudent use of antimicrobials. [en línea] <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf> [consulta: 19-02-2019]

ONE HEALTH INITIATIVE. 2018. About the One Health Initiative. [en línea] <<http://www.onehealthinitiative.com/about.php>> [consulta: 15/11/2018]

PATEL, J.; RICHTER, S. 2015. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. **In:** Jorgensen J., Pfaller M.; Carroll K.; Funke G.; Landry M.; Richter S.; Warnock D. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Press. 1212-1245.

PETERSEN, A.; AARESTRUP, F.; HOFSHAGEN, M.; SIPILÄ, H.; FRANKLIN, A.; GUNNARSSON, E. 2003. Harmonization of Antimicrobial Susceptibility Testing among Veterinary Diagnostic Laboratories in the Five Nordic Countries. Microbial Drug Resistance. 9 (4): 381-388.

MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2017. Resolución Exenta N°6801. Establece Requisitos para el Registro, Comercialización y Uso de Antimicrobianos. Ministerio de Agricultura, Subsecretaría de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero. Santiago, Chile. 7 de noviembre de 2017.

RICE, L. 2012. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. Mayo Clinic Proceedings. 87 (2): 198-208.

RUSHTON, J.; PINTO, J.; STÄRK, K. 2014. Antimicrobial Resistance: The use of antimicrobials in the livestock sector. OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers. OECD Publishing, París. 44 p.

SMITH, R.; COAST, J. 2013. The true cost of antimicrobial resistance. British Medical Journal. 346: f1493.

TENOVER, F. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine. 119 (6A): S3-S10.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. Q&A What is antimicrobial resistance? [en línea] <<http://www.who.int/features/qa/75/en/>> [consulta: 07/11/2018]