



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *SALMONELLA* SPP. AISLADAS DE BOVINOS DE LAS REGIONES V, METROPOLITANA Y X.

### CONSTANZA SOLEDAD PEÑALOZA SANDOVAL

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CONSUELO BORIE P.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: BETTY SAN MARTÍN N.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO SMITH S.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2008



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



RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE  
*SALMONELLA* SPP. AISLADAS DE BOVINOS DE LAS  
REGIONES V, METROPOLITANA Y X.

**CONSTANZA SOLEDAD PEÑALOZA SANDOVAL**

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

**PROFESOR GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO**

SANTIAGO, CHILE  
2008

## DEDICATORIA

*A Claudio y Diego los pilares fundamentales de mi vida*

*A mis padres y hermanos*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es fruto del esfuerzo de un sinnúmero de personas, que sin las cuales no hubiese sido posible concretar este anhelado sueño, porque gracias a su apoyo ayudaron a que este árbol entregara sus primeros frutos. De esta forma quisiera agradecer a la Dra. Betty San Martín, Dra. María Luisa Sánchez, Dra. María Antonieta Jara, Dr. Sebastián Sánchez, Sr. Carlos Campos, por la valiosa ayuda prestada, tanto por sus conocimientos y consejos.

En especial quisiera agradecer a mi profesor guía Dra. Consuelo Borie y a la Dra. Verónica Bravo, porque además de la ayuda brindada en este tiempo que fue vital para esta tesis, se han convertido en un verdadero núcleo de afecto y confianza.

Existe un grupo de personas a las cuales es imposible olvidar porque sin ellos no hubiese podido lograr nada, me refiero a mi familia, mis amigas, a mis hermanos y en especial a mis padres por toda la paciencia, la dedicación y el amor que día a día me entregan, ojalá pudiese ser posible expresar en palabras lo fundamental que ustedes han sido para que pueda culminar esta etapa. Gracias.

# ÍNDICE

	PÁGINA
Resumen	1
Summary	3
Introducción	5
Revisión Bibliográfica	6
Objetivos	22
Materiales y Métodos	
1. Tamaño muestral	23
2. Obtención de muestras	23
3. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp.	24
4. Test de susceptibilidad antimicrobiana	25
Resultados	28
Discusión	35
Conclusiones	41
Anexo	42
Bibliografía	43

## RESUMEN

Los agentes antimicrobianos han sido usados en la agricultura desde comienzos de la década de los cincuenta, ya sea para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas como también para promover el crecimiento y aumentar la eficiencia alimentaria en animales. Al igual que lo ocurrido en medicina humana, el uso y abuso de drogas antimicrobianas han generado una exagerada presión de selección sobre las poblaciones bacterianas, lo que ha tenido como consecuencia la emergencia y diseminación de resistencia bacteriana.

El impacto de la resistencia bacteriana ha sido de tal magnitud que organizaciones como la Organización Mundial de la Salud, vienen trabajando desde la década de los ochenta para incentivar la implementación de una serie de medidas que logren de alguna manera, mitigar el explosivo aumento de la resistencia bacteriana a nivel mundial. Entre ellas, una de las más importantes es la implementación de redes de vigilancia de la resistencia bacteriana a nivel nacional que permitan determinar los niveles de resistencia bacteriana y evaluar la efectividad de las medidas implementadas.

El objetivo fundamental de este estudio, fue determinar los niveles de resistencia en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos provenientes de las regiones V, Metropolitana y X, y de esta manera poder evaluar la situación actual de la resistencia en este importante agente zoonótico en estos animales de producción.

De las 29 cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde 2.118 bovinos se hallaron los siguientes serotipos: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Panama, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Mbandaka y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Dublin. El 86,21% de las cepas mostró resistencia a uno o más de los 14 antimicrobianos analizados, existiendo un alto porcentaje de multiresistencia (68%). Las drogas que presentaron mayor número de cepas resistentes fueron: amoxicilina (72%), oxitetraciclina (72%) y estreptomicina (48%); siendo quinolonas el único grupo de antimicrobianos al que las cepas presentaron

un 100% de sensibilidad. Se establecieron 12 diferentes perfiles de resistencia para las cepas de *Salmonella* spp. aisladas.

Estos resultados permiten visualizar la necesidad de implementar una serie de medidas en el ámbito de la medicina veterinaria, entre las que se encuentra establecer un programa de vigilancia de la resistencia bacteriana a nivel nacional, de carácter permanente. Este programa de vigilancia debería incluir aislamientos realizados en alimentos y especies de abasto, complementando con esto la información de los programas humanos actualmente vigentes.

## SUMMARY

The Agricultural field has been using antimicrobial agents from the beginning of the fifties for treatment and prevention of infectious illness, as well as to promote animal growth and increase alimentary efficiency. Just like what happened in human medicine, the use and abuse of antimicrobial drugs has caused the bacterial populations to experiment an extreme selection pressure. This has led in turn to the development and dispersion of bacterial resistance.

The impact of antimicrobial resistance has been of such an extent that organizations such as the World Health Organization has been working since the eighties to carry out a number of initiatives trying to relieve in some way the explosive increase of bacterial resistance on a world level. The most important of these initiatives is the implementation of bacterial resistance surveillance nets on a national level that make possible to establish the bacterial resistance levels and evaluate the effectiveness of the implemented initiatives.

The essential goal of this study was to establish the resistance levels in *Salmonella* spp. strains isolated from bovines coming from the Fifth, Metropolitan and Tenth Region, so as to be able to evaluate the resistance present-day situation of this important zoonotic agent in yield animals.

The following serotypes of *Salmonella* spp. were found in the 29 strains isolated from 2.118 bovines: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Panama, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin. The 86.21% of the strains showed to be resistant to one or more of the 14<sup>th</sup> analyzed antimicrobial. There was also a high percentage of multiresistance (68%). The drugs that displayed a higher number of resistant strains were: amoxicillin (72%), oxitetracyclin (72%) and streptomycin (48%); being the quinolones the only antimicrobial group to which the stocks proved to be 100% sensitive. There were 12 resistance profiles established for the isolated *Salmonella* spp. strains.

These results are pointing out that is necessary to implement a variety of initiatives in the veterinarian medicine field, among which there should be a surveillance program for antimicrobial resistance on a national level, of permanent character. This surveillance program should include isolations carried out on food and food animals, adding to the information of the human programs in force at present.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un fenómeno que se viene observando paralelamente con el desarrollo de los antimicrobianos, lo que inicialmente se describió como una curiosidad científica, se fue transformando en una amenaza al éxito de los tratamientos de las enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas familias de antimicrobianos entre los años 1950 y 1960 y las modificaciones a dichas moléculas en las décadas del 70 y 80 crearon en el ambiente científico una falsa sensación de seguridad, pues se pensó que con esto se frenaría el aumento en la resistencia. En la actualidad, el tema de la resistencia ha cobrado importancia, y es así como muchos países ya han elaborado planes nacionales de contingencia para frenar su aumento.

El uso indebido de los antimicrobianos es, sin duda, una de las principales causas de la generación de resistencia. La Medicina Veterinaria juega un rol fundamental, debido a que son muchos los estudios que han demostrado el impacto que ha tenido el uso y abuso de los antimicrobianos en los animales de abasto, en la selección y posterior transmisión de genes de resistencia en bacterias zoonóticas, bacterias patógenas y bacterias saprófitas. Tal es el impacto que ha causado, que organismos como la Organización Mundial de la Salud y el "Codex Alimentarius" han generado documentos destinados a normar su utilización en pro de contener la resistencia antimicrobiana en los animales destinados a consumo humano. En estos documentos se hace una especial recomendación a la generación de Sistemas de Vigilancia a nivel nacional, que permitan evaluar el estado de este riesgo, como también el impacto que ha tenido la aplicación de las medidas en la mitigación de este problema.

El objetivo de este estudio fue determinar la resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de las regiones V, Metropolitana y X, con el fin de entregar información sobre los niveles de resistencia presentes en esta especie animal e incentivar la instauración de un programa nacional permanente de vigilancia de resistencia en Medicina Veterinaria.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un fenómeno que se puede definir como la capacidad que posee un microorganismo para seguir multiplicándose o bien, persistir en presencia de niveles terapéuticos de un agente antimicrobiano (OMS, 2000).

El fenómeno de la resistencia antimicrobiana se fue observando paralelamente al desarrollo de estos medicamentos; se remonta a 1940 cuando Abraham y Chain detectaron que, en extractos de una cepa de *E. coli*, desaparecía la actividad antibacteriana de la penicilina. Como esta actividad se perdía por acción del calor, concluyeron que el agente causante debía ser una enzima a la cual denominaron "penicilinasa". Ya en 1944, Kirby demostró la presencia de la penicilinasa en *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina G. De ahí en adelante, se han descrito múltiples mecanismos de resistencia para muchos de los antimicrobianos con que actualmente cuenta el arsenal terapéutico (Alós, 1994).

En los países en vías de desarrollo, a los que pertenece un 78% de la población mundial, se ha estimado que entre las principales causas de muerte en la población se encuentran las enfermedades infecciosas, ocupando una parte muy importante las enfermedades de origen bacteriano. De ahí que la problemática de la resistencia bacteriana tenga una connotación mundial, ya que los fármacos antimicrobianos, aún en la actualidad, y con el desarrollo de una serie de tecnologías, siguen siendo una de las principales herramientas terapéuticas usadas para combatir las infecciones bacterianas (Hart & Kariuki, 1998).

La resistencia bacteriana genera una serie de impactos: a nivel de salud pública se ha observado un aumento en mortalidad y morbilidad debido al fracaso en las terapias, el encarecimiento de los costos por tratamientos, hospitalización, entre otros, obligando a la investigación y generación de nuevas drogas antimicrobianas mucho más costosas y eventualmente, de mayor toxicidad, todo esto sumado, a que se genera un abandono de

muchas drogas del arsenal terapéutico, que inicialmente fueron muy útiles. Lo mismo ha sucedido en Medicina Veterinaria, donde el fracaso de una terapia antimicrobiana, implica también un aumento en los costos de producción, lo que trae consecuencias tanto al productor como al consumidor (Tollefson *et al.*, 2003).

El aumento generalizado de la resistencia en bacterias patógenas, ha dado la voz de alarma, generando una preocupación a nivel mundial sobre el tema. Patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* han resurgido producto de, entre otros aspectos, la presencia del virus del VIH y las altas tasas de resistencia que presentan algunas cepas bacterianas (OMS, 1994; Zumla & Grange, 1998; Chan & Iseman, 2002), otros patógenos como *Streptococcus pneumoniae* (Fenoll *et al.*, 1998) y *Staphylococcus aureus* (OMS, 2001; Duckworth, 2003) han presentado una preocupante disminución en la sensibilidad de sus aislamientos lo que se traduce en grandes problemas a nivel hospitalario, reflejando la situación mundial de la resistencia bacteriana. Este hecho, sumado al aumento masivo del comercio y los movimientos humanos, producto de la globalización, han permitido que los agentes infecciosos, incluidos los fármacorresistentes, se propaguen rápidamente (OMS, 2001).

A medida que se incrementa la prevalencia de la resistencia bacteriana y que de esta se desprendan implicancias clínicas, es necesario redoblar los esfuerzos en pro de buscar medidas que mitiguen este descontrolado aumento (OMS, 2001).

A raíz de lo expuesto anteriormente, organizaciones internacionales como el "Codex Alimentarius" (FAO/OMS), la Organización Internacional de Epizootias (OIE) y la misma Organización Mundial de la Salud (OMS), desde la década de los ochenta, vienen planteando la necesidad de trazar directrices con respecto a este tema; es así como han generado múltiples documentos como el publicado en el año 2001, "Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos", que tiene como objetivo proporcionar un marco de intervenciones destinadas a reducir la aparición y propagación de microorganismos resistentes. Entre las principales recomendaciones que se hacen al respecto destacan:

1. Reducir la carga y propagación de las infecciones.
2. Mejorar el acceso y educar a todas las partes involucradas para el correcto uso de los fármacos antimicrobianos.
3. Fortalecer los sistemas de salud y crear *Sistemas de vigilancia de la resistencia bacteriana*. La información generada por estos sistemas debe posteriormente ser integrada a redes de información sobre el tema; fomentando de esta forma la colaboración entre gobiernos, organizaciones no gubernamentales (ONG) y organismos internacionales, entendiendo la información generada por estos sistemas de vigilancia como un bien de carácter público internacional.
4. Limitar la generación de resistencia a través de una apropiada legislación y políticas que regulen el desarrollo, autorización, distribución y venta de antimicrobianos, tanto en medicina humana como veterinaria.
5. Cumplimiento de los reglamentos y la legislación generada respecto al tema.
6. Estimular el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos, así como métodos alternativos de lucha contra las enfermedades bacterianas como es el desarrollo de vacunas. Enfatizar los esfuerzos hacia la población para la prevención de la ocurrencia de éstas.

Para el éxito en la aplicación y seguimiento de las recomendaciones hechas por la OMS en este documento, es fundamental que los países reconozcan que existe un problema causado por la resistencia bacteriana y que se logre la formación de grupos de estudios intersectoriales eficaces (OMS, 2001).

A pesar de que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un fenómeno normal, y de cierta manera, esperable, al ser una respuesta evolutiva de los microorganismos para poder defenderse de sus efectos nocivos, el problema radica en el *explosivo aumento de la resistencia bacteriana* producto de una serie de factores interrelacionados, siendo uno de los principales, el uso indebido de estos agentes terapéuticos, ya sea por su uso excesivo, incorrecto o subutilización de estos (Levy, 1998; OMS, 2001).

Esto ha traído una serie de controversias en el ámbito veterinario, debido al uso indiscriminado en producción animal. Esta se menciona como una de las múltiples causas que ha seleccionado el desarrollo de bacterias resistentes o bien de genes, que al ser introducidos en la cadena alimentaria, pueden ser transferidos a otras bacterias patógenas para el ser humano o bien afectarlos directamente (Wegener *et al.*, 1997).

Es así como la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la "Food and Agriculture Organization" (FAO) de las Naciones Unidas y la Organización Internacional de Epizootias (OIE) con la participación de la "World Federation of the Animal Health Industry" (COMISA), generaron el documento denominado "WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food" como un componente principal de la "Estrategia mundial de la OMS para la contención de la resistencia antimicrobiana". La importancia que tiene el uso de antimicrobianos en los animales destinados a consumo humano, requiere de un tratamiento especial. El principio fundamental de esta discusión es *minimizar el impacto negativo que tiene en la salud pública el uso de los agentes antimicrobianos en los animales de producción, asegurando paralelamente el uso seguro y efectivo de estos agentes terapéuticos en medicina veterinaria*. Entre las recomendaciones que se entregan, se enumeran una serie de factores a controlar: desde la aprobación de las licencias para nuevos antimicrobianos, pasando por su fabricación, venta y distribución, pudiendo ser expendidos exclusivamente bajo la prescripción médico veterinaria. Se apunta principalmente al uso terapéutico de los antimicrobianos en medicina veterinaria, recomendando desincentivar su uso como promotores del crecimiento, partiendo por la prohibición del uso de antimicrobianos que pertenecen a la misma clase de los usados en medicina humana e incentivar la eliminación voluntaria de su uso entre los productores. Se pone especial énfasis al establecimiento de programas nacionales de vigilancia de la resistencia antimicrobiana que deben también, incluir estudios sobre las cantidades de antimicrobianos usados y su destino, datos que deben recopilarse permanentemente para de esta manera asegurar futuros análisis epidemiológicos (OMS, 2000)

La presencia de elementos genéticos que pueden ser transferibles como plasmidios, integrones y transposones, determina que la generación de resistencia bacteriana en medicina veterinaria no sólo sea un problema de salud pública por la presencia de bacterias zoonóticas resistentes, sino también por el potencial riesgo que significa la transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias de origen animal y humano. Este hecho se ha podido comprobar a través de distintos estudios como el de Leverstein-van Hall *et al.* que en 2002 determinaron el traspaso interespecie de integrones mediadores de multiresistencia en la familia de las enterobacteriaceas. Otros estudios como el realizado por Winokur *et al.* (2001), pudo determinar el traspaso de un plasmidio mediador de resistencia CMY-2 AmpC  $\beta$ -lactamasa entre especies distintas de bacterias como lo son *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. aisladas desde humanos y animales de abasto. Este fenómeno no es exclusivo de las enterobacteriaceas; otros grupos bacterianos como *Staphylococcus aureus* también se han visto afectados por este fenómeno; Khan *et al* en el año 2000 pudieron comprobar la transmisión horizontal de los genes *erm A* y *erm C*, codificadores de la resistencia a eritromicina, ocurrida desde aislamientos realizados en pollos y seres humanos, observándose experimentalmente una alta tasa de transferencia entre ambas cepas aisladas desde estas dos especies.

Se ha observado la aparición de plasmidios híbridos generados entre plasmidios que codifican genes de virulencia y determinantes de resistencia, a través de procesos de recombinación o por la simple adquisición de grupos de genes portadores de multiresistencia. Esto propicia una fantástica adaptación al medio por parte del microorganismo, con todos los riesgos que esto conlleva (Lin-hui *et al.*, 2004; Chishih & Cheng-Hsun, 2006).

## **1. Uso de los antimicrobianos en animales destinados para consumo humano.**

Los agentes antimicrobianos han sido usados en la agricultura, incluyendo el ganado, desde comienzos de la década de los cincuenta para el tratamiento de las enfermedades infecciosas y como promotores del crecimiento (Angulo *et al.*, 2004).

En las últimas décadas la tendencia en producción animal ha sido la creación de sistemas productivos cada vez más intensivos, al ser esta una de las formas más eficientes de producir. Estos cambios radicales de los sistemas generaron una serie de inconvenientes en el aspecto sanitario, lo que determinó que el uso de los antimicrobianos se haya extendido a distintos ámbitos de acción, además del netamente terapéutico, utilizándose también como promotores del crecimiento y en la profilaxis de enfermedades infecciosas en grupos de animales en riesgo (McEwen & Fedorka-Cray, 2002; Anderson *et al.*, 2003; Bywater, 2005). El uso de los antibióticos en animales destinados a consumo humano, es un tema de salud pública debido a que su uso y abuso selecciona resistencia bacteriana las cuales, a través de los alimentos pueden ser traspasadas al hombre. Uno de los mejores ejemplos en los últimos años de la emergencia de resistencia en especies de abasto y su posterior transferencia al hombre, es lo ocurrido con la resistencia a las fluoroquinolonas. Estos fármacos en medicina humana son usados para el tratamiento de las infecciones gastrointestinales como salmonelosis y campilobacteriosis. La resistencia a fluoroquinolonas emergió en *Campylobacter* spp., después de ser aprobado el uso de enrofloxacin en el agua de aves comerciales en Holanda. Las primeras cepas resistentes se detectaron en pollos y posteriormente en aislamientos provenientes de muestras humanas (Endtz *et al.*, 1991). Posteriormente este fenómeno fue repitiéndose en distintas partes del mundo y también en otras especies bacterianas como *Salmonella* spp. (Malorny *et al.*, 2003; Marimon *et al.*, 2004).

Según informes de organismos internacionales se calcula que en Norteamérica y Europa el 50% del tonelaje de toda la producción de antimicrobianos se usa en animales destinados al consumo humano (OMS, 2001).

Los antimicrobianos usados como agentes terapéuticos en los animales destinados a producción son raramente aplicados de forma individual, realizándose manejos de masivas aplicaciones, lo que se ha descrito, para su uso en distintas aplicaciones como **metafilaxis** que se define como la administración masiva de un antimicrobiano en dosis terapéuticas pero por cortos periodos de tiempo. Se aplica con un fin terapéutico como preventivo, **profilaxis** que es la administración de un agente antimicrobiano a un rebaño sano que están expuestos a situaciones de riesgo, con el propósito de poder prevenir la

aparición de una enfermedad infecciosa y ***promotores del crecimiento*** que se caracteriza por la aplicación de un antimicrobiano por largos periodos de tiempo en dosis subterapéuticas (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

El uso de los agentes antimicrobianos como promotores del crecimiento es, sin duda uno de los usos más controversiales que han tenido los antimicrobianos en producción animal. Su uso se fundamenta en las siguientes bases biológicas: el efecto directo sobre la flora bacteriana, debido que al suprimirla se produce una disminución de la competencia por nutrientes. También disminuye la excreción de metabolitos bacterianos y otras sustancias inmunomediadoras de interleukina-1 que deprimen la eficiencia de conversión alimentaria. Producen un aumento en la digestibilidad de los nutrientes, producto de la reducción en el grosor de la pared intestinal y de las vellosidades de la lámina propia y la reducción de la presentación de los patógenos oportunistas y las infecciones subclínicas (Dibner & Richards, 2005).

Todos los efectos benéficos de su uso en producción animal, se ven contrarrestados por la asociación que existe entre su uso y la aparición de mayores niveles de resistencia bacteriana en aislamientos realizados tanto en animales, como en productos alimenticios y en seres humanos (OMS, 1997; OMS, 2001; Angulo *et al.*, 2004; Dibner & Richards, 2005; Bywater, 2005). Se ha demostrado que estos tratamientos en animales producen una exagerada presión de selección sobre las poblaciones bacterianas, ya que al aplicarse en dosis subletales por largos periodos de tiempo eliminan a las poblaciones que presentan sensibilidad a estos antimicrobianos y seleccionan poblaciones resistentes (McEwen & Fedorka-Cray, 2002).

Esto se ve agravado debido a que muchos de los antimicrobianos usados como promotores del crecimiento, en producción animal, son usados también en el control de las enfermedades en humanos y otros que pertenecen a una misma clase generan resistencia cruzada con antimicrobianos usados en medicina humana. Hay mucha evidencia científica que avala esta afirmación, como es el caso del uso de la avoparcina como promotor del crecimiento en animales, que contribuyó a aumentar la cantidad de *Enterococcus* resistentes a vancomicina; estos microorganismos son causantes de graves

enfermedades en personas con compromiso inmunitario. También preocupa que los genes de resistencia a vancomicina puedan ser traspasados a otras cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus* donde la vancomicina también constituye uno de los tratamientos de última instancia (Wegener, 1999; Bywater, 2005).

Entre las estrategias para contener el aumento de la resistencia bacteriana planteadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2001) en lo que respecta al uso de antimicrobianos en producción animal, es categórica en señalar la prohibición de su uso como promotores del crecimiento a todos los antimicrobianos que pertenezcan a la misma familia o bien que puedan establecer resistencia cruzada con antimicrobianos usados en medicina humana, constituyendo el primer paso para el abandono de esta práctica. Sumado a esto, la implementación de programas de vigilancia para medir el riesgo y monitorear el uso de antimicrobianos y los niveles de resistencia bacterianos presentes en animales de abasto. Es así como la Unión Europea en el 2001 prohibió el uso de promotores del crecimiento relacionados con aquellos usados en medicina humana como la avoparcina, tilosina, espiramicina, bacitracina y virginamicina, siendo este el primer paso para discontinuar el uso definitivo de todo tipo de antimicrobiano como promotor del crecimiento, en animales de abasto, los que fueron prohibidos a contar del 31 de diciembre de 2005 de acuerdo a la regulación de la Comisión Europea 1831/2003 (Unión Europea, Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2003; Gallhoff, 2006).

Suecia en 1986 fue el primer país que prohibió el uso de cualquier clase de antibióticos como promotor del crecimiento, disminuyendo en un 55% el uso de antimicrobianos, comprobándose que no existen efectos negativos a largo plazo en la productividad de los planteles ni en la competitividad. En 1999 los productores daneses abandonaron voluntariamente el uso de promotores del crecimiento, de esta manera lograron disminuir en un 60% el volumen de agentes antimicrobianos usados anualmente en producción animal. Estos países pioneros en este tipo de medidas han demostrado que, en conjunto con otras medidas, se logra una disminución en los niveles de resistencia bacteriana (Angulo *et al.*, 2004).

En el caso de la industria bovina en particular el ganado de carne está sometido a numerosos manejos que incluyen la masiva administración de antimicrobianos para prevenir, entre otras enfermedades, los brotes de enfermedades respiratorias. A diferencia de esta situación las lecherías mantienen un control más estricto sobre los tratamientos con antimicrobianos, en los animales que están en producción, producto de los castigos aplicados a las leches con residuos de estas sustancias, por parte de la industria lechera; así todo hay una serie de manejos que involucran el uso de antimicrobianos: como es la terapia de secado (McEwen & Fedorka-Cray, 2002; Sicho, 2006). También es un hecho habitual que posterior a un tratamiento por mastitis y durante el periodo de resguardo, la leche sea entregada para la alimentación de terneros, esta práctica puede estar determinando exponer a antimicrobianos a animales de corta edad, predisponiendo la aparición de resistencia antimicrobiana en las poblaciones bacterianas (DANMAP, 2006).

Se ha observado que los antimicrobianos usados en producción animal cuentan con bajo o nulo asesoramiento de médicos veterinarios en su prescripción, jugando un rol importantísimo las compañías farmacéuticas, importadoras y farmacias veterinarias que incentivan entre los productores el uso de este tipo de medicamentos, observándose, en múltiples situaciones la entrega de información errónea respecto a su uso, dosis, periodos de carencia y ritmo horario. A estas situaciones se suma que, debido al aumento en los costos de producción que esto significa y a la falta de servicios de diagnóstico, hacen que el uso de los antimicrobianos sea empírico, sin pruebas que demuestren la presencia de enfermedad, ni la sensibilidad del patógeno al antimicrobiano usado (OMS, 2001). Todo esto ha contribuido a la generación de cepas bacterianas resistentes y multiresistentes en el ganado, con el potencial riesgo de transferencia de bacterias patógenas o bien de genes de resistencia al hombre (McEwen & Fedorka-Cray, 2002). El uso de agentes antimicrobianos en especies animales en nuestro país no está normado, sin requerirse para su venta una receta médico veterinaria.

El uso de antimicrobianos en producción animal no es para remediar errores de manejo por lo que estrategias de vacunación y buenos manejos sanitarios son necesarios para disminuir el abuso de estos agentes en medicina veterinaria (Grungel, 2006).

De ahí que todos los esfuerzos concernientes a disminuir el incremento de la resistencia bacteriana requieren la colaboración de todos los sectores de la sociedad incluyendo a los productores, médicos veterinarios, médicos humanos y organizaciones estatales y privadas encargadas de velar por la salud pública. Todas las medidas destinadas a disminuir de algún modo los niveles de resistencia presentes, requieren de métodos de evaluación, para determinar su efectividad. La única manera de efectuar esto es a través de la implementación de programas de vigilancia sistemática de la resistencia a los antimicrobianos, que permitan determinar cual es la situación actual y poder detectar cambios que se han producido, dando la voz de alerta sobre nuevas apariciones o incrementos en la resistencia antimicrobiana (Anderson *et al.*, 2003).

## **2. Programas de vigilancia de resistencia bacteriana.**

La resistencia bacteriana es un proceso dinámico en el tiempo, de ahí la importancia que tiene la vigilancia de la resistencia antimicrobiana. Los programas de vigilancia de la resistencia bacteriana deben ser capaces de poder observar la evolución de la resistencia bacteriana, así como detectar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia y funcionar como fuentes de informaciones para realizar recomendaciones sobre políticas de sanidad humana y animal (OIE, 2006). Es así como muchos países han implementado planes de vigilancia de la resistencia bacteriana, como "National Antimicrobial Resistance Monitoring Program" (NARMS) de EE.UU., "Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program" (DANMAP) de Dinamarca, "Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring" (SVARM) de Suecia, entre otros. Dichos programas deben complementarse con programas de vigilancia en el consumo de antimicrobianos (Bywater, 2005).

Todos estos programas siguen una serie de normas preestablecidas de la forma en la cual se realiza la vigilancia, para que de esta manera la información obtenida por los distintos países pueda ser fácilmente cotejada. Se rigen por la comparación de los patrones de resistencia en aislamientos de bacterias, las cuales se identifican por especie. Es importante que toda la información recopilada por estos programas sea pública para con ella generar redes de información entre países, que facilite el estudio epidemiológico

de la resistencia (Bywater, 2005). Estas bacterias son aisladas de muestras provenientes del ganado, alimentos y humanos, utilizando métodos idénticos o bien, comparables. Para las muestras obtenidas desde el ganado se aíslan tres tipos de bacterias: Bacterias patógenas animales, bacterias indicadoras, bacterias zoonóticas.

Las bacterias patógenas de los animales se usan para detectar la aparición de resistencia que pueda representar un peligro para la salud de los seres humanos y los animales y guiar a los médicos veterinarios en sus decisiones a la hora de hacer prescripción (OIE, 2006).

Las bacterias indicadoras son bacterias comensales pertenecientes a la flora normal presentes en los seres vivos y por lo tanto están constantemente expuestas a agentes antimicrobianos pudiendo volverse resistentes y constituir reservorios de genes de resistencia, transferibles a bacterias patógenas. La prevalencia de la resistencia en estas bacterias tanto en hombres como animales son utilizadas como indicadores de la presión de selección producto de los agentes antimicrobianos usados y reflejan el potencial de la futura resistencia en los patógenos (Angulo *et al.*, 2004).

Las bacterias zoonóticas son aisladas porque estas desarrollan resistencia en sus reservorios animales y pueden comprometer terapias cuando causan infecciones en humanos (Aarestrup, 2005). De estas, la más estudiada por los programas de vigilancia es *Salmonella* spp. (Wegener *et al.*, 1997) por ser una de las más importantes bacterias zoonóticas transmitidas por los alimentos (OMS, 1997).

### **3. El peligro de la resistencia antimicrobiana en bacterias zoonóticas: *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. es una bacteria zoonótica, que al ser introducida en la cadena alimentaria constituye uno de los 250 agentes causantes de las descritas enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). Este grupo de enfermedades ha surgido como una importante causa de morbilidad, este último tiempo, debido a los cambios en los sistemas de vida y en los hábitos alimentarios. Sólo en EE.UU. se estiman en alrededor de 76

millones los casos anuales de ETA, que significan 325.000 hospitalizaciones y más de 5.000 muertes (Mead *et al.*, 1999). De éstos, 1,4 millones corresponde a infecciones generadas por *Salmonella* spp., alrededor de 600 casos terminan en la muerte del paciente. La principal complicación asociada a estas infecciones son los casos de septicemia, los que alcanzan a un 7% de las 40.000 infecciones confirmadas por cultivo bacteriológico y reportado anualmente. Si bien los antibióticos no son esenciales para el tratamiento de muchos de los casos de Salmonelosis intestinal, son la única esperanza de tratamiento para los pacientes que sufren de esta enfermedad invasiva (Fey *et al.*, 2000), debido que *Salmonella* es capaz de causar desde infecciones asintomáticas hasta severas enfermedades extraintestinales como bacteremias, meningitis y osteomielitis (Butaye *et al.*, 2006).

Estudios epidemiológicos en seres humanos sostienen la tesis que un gran porcentaje de las infecciones por *Salmonella* resistentes son adquiridas por el consumo de alimentos de origen animal contaminados (White *et al.*, 2001; Butaye *et al.*, 2006).

El ganado bovino de leche constituye un reservorio de *Salmonella* spp. y productos como la leche y sus derivados son considerados como vehículos para la transmisión de esta zoonosis en humanos. En Estados Unidos se han detectado numerosos brotes asociados a leche contaminada post pasteurización, teniendo especial importancia el ocurrido en Pennsylvania y en New Jersey, producto de la multiresistencia presente en las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium causantes del brote; estas resultaron ser resistentes a ampicilina, kanamicina, estreptomina, sulfametoxazol y tetraciclinas, coincidiendo con las aisladas de bovinos provenientes de plantales lecheros involucrados en el brote (Olsen *et al.*, 2004). Otro brote importante ocurrió en el estado de Washington por el consumo de queso fresco no pasteurizado contaminado con *Salmonella* Typhimurium DT104 (Villar *et al.*, 1999) Fey *et al.*, 2000 pudieron comprobar a través del análisis de las características genético moleculares la similitud entre una cepa de *Salmonella* Typhimurium multiresistente que fue aislada de un niño que padecía Salmonelosis clínica, y una cepa aislada desde rebaños bovinos asociados con el brote. Se ha podido establecer que *Salmonella* spp. constituyen un reservorio de  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido (ESBL), que son enzimas con la capacidad de hidrolizar y por lo tanto

inactivar cefalosporinas de tercera y cuarta generación; este fenómeno se cree que surge producto de la presión de selección generada por el uso de ceftiofur en ganado (Witte, 2006).

Muchos países han podido realizar estudios retrospectivos para observar como ha variado la resistencia de *Salmonella* spp. en el tiempo, comprobando de esta manera, lo dinámico del proceso. Es así como Van Duijkeren *et al.*, en un estudio holandés publicado en el 2003, usando cepas de *Salmonella* spp. aisladas de humanos y distintas especies de abasto como bovinos, pollos y cerdos, pudieron comprobar como había evolucionado la resistencia entre los años 1984 y 2001. Se pudo determinar que el serotipo que presentó los mayores índices de resistencia era *Salmonella* Typhimurium. Este serotipo se caracterizó por presentar similares niveles de resistencia entre especies como humanos, pollos y cerdos; siendo éstos totalmente distintos a los niveles presentados por los aislamientos realizados en bovinos, donde se observaron niveles muy altos de resistencia. Estas variaciones se deben a los fagotipos predominantes en distintas épocas, siendo el más importante en todas las especies el DT 104 (resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfametoxazol y tetraciclinas). Si bien no fue posible determinar con claridad que el amplio uso de antimicrobianos en producción animal haya determinado en su totalidad la emergencia de los fagotipos multiresistentes en *Salmonella* spp. se pudo observar que los antimicrobianos más usados en Medicina Veterinaria eran los que presentaban mayores tasas globales de resistencia.

Dinamarca, uno de los países que posee uno de los primeros programas de vigilancia de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos, pudo determinar, al prohibir el uso de los promotores de crecimiento, una disminución de un 50% en el consumo de antimicrobianos por parte de los productores de ganado, estimándose que el consumo de antimicrobianos en bovinos fue de 15 toneladas (13% del consumo total de antimicrobianos en producción animal). *Salmonella* en bovinos exhibió los mayores niveles de resistencia para estreptomina, tetraciclinas, ampicilina (69,2%) y sulfonamidas (73,1%) registrándose un aumento en la resistencia a tetraciclinas y sulfonamidas al compararlo con el año 2005 (DANMAP, 2006).

La emergencia de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a más de un antimicrobiano a la vez es un problema de connotación mundial que ha sido asociado al uso de antimicrobianos en el ganado. Es tal la importancia de la propagación de cepas de *Salmonella* spp. multiresistentes que países como Dinamarca, a partir del año 1998, han implementado una política de tolerancia cero para el fagotipo multiresistente de *Salmonella* Typhimurium DT 104 para de esta forma ofrecer una mayor protección al consumidor debido al gran potencial de diseminación que éste posee en animales de abasto, sumado a la creciente virulencia que ha exhibido en humanos (Wegener, 2006). La importancia del fagotipo DT104 reside en que a pesar de haberse detectado otros brotes de fagotipos multiresistentes es el único que ha logrado una diseminación mundial (Butaye *et al.*; 2006). La preocupación mostrada por Dinamarca al respecto es compartida por otros países como Japón (Esaki *et al.*, 2004), República Checa (Karpiskova *et al.*, 1999), Estados Unidos (Davis, *et al.*, 1999), Holanda (Van Duijkeren *et al.*, 2003), Alemania (Malorny *et al.*, 2003) entre otros. Este fagotipo ha presentado en este último tiempo resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas (Lin-Hui *et al.*, 2004; Butaye *et al.*, 2006).

#### **4. Resistencia bacteriana en Chile**

La vigilancia de la resistencia bacteriana en Chile se realiza actualmente de manera parcial y sin un organismo central que compile la información generada desde las distintas fuentes de información. La vigilancia se realiza exclusivamente en humanos siendo cuatro los programas instaurados tanto por organismos gubernamentales como por privados:

1. **Instituto de Salud Pública de Chile.** Creó un programa de vigilancia de patógenos asociados a infecciones ambulatorias (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Neiseria* spp., *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.) y es el principal programa de vigilancia en Chile, siendo la metodología centralizada de éste su principal limitante.
2. **Ministerio de Salud de Chile** (Programa de Control de Infecciones). Recopila información sobre resistencia bacteriana de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina y *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*

*baumannii* y *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina. Teniendo una mayor cobertura al solo recopilar los datos, pero sin poder certificar la exactitud de los resultados.

3. **Universidad de Chile** (Red PRONARES). Actualmente no esta en actividad, pero entre los años 1997 y 2002 realizó una vigilancia de patógenos asociados a infecciones ambulatorias y hospitalarias en seres humanos, a través del sistema WHONET, lo que permite una metodología descentralizada y al certificar sus fuentes, garantizando la exactitud de los datos obtenidos, siendo su limitante la escasa cobertura.
4. **Red SENTRY**. (Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Company) Vigilancia de la resistencia por síndromes clínicos de patógenos causantes de infecciones ambulatorias y patógenos hospitalarios. Su metodología es centralizada en laboratorios de Referencia (EUA) pero posee una escasa representatividad (García, 2003).

A pesar de los esfuerzos realizados en nuestro país para la implementación de las medidas recomendadas por la OMS, la estimación de la magnitud de la resistencia bacteriana es un problema no resuelto. Desde el 2002 se trabaja en la implementación de la Red Nacional para la Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana, una iniciativa conjunta de la Sociedad Chilena de Infectología y el Instituto de Salud Pública, que tiene como objetivo principal el obtener datos de resistencia confiables y representativos del país (García, 2003). Es importante destacar en este sentido que sólo se incluyen muestras obtenidas desde seres humanos, sin contemplar la obtención de muestras de origen animal y desde alimentos, por lo tanto si bien esta red permitirá tener datos más fidedignos de la situación nacional, sigue siendo incompleta al no incluir información en lo que respecta a resistencia bacteriana en el área veterinaria.

Nuestro país es parte, junto con otros 20 países latinoamericanos, de la Red de vigilancia de la susceptibilidad a los antibióticos para *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*, creada en 1997 por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Esta red nace producto de la alerta regional suscitada por la emergencia y reemergencia de patógenos en la región entre los cuales se encuentran las originadas por la resistencia a

los antibióticos. Esta es la primera fase para que los países de nuestro continente pongan en acción una estrategia para la contención de la resistencia bacteriana, donde la vigilancia juega un rol fundamental (OPS, 2004).

Según los datos publicados en el informe 2002 de la Red de Vigilancia de la Susceptibilidad a los Antibióticos, los aislamientos de *Salmonella* desde seres humanos (n=1.043) presentaron los siguientes porcentajes de cepas resistentes a al menos un antimicrobiano, clasificados según su serotipo: *Salmonella* Enteritidis (39%), *Salmonella* Typhimurium (5%), *Salmonella* Montevideo (3%) y otros serotipos (17%) (OPS, 2002).

En Chile existe un gran vacío de información sobre resistencia bacteriana en especies animales; el único estudio de resistencia en *Salmonella* spp., realizado en especies de abasto demostró que en aves comerciales, un 77% de las cepas presentan algún grado de resistencia antimicrobiana, existiendo un 41.48% de cepas resistentes al ácido nalidíxico y ácido oxolínico, un 39,36 % a flumequina y un 30.85% de resistentes a la oxitetraciclina (San Martín *et al.*, 2005). En cerdos se demostró la existencia de un 83% de cepas resistentes a uno o más antibióticos, siendo la resistencia a oxitetraciclina y estreptomicina las más frecuentes (49% y 50%) (Bravo, 2004). Otro estudio de sensibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles detectó que 55,17% de las cepas eran resistente al menos a un antimicrobiano. Se registró que un 46,5% de las cepas eran resistentes a estreptomicina, 6,9% eran resistentes a oxitetraciclina, 5,1% a ácido nalidíxico e igual porcentaje, 1,7% a cloranfenicol, amoxicilina, ciprofloxacino y flumequina (Borie *et al.*, 2004)

En nuestro país no existe información sobre resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp. en bovinos, y a pesar de no ser el reservorio más importante, es responsables de brotes en seres humanos, por lo que es de vital importancia poder determinar cuál es la situación actual, dado el amplio uso que tienen las terapias antimicrobianas en la especie bovina lo que podría estar indicando la presencia cepas resistentes.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos en tres regiones de Chile.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de bovinos de las regiones V, Metropolitana y X.
2. Establecer perfiles de resistencia antimicrobiana en las cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de las regiones V, Metropolitana y X.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## **Diseño:**

Este trabajo forma parte del proyecto Fondecyt N° 1030857 "Monitoreo de la resistencia bacteriana en animales de producción: primer estudio de perfiles de resistencia en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas desde aves, cerdos y bovinos a nivel nacional". Se planteó como un estudio descriptivo de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas nativas de *Salmonella* spp. aisladas de bovinos de tres regiones del país.

### **1. Tamaño muestral:**

Para el cálculo del número de cepas a estudiar, se consideraron datos internacionales de porcentajes promedios de resistencia de un 70%, con una prevalencia promedio de un 1%, con un nivel de confianza de 95% y un error máximo de  $\pm 0,20$ . Según estos valores, el número de cepas a aislar y el número de muestras necesarias para obtenerlas fueron: al menos 21 cepas y 2.100 muestras de bovinos (Snedecor y Cochran, 1989).

De las regiones V y Metropolitana se recolectaron muestras entre los meses de Abril a Septiembre de 2004. Se obtuvieron 30 muestras por plantel en un total de 21 planteles, 19 de los cuales correspondieron a lecherías y 2 a "feedlots".

De la X región se obtuvo un total de 1.488 muestras, de las cuales 414 correspondían a novillos de matadero y 1.074 se obtuvieron desde planteles lecheros. Las 23 cepas aisladas (8 cepas aisladas desde novillos y 15 desde planteles lecheros) fueron donadas para este estudio por la doctora Erika Getsche de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Austral de Chile.

### **2. Obtención de muestras:**

De las regiones V y Metropolitana se recolectaron 5 gramos de heces frescas de bovino, obtenidas desde lecherías y mataderos. Las muestras se obtuvieron con una

manga de palpación directamente desde el recto de los animales en estudio y luego se transportaron debidamente etiquetadas y a temperatura de refrigeración. Antes de las 8 horas de obtenida, las muestras se procesaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **3. Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.**

Las muestras se procesaron de acuerdo a las pautas recomendadas por Murray y Barton (1993) para muestras clínicas. El procedimiento contempló un proceso de enriquecimiento mediante la adición de caldo Rappaport Vassiliadis en relación de 1:100, el cual se incubó por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se traspasó a un medio selectivo Agar XLD (Oxoid®), incubándose por 24 horas a 37°C. Las colonias morfológicamente sospechosas se identificaron a través de las siguientes pruebas bioquímicas estándares: TSI (fermentación de azúcares y producción de ácido sulfhídrico), LIA (lisina decarboxilasa y producción de ácido sulfhídrico), Citrato de Simmon's (utilización de citrato), Fenilalanina (fenilalanina deaminidasa), MIO (movilidad, producción de indol y ornitina decarboxilasa) y caldo urea (utilización de urea). Todas las colonias que presentaron una bioquímica concordante con *Salmonella* spp. se sometieron a pruebas de aglutinación rápida con suero polivalente Poli A-I y Vi (Difco®) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las cepas que no aglutinaron con el antisuero, se corroboró su identificación mediante el kit de diagnóstico rápido BBL Crystal para entéricos fermentadores (BBL®).

En los casos en que no existió aislamiento a las 24 horas, se sometió nuevamente el caldo Rappaport Vassiliadis a incubación y cultivo por 48 y 72 horas, repitiéndose el esquema descrito.

Este mismo procedimiento fue realizado en las muestras colectadas por la Universidad Austral de Chile y que posteriormente fueron donadas, formando parte de este estudio.

## 4. Test de susceptibilidad antimicrobiana

Se realizó mediante el estudio de Concentraciones Mínimas inhibitorias (CMI) por el método de dilución en agar, según las normas recomendadas por el "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (N.C.C.L.S., 2002)

### a. Antimicrobianos

Se utilizaron los siguientes antimicrobianos en forma de droga pura:

- **Uso en medicina veterinaria:**

- Enrofloxacino (Arlab®, potencia 1003 µg/mg)
- Florfenicol (Sigma®, potencia 1000 µg/mg)
- Ácido oxolínico (Oxoid®, potencia 990 µg/mg)
- Flumequina (Arlab®, potencia 946 µg/mg).

- **Uso en medicina humana:**

- Cloranfenicol (Oxoid®, potencia 980 µg/mg)
- Ciprofloxacino (Oxoid®, potencia 1000 µg/mg).

- **Uso en medicina humana y veterinaria:**

- Gentamicina (Sigma®, potencia 638 µg/mg)
- Amoxicilina/Ácido clavulánico (Oxoid®, potencia 558 µg/mg)
- Oxitetraciclina (Oxoid®, potencia 960 µg/mg)
- Amoxicilina (Oxoid®, potencia 989 µg/mg)
- Ácido nalidíxico (Oxoid®, potencia 970 µg/mg)
- Estreptomicina (Arlab®, potencia 773 µg/mg)
- Cefotaxima (Oxoid®, potencia 950 µg/mg)
- Sulfametoxazol/trimetoprim (Arlab®, potencia 1000/980 µg/mg)

### b. Preparación de las diluciones de los antimicrobianos

De cada antimicrobiano, se prepararon 10 diluciones al doble y decrecientes a partir de una solución stock de 1280 µg/ml, excepto para sulfametoxazol/trimetoprim, donde se preparó una concentración stock a razón de 19:1 (6080 µg/ml de sulfametoxazol y de 320 µg/ml para trimetoprim).

Los solventes y diluyentes utilizados para los distintos antimicrobianos se presentan en el anexo I.

### **c. Preparación de las placas con antimicrobianos**

Una vez obtenidas las diez diluciones para cada antimicrobiano se procedió a mezclarlas con Agar Mueller-Hinton II (Difco®) a razón de 1:9. Para esto se usaron tubos con 18 ml de agar, a 50°C, a los cuales se les agregó 2 ml. de antimicrobiano y se homogeneizó, para luego depositarlo en placas identificadas según el antimicrobiano usado y su concentración. Las placas se dejaron secar por media hora, manteniéndose en refrigeración por un máximo de 5 días. Se consideraron dos placas control sin antimicrobianos y una contra muestra para cada dilución preparada.

### **d. Preparación e impresión del Inóculo bacteriano**

Cada cepa de *Salmonella* spp. fue incubada en caldo común por 18 a 24 horas a 37°C; luego las suspensiones bacterianas se ajustaron a una concentración equivalente al 0,5 del Nefelómetro de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  bacterias/ml) mediante la adición de suero fisiológico, posteriormente esta suspensión se diluyó en una razón de 1:10 en suero fisiológico ( $1,5 \times 10^7$  bacterias/ml).

Cada suspensión bacteriana se traspasó en forma estéril a un pocillo del equipo inóculo replicador de Steer (Cahtra®), procediéndose a la impresión de cada una de las placas. Primero se imprimieron las placas control sin antimicrobiano y luego, en orden creciente cada una de las diluciones de cada antimicrobiano en estudio. Las placas impresas se dejaron secar por 30 minutos y posteriormente se llevaron a la estufa de cultivo por 24 horas a 37°C.

Cada vez que se realizó un estudio de Concentración Mínima Inhibitoria se utilizó como cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **e. Lectura y análisis de resultados**

Se determinó, para cada cepa, la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo bacteriano (CIM), expresado en µg/ml. Con estos valores y

según los puntos de corte establecidos por el "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (N.C.C.L.S., 2002) se calculó el porcentaje de cepas sensibles (S), sensibilidad intermedia (I) y resistente (R) además se calculó la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo del 50% de la población bacteriana (CIM<sub>50</sub>) y la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo del 90% de la población bacteriana (CIM<sub>90</sub>) para cada antimicrobiano.

Las cepas que presentaron sensibilidad intermedia, se asumieron como resistentes.

Con estos resultados se agruparon las distintas cepas según sus perfiles de resistencia como una forma de clasificar las asociaciones fenotípicas que se generan entre las cepas con idéntica multiresistencia.

A título complementario se solicitó la serotipificación de todas las cepas al Instituto de Salud Pública de Chile, Laboratorio de Referencia de Enterobacterias a cargo del Dr. Juan Carlos Hormazabal.

## RESULTADOS

En este estudio de las 630 muestras obtenidas desde las regiones V y Metropolitana se logró aislar 6 cepas de *Salmonella* spp., 4 cepas desde lecherías y 2 cepas desde "feedlots". Estas fueron analizadas junto con las 23 cepas obtenidas de la Universidad Austral de Chile.

La serotipificación de las cepas se presenta en la tabla número 1.

**Tabla nº 1.** Serotipos de 29 cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de la regiones V, Metropolitana y X de Chile.

Serotipo	Número de cepas (%)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	15 (51,72)
<i>Salmonella</i> Panama	7 (24,14)
<i>Salmonella</i> Mbandaka	4 (13,79)
<i>Salmonella</i> Dublin	2 (6,90)
N. T. <sup>1</sup>	1 (3,45)
<b>Total</b>	<b>29 (100,00)</b>

<sup>1</sup> N.T.: No tipificable

En la tabla número 2 se puede apreciar los serotipos presentes según la región de origen. De las cepas provenientes de las regiones V y Metropolitana se detectaron los serotipos *Salmonella* Mbandaka (4 cepas) y *Salmonella* Typhimurium (1 cepa). De las cepas pertenecientes a la X región, el serotipo predominante fue *Salmonella* Typhimurium (60,9%), seguida por *Salmonella* Panama (30,4%) y *Salmonella* Dublin (8,7%).

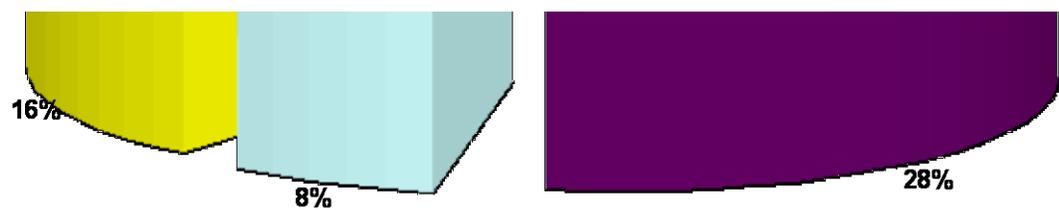
**Tabla nº 2.** Número de cepas correspondientes a cada serotipo de *Salmonella* aisladas desde bovinos de las regiones V, Metropolitana y X de Chile clasificados según su región de origen.

<b>Serotipo</b>	<b>Nº de cepas de regiones V y RM</b>	<b>Nº de cepas X región</b>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	14
<i>Salmonella</i> Mbandaka	4	-
<i>Salmonella</i> Dublin	-	2
<i>Salmonella</i> Panama	-	7

En el gráfico número 1 se puede observar que 25 de las 29 cepas en estudio presentó resistencia a uno o más antimicrobianos. Un 32% presentó resistencia a un solo antimicrobiano, un 16% a dos y a tres antimicrobianos respectivamente, el 8% fue resistente a cuatro antimicrobianos y el 28% resultó ser resistente a cinco o más antimicrobianos (gráfico número 2).

La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Salmonella* spp. se presenta en la tabla número 3. Los mayores porcentajes de resistencia fueron detectados para Amoxicilina (72%), Oxitetraciclina (72%), Estreptomina (48%) y Amoxicilina / ácido clavulánico (36%). No se detectaron cepas resistentes a las 5 quinolonas en estudio (flumequina, ácido oxolínico, ácido nalidíxico, enrofloxacino y ciprofloxacino) siendo esta la única familia de antimicrobianos a la cual las bacterias demostraron sensibilidad total.

**Gráfico n° 1.** Susceptibilidad antimicrobiana de 29 cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de las regiones V, Metropolitana y X de Chile.

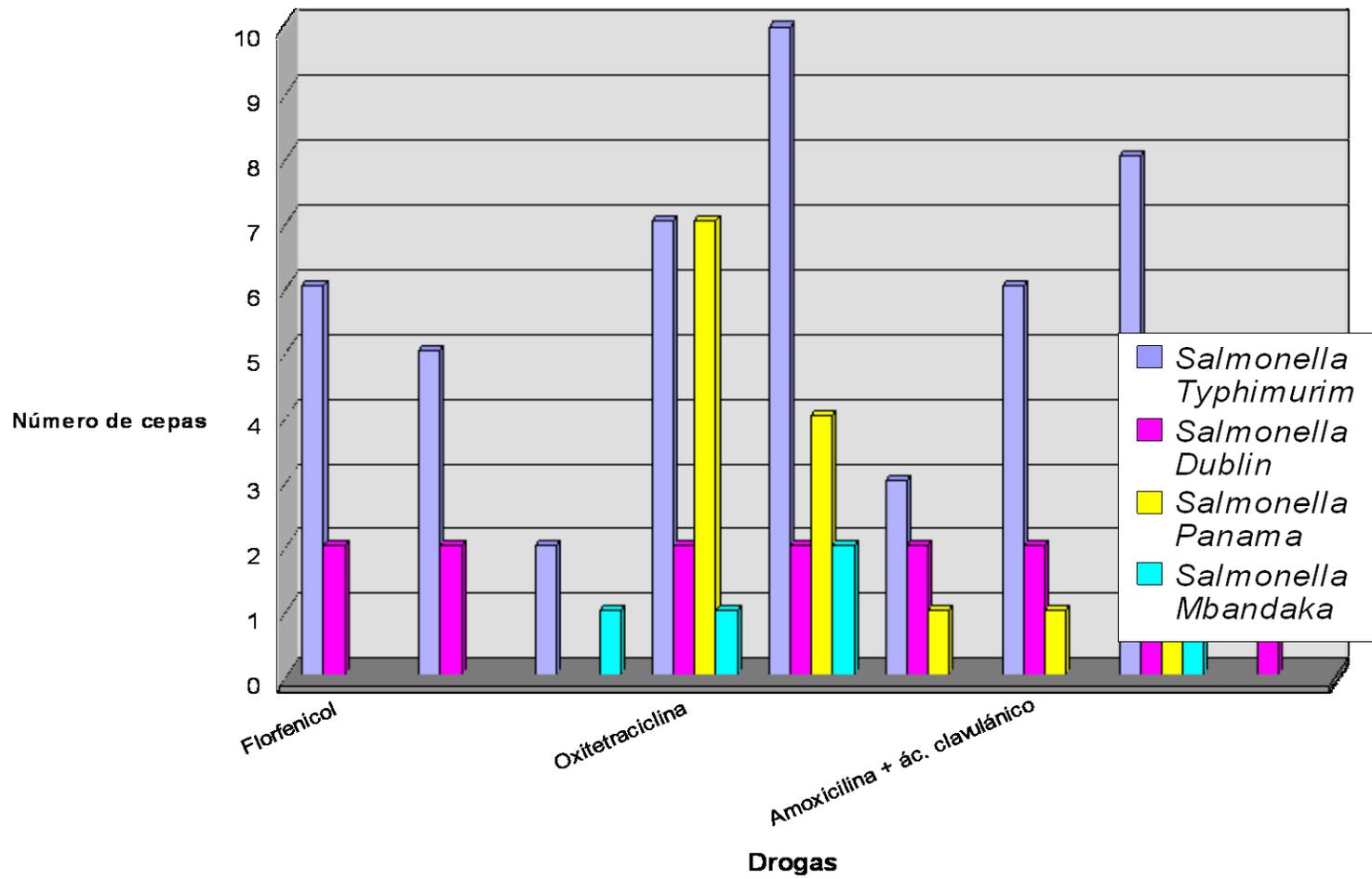


**Gráfico n° 2.** Porcentaje de resistencia a uno o más antimicrobianos de 25 cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de las regiones V, Metropolitana y X de Chile

**Tabla nº 3.** Resistencia de 25 cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de las regiones V, Metropolitana y X de Chile según antimicrobiano.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Número de cepas resistentes</b>	<b>Porcentaje de cepas resistentes (%)</b>
<b>Amoxicilina</b>	18	72%
<b>Oxitetraciclina</b>	18	72%
<b>Estreptomina</b>	12	48%
<b>Amoxicilina / ácido clavulánico</b>	9	36%
<b>Florfenicol</b>	8	32%
<b>Cefotaxima</b>	7	28%
<b>Cloranfenicol</b>	7	28%
<b>Gentamicina</b>	3	12%
<b>Sulfametoxazol / trimetoprim</b>	1	4%
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>100%</b>

En el gráfico número 3 se detallan los niveles de resistencia según serotipo. Se puede apreciar que el serotipo *Salmonella* Typhimurium presentó resistencia frente a todos los antimicrobianos en estudio excepto para Sulfametoxazol / trimetoprim y quinolonas. *S.* Panama presentó resistencia a amoxicilina, amoxicilina / ácido clavulánico, oxitetraciclina, estreptomina y cefotaxima. Mientras que Mbandaka demostró resistencia a gentamicina, oxitetraciclina, amoxicilina y estreptomina. Las dos cepas de *Salmonella* Dublin fueron resistentes a todos los antimicrobianos en estudio excepto a gentamicina y quinolonas. La cepa no tipificada presentó sensibilidad al 100% de los antimicrobianos estudiados.



**Gráfico número 3.** Resistencia de diferentes serotipos de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de las regiones V, Metropolitana y X de Chile.

Los valores CIM determinados en el 50 y 90% de la población bacteriana en estudio se presentan en la tabla número 4. Se puede apreciar que de la familia de las quinolonas flumequina, enrofloxacino y ciprofloxacino no exhibieron diferencias entre CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> lo que refleja la alta sensibilidad que mostró la población en estudio a estos antimicrobianos. Ác. oxolínico y ác. nalidíxico presentaron mayores diferencias entre ambos valores, a pesar de clasificarse todavía como sensibles.

**Tabla nº 4.** Concentración mínima inhibitoria 50 y 90 en las cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de las Regiones V, Metropolitana y X de Chile.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>CIM<sub>50</sub></b>	<b>CIM<sub>90</sub></b>	<b>Puntos de Corte (µg/ml)</b>
<b>Enrofloxacino</b>	< 0,125 µg/ml	< 0,125 µg/ml	≥2
<b>Flumequina</b>	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	≥32
<b>Ciprofloxacino</b>	<0,125 µg/ml	<0,125 µg/ml	≥2
<b>Sulfametoxazol / trimetoprim</b>	0,5/9,5 µg/ml	0,5/9,5 µg/ml	≥4/76
<b>Gentamicina</b>	0,5 µg/ml	1 µg/ml	≥16
<b>Ácido Oxolínico</b>	0,5 µg/ml	1 µg/ml	≥32
<b>Ácido Nalidíxico</b>	2 µg/ml	4 µg/ml	≥32
<b>Florfenicol</b>	4 µg/ml	32 µg/ml	≥32
<b>Estreptomycin</b>	64 µg/ml	128 µg/ml	≥64
<b>Oxitetraciclina</b>	64 µg/ml	>128 µg/ml	≥16
<b>Cefotaxima</b>	<0,125 µg/ml	>128 µg/ml	≥32
<b>Cloranfenicol</b>	2 µg/ml	> 128 µg/ml	≥32

El análisis individual de las cepas multiresistentes demostró la presencia de 12 perfiles de resistencia de los cuales los más frecuentes fueron: Cloranfenicol/ Amoxicilina + ácido clavulánico / Oxitetraciclina/ Amoxicilina/ Estreptomicina /Flofenicol (17,64%) y Cloranfenicol/ Amoxicilina + ácido clavulánico / Oxitetraciclina/ Amoxicilina/ Cefotaxima/ Estreptomicina/ Flofenicol (17,64%) (Tabla número 5).

**Tabla nº 5.** Perfiles de resistencia de 17 cepas de *Salmonella* spp. aislada desde bovinos de las regiones V, Metropolitana y X de Chile.

<b>Perfil de resistencia</b>	<b>Porcentaje de cepas</b>	<b>Número de cepas</b>
CN/Ot/St	5,88 %	1
CN/Ot	5,88 %	1
Ot/AMC/CTX/AML	5,88 %	1
Ot/AML	5,88 %	1
Ot/AML/CTX	5,88 %	1
FFC/AMC/C/AML/CTX/Ot/St/SXT	5,88 %	1
Ot/ AML/ St/ FFC	5,88 %	1
AML/AMC	5,88 %	1
CTX/St	5,88 %	1
AML/St/Ot	11,76%	2
C/AMC/Ot/AML/St/FFC	17,64%	3
C/AMC/Ot/AML/CTX/St/FFC	17,64%	3

CN: Gentamicina Ot: Oxitetraciclina St: Estreptomicina AML: Amoxicilina CTX: Cefotaxima AMC: Amoxicilina / ác. clavulánico FFC: florfenicol C: Cloranfenicol SXT: Sulfametoxazol/trimetoprim

A pesar de no ser uno de los objetivos del estudio, ni poseer validez estadística se observó un mayor porcentaje de resistencia en las cepas aisladas desde lecherías que aquellas provenientes de "feedlots".

## DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un problema de connotación mundial, en este sentido Chile esta desarrollando en el ámbito de la medicina humana una serie de medidas para contribuir al conocimiento y control de ella. Lamentablemente estas iniciativas no han considerado el análisis de bacterias de origen animal por lo que la información existente sobre resistencia es incompleta, y no refleja en forma fidedigna la realidad nacional. Este estudio se planteó como la primera evaluación de los niveles de resistencia de cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de tres regiones de Chile. Para esto se trabajó primariamente en el aislamiento de cepas de *Salmonella* spp. donde se logró obtener 29 cepas, de un total de 2.118 muestras de bovino analizadas. El bajo nivel de aislamiento (1,37%) obtenido en este estudio era esperado ya que la prevalencia en el ganado bovino es relativamente inferior a otras especies de animales de abasto como pollos y cerdos, donde se alcanzan niveles de prevalencia del orden de un 14,3% (Lipanwongpranee *et al.*, 1999) a un 35,38% (Domínguez *et al.*, 2002) en pollos y un 47% en cerdos (Swanenburg *et al.*, 2001). Según datos internacionales, la prevalencia en ganado bovino de lechería varia entre un 5,4% (Wells *et al.*, 2001) y un 5,9% (Huston *et al.*, 2002) mientras que en ganado bovino de carne varía entre 2% (McEvoy *et al.*, 2003), y 6,3% (Dargatz *et al.*, 2003). En Gran Bretaña, como resultado de la vigilancia nacional de *Salmonella* realizada en mataderos en cerdos, bovinos y ovejas, entre los años 1999 y 2000 se halló también una baja prevalencia de *Salmonella* en bovinos (0,2%) al igual que en ovinos (0,1%) en comparación con cerdos (23%) (Davis *et al.*, 2004). Otro factor que incide en la baja prevalencia es la utilización de protocolos de muestreo de una sola obtención a un rebaño, lo que indudablemente subestima la prevalencia debido a la excreción intermitente que se produce de la bacteria por parte del animal infectado (Sorensen *et al.*, 2003; Huston *et al.*, 2002).

De las 29 cepas analizadas un 86,21% demostró resistencia a uno o más antimicrobianos, lo que coincide con los valores observados en *Salmonella* spp. aislados en cerdos (83%) y aves de corral (77%) en Chile (Bravo, 2004; San Martín *et al.*, 2005). Otros estudios realizados en bovinos en distintas partes del mundo muestran valores disímiles: en EE.UU. sólo un 25,1% de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde

bovinos de "feedlots" fueron resistentes a uno o más antibióticos, (Dargatz *et al.*, 2002), en contraste con ello, en Francia se observó un alto porcentaje de cepas resistentes a uno o más antibióticos en la especie bovina (63,7%) lo que contrastaba con el menor porcentaje de resistencia que exhibían las cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde las aves en estudio (33,6%) (Brisabois & Martel, 1997). En Reino Unido, de las dos cepas de *Salmonella* Typhimurium, halladas en bovinos ambas resultaron ser resistentes, exhibiendo una de ellas el serotipo DT104 pentaresistente (ACSSuT<sup>1</sup>) y la otra cepa mostró resistencia a furazolidona (Davis *et al.*, 2004).

Las infecciones por *Salmonella* spp. están causando una creciente preocupación por la aparición y el incremento de la prevalencia de aislamientos multiresistentes, como es el caso de *Salmonella* Typhimurium DT104 que inicialmente fue asociado a ganado bovino (Davis *et al.* 1999; Sorensen *et al.*, 2003). En este estudio, a pesar de no hallarse el fenotipo ACSSuT, se pudo observar que existió un gran porcentaje de cepas multiresistentes (68%). La emergencia de bacterias multiresistentes es el fenómeno que se ha presentado en la última década, en donde el hallazgo de microorganismos resistentes a más de 10 tipos distintos de antimicrobianos no es un hecho inusual (Levy, 1998). En el Oeste de Francia el porcentaje de *Salmonella* MDR (Multidrug resistance) aisladas desde vacas de lechería sanas resultó ser de 1,9% del total de rebaños de infectados, este porcentaje resultó ser mucho más bajo que lo esperado explicado en parte por ser aislamientos realizados en animales sanos, observándose mayor presencia en estudios de aislamientos de animales con signos clínicos (Lailier *et al.*, 2005).

En este estudio se encontró que los mayores números de cepas eran resistentes a Amoxicilina (72%), Oxitetraciclina (72%) y Estreptomina (48%), lo que coincide en parte con los datos entregados por "National Antimicrobial Resistance Monitoring Systems" (NARMS) de Estados Unidos correspondiente al año 2003 donde para ganado bovino de lechería (n=475) los antimicrobianos que presentaron mayores porcentajes de resistencia fueron: tetraciclinas (65,5%), estreptomina (63,2%), ampicilina (62,9%), cloranfenicol (56,4%) y sulfametoxazol (52,6%) y en bovinos de carne (n=48): tetraciclina, estreptomina y ampicilina todas con el mismo porcentaje de

---

<sup>1</sup> Abreviación de A: ampicilina, C: cloranfenicol, S: estreptomina, Su: sulfametoxazol, T: tetraciclina.

resistencia (33,3%), seguidas por sulfametoxazol (29,2%) y cloranfenicol, kanamicina, cefalotin, ceftiofur y amoxicilina/ácido clavulánico (27,1%) (NARMS, 2003). Estos últimos datos también coinciden con otros estudios en Estados Unidos de resistencia en ganado de engorda siendo tetraciclina (23,2%) y sulfametoxazol (5,7%), los antimicrobianos que comúnmente presentan altas tasas de resistencia. A pesar de ello es relevante que el impacto del uso de tetraciclina como agente primario en los tratamientos en ganado de engorda y su histórico uso como promotor del crecimiento no halla generado niveles mayores de resistencia, en el ganado en estudio (Dargatz *et al.*, 2002). En Francia también se observó cierta similitud en los resultados siendo tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol y sulfonamidas los antimicrobianos a los que presentaron mayores porcentajes de resistencia (Lailler *et al.*, 2005).

A pesar de que de las cepas de *Salmonella* spp. incluidas en este estudio, ninguna presentó resistencia al grupo de las quinolonas, siendo esta la única familia de antimicrobianos que presentó altos niveles de sensibilidad, según valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>, no se descarta la futura aparición de resistencia, dado que Chile no existen restricciones en cuanto al uso de estas y en especial de las fluoroquinolonas en producción animal, como agentes terapéuticos en las enfermedades que afectan al ganado. Además es un grupo de antibióticos al cual *Salmonella* spp. en muchos países ha presentado en el último tiempo un aumento en su resistencia (Wray *et al.*, 1993; Griggs *et al.*, 1994; Frost *et al.*, 1996; Malorny *et al.* 1999). En este estudio ác. oxólinico, y ác. nalidíxico, a pesar que las cepas se clasificaran como sensibles, presentaron mayores diferencias entre ambos valores (CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>), tomando en consideración que las dos son quinolonas de primera generación, lo que pudiese estar prediciendo un cambio en los niveles de susceptibilidad de *Salmonella*. Se ha observado que la presencia de resistencia al ác. nalidíxico es un buen predictor de un posterior surgimiento de resistencia a fluoroquinolonas (Hakenen *et al.*, 1999; Lin-Hui *et al.*, 2004). A pesar de que la resistencia a fluoroquinolonas en ausencia de resistencia a ác. nalidíxico es un fenómeno observado desde 2005 producto de un nuevo mecanismo de resistencia (Hakanen *et al.*, 2005).

A pesar de que el bajo número de cepas con las cuales se trabajó no permiten hacer un análisis estadístico certero, aún así, se pudo observar la tendencia de que de los

cuatro serotipos encontrados en el estudio, *Salmonella* Typhimurium, fue el serotipo más común (51,72%) y fue el que presentó la mayor cantidad de cepas resistentes. Esto coincide con lo hallado en Francia donde un 94,0% de las cepas resistentes en bovinos pertenecían al serotipo Typhimurium (Brisabois & Martel, 1997) y lo hallado en Suecia en el 2005 por el "Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring" (SVARM) donde de las 19 cepas aisladas desde la especie bovina el 36,8% eran *Salmonella* Typhimurium siendo el serotipo más abundante (SVARM,2005). La importancia de este serotipo reside en que se ha visto que aproximadamente un 25% de las infecciones causadas por *Salmonella* en EE.UU. en medicina humana son causadas por Typhimurium (Villar *et al*, 1999) esto coincide con un estudio realizado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que determinó que *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis* y *Staphylococcus aureus* fueron los microorganismos más frecuentemente encontrados como causa de ETA (Enfermedades transmitidas por los alimentos) en la Región Metropolitana para el período 1999 - 2000 (Prado *et al*, 2002); además de ser un serotipo comúnmente asociado a multiresistencia. En un estudio retrospectivo realizado en Holanda (van Duijkeren *et al.*, 2003) con información colectada entre los años 1984 y 2001 mostró que *Salmonella* Typhimurium fue el serotipo que presentó los más altos porcentajes de resistencia en las 4 especies analizadas (cerdos, aves de corral, bovinos y seres humanos). En bovinos se observaron altos niveles de resistencia en este serotipo los que variaron desde un 80,6% hasta un 67,6%, siendo muy común la aparición dentro del mismo serotipo de fagotipos multiresistentes distintos. Este estudio, al ser un estudio retrospectivo, pudo demostrar la compleja variación que existe entre los distintos serotipos multiresistentes, primando distintos perfiles de resistencia en distintas temporadas. En países como Japón en un estudio realizado por Esaki *et al.*, 2004 se cuantificaron los niveles de resistencia de *Salmonella* spp. aisladas desde animales de abasto, entre los años 2001 y 2002, enmarcados en el "Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program", programa de vigilancia implementado en 1999, producto del impacto causado en el ámbito de la salud pública debido al alarmante aumento de la resistencia bacteriana. En este estudio se trabajó sobre la base de 82 aislamientos de *Salmonella* spp. desde las 3 principales especies de abasto; cerdos, aves y bovinos: encontrándose que el serotipo más común resultó ser Typhimurium, lo que coincide con lo descrito en humanos siendo este

en conjunto con *S. Infantis* los agentes causantes de Salmonelosis más prevalentes en humanos.

Los perfiles de resistencia encontrados en este estudio fueron 12, siendo dos los más frecuentes, ambos con un 17,64%, cloranfenicol/ amoxicilina + ác. clavulánico/ oxitetraciclina/ amoxicilina/ estreptomina/ florfenicol y cloranfenicol/ amoxicilina + ác. clavulánico/ oxitetraciclina/ amoxicilina/ cefotaxima/ estreptomina/ florfenicol. La familia de los  $\beta$ -lactámicos (amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulánico y cefotaxima) esta presente en uno de los perfiles más frecuentemente encontrados por este estudio, al igual que otros estudios la gran mayoría de los perfiles de resistencia encontrados están representados solo por una cepa, lo que sugiere que no sería una expansión clonal de un grupo de genes codificadores de multiresistencia (Dargatz *et al.*, 2003; Akkina *et al.*, 1999). La determinación de los perfiles de resistencia en los aislamientos realizados son de vital importancia para la identificación de la tendencia de resistencia antimicrobiana que tendrán los aislamientos de *Salmonella* spp. en el futuro (Dargatz *et al.*, 2002).

Si bien la baja prevalencia encontrada en este estudio es tranquilizante; es alarmante la proporción de aislamientos multiresistentes y justifica investigaciones futuras en post de poder evaluar como evoluciona esta situación a nivel nacional.

Por toda la evidencia anteriormente expuesta se hace imperiosamente necesario el establecimiento en nuestro país de una red de vigilancia de la resistencia bacteriana, que siga las recomendaciones realizadas por la OMS para estos casos, donde se incluyan aislamientos realizados desde seres humanos, animales y productos alimenticios. Esta información debe ser representativa de la realidad nacional, confiable y estandarizada para poder ser comparada con los datos obtenidos por similares planes implementados en otros países.

Esta medida ayudará, primariamente a realizar un diagnóstico de la resistencia bacteriana en Chile y posteriormente cumplirá el rol de evaluar la efectividad de las medidas implementadas para mitigar este gran problema. Adicionalmente, brindará las

herramientas necesarias para estudios epidemiológicos futuros que ayuden a comprender más sobre resistencia y como detener su explosivo aumento.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permiten concluir:

1. La presencia de altos niveles de resistencia y multiresistencia en las cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde bovinos de las Regiones V, Metropolitana y X.
2. Los antimicrobianos que exhibieron los mayores porcentajes de cepas resistentes fueron: amoxicilina, oxitetraciclina y estreptomina.
3. Quinolonas fueron el único grupo de antimicrobianos que presentó 100% de cepas sensibles.
4. Los antimicrobianos que presentaron menores diferencias entre CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> fueron flumequina, enrofloxacino y ciprofloxacino.
5. Existe en nuestros aislados una gran diversidad de perfiles de resistencia.

## ANEXO I

<b>ANTIMICROBIANO</b>	<b>SOLVENTE</b>	<b>DILUYENTE</b>
Amoxicilina, ácido clavulánico	Buffer fosfato pH 6.0,0.1 mol/L	Buffer fosfato pH 6.0,0.1 mol/L
Cefotaxima	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Cloranfenicol	Etanol 95%	Agua destilada estéril
Enrofloxacino	NaOH 0,1 mol/L	Agua destilada estéril
Florfenicol	NaOH 0,1 mol/L	Agua destilada estéril
Ácido Oxolínico	NaOH 0,1 mol/L	Agua destilada estéril
Ácido Nalidíxico	NaOH 0,1 mol/L	Agua destilada estéril
Flumequina	NaOH 0,1 mol/L	Agua destilada estéril
Ciprofloxacino	NaOH 0,1 mol/L	Agua destilada estéril
Gentamicina	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Oxitetraciclina	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Sulfametoxazol	½ volumen de agua y ½ volumen de NaOH 0,1 mol/L	Agua destilada estéril
Trimetoprim	Ácido láctico 0,05 mol/L	Agua destilada estéril
Estreptomicina	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril

**Fuente:** NCCLS. 1993. vol. 13 nº 25, 17 p.

## BIBLIOGRAFÍA

- AARESTRUP, F.** 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96: 271-281.
- ALÓS, J.** 1994. Resistencia bacteriana a los antibióticos: The never ending story. *Med. Clin. (Barc.)* 103: 94-96.
- AKKINA, J.; HOQUE, A.; ANGULO, F.; JOHNSON, R.; PETERSEN, K.; SAINI, P.; FEDORKA-CRAY, P.; SCHLOSSER, W.** 1999. Epidemiologic aspects, control, and importance of multiple-drug resistance *Salmonella* Typhimurium DT104 in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214 (6): 790-798.
- ANDERSON, A.; McCLELLAN, J.; ROSSITER, S.; ANGULO, F.** 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb. Drug Resist.* 9: 373-379.
- ANGULO, F.; BAKER, N.; OLSEN, S.; ANDERSON, A.; BARRETT, T.** 2004. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 15 (2): 78-85.
- BORIE, C.; SOBARZO, G.; JARA, M.; SANCHEZ, M.; SAN MARTIN, B.; MORALES, M.** 2004. Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles en cautiverio en Chile. **In:** XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Argentina. 24 – 28 de octubre de 2004 [en línea]. <<http://www.panalimentos.org/panvet2004/Doc/409word00658.doc>> [consulta 01-10-2007].
- BRAVO, V.** 2004. Utilización de *Salmonella* spp. en el monitoreo de resistencia bacteriana en cerdos y aves. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 52 p.
- BRISABOIS, A.; MARTEL, J.** 1997. Resistance in zoonotic *Salmonella* in France. **In:** The medical impact of the use of antimicrobial in foods animals. Berlín, Alemania. 13 – 17 de Octubre de 1997. pp.43-44.
- BUTAYE, P.; MICHAEL, G.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T.; BRISABOIS, A.; WHITE, D.** 2006. The clonal spread of multidrugs-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes Infect.* 8: 1891-1897.

- BYWATER, R.** 2005. Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. *Poult. Sci.* 84: 644-648.
- CHAN, E.; ISEMAN, M.** 2002. Current medical treatment for tuberculosis. *Br. Med. J.* 325: 1282-1286.
- CHISHIH, C.; CHENG-HSUN, C.** 2006. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and this association with antimicrobial resistance. *Microbes Infect.* 8: 1931-1936.
- DANISH INTEGRATED ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING AND RESERCH PROGRAM (DANMAP).** 2006. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. [en línea]. <[http://www.danmap.org/pdfFiles/danmap\\_2006.pdf](http://www.danmap.org/pdfFiles/danmap_2006.pdf)> [consulta 01-10-2007].
- DARGATZ, D.; FEDORKA-CRAY, P.; LADELY, S.; FERRIS, K.; GREEN, A.; HEADRICK, M.** 2002. Antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella* isolates from cattle in feedlots. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221 (2): 268-272.
- DARGATZ, D.; FEDORKA-CRAY, P.; LADELY, S.; FERRIS, K.; KOPRAL, C.; HEADRICK, M.** 2003. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from US cattle in feedlots in 1999 and 2000. *J. Appl. Microbiol.* 95: 753-761.
- DAVIS, M.; HANCOCK, D.; BESSER, T.; RICE, D.; GAY, J.; GAY, C.; GEARHART, L.; DIGIACOMO, J.** 1999. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from humans and cattle in the northwest United States, 1982-1997. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 802-806.
- DAVIS, R.; DALZIEL, R.; GIBBENS, J.; WILESMITH, J.; RYAN, J.; EVANS, S.; BYRNE, C.; PAIBA, G.; PASCOE, S.; TEALE, C.** 2004. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). *J. Appl. Microbiol.* 96: 750-760.
- DIBNER, J.; RICHARDS, J.** 2005. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. *Poult. Sci.* 84: 634 – 643.
- DOMINGUEZ, C.; GOMEZ, I.; ZUMALACARREGUI, J.** 2002. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 30 (72): 165-168.
- DUCKWORTH, G.** 2003. Controlling Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Br. Med. J.* 327: 1177-1178.

- ENDTZ, H.; RUIJS, G.; VAN KUNGEREN, B.; JANSEN, W.; VAN DER REYDEN, T.; MOUTON, R.** 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of flouroquinolones in veterinary medicine. J. Antimicrob. Chemother. 27: 199-208.
- ESAKI, H.; MORIOKA, A.; ISHIHARA, K.; KOJIMA, A.; SHIROKI, S.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.** 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001- 2002): report from Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. J. Antimicrob. Chemother. 53: 266-270.
- FENOLL, A.; JADO, I.; VICIOSO, D.; PERÉZ, A.; CASAL, J.** 1998. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: Update (1990 to 1996). J. Clin. Microbiol. 36 (12): 3447-3454.
- FEY P.; SAFRANEK T.; RUPP M.; DUNNE E.; RIBOT E.; IWEN P.; BRADFORD P.; ANGULO F.; HINRICHS S.** 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by child from cattle. N. Engl. J. Med. 27: 1242-1248.
- FROST, J.; KELLEHER, A.; ROWE, B.** 1996. Increasing ciprofloxacin resistance in *Salmonella* in England and Wales 1991-1994. J. Antimicrob. Chemother. 37: 85-91.
- GALLHOFF, G.** 2006. Community strategy against antimicrobial resistance. Int. J. Med. Microbiol. 296 (S2): 7-8.
- GARCIA, P.** 2003. Resistencia bacteriana en Chile. Rev. Chilena Infectol. 20 (supl. 1): S11-S23.
- GRIGGS, D.; HALL, M.; JIN, Y.; PIDDOCK, J.** 1994 Quinolone resistance in veterinary isolated of *Salmonella*. J. Antimicrob. Chemotherapy 33: 1173-1189.
- GRUNDEL, C.** 2006. Meeting report: First National Scientific symposium "risk Management for the limitation of antibiotic resistance". Int. J. Med. Microbiol. 296 (S2): 1-3.
- HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; JALAVA, J.; SIITONEN, A.; HUOVINEN, P.** 1999. Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella* and validation of nalidixic acid screening test. J. Clin. Microbiol. 37 (11): 3572-3577.
- HAKANEN, A.; LINDGREN, M.; HUOVINEN, P.; JALAVA, J.; SIITONEN, A.; KOTILAINEN, P.** 2005. New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enterica*: nalidixic acid-susceptible isolated with reduced fluoroquinolone susceptibility J. Clin. Microbiol. 43 (11): 5775-5778.

**HART, CA.; KARIUKI, S.** 1998. Antimicrobial resistance in developing countries. Br. Med. J. 317: 647-650.

**HUSTON, C.; WITTUM, T.; LOVE, B.; KEEN, J.** 2002. Prevalence of fecal shedding of *Salmonella* spp. in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 220 (5): 645-649.

**KHAN, S.; NAWAS, M.; KHAN, A.; CERNIGLIA, C.** 2000. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38 (5): 1832-1838.

**KARPISKOVA, R.; BENES, C.; DEDICOVA, D.** 1999. Aparición de *Salmonella* Typhimurium DT 104 resistente a múltiples fármacos en la Republica Checa. Euro. Surveill. 4 (5): 56-58.

**LAILLER, R.; SANAA, M.; CHADOEUF, J.; FONTEZ, B.; BRISABOIS, A.; COLMIN, C.; MILLEMANN, Y.** 2005 Prevalence of multidrug resistant (MDR) *Salmonella* in bovine dairy herds in western France. Prev. Vet. Med. 70: 177-189.

**LEVERSTEIN-VAN HALL, M.; BOX, A.; BLOK, H.; PAAUW, A.; FLUIT, A.; VERHOEF, J.** 2002. Evidence of Extensive Interspecies Transfer of Integron-Mediated Antimicrobial Resistance Genes among Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae in a Clinical Setting. J. Infect. Dis. 186:49-56.

**LEVY, S.** 1998. Antimicrobial resistance: bacteria on the defense. BMJ. 317:612-613.

**LIN-HUI, S.; CHENG-HSUN, C.; CHISHIH, C.; JONATHAN, T.** 2004. Antimicrobial resistance in Nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. Clin. Infect. Dis. 39: 546-551.

**LIPANWONGPRANEE, S.; HAYASHIDANI, H.; OKATAMI, A.; ONO, K.; HIROTA, C.; KANEKO, K.; OGAWA, M.** 1999. Prevalence and persistence of *Salmonella* in Broiler chicken flocks. J. Vet. Med. Sci. 61: 255-259.

**MALORNY, B.; SCHROETER, A.; GUERRA, B.; HELMUTH, R.** 1999. Incidence of quinolone resistance over the period 1996 to 1998 in veterinary of *Salmonella* isolates from Germany. Antimicrob. Agents Chemother. 43 (9): 2278-2282.

**MALORNY, B.; SCHROETER, A.; GUERRA, B.; HELMUTH, R.** 2003. Incidence of quinolone resistance in strain of *Salmonella* isolated from poultry, cattle and pigs in Germany between 1998 and 2001. Vet. Rec. 22: 643-648.

**MARIMÓN, J.; GOMARÍZ, M.; ZIGORRAGA, C.; CILLA, G.; PÉREZ-TRALLERO, E.** 2004. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella*

*enterica* isolated obtained in Spain from 1981 to 2003. Antimicrob. Agents Chemother. 48 (10): 3789-3793.

**McEVOY, J.; DOHERTY, A.; SHERIDAN, J.; BLAIR, I.; McDOWELL, D.** 2003. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at commercial abattoir. J. Appl. Microbiol. 94: 693-700.

**McEWEN S.; FEDORKA-CRAY P.** 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. Clin. Infect. Dis. 34 (suppl 3) S93-106.

**MEAD P.; SLUTSKER L.; DIETZ V.; McCRAIG L.; BRESEE J.; SHAPIRO C.** 1999. Food-related illness and deaths in United State. J. Infect. Dis. 5: 607-625.

**MURRAY, J.; BARTON, M.** 1993. Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Disease. Canberra. Australia. 8 p.

**NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEMS (NARMS).** 2003. FDA/USDA/CDC National Antimicrobial Resistance Monitoring System - Enteric Bacteria (NARMS - EB) Veterinary Isolates Final Report - 2003. [en línea] <<http://www.ars.usda.gov/Business/docs.htm?docid=6764>>

**NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).** 1993. Methods for dilutions susceptibility test for bacteria that growth aerobically. 3<sup>o</sup> ed. Approved Standard. 13(25): 1-17

**NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).** 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals - Second Edition: Approved Standard M31-A2. NCCLS, Villanova, PA, USA. 32 p.

**OLSEN, S.; YING, M.; DAVIS, M.; DEASY, M.; HOLLARD, B.; IAMPIETRO, L.; BAYSINGER, C.; SASSANO, F.; GORMLEY, B.; HUNG, M.; PILOT, K.; ORSINI, M.; VAN DUYNE, S.; RANKIN, S.; GENESE, C.; BRESNITZ, E.; SMUCKER, J.; MOLL, M.; SOBEL, J.** 2004. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infection from milk contaminated after pasteurization. Emerg. Infect. Dis. 10 (5): 932-935.

**ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE).** 2006. Código Sanitario para los animales terrestres 2006. [en línea]. <[http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es\\_chapitre\\_3.9.1.html](http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_chapitre_3.9.1.html)> [consulta 08-03-2007].

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 1994. TB - a global emergency. WHO report on the TB epidemic. Ginebra, Suiza: WHO, 1994. [en línea]. <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1994/WHO\\_TB\\_94.177.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1994/WHO_TB_94.177.pdf)> [consulta 02-09-2006].

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 1997. The medical impact of antimicrobial use in food animals. Report of a WHO meeting. Berlín, Alemania, 13-17 Octubre 1997. Pp. 24. . [en línea]. <<http://www.who.int/emc>> [consulta 10-05-2005].

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2000. WHO Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food. [en línea] <<http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf>> [consulta 18-03-2005]

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. [en línea] <<http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf>> [consulta 01-04-2005]

**ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS).** 2002. Informe anual regional de los países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. 17-19 de abril de 2002. Pp 105

**ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS).** 2004. Vigilancia de la resistencia a los antibióticos. [en línea]. <<http://www.paho.org/spanish/ad/dcp/cd/bahia-antimicrob.pdf>> [consulta 25-04-2004].

**PRADO, V.; SOLARI, V.; ALVAREZ, I.; ARRELLANO, C.; VIDAL, R.; CARREÑO, M.; MAMANI, N.; FUENTES, D.; O'RYAN, M.; MUÑOZ, V.** 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Santiago de Chile. Periodo 1999-2000. Rev. Med. Chil. 130(5): 495-501.

**SAN MARTÍN, B.; LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, V.; CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J.; BORIE, C.** 2005. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant Salmonella spp. from poultry farms. Vet. Microbiol. 110 (239 -244).

**SISCHO, W.** 2006. Stakeholder position paper: Dairy producer. Prevent. Vet. Med. 73: 203 – 208.

**SNEDECOR, G.; COCHRAN, W.** 1989. Statistical methods. 8º ed. Iowa State University Press. Iowa, USA. Pp. 503.

**SORENSEN, O.; McFALL, M.; MANNINEN, K.** 2003. Prevalence of *Salmonella* in dairy herds in Alberta. Can. Vet. J. 44 (3): 230 -231.

- SWANENBURG, M.; URLINGS, H.; SNIJDERS, J.; KEUZENKAMP, D.; VAN KNAPEN, F.** 2001. *Salmonella* in Slaughter pigs: prevalence serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 70 (3): 243-254.
- SWEDISH VETERINARY ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING (SVARM).** 2005. SVARM 2005 Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring report. [en línea]. <<http://www.sva.se/dokument/stdmall.html?id=1283>> [consulta 12-10-2006].
- TOLLEFSON, L.; ANGULO, F.; FEDORKA-CRAY, P.** 2003. Public health aspects of antibiotic resistance monitoring in the USA. National Antimicrobial Resistance Monitoring Program Publications. [en línea]. <[http://www.cdc.gov/narms/pub/publications/tollefson\\_1/tollefson\\_1.htm](http://www.cdc.gov/narms/pub/publications/tollefson_1/tollefson_1.htm)> [consulta 12-03-2004].
- UNION EUROPEA. PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO DE LA UNION EUROPEA.** 2003. Reglamento (CE) Nº 1831/2003 Sobre los aditivos en la alimentación animal. 18 Octubre 2003. [en línea] <[http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2003/l\\_268/l\\_26820031018en00290043.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2003/l_268/l_26820031018en00290043.pdf)> [consulta 19-12-2006].
- VAN DUIJKEREN, L.; WANNET, W.; HOUWERS, D.; VAN PELTS, W.** 2003. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains from humans, cattle, pigs and chickens in the Netherlands from 1984 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41(8): 3574-3578.
- VILLAR, R.; MACEK, M.; SIMONS, S.; HAYES, P.; GOLDOFT, M.; LEWIS, J.; ROWAN, L.; HURSH, D.; PATNODE, M.; MEAD, P.** 1999. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. *J. Am. Med. Assoc.* 218(19): 1811-1815.
- WEGENER, HC.; BAGER, F.; AARESTRUP, FM.** 1997. Vigilancia de la resistencia antimicrobiana en el hombre, productos alimenticios y ganado en Dinamarca. *Euro. Surveill.* 2(3): 17-19.
- WEGENER, HC.** 1999. Use of growth antimicrobial promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 329-335.
- WEGENER, HC.** 2006. Risk management for the limitation of antibiotic resistance - experience of Denmark. *Int. J. Med. Microbiol.* 296 (Suppl 41): 11-13.

- WELLS, S.; FEDORKA-CRAY, P.; DARGATZ, D.; FERRIS, K.; GREEN, A.** 2001. Fecal shedding of *Salmonella* spp. by dairy cows on farm and cull cow markets. J. Food Prot. 64: 3-11.
- WHITE, D.; ZHAO, S.; SUDLER, R.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; CHEN, S.; McDERMOTT, P.; McDERMOTT, S.; WAGNER, D.; MENG, J.** 2001. The isolation of antimicrobial-resistant *Salmonella* from retail ground meats. N. Engl. J. Med. 345 (16): 1147-1154.
- WINOKUR, P.; VONSTEIN, D.; HOFFMAN, L.; UHLENHOPP, E.; DOERN, G.** 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC  $\beta$ -Lactamase Plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals and humans. Antimicrob. Agents Chemother. 45 (10): 2716-2722.
- WITTE, W.** 2006. Resistance monitoring of human pathogenic bacteria in Germany, SWOT analysis and examples. Int. J. Med. Microbiol. 296 (S2): 63-67.
- WRAY, C.; McLAREN, I.; BEEDELL, Y.** 1993. Bacterial resistance monitoring of *Salmonella* isolated from animals, national experience of surveillance schemes in the United Kingdom. Vet. Microbiol. 35: 313-319.
- ZUMLA, A.; GRANGE, J.** 1998. Science, medicine and the future: tuberculosis. Br. Med. J. 316: 1962-1964.