



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

**RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Salmonella* spp.
AISLADAS DESDE CAUCES DE AGUA DE LA REGIÓN
METROPOLITANA Y SU ASOCIACIÓN CON EL ÁREA
GEOGRÁFICA**

JAVIER HERNÁN VALENZUELA FLORES

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

PROFESOR GUÍA: LISETTE LAPIERRE

COLABORADOR: MARÍA CRISTINA MARTINEZ
INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA

SANTIAGO, CHILE
2016



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

**RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Salmonella* spp.
AISLADAS DESDE CAUCES DE AGUA DE LA REGIÓN
METROPOLITANA Y SU ASOCIACIÓN CON EL ÁREA
GEOGRÁFICA**

JAVIER HERNÁN VALENZUELA FLORES

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

Nota Final:

Profesora Guía : Lisette Lapierre A.
Profesor Corrector: Patricio Retamal M
Profesora Corrector: Consuelo Borie P.

SANTIAGO, CHILE

2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi madre y hermano, por entregarme su amor y apoyo incondicional, guiar mi camino universitario, por sus esfuerzos y confiar en mí. Gracias por ayudarme a cumplir mi sueño. Los admiro y amo demasiado.

A mi polola, el amor de mi vida, por estar siempre presente en cada momento y cuando más lo necesité, por ser incondicional. Con tu amor y paciencia, me enseñaste a nunca perder la esperanza, incluso en los momentos más difíciles de la carrera. Te amo con todo mi corazón.

A la familia Araya-Fernández quienes me han acompañado en esta hermosa etapa de la vida. Por compartir grandes momentos, lleno de estudio, alegría, risas, apoyo, penas y hogar.

A Dra. Lissette Lapierre, mi profesora guía, quien me permitió participar en esta investigación, por haber confiado en mí y compartir con mucha dedicación sus conocimientos y tiempo. Gracias por sus consejos y orientación. A los Profesores consejeros Patricio Retamal y Consuelo Borie, quienes siempre me ayudaron en todo lo que necesitaba. A todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos.

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.

Y a Dios por acompañarme en cada paso de mi vida.

ÍNDICE

| CONTENIDO | PÁGINA |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 3 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 6 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 14 |
| 5.1 Muestras y Selección..... | 14 |
| 5.2 Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos en las cepas de <i>Salmonella</i> | 16 |
| 5.3 Asociación entre área geográfica con fenotipos de resistencia..... | 19 |
| 5.4 Bioseguridad | 20 |
| 6. RESULTADOS | 21 |
| 7. DISCUSIÓN | 30 |
| 8. CONCLUSIONES | 36 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 37 |

ÍNDICE DE TABLAS

| TABLA | PÁGINA |
|---|--------|
| Tabla 1. Nombre, dirección y datos de georreferenciación de los 50 lugares muestreados y resultado del aislamiento de <i>Salmonella</i> | 14 |
| Tabla 2. Interpretación de la zona de diámetro en patógenos de Medicina Veterinaria (CLSI, 2007). | 18 |
| Tabla 3. Número y porcentaje de cepas resistentes a los distintos antimicrobianos..... | 22 |
| Tabla 4. Fenotipos de resistencia a los antimicrobianos en cepas de <i>Salmonella</i> aisladas desde cauces de agua de la RM. | 23 |
| Tabla 5. Perfiles de resistencia y relación con área geográfica. | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| GRÁFICO | PÁGINA |
|--|--------|
| Gráfico 1. Serotipos de <i>Salmonella</i> aisladas en muestras de cauces de agua..... | 21 |
| Gráfico 2. Distribución de la prevalencia de <i>Salmonella</i> en las distintas áreas geográficas. | 25 |
| Gráfico 3. Número de cepas de <i>Salmonella</i> resistente para cada antimicrobiano en el área urbana..... | 26 |
| Gráfico 4. Número de cepas de <i>Salmonella</i> resistente para cada antimicrobiano en el área semirural. | 27 |
| Gráfico 5. Número de cepas de <i>Salmonella</i> resistente para cada antimicrobiano en el área rural..... | 27 |

ÍNDICE DE ANEXO

| ANEXO | PÁGINA |
|--|--------|
| Anexo 1: Certificado de Bioseguridad..... | 41 |
| Anexo 2. Antimicrobianos evaluados y significancia (valor de p) para su asociación con los serotipos en estudio..... | 42 |

1. RESUMEN

La calidad microbiológica del agua que se utiliza en el riego de cultivos y hortalizas, adquiere importancia en términos de salud pública, ya que esta podría ser el vehículo para la transmisión de bacterias patógenas a la población, algunas de las cuales podrían presentar determinantes génicos de resistencia a antimicrobianos. El objetivo de este estudio fue determinar fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde diferentes cauces de ríos o canales, y su asociación con las distintas áreas geográficas en la Región Metropolitana.

Se tomaron 100 muestras de agua de la Región Metropolitana, desde las cuales se aislaron 35 cepas de *Salmonella* spp., identificándose 18 serotipos diferentes. Estas cepas fueron analizadas mediante el método de difusión en placa Kirby Bauer según las normas recomendadas por el Clinical Laboratory Standards Institute (2007) para determinar los fenotipos de resistencia. Los antibióticos utilizados fueron: Enrofloxacino, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Gentamicina, Tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim, Ceftiofur, Ampicilina, Cefadroxilo, Cloranfenicol, Amikacina, Azitromicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Kanamicina, Ácido Nalidíxico, Estreptomina, Sulfisoxazole. Posteriormente, se analizó la asociación de los fenotipos y perfiles de resistencia con las distintas áreas geográficas de donde fueron obtenidas las cepas.

El 89% de las cepas presentó resistencia a tres o más antibióticos de grupos farmacológicos no relacionados, es decir, fueron multirresistentes. Las drogas que presentaron mayor porcentaje de cepas resistentes fueron: Estreptomina 97%, Ceftiofur 91%, Kanamicina 91%, y Cefadroxilo 89%; siendo fenicol el único grupo farmacológico con un 100% de sensibilidad. Se establecieron en las cepas un total de 28 perfiles de resistencia distintos.

Al establecer si existía o no una asociación entre los perfiles de resistencia observados y las áreas geográficas desde donde se aislaron las cepas, se encontró que no existe asociación entre ambas variables ($p > 0,05$). Sin embargo, dentro de los fenotipos de resistencia, fueron estadísticamente significativo Ácido Nalidíxico ($p = 0,0096$) y ciprofloxacino ($p = 0,039$), los cuales están asociados a las áreas rurales.

Con los datos presentados se puede concluir que existe una gran variedad de serotipos de *Salmonella* en las muestras de agua de la Región Metropolitana, con un alto porcentaje de cepas multiresistentes a los antibióticos (89%). Se identificaron una gran diversidad de perfiles de resistencia, lo que sugiere que la multi-resistencia no se debería a una expansión clonal. No hubo asociación entre los perfiles de resistencia y las áreas geográficas, en cuanto a los fenotipos de resistencia, Ácido Nalidíxico y Ciprofloxacino fue asociada al área rural. Por lo tanto, este estudio sugiere que los cursos de aguas superficiales de la Región Metropolitana, representan un riesgo para la población y para los animales, ya que estas corrientes pueden actuar como un vehículo para la difusión de estos organismos patógenos y sus genes de resistencia, las que podrían transmitirse entre diferentes hospedadores o entornos ecológicos.

Palabras claves: *Salmonella* spp, resistencia antimicrobianos, cauces de agua, área geográfica, Región Metropolitana.

2. SUMMARY

The microbiological quality of water used to irrigate crops and vegetables, becomes important in terms of public health, as this could be the vehicle for the transmission of pathogen bacteria to the population, some of which could present determining gene of antimicrobial resistance. The objective of this study was to determine antibiotic resistance phenotypes in *Salmonella* spp. strains isolated from different courses of rivers or channels, and its association with the different geographical areas in the Metropolitan Region.

100 water samples from the Metropolitan Region were taken, from which 35 strains of *Salmonella* spp. were isolated, and 18 different serotypes were identified. These strains were analyzed by the disk diffusion method of Kirby Bauer as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (2007) to determine resistance phenotypes. The antibiotics used were Enrofloxacin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Gentamicin, Tetracycline, Sulfamethoxazole/Trimethoprim, Ceftiofur, Ampicillin, Cefadroxil, Chloramphenicol, Amikacin, Azithromycin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Kanamycin, Nalidixic Acid, Streptomycin, Sulfisoxazole. Subsequently, the association between the phenotypes and resistance profiles with different geographical areas from which the strains were obtained was analyzed.

89% of the strains showed resistance to three or more antibiotics from unrelated pharmacological groups, namely, were multiresistant. The drugs with a higher percentage of resistant strains were 97% Streptomycin, 91% Ceftiofur, 91% Kanamycin and 89% Cefadroxil; Amphenicol being the only pharmacological group with 100% sensitivity. A total of 28 different resistance profiles were established in the strains.

While establishing whether there was an association between the resistance profiles observed and geographical areas from which the strains were isolated, no association was found between the two variables ($p > 0.05$). However, within the resistance phenotypes they were statistically significant Nalidixic acid ($p = 0.0096$) and Ciprofloxacin ($p = 0.039$), which are associated with rural areas.

With the presented data, we can conclude that there are varieties of serotypes of *Salmonella* in samples of water from the Metropolitan Region with a high percentage (89%) of strains being multiresistant to antibiotics. A wide range of resistance profiles were identified, suggesting that multidrug resistance is not due to a clonal expansion. There was no association between resistance profiles and geographical areas, There was no association between resistance profiles and geographical areas, in terms of resistance phenotypes, nalidixic acid and ciprofloxacin was associated to rural areas. Therefore, this study suggests that surface water courses in the Metropolitan Region, pose a risk to people and animals, as these currents can act as a vehicle for the spread of these pathogens and their resistance genes, which could be transmitted between different hosts or ecological environments.

Keywords: *Salmonella* spp, antimicrobial resistance, geographic area.

3. INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial y la creciente urbanización han causado graves problemas ambientales debido al vertimiento de efluentes industriales y domésticos en diferentes ecosistemas. La liberación tanto de compuestos tóxicos como de bacterias patógenas que además podrían ser resistentes a los antibióticos, presentes en aguas residuales, constituye una de las causas de la contaminación de los ecosistemas acuáticos y en particular los ríos. Los efectos de la contaminación han llevado a la degradación de los recursos hídricos, a la disminución de la calidad de las aguas disponibles para el abastecimiento de la población, así como para el uso agrícola e industrial.

La calidad microbiológica del agua que se utiliza en el riego de cultivos y hortalizas, adquiere importancia en términos de salud pública, ya que esta podría ser el vehículo para la transmisión de bacterias patógenas a la población como es el caso de las bacterias del género *Salmonella* spp. Si además, estas bacterias presentan resistencia a los antibióticos de uso en terapia, puede tener consecuencias muy graves, ya que incrementa la morbilidad y la mortalidad de los procesos infecciosos, contribuye a la diseminación de resistencia a los antimicrobianos (RAM), aumenta la frecuencia de efectos adversos relacionados e incrementa el costo de la atención hospitalaria.

Es importante señalar que la resistencia a los antibióticos es un tema muy importante en Salud Pública y que ha emergido en los últimos años. Las bacterias, ya no se detectan solo en muestras provenientes de pacientes o animales sino que se han detectado en distintos ecosistemas y distintos ambientes, como suelo, alimentos y en muestras de agua o sedimentos obtenidos desde ríos.

El objetivo de esta memoria de título es determinar la sensibilidad a distintos antibióticos en diferentes serotipos del género *Salmonella*, las que fueron aisladas desde diferentes cauces de ríos y/o canales de la Región Metropolitana, cuyas aguas son utilizadas en la agricultura o de forma recreativa, y además asociar estadísticamente los resultados de sensibilidad con el área geográfica de los lugares muestreados.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Generalidades

Salmonella es el agente etiológico de la salmonelosis, enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) que anualmente origina millones de casos en el mundo. Esta enfermedad constituye un serio problema en el ámbito social, económico y de salud pública (Bagudo *et al.*, 2014).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos rectos Gram negativos, que no fermentan la lactosa, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos, con excepción de la serovariedad Gallinarum-Pullorum (Bagudo *et al.*, 2014).

Salmonella tiene 2 especies, *Salmonella enterica* con 6 subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*) y *Salmonella bongori*. El género *Salmonella* posee más de 2400 serovariedades diferentes (Levantesi *et al.*, 2012).

En cuanto a su epidemiología en Chile y en otros países, se describe un incremento de salmonelosis en humanos producida específicamente por *S. Enteritidis*. En el año 2010, la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos de Estados Unidos (FoodNet) reportó 8.256 casos de salmonelosis confirmados por laboratorio (92%), siendo *S. Enteritidis* el serotipo más frecuente (22%), seguida por *S. Newport* (14%), y *S. Typhimurium* (13%) (CDC, 2011). En Chile, durante el período enero 2009 a julio 2014, se observó predominio de *S. Enteritidis* (65,3%) seguida de *S. Typhimurium* (12,7%). Además, en el período comprendido entre la semana epidemiológica 1-29 de 2014, se notificaron 552 brotes de ETA. De los brotes notificados, se logró identificar el agente causal en el 9%, siendo la bacteria más frecuente *Salmonella* spp. en un 87% de las muestras (MINSAL, 2014).

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial que se caracteriza por un cuadro agudo de fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómito. Por lo general es autolimitada, de manera que el tratamiento con antibióticos solo es requerido en casos graves, siendo

utilizados con mayor frecuencia la combinación Amoxicilina/Ác. Clavulánico, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas (Toro *et al.*, 2014). En niños la elección es la cefalosporina de 3ª generación, Ceftriaxona (Mejias *et al.*, 2008 y Thomas *et al.*, 2013).

El principal reservorio de *Salmonella* se encuentra en los animales y los microorganismos son transmitidos al ser humano, ya sea directamente o a través de productos alimenticios contaminados especialmente de origen animal, tales como: huevos crudos o parcialmente cocidos; carne roja y sus derivados; carne de aves de corral; leche cruda y productos lácteos. Sin embargo, actualmente se han agregado a la lista de alimentos peligrosos, las frutas y verduras que se consumen crudas, así como sus derivados (jugos, ensaladas, etc.) (Li *et al.*, 2014).

Las hortalizas por su forma de cultivar (crecimiento a ras de suelo), están expuestas a contaminación de tipo biológica, que puede ser consecuencia del riego con aguas superficiales contaminadas con heces de humanos o de animales, así como deficiente calidad sanitaria del agua utilizada para lavar los vegetales cosechados (Lertworapreecha *et al.*, 2013). La capacidad de los patógenos entéricos de sobrevivir en agua es crítica para la transmisión. Hay muchos factores que pueden afectar la capacidad de supervivencia de patógenos en el agua, como la exposición a la luz solar, la depredación, la temperatura del agua y la química del agua (Thomas *et al.*, 2013).

Al respecto, el determinar que las aguas superficiales están contaminadas con bacterias patógenas o con sustancias peligrosas es relevante ya que, muchas regiones del mundo están experimentando crecientes problemas de déficits hídricos (FAO, 2013). Esto se debe al aumento de la demanda de agua frente a un recurso hídrico estático o en disminución debido a las periódicas sequías, por la contaminación provocada por las aguas residuales de ciudades, y la contaminación de los acuíferos por diversas fuentes. Dicha contaminación del agua empeora los efectos de la escasez, al reducir la cantidad de agua segura para el consumo y para el riego (FAO, 2013). En cuanto a Chile, existe un déficit hídrico, por lo que el uso de aguas de superficie toma mayor importancia para el riego agrícola (ANDESS A.G., 2013).

Un estudio, realizado en México en muestras obtenidas de agua para el uso de riego de diferentes productos cerca de una granja en Sonora, detectó un 23% de muestras positivas a *Salmonella*. Otro estudio, en Texas se aislaron 16 cepas desde 25 muestras, y en cuatro regiones diferentes del valle de Culiacán se recuperaron 39% de muestras positivas (Levantesi *et al.*, 2012). Siendo, según Bagudo *et al.*, (2014) las de mayor frecuencia el serotipo *Salmonella* Typhimurium un 19.5% y *S. Enteritidis* 15,3%.

Duffy *et al.*, (2005) analizaron muestras de frutos, superficies, agua de riego y suelo, y encontraron la mayor contaminación por *Salmonella* en agua de irrigación. Por otra parte, López *et al.*, (2009) recolectaron 51 muestras de agua de riego en Sinaloa, de ellas 20 resultaron positivas a *Salmonella*, las cuales se confirmaron por PCR. Las muestras de agua se colectaron en las orillas de canales de riego, entre la interfase agua-suelo o agua-concreto. Los canales de uso agrícola en Sinaloa se encuentran al aire libre, por lo que la contaminación puede tener diversos orígenes, como introducción de agua residual a los canales, descargas domésticas, y excretas de animales silvestres como reptiles y aves (López *et al.*, 2009). Estos autores propusieron que la interfase que se forma entre el agua y el suelo en los canales, puede servir de reservorio de microorganismos indicadores de contaminación fecal.

Habitualmente se realizan estudios en ríos impactados por las actividades agrícolas, debido a la mayor prevalencia de patógenos como *Salmonella*. Del mismo modo, ríos impactados por el vertimiento de aguas residuales deben ser monitoreados frecuentemente (Thomas *et al.*, 2013). Los caudales urbanos, por el contrario, no son consideradas como fuentes significativas de patógenos, sobre todo si no hay fuentes puntuales de contaminación (es decir, instalaciones de tratamiento de aguas residuales) (Thomas *et al.*, 2013). Aunque las zonas urbanas tendría una baja tasa de contaminación por estiércol de los animales de granja, estas corrientes pueden todavía llevar los residuos fecales a través de la escorrentía de aguas pluviales, de las mascotas y vida silvestre (Dorner *et al.*, 2004). En Alberta, Johnson *et al.*, (2003) reportaron que *Salmonella* se encuentra en un alto porcentaje (26,3%) de las muestras de las alcantarillas municipales; uno de los sitios muestreados mostró una prevalencia de 80,0%.

Thomas *et al.*, (2013) demostraron una alta prevalencia y diversidad de serotipos de *Salmonella* en comparación con los otros efluentes agrícola/rural. Un hallazgo similar fue reportado recientemente por Patchanee *et al.*, (2010) quienes observaron una mayor diversidad de serotipos de *Salmonella* en una cuenca de Carolina del Norte caracterizando esta cuenca como residencial/industrial, en comparación con los designados como agrícola (cultivo o la producción porcina). Estos autores especularon que la mayor diversidad de serotipos de *Salmonella* observados se relaciona con la mayor variedad de hospedadores en caudales urbanos.

La evidencia directa de que el agua de riego es la causante de enfermedades transmitidas por los alimentos es relativamente difícil de probar. Esto es debido a que una relación "causa-efecto", requiere que la misma cepa patógena deba ser aislada del paciente, producir la enfermedad, y además deba ser aislada desde la fuente, es decir, desde el cauce de agua. Para poder establecer esto se necesitan realizar estudios de clonalidad mediante técnicas moleculares (Pachepsky *et al.*, 2011).

Sumado al riesgo de transmisión de patógenos desde aguas, existe otro punto importante de señalar y es que estos patógenos podrían presentar resistencia a los antimicrobianos. La resistencia a los antimicrobianos (RAM), es definida por FAO/OIE/OMS (2008), como la capacidad de un microorganismo de multiplicarse o persistir en presencia de un agente antimicrobiano, con relación al homólogo susceptible de la misma especie. Al respecto, está demostrado que los genes de resistencia son intercambiables entre los ecosistemas y que cada vez son menos las barreras para la transferencia de estos genes entre distintos microorganismos, hospederos de distinta especie y el medioambiente (Radhouani *et al.*, 2014).

En medicina veterinaria se usan los antimicrobianos con tres objetivos, el uso terapéutico, profiláctico y como promotores del crecimiento. En nuestro país desde el 2006 el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), no autoriza los antimicrobianos como promotores de crecimiento, sólo se registran con fines terapéuticos. En el sector de la producción animal se administran tratamientos profilácticos para prevenir la propagación de infecciones de animales enfermos a sanos en una misma unidad de producción. Se considera que la exposición prolongada a dosis bajas o subterapéuticas de antimicrobianos favorece la

selección de cepas resistentes (Marshall y Levy, 2011). Además, la automedicación en humanos es una práctica común, la cual no es supervisada por un médico favoreciendo también la emergencia de cepas resistentes (Bada-Alamedji *et al.*, 2006).

En el caso de *Salmonella*, se ha reportado en los últimos años un incremento en el número de cepas resistentes a los antimicrobianos en países desarrollados y en vía de desarrollo. Recientemente, un estudio realizado en Dinamarca informó que la frecuencia de resistencia a las fluoroquinolonas ha aumentado en *S. Enteritidis* de un 0,8% a un 8,5%. En Inglaterra y Gales, se ha reportado en *S. Enteritidis* un incremento de un 19% a un 35% de resistencia, y *S. Typhimurium* incrementó de un 82% a un 90% (Lertworapreecha *et al.*, 2013).

En una investigación realizada por Briceño *et al.*, (2007) se pudo apreciar el alto índice de resistencia al Ác. Nalidíxico (73,3%), no así a Ciprofloxacino (2,7%) y a Enrofloxacino (6,2%) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde una planta procesadora de aves en Venezuela. Este elevado porcentaje de resistencia hacia Ácido Nalidíxico es alarmante, ya que, se ha reportado que la resistencia contra quinolonas de primera generación puede reducir la susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* contra fluoroquinolonas (Cebrian *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Toro *et al.*, (2014) sobre la resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *S. enterica* aisladas de pacientes humanos en España, de los 114 aislados clínicos (2009-2010) se detectaron 18 serotipos distintos destacando entre ellos Typhimurium (61%) y Enteritidis (16%), observándose altos porcentajes de resistencia a Sulfamidas (68%), Tetraciclinas (58%), Ampicilina (55%) y Estreptomina (46%).

En otro estudio realizado por Li *et al.*, (2014) sobre aislados de *S. enterica* en aguas superficiales en el sureste de EE.UU. se observó con más frecuencia *S. Newport* (57%), seguida por *S. Enteritidis* (12%), *S. Muenchen* (8%), *S. Javiana* (6%), *S. Thompson* (4%), y otros serovares. En este trabajo, el fenotipo de resistencia más comúnmente observado fue Ceftriaxona (35,3%). Las cepas fueron susceptibles a Gentamicina, Ciprofloxacino, Ácido Nalidixico y Trimetoprim.

En una investigación realizada por Thomas *et al.*, (2013) se aisló *Salmonella* en un 78,4% de muestras de agua obtenida de canales urbanos y rurales/agrícolas (entre noviembre 2003-julio 2005) en la cuenca de Grand River (Ontario, Canadá). De los 235 aislamientos, se detectaron 38 serotipos distintos, siendo *S. Typhimurium* DT 104 y *S. Heidelberg* DT 19 los predominantes. La corriente urbana tenía mayor prevalencia de *Salmonella*, más diversidad de serotipos y una mayor variabilidad genéticas en comparación con las corrientes rurales/agrícolas. A pesar de la frecuencia de RAM observada en los aislados de los animales de granja, no había más resistencia en estos serotipos aislados desde los caudales agrícolas/rurales en comparación con los caudales urbanos.

En cuanto a *S. Typhimurium* aisladas de animales de granja comúnmente demuestran una alta proporción de resistencia a los antibióticos, mayor que otros serotipos (Zhao *et al.*, 2007). Por ejemplo, The Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), informó que la frecuencia de resistencia a los antimicrobianos en *S. Typhimurium* tiene un rango de 60% a 94,7% en bovinos (aislados clínicos), de un 57,4% a 94,1% en cerdos (aislados clínicos y de matadero), y en aves de corral tiende a ser menor en este programa de monitoreo (Thomas *et al.*, 2013).

La tasa de multirresistencia en las cepas de *Salmonella* spp. ha incrementado considerablemente en años recientes. La mayoría de los patrones o perfiles están representados solamente por un aislado. Sin embargo, existen casos de clones multirresistentes, es así como en la última década, cepas de *S. enterica* multirresistentes han sido detectadas en muchos países europeos, en particular clones de *S. Typhimurium* DT104, siendo un grave problema de salud ya que esta se relaciona con la grave infección que puede causar, las dificultades para establecer un tratamiento empírico (e incluso dirigido) correcto, la facilidad para la dispersión de la multirresistencia y la ausencia de nuevos antimicrobianos activos frente a este patógeno (Briceño *et al.*, 2007 y Dargatz *et al.*, 2003).

Si bien, existen varios estudios realizados en cepas de *Salmonella* aisladas de distintas fuentes, respecto a su epidemiología y a la susceptibilidad que presentan a los antimicrobianos, actualmente hay pocos estudios acerca de la prevalencia, la distribución, la diversidad y la resistencia a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* spp., aisladas

desde recursos hídricos (Li *et al.*, 2014). Específicamente en nuestro país, no existen estudios de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella* aisladas desde cauces de río. Estudios de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas aisladas desde el ambiente, puede ayudar a establecer el origen de estas cepas resistentes y por lo tanto eliminar la fuente de contaminación. En la mayoría de los casos de *Salmonella* que ingresan a los cursos de agua es después de la movilización de material de desechos, ya sea por los fenómenos hidrobiológicos, animales silvestres, o zonas rurales donde existe una importante cantidad de planteles o productores de traspatio con animales destinados a la producción como aves y cerdos, ganadería bovina de carne y leche. Estos planteles o productores podrían en general utilizar gran cantidad de antimicrobianos, seleccionando bacterias resistentes en dichos animales, que podrían ser drenados al medio acuífero.

Con estos antecedentes el objetivo de este estudio es evaluar la resistencia a distintos antimicrobianos en cepas de *Salmonella* spp., aisladas en diferentes cauces de agua de la Región Metropolitana que podrían ser utilizados tanto en el riego para la agricultura, como para la recreación y que pueden por lo tanto, representar un riesgo para la salud pública.

HIPÓTESIS

Las cepas de *Salmonella* spp., aisladas desde algunos cauces de agua de la Región Metropolitana son multirresistentes a los antibióticos y esta multirresistencia presenta una asociación con el área geográfica, ya sea rural, semi rural o urbana.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de resistencia frente a diferentes antimicrobianos en cepas de *Salmonella* spp., aisladas desde cauces de agua de la Región Metropolitana, asociando los resultados con el área geográfica de los lugares muestreados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar fenotipos de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde cauces de agua de la Región Metropolitana.
2. Identificar asociación del área geográfica con los fenotipos de resistencia y perfiles de resistencia obtenidos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Muestras y Selección

Esta Memoria de Título se realizó con cepas colectadas por el laboratorio de Microbiología de los Alimentos perteneciente al Instituto de Salud Pública (ISP), a cargo de la Bioquímica María Cristina Martínez. Las pruebas de sensibilidad se realizaron en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile. Todas las muestras fueron obtenidas desde agua y posteriormente se realizaron las pruebas de aislamiento e identificación de *Salmonella* en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del ISP. Se obtuvieron en total 35 cepas de *Salmonella*, las que fueron serotipificadas en el ISP, de las cuales se identificaron 18 serovariedades distintas (Tabla 1).

Tabla 1. Nombre, dirección y datos de georreferenciación de los 50 lugares muestreados y resultado del aislamiento de *Salmonella*.

| Nombre Canal | Dirección | Comuna | Primer Muestreo | Segundo muestreo | Latitud | Longitud |
|-----------------|---|----------|-----------------|------------------|----------------|----------------|
| Río Clarillo | Interior reserva CONAF | Pirque | ND | ND | 33° 43' 39,48" | 70° 28' 38,62" |
| Canal La Sirena | Puente La Sirena, parcela 3 | Pirque | ND | ND | 33° 36' 24,12" | 70° 29' 18,67" |
| Aguas Claras | Puente Pelvin | Peñaflor | S. Infantis | ND | 33° 36' 22,89" | 70° 54' 32,91" |
| Aguas Claras | Puente Pelvin | Peñaflor | S. Panama | ND | 33° 36' 22,89" | 70° 54' 32,91" |
| Las Mercedes | Puente La Esperanza, Cuesta Barriga | Peñaflor | S. Infantis | ND | 33° 42' 51,70" | 70° 53' 36,21" |
| Las Mercedes | Puente La Esperanza, Cuesta Barriga | Peñaflor | S. Panama | ND | 33° 42' 51,70" | 70° 53' 36,21" |
| Batucano | Calle Central costado autopista nororient. Chicureo | Colina | ND | ND | 33° 17' 55,52" | 70° 39' 57,33" |
| Canal Colina | Calle El Alba I/autopista colina | Colina | ND | ND | 33° 17' 55,96" | 70° 40' 55,95" |
| Mansel | Boca Toma | Paine | ND | ND | 33° 54' 42,71" | 70° 43' 52,52" |
| Canal Cameliano | Camino Chada, puente Culitrin | Paine | S. Brandenburg | ND | 33° 52' 35,33" | 70° 40' 13,71" |

| | | | | | | |
|-----------------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Canal el Carmen | Camino Chicureo 1340 | Colina | ND | ND | 33° 17' 11,01" | 70° 40' 21,34" |
| Río Colina | Puente San Luis | Colina | ND | No se realizó | 33° 12' 27,99" | 70° 40' 0,31" |
| Canal San José | Camino El transito. Pomaire. | Melipilla | S. Corvallis | S. iii B | 33° 39' 24,83" | 71° 8' 59,66" |
| Canal San José | Camino El transito. Pomaire. | Melipilla | S. Newport | ND | 33° 39' 24,83" | 71° 8' 59,66" |
| Canal San José | Camino El transito. Pomaire. | Melipilla | S. Agona | ND | 33° 39' 24,83" | 71° 8' 59,66" |
| Canal Picano | Camino El transito. Pomaire. | Melipilla | S. Corvallis | S. Typhimurium | 33° 39' 52,65" | 71° 9' 22,02" |
| Canal Troncos Unidos | Puente Los Morros | Buin | ND | ND | 33° 39' 19,30" | 70° 39' 35,61" |
| Canal Huidobro | Camino Padre Hurtado, Viña Santa Rita | Buin | ND | ND | 33° 43' 26,74" | 70° 40' 55,20" |
| Canal el Castillo | Camino antiguo a Melipilla | Talagante | S. Brandenburg | No detectado | 33° 38' 52,65" | 70° 33' 33,94" |
| Canal el Castillo | Camino antiguo a Melipilla | Talagante | S. Senftenberg | ND | 33° 38' 52,65" | 70° 33' 33,94" |
| Canal Trebulco | 21 de Mayo N°1710 | Talagante | S. Typhimurium | ND | 33° 40' 21,63" | 70° 55' 31,22" |
| Canal Trebulco | 21 de Mayo N°1710 | Talagante | S. Give | ND | 33° 40' 21,63" | 70° 55' 31,22" |
| Colina derecho | Gral. San Martín P.42 | Colina | S. Montevideo | S. Montevideo | 33° 11' 19,10" | 70° 39' 31,13" |
| Colina izquierdo | La Capilla Santa Filomena | Colina | ND | ND | 33° 11' 22,22" | 70° 39' 1,57" |
| Canal Bodenhansen | Camino Rapel Km 10 | Melipilla | ND | S. Enteritidis | 33° 45' 24,09" | 71° 13' 56,90" |
| Estero Popeta | Camino Rapel, Pte Mandinga N°1 | Melipilla | S. Typhimurium | ND | 33° 48' 4,67" | 71° 18' 8,97" |
| Canal El Gato | Las Parcelas, Pte N°2 | Isla Maipo | S. Heidelberg | ND | 33° 42' 57,09" | 70° 53' 19,08" |
| Canal El Gato | Las Parcelas, Pte N°2 | Isla Maipo | ND | ND | 33° 42' 57,09" | 70° 53' 19,08" |
| Canal Carampangue | Camino Carampangue (compuertas) | Isla Maipo | S. Livingston | S. Enteritidis | 33° 41' 29,55" | 70° 55' 36,87" |
| Zanjon de la aguada | Tobalaba/Palena | Santiago | ND | S. Enteritidis | 33° 31' 1,17" | 70° 34' 8,33" |
| Río Maipo | Puente Las Vertientes | San José Maipo | ND | ND | 33° 35' 30,56" | 70° 28' 25,23" |
| Canal Los Choros | Carretera General San Martín Puente Verde | Colina | ND | ND | 33° 20' 59,37" | 70° 41' 26,79" |
| Canal Chacabuco | Las Vertiente Tranque el Canelo | Colina | ND | ND | 33° 2' 41,59" | 70° 40' 52,00" |
| Canal Hospital | Panamericana Sur, Parcela 222 | Paine | S. Typhimurium | ND | 33° 53' 47,81" | 70° 44' 4,18" |

| | | | | | | |
|-----------------------------|--|-----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|
| Canal Aguila Norte | Camino Interior El Cristo | Paine | ND | S. Santiago | 33° 54' 17,48" | 70° 45' 4,12" |
| Canal Santa Cruz | Camino Lonquen P 11,5 | Calera de Tango | S. Mbandaka | ND | 33° 36' 23,33" | 70° 47' 24,10" |
| Estero Puangue | Puente Isla de Rojas | María Pinto | S. Typhimurium | ND | 33° 29' 10,88" | 71° 3' 47,23" |
| Estero Puangue | Puente Isla de Rojas | María Pinto | S. Mbandaka | ND | 33° 29' 10,88" | 71° 3' 47,23" |
| Estero Puangue | Puente Isla de Rojas | María Pinto | S. Anatum | ND | 33° 29' 10,88" | 71° 3' 47,23" |
| Río Angostura | Puente Aguila Sur-Norte | Paine | ND | ND | 33° 52' 14,71" | 70° 44' 59,39" |
| Aguila Sur | Camino Interior El Crito | Paine | ND | ND | 33° 54' 22,91" | 70° 44' 33,74" |
| Aguila Sur | Camino Interior El Crito | Paine | ND | S. Santiago | 33° 54' 22,91" | 70° 44' 33,74" |
| Mapocho primera | Puente inicio Raúl Labbe | Lo Barnechea | ND | ND | 33° 21' 46,99" | 70° 29' 57,78" |
| Mapocho segunda | Puente Manuel Rodríguez | Santiago | ND | ND | 33° 25' 47,23" | 70° 39' 37,18" |
| Canal Unidos de Buin | Panamericana Sur Km 30 | Buin | ND | ND | 33° 41' 19,10" | 70° 42' 48,13" |
| Canal culipran | Camino La Viluma paradero 19 | Melipilla | ND | ND | 33° 43' 6,49" | 71° 11' 4,63" |
| Canal Eyzaguirre | La Boca Toma Canal Eyzaguirre INIA | La Pintana | ND | ND | 33° 34' 44,80" | 70° 36' 42,44" |
| Canal Carmelitas | Interior La Platina INIA | La Pintana | ND | ND | 33° 34' 30,03" | 70° 37' 19,17" |
| Canal San Francisco | Interior La Platina INIA | La Pintana | S. Typhimurium | ND | 33° 34' 17,45" | 70° 37' 30,49" |
| Canal San José | Frente Hospital Sótero del Río, Av Concha y Toro | Puente Alto | ND | ND | 33° 34' 32,99" | 70° 34' 58,16" |

ND: No Detectado

5.2 Evaluación de la sensibilidad a los antibióticos en las cepas de *Salmonella*

El ensayo se realizó mediante el método de difusión en placa Kirby-Bauer de acuerdo a las normas recomendadas por el Clinical Laboratory Standards (CLSI) (CLSI, 2007).

Antimicrobianos:

Los antimicrobianos (Oxoid®) a evaluar ($\mu\text{g}/\text{disco}$) fueron los siguientes: - Enrofloxacin ENR (5), Amoxicilina + Ácido Clavulánico AMC(30), Gentamicina CN (10), Tetraciclina

TE (30), Sulfametoxazol + Trimetoprim STX (25), Ceftiofur EFT (30), Ampicilina AMP (10), Cefadroxilo CFR (30), Cloranfenicol C (30), Amikacina AK (30), Azitromicina AZM (15), Ceftriaxona CTR (30), Ciprofloxacino CIP (5), Kanamicina KAN (30), Ácido Nalidíxico NA (30), Estreptomicina S (10) y Sulfisoxazole SFX (300). Estos antimicrobianos se eligieron en base a las recomendaciones señaladas por el CSLI (2007) y el National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) (NARMS, 2012) para *Salmonella* spp. Se utilizó como cepa control: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Procedimiento

- a. Preparación de las placas. Se utilizó el agar Mueller – Hinton (OXOID®), preparado de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las placas tuvieron una superficie uniforme y una profundidad de aproximadamente 4 mm.
- b. Preparación de inóculos bacterianos. Las cepas en estudio se sembraron en 2 mL de caldo APT (AES Laboratories®) y se incubaron por 18 a 24 h a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Luego 100 μL de la suspensión bacteriana se inocularon en 5 mL de APT, se midió la concentración bacteriana en espectrofotómetro (Dynamica®, modelo HALO RB-10) (OD600) y se incubaron en agitación a 37°C hasta alcanzar una OD600 de 0,25 ($1-5 \times 10^8$ UFC/mL).
- c. Inoculación de placas y aplicación de sensidiscos: Cada suspensión bacteriana, fue sembrada uniformemente sobre la superficie de una placa de agar Mueller - Hinton usando una tórula de algodón estéril. Una vez inoculadas, las placas se dejaron en reposo por algunos minutos para luego colocar los sensidiscos (Oxoid®) a una distancia equidistante sobre el agar, utilizando un equipo dispensador de sensidiscos (Oxoid®). Posteriormente las placas fueron incubadas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24h.
- d. Lectura e Interpretación de Resultados: La lectura se realizó midiendo con un pie de metro el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano proyectado desde el sensidisco, interpretándose como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R) usando como pauta los rangos establecidos por el CLSI, (2007) y Parry *et al.*, (2015) (Tabla 2). Las cepas cuyo halo de inhibición resultaron intermedio, fueron clasificadas como cepas resistentes para este estudio.

Las cepas que presentaron resistencia a tres o más antibióticos de grupos farmacológicos no relacionados se consideraron como resistentes a múltiples drogas (MDR).

Tabla 2. Interpretación de la zona de diámetro en patógenos de Medicina Veterinaria (CLSI, 2007).

| Antibiótico | Código | Zona de diámetro estándar (mm) | | | <i>E.coli</i> ATCC 25922 |
|--------------------------------|---------|--------------------------------|------------|----------|--------------------------|
| | | Resistente | Intermedio | Sensible | |
| Ampicilina | AMP-10 | <13 | 14-16 | >17 | 16-22 |
| Amoxicilina –Ácido Clavulánico | AMC-30 | <13 | 14-17 | >18 | 18-24 |
| Gentamicina | CN-10 | <12 | 13-14 | ≥15 | 19-26 |
| Tetraciclina | TE-30 | <11 | 12-14 | ≥15 | 18-25 |
| Sulfametazol-Trimetoprim | STX-25 | <10 | 11-15 | ≥16 | 23-29 |
| Enrofloxacino | ENR-5 | ≤15 | 16-20 | ≥21 | 30-40 |
| Cefadroxiolo | CFR-30 | ≤14 | 15-17 | ≥18 | 21-27 |
| Ceftiofur | EFT-30 | ≤14 | 15-22 | ≥23 | 29-35 |
| Cloranfenicol | C-30 | ≤12 | 13-17 | ≥18 | 31-40 |
| Amikacina | AK-30 | ≤14 | 15-16 | ≥17 | 19-26 |
| Azitromicina | AZM-15 | ≤12 | NA | ≥13 | NA |
| Ceftriaxona | CTR-30 | ≤13 | 14-20 | ≥21 | 29-35 |
| Ciprofloxacino | CIP-5 | ≤15 | 16-20 | ≥21 | 30-40 |
| Kanamicina | KAN-30 | ≤13 | 14-17 | ≥18 | 17-25 |
| Ácido nalidíxico | NA-30 | ≤13 | 14-18 | ≥19 | 22-28 |
| Estreptomina | S-10 | ≤11 | 12-14 | ≥15 | 12-20 |
| Sulfisoxazole | SFX 300 | ≤12 | 13-16 | ≥17 | 15-23 |

NA: No Aplica

5.3 Asociación entre área geográfica con fenotipos de resistencia

Procedimiento:

- a) Clasificación de área geográfica: Para realizar el objetivo específico 2, lo primero que se realizó fue la clasificación de las áreas geográficas en zonas urbanas, rurales y semirurales, entendiéndose este último como un área de transición entre el campo y la ciudad, con predominio de lo urbano. Se caracteriza al semirural como un sector muy dinámico y complejo, con rasgos de interface ecológica y de frontera socio productivo, donde se atenúan o disminuyen los servicios del sistema urbano y los servicios ecológicos (Cardoso, 2012). Se utilizó el sitio web sit.conaf.cl para definir las zonas urbanas y rurales, las cuales las define de las siguientes maneras: zona urbana como área industrial-urbana, y zona rural como área agrícola. Además, para interés de este estudio se definió la zona semirural como aquel punto de muestreo que este en una zona agrícola y a una distancia igual o menor a 1 Km. de la zona urbana. Y la zona rural se definió como aquel punto de muestreo ubicado en una zona agrícola que se encuentre a más de 1 Km. de la zona urbana.
- b) Identificación de los puntos de muestreos positivos a *Salmonella* con su respectiva área geográfica: una vez realizada la clasificación de las áreas geográficas, se identificó a que área geográfica corresponde cada punto de muestreo positivo a *Salmonella*.
- c) Asociación del área geográfica con fenotipos de resistencia y perfiles de resistencia: finalmente, a través del programa Infostat® (v2010) se realizó la asociación de ambas variables.

Análisis estadístico

Para el cumplimiento del objetivo específico 2, los resultados se analizaron con el programa Infostat® (v2010) mediante la realización de tablas de contingencia para análisis de datos categóricos, utilizando X^2 .

5.4 Bioseguridad

Salmonella es clasificada como un agente de riesgo intermedio de acuerdo al “Manual de Normas de Bioseguridad” generado por CONICYT (2008), el cual sugiere medidas que corresponden al Nivel 2 de Bioseguridad. En este trabajo con su respectiva certificación (Anexo 1), se consideró:

- Entrenamiento en la manipulación de muestras y procedimientos experimentales.
- Los procedimientos en que se manipulen bacterias vivas fueron realizados en cabina de bioseguridad clase IIA.
- Las manos se desinfectaron con alcohol 70% antes y después de trabajar con los agentes bacterianos.
- Los guantes y delantal son los principales elementos de protección individual a utilizar.
- Todo el material de desecho fue descontaminado mediante autoclave antes de su eliminación.

6. RESULTADOS

I. Serotipos de *Salmonella* y su frecuencia en sitios muestreados

Se tomaron 100 muestras de agua, obteniéndose un total de 35 muestras positivas al género *Salmonella* (35%), de los cuales se identificaron 18 serotipos diferentes, siendo el de mayor frecuencia: *S. Typhimurium* (17%), seguida por *S. Grupo C1* (11%) y *S. Enteritidis* (9%) (Gráfico 1).

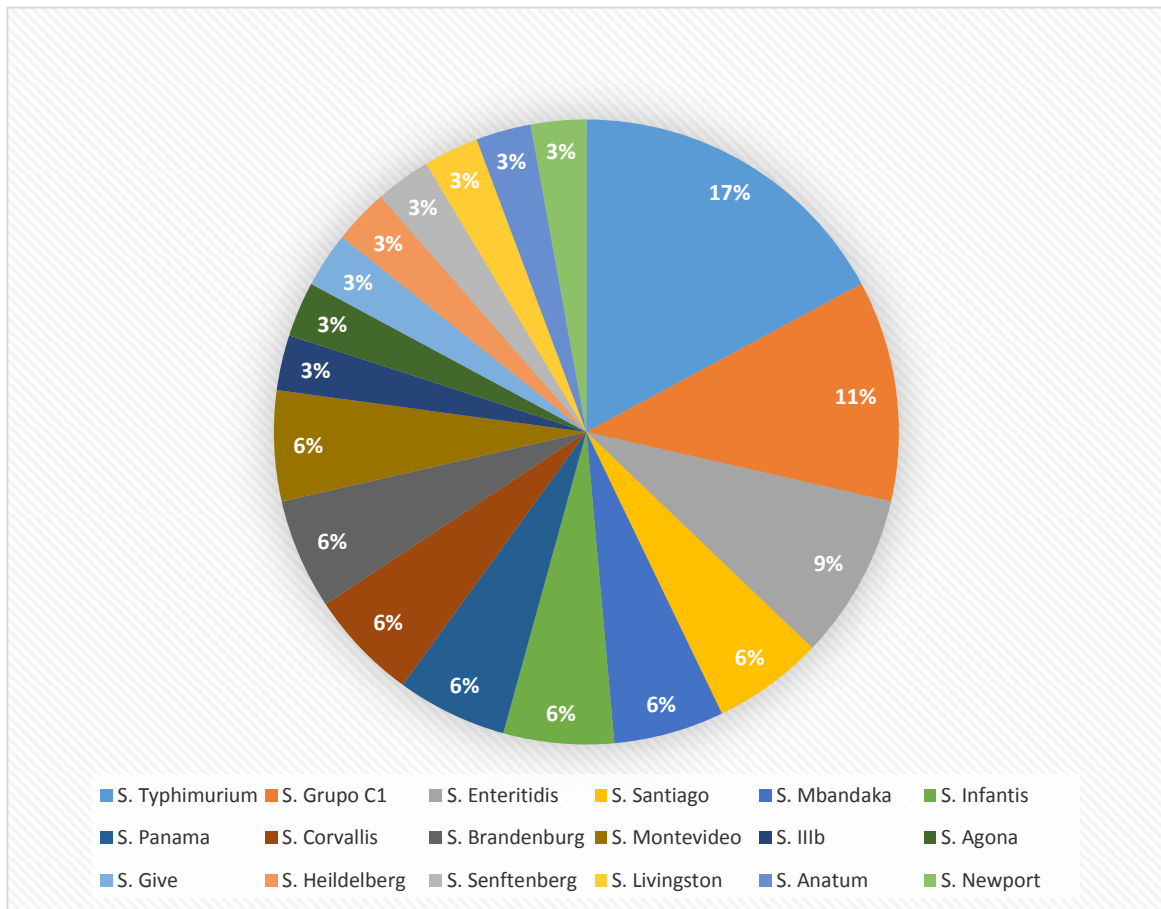


Gráfico 1. Serotipos de *Salmonella* aisladas en muestras de cauces de agua.

II. Porcentaje de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella* spp.

Luego de realizar las pruebas de sensibilidad a los 17 antimicrobianos recomendados por el CLSI (2007) y NARMS (2012), se obtuvo los siguientes fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana, que se presentan en la tabla 3. Los mayores porcentajes de resistencia fueron detectados para Estreptomicina 97% (34/35), Ceftiofur 91% (32/35), Kanamicina 91% (32/35) y Cefadroxilo 89% (31/35). No se detectaron cepas resistentes al Cloranfenicol.

Tabla 3. Número y porcentaje de cepas resistentes a los distintos antimicrobianos.

| Antimicrobiano | Número de cepas resistentes | Porcentaje de cepas resistentes |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Estreptomicina | 34 | 97% |
| Ceftiofur | 32 | 91% |
| Kanamicina | 32 | 91% |
| Cefadroxilo | 31 | 89% |
| Sulfisoxazole | 26 | 74% |
| Amikacina | 24 | 69% |
| Azitromicina | 16 | 46% |
| ÁC. Nalidíxico | 15 | 43% |
| Gentamicina | 11 | 31% |
| Enrofloxacino | 7 | 20% |
| Ciprofloxacino | 7 | 20% |
| Tetraciclina | 3 | 9% |
| Ampicilina | 3 | 9% |
| Ceftriaxona | 2 | 6% |
| Amoxicilina/Ác. Clavulánico | 1 | 3% |
| Sulfametoxazol/Trimetoprim | 1 | 3% |
| Cloranfenicol | 0 | 0% |

III. Detección de fenotipos de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella* aisladas desde cauces de agua.

Del total de cepas de *Salmonella* analizadas, se identificaron 31 cepas con resistencia a 3 o más antimicrobianos de grupos farmacológicos no relacionados (89%), es decir, cepas multirresistentes, y 4 cepas fueron resistentes sólo a 1 o 2 antimicrobianos de grupos farmacológicos no relacionados (11%). Los fenotipos de resistencia se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Fenotipos de resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella* aisladas desde cauces de agua de la RM.

| Código ID | Serotipo | Fenotipos de resistencia |
|-----------|-----------------------|--|
| SM 12-24 | <i>S. Infantis</i> | S, AZN,K, AK, EFT, CFR, TE |
| SM 12-25 | <i>S. Panama</i> | S,CFR, EFT, AK, K, NA, SF |
| SM 12-26 | <i>S. Infantis</i> | S, AZN,CFR, EFT, CRO, K, NA, SF |
| SM 12-27 | <i>S. Panama</i> | S, AZN,AMP, CFR, EFT, AK, CIP, K, NA, SF |
| SM 12-30 | <i>S. Corvallis</i> | NA, SF,S, CFR, EFT |
| SM 12-32 | <i>S. Agona</i> | S, AZN,CN, CFR, EFT, AK, K, SF |
| SM 12-33 | <i>S. Corvallis</i> | S, SF,CN, CFR, EFT, AK, K, NA |
| SM 13-34 | <i>S. Brandenburg</i> | S, AZN, NA,ENR, CFR, EFT, K |
| SM 13-35 | <i>S. Senftenberg</i> | S, ENR, AK, K, NA, SF,CFR, EFT, CIP |
| SM 13-37 | <i>S. Give</i> | S,CN, CFR, EFT, AK, K, SF |
| SM 13-60 | <i>S. Typhimurium</i> | AZN, K,CFR, EFT, AK, NA, SF |
| SM 13-41 | <i>S. Montevideo</i> | S, AZN,CN, CFR, EFT, AK, K, SF |
| SM 13-59 | <i>S. Anatum</i> | S, AZN,CN, CFR, EFT, AK, K, SF |
| SM 13-61 | <i>S. Santiago</i> | S, NA,ENR, CFR, EFT, CIP, K, SF |

| | | |
|-----------------|-----------------------|---|
| SM 13-64 | <i>S. Grupo C1</i> | SF,S |
| SM 12-31 | <i>S. Newport</i> | S, CFR, AK, AZN, SF,CN, EFT, K |
| SM 13-38 | <i>S. Typhimurium</i> | S, ENR, CFR,AZN,EFT, AK, K, NA |
| SM 13-42 | <i>S. Typhimurium</i> | AMP, TE, SXT, S, K, SF,AMC, CFR, EFT, K |
| SM 13-45 | <i>S. Grupo C1</i> | S, AZN, CIP, K, NA, SF,CN, CFR, AK |
| SM 13-46 | <i>S. Livingston</i> | AMP, S, AZN, NA,CFR,CRO EFT, AK, CIP, K, SF |
| SM 13-49 | <i>S. Typhimurium</i> | S, AZN, NA,ENR, CFR, EFT, AK, K, SF |
| SM 13-57 | <i>S. Mbandaka</i> | S, AZN, NA,CN, CFR, EFT, AK, K, SF |
| SM 13-62 | <i>S. Grupo C1</i> | TE, S, CFR, EFT, SF |
| SM 13-63 | <i>S. Santiago</i> | S, CFR, EFT, K, SF |
| SM 13-65 | <i>S. Enteritidis</i> | S, CFR, EFT, K, SF |
| SM 14-66 | <i>S. Typhimurium</i> | S, EFT, AK, K |
| SM 14-67 | <i>S. Grupo C1</i> | S,CN, EFT, AK, K |
| SM 14-68 | <i>S. IIIb</i> | S, AK,K |
| SM 14-69 | <i>S. Enteritidis</i> | S,CFR,EFT, K, SF |
| SM 14-70 | <i>S. Enteritidis</i> | S, CFR,EFT, K, SF |
| SM 14-71 | <i>S. Montevideo</i> | AZN,S, CFR, EFT, AK, K |
| SM 12-28 | <i>S. Brandenburg</i> | CN, S, ENR, AK, NA,CFR, EFT, AK, NA |
| SM 13-44 | <i>S. Heidelberg</i> | S, ENR, AK, K, CIP, NA,CFR, EFT, K |
| SM 13-53 | <i>S. Mbandaka</i> | S, AZN,CN, CFR, EFT, AK, K, SF |
| SM 13-55 | <i>S. Typhimurium</i> | S,CFR, EFT, K |

Código ID: Código de Identificación

ENR: Enrofloxacinó AMC: Amoxicilina/Ac. Clavulánico CN: Gentamicina TE: Tetraciclina SXT: Sufametoxazole/Trimetoprima EFT: Ceftiofur AMP: Ampicilina CFR: Cefadroxilo AK: Amikacina AZN: Azitromicina CRO: Ceftriaxona C: Cloranfenicol CIP: Cirpofloxacinó K: Kanamicina NA: Ac. Nalidíxico S: Estreptomyciná SF: Sulfisoxazole.

IV. Detección de perfiles multirresistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella* spp.

El análisis individual de las cepas, demostró la presencia de 24 perfiles de multirresistencia de los cuales los más frecuentes fueron: S/AZN/CN/CFR/EFT/AK/K/SF (21%) y S/CFR/EFT/K/SF (17%).

V. Identificación del área geográfica al cual pertenece cada punto de muestreo positivo a *Salmonella*.

De acuerdo a lo señalado en el objetivo específico N°2, con el uso del sitio web sit.conaf.cl, se logró establecer para cada aislado de *Salmonella* (n=35) el tipo de área geográfica correspondiente, de donde se obtuvo esa muestra que resultó positiva. Los resultados fueron: área semirural con un 46% de los aislados de *Salmonella* (16/35), seguida de la zona urbana (40%, 14/35), y del área rural (14%, 5/35) (Gráfico 2).

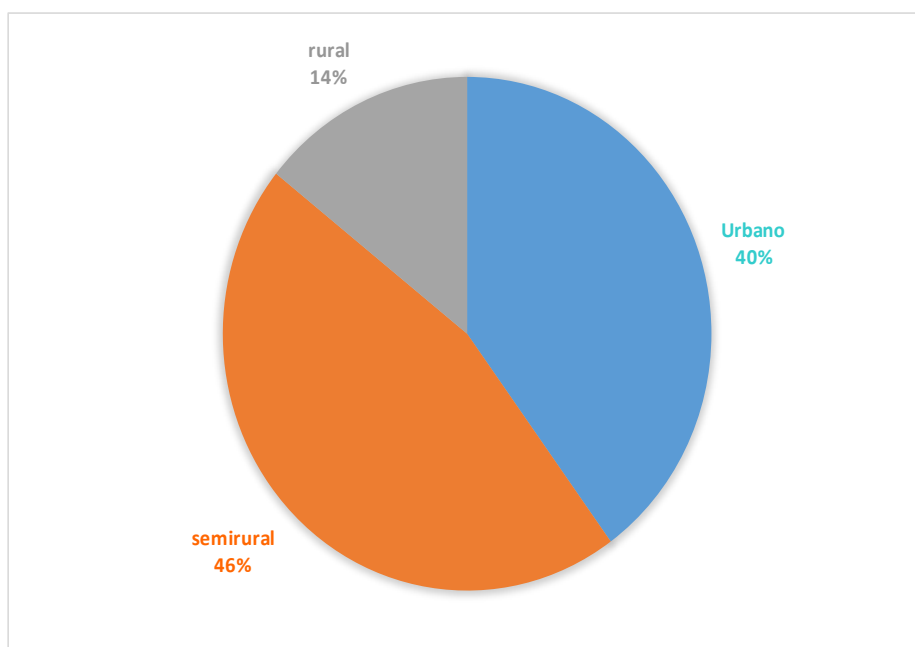


Gráfico 2. Distribución de la prevalencia de *Salmonella* en las distintas áreas geográficas.

De acuerdo a los fenotipos de resistencia observados en la tabla N°3, y el análisis realizado para obtener los datos del gráfico N°2, se logró identificar el número de cepas resistentes para cada antimicrobiano en las diferentes áreas geográficas, los datos se muestran en los gráficos 3, 4 y 5.

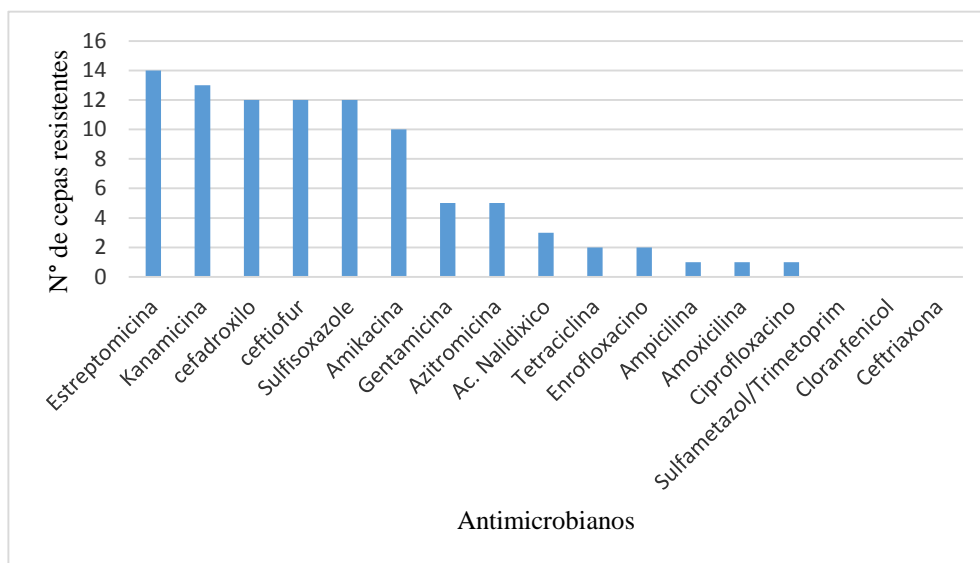


Gráfico 3. Número de cepas de *Salmonella* resistente para cada antimicrobiano en el área urbana.

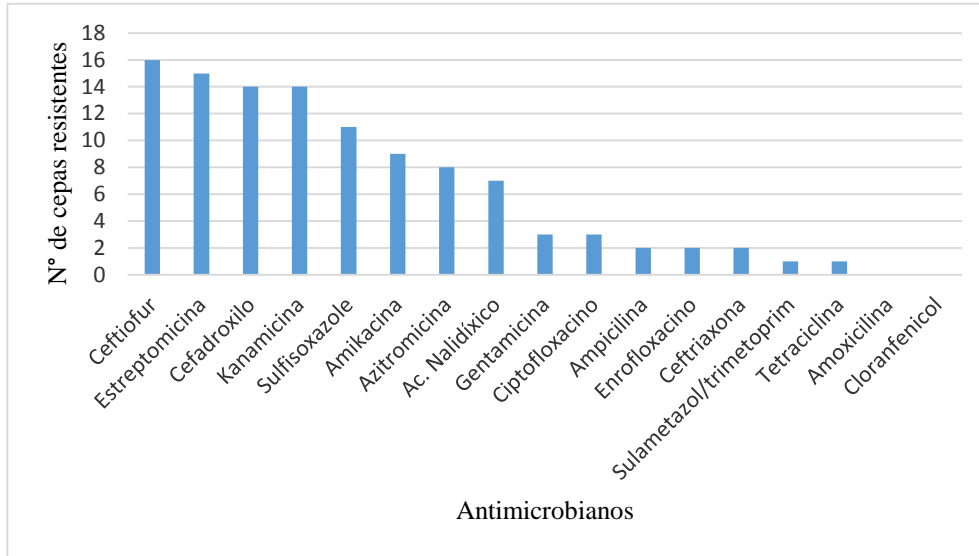


Gráfico 4. Número de cepas de *Salmonella* resistente para cada antimicrobiano en el área semirural.

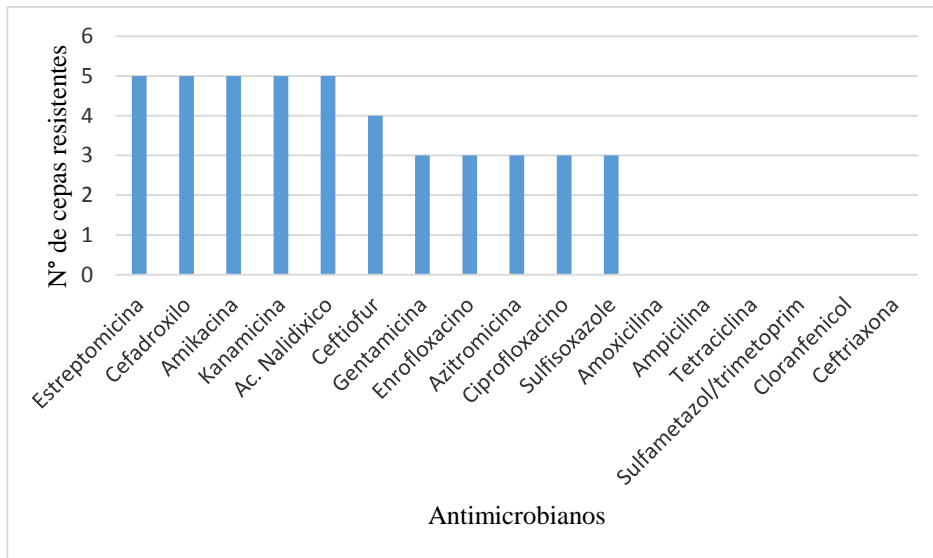


Gráfico 5. Número de cepas de *Salmonella* resistente para cada antimicrobiano en el área rural.

VI. Descripción de los perfiles de resistencia y área geográfica de obtención del aislado.

En la tabla 5 se identifica cada perfil de resistencia con su respectiva área geográfica, desde donde se obtuvo dicha cepa. Se observa que los perfiles de mayor frecuencia se encuentran en áreas urbanas y semirurales.

Tabla 5. Perfiles de resistencia y relación con área geográfica.

| Código ID | Perfiles de resistencia | Área geográfica | | | |
|---|---|-----------------|--------|-----------|-------|
| | | Nºcepas | Urbano | semirural | rural |
| SM 12-32/ SM 13-53/ SM 13-59/ SM 13-41/ SM 12-31 | S, AZN,CN, CFR, EFT, AK, K, SF | 5 | 3 | 2 | 0 |
| SM 13-63/ SM 13-65/ SM 14-69/ SM 14-70 | S, CFR, EFT, K, SF | 4 | 2 | 2 | 0 |
| SM 12-24 | S, AZN,K, AK, EFT, CFR, TE | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SM 12-25 | S,CFR, EFT, AK, K, NA, SF | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SM 12-26 | S, AZN,CFR, EFT, CRO, K, NA, SF | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 12-27 | S, AZN,AMP, CFR, EFT, AK, CIP, K, NA, SF | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 12-30 | NA, SF,S, CFR, EFT | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 12-33 | S, SF,CN, CFR, EFT, AK, K, NA | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SM 13-34 | S, AZN, NA,ENR, CFR, EFT, K | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 13-35 | S, ENR, AK, K, NA, SF,CFR, EFT, CIP | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 13-37 | S,CN, CFR, EFT, AK, K, SF | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SM 13-60 | AZN, K,CFR, EFT, AK, NA, SF | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 13-61 | S, NA,ENR, CFR, EFT, CIP, K, SF | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SM 13-38 | S, ENR, CFR,AZN,EFT, AK, K, NA | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SM 13-42 | AMP, TE, SXT, S, K, SF,AMC, CFR, EFT, K | 1 | 1 | 0 | 0 |

| | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|
| SM 13-45 | S, AZN, CIP, K, NA, SF,CN, CFR, AK | 1 | 0 | 0 | 1 |
| SM 13-46 | AMP, S, AZN, NA,CFR, EFT, AK, CIP, K, SF | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 13-49 | S, AZN, NA,ENR, CFR, EFT, AK, K, SF | 1 | 0 | 0 | 1 |
| SM 13-57 | S, AZN, NA,CN, CFR, EFT, AK, K, SF | 1 | 0 | 0 | 1 |
| SM 13-62 | TE, S, CFR, EFT, SF | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 14-67 | S,CN, EFT, AK, K | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 14-71 | AZN, S, CFR, EFT, AK, K | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 12-28 | CN, S, ENR, AK, NA,CFR, EFT, AK, NA | 1 | 0 | 0 | 1 |
| SM 13-44 | S, ENR, AK, K, CIP, NA,CFR, EFT, K | 1 | 0 | 0 | 1 |
| SM 13-64 | SF,S | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SM 14-66 | S, EFT, AK, K | 1 | 0 | 1 | 0 |
| SM 14-68 | S, AK,K | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SM 13-55 | S,CFR, EFT, K | 1 | 0 | 1 | 0 |

Código ID: Código de Identificación

ENR: Enrofloxacino AMC: Amoxicilina/Ac. Clavulánico CN: Gentamicina TE: Tetraciclina SXT: Sufametoxazole/Trimetoprima EFT: Ceftiofur AMP: Ampicilina CFR: Cefadroxilo AK: Amikacina AZN: Azitromicina CRO: Ceftriaxona C: Cloranfenicol CIP: Cirpofloxacino K: Kanamicina NA: Ac. Nalidíxico S: Estreptomycin SF: Sulfisoxazole.

VII. Identificación de los perfiles de resistencia y fenotipos de resistencia a antibióticos asociados a las áreas geográficas en estudio.

A través del programa InFostat® (v2010) se analizaron las cepas en tablas de contingencia para análisis de datos categóricos utilizando el estadígrafo de Chi cuadrado X^2 .

En cuanto a los resultados analizados, Chi cuadrado indicó que no existe asociación entre perfiles de resistencia y las diferentes áreas geográficas $p > 0,05$. Por otra parte, dentro de los fenotipos de resistencia, sólo fueron estadísticamente significativo Ácido Nalidíxico ($p=0,0096$) y Ciprofloxacino ($p=0,039$), los cuales están asociados a las áreas rurales.

7. DISCUSIÓN

La resistencia a los antimicrobianos que presentan las bacterias zoonóticas, es una realidad y problemática en el ámbito de la salud pública a nivel mundial. Este problema involucra un componente médico, social, económico y ético, dado que las infecciones producidas por estas bacterias traen como consecuencia prolongadas hospitalizaciones, ausencia laboral y terapias con antibióticos más costosos, lo cual afecta a toda la sociedad. Bacterias resistentes se han identificado en muestras de animales, en muestras de personas, en alimentos y en muestras medioambientales. En Chile, existen datos sobre la presencia de agentes patógenos y sus fenotipos de resistencia, sin embargo la información es incompleta, y no refleja en forma fidedigna la realidad nacional, debido a que no existe actualmente un sistema oficial de vigilancia de la resistencia integrado.

Este estudio se planteó como la primera evaluación de los niveles de resistencia en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras medioambientales, específicamente de ríos y canales de la Región Metropolitana. Para esto se trabajó con cepas aisladas por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), en el marco del proyecto FONIS 2012: “Estudio de presencia de enteropatógenos en aguas de cursos superficiales de la región metropolitana y su uso potencial como agua de riego”. En este proyecto se tomaron 100 muestras de agua, de las cuales resultaron positivas 35 de ellas al género *Salmonella* (35%). El nivel de aislamiento (35%) obtenido en este trabajo es similar a los estudios realizados por Levantesi *et al.*, (2012), en el cual la prevalencia de *Salmonella* en muestras de agua que se utilizan para el riego de frutas y verduras en una granja de Sonora México fue de un 23%. También, nuestros resultados fueron similares a lo que ocurre en cuatro regiones del Valle de Culiacán en la que se recuperaron un 39% de muestras positivas a *Salmonella*, sin embargo otros trabajos señalan aislamientos más bajos, por ejemplo en Texas se observó en un 9% de prevalencia, y un 6% fue detectada de aguas superficiales en Grecia (Pachepsky *et al.*, 2011). La frecuencia de detección de este género es bastante variable, de un 3% a un 100% en aguas superficiales (Levantesi *et al.*, 2012).

Por otra parte, los canales urbanos, son generalmente subestimados como fuentes significativas de patógenos, sobre todo si no hay una fuente de contaminación (por ejemplo,

instalaciones de tratamiento de aguas residuales). Aunque las zonas urbanas tendrían una baja tasa de contaminación por estiércol de los animales de granja, estas corrientes pueden llevar residuos fecales a través de la escorrentía de aguas pluviales, de los animales domésticos y la vida silvestre (Thomas *et al.*, 2013). En Alberta, Johnson *et al.*, (2003) informaron que *Salmonella* fue aislada en una alta proporción (26,3%) de las muestras de los desagües pluviales municipales, un sitio incluso mostró una prevalencia de 80,0%.

Thomas *et al.*, (2013) aislaron *Salmonella* en un 78,4% de muestras de agua de canales urbanos y rurales/agrícolas (noviembre 2003-julio 2005) en la cuenca de Grand River (Ontario, Canadá). De los 235 aislamientos, se detectaron 38 serotipos distintos, siendo *S. Typhimurium* y *S. Heidelberg* los predominantes. La corriente urbana tenía mayor ocurrencia de *Salmonella*, más diversidad de serotipos y una mayor variabilidad genética en comparación con las corrientes rurales/agrícolas. Estos resultados son similares a los observados en nuestro estudio. Sin embargo, para nuestro trabajo no tan solo contempló esas dos áreas geográficas, sino que también el área semirural, un dato no menor ya que, hoy en día existe mucha migración de población de lo rural a lo urbano, además con el rápido crecimiento poblacional, es necesario construir en zonas donde anteriormente era una explotación agrícola, convirtiendo estas zonas en periurbano o semirural. Por otra parte, alrededor de Santiago existen comúnmente parcelas de agrado que pertenecen al ámbito semirural, desde los cuales fueron principalmente recolectadas las muestras de agua, contribuyendo con ello al análisis de la multirresistencia obtenida.

En cuanto a los serotipos más frecuentes, el CDC (2011) reportó *S. Enteritidis* (22%) seguida por *S. Newports* (14%) y *S. Typhimurium* (13%) en aislados humanos; en Chile, el MINSAL (2014) indica un predominio de *S. Enteritidis* (65,3%) seguida de *S. Typhimurium* (12,7%) en aislados de muestras desde pacientes humanos. Por su parte, Toro *et al.*, (2014) detectó 18 serotipos distintos en aislados de humanos destacando entre ellos *S. Typhimurium* (61%) y *S. Enteritidis* (16%). En cuanto a muestras obtenidas desde otras fuentes como son los vegetales, un trabajo realizado en Tailandia, encontró que el serotipo predominante fue *S. Typhimurium* (33%) (Lertworapreecha *et al.*, 2013). Otro estudio realizado por Li *et al.*, (2014) sobre aislados de *S. enterica* obtenidos en aguas superficiales en el sureste de EE.UU. se observó con más frecuencia *S. Newport* (57%), seguida por *S.*

Enteritidis (12%). En una recopilación de información realizada por Levantesi *et al.*, (2012) observó tanto en México, Italia y Francia, el predominio de *S. Typhimurium*, mientras que en otras regiones del mundo se observó que otros serotipos se aislaban con mayor frecuencia, por ejemplo *S. Rubislaw* en Canadá, *S. Anatum* en EE.UU., *S. Newport* en Holanda, entre otros. En cuanto a nuestro estudio, se aislaron 18 serotipos, siendo el serotipo Typhimurium el más prevalente, similar a lo que ocurre en distintas regiones del mundo: en muestras de agua superficiales en EE.UU (Levantesi *et al.*, 2012), en aislados de pacientes humanos en España (Toro *et al.*, 2014), y en muestras vegetales (Lertworapreecha *et al.*, 2013) en el sur de Tailandia. Este serotipo ocasiona entre 40 y 70 % de los casos de salmonelosis reportados en Estados Unidos. Esto puede deberse al amplio rango de hospederos que la bacteria puede utilizar, en los cuales se incluyen, además de los humanos, ganado bovino, porcino, equino, y una amplia diversidad de aves silvestres y de corral (López *et al.*, 2009).

Los antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones graves producidas por *S. enterica* son: Amoxicilina/Ac. Clavulánico, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas, pero la aparición de mecanismos de resistencia a dichos antibióticos limita las opciones terapéuticas. La resistencia a fluoroquinolonas resulta todavía infrecuente en *S. enterica* en comparación con la resistencia a otros fármacos. En un estudio realizado por Toro *et al.*, (2014) sobre la resistencia a antibióticos en aislados clínicos humanos de *S. enterica*, se observó altos porcentajes de resistencia a Sulfamidas (68%), Tetraciclinas (58%), Ampicilina (55%) y Estreptomina (46%). Li *et al.*, (2014) señalan que el 35,3% de las cepas fueron resistentes a Ceftriaxona, mientras que las cepas fueron susceptibles a Gentamicina, Ciprofloxacino, Ácido Nalidixico y Trimetoprim. Por otra parte, un trabajo realizado por López *et al.*, (2009) detectó *Salmonella* y evaluó su resistencia a distintos antimicrobianos en muestras de agua, resultando las 20 cepas de *Salmonella* susceptibles a Ampicilina, Ciprofloxacino y Trimetoprim-Sulfametoxazol, mientras que el 60 % de ellas presentaron resistencia a tetraciclina y todas correspondieron al serotipo Typhimurium. López *et al.*, (2009) señalan que los altos porcentajes de resistencia a tetraciclina pueden deberse a que este fármaco presenta actividad contra diversos grupos de bacterias, motivo por el cual ha sido desde hace muchos años ampliamente utilizado para terapia en infecciones humanas y para la prevención y control

de infecciones en plantas y animales. En nuestro estudio se observó un alto porcentaje de resistencia a Estreptomina (97%), Ceftiofur (91%), Kanamicina (91%) y Cefadroxilo (89%), mientras que no se observaron cepas resistentes a Cloranfenicol. Cabe destacar que para nuestro trabajo se consideró resistente también a cepas con fenotipo de resistencia intermedia. En cuanto a Tetraciclina, siendo mencionado en varios estudios como uno de los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia, en nuestro estudio se observó que tan solo 3 cepas de 35 (9%) fueron resistentes, mientras que si se contempla sólo el serotipo *S. Typhimurium* aumenta el porcentaje a un 17%, siendo igualmente inferior a los estudios mencionados anteriormente. Esto nos podría sugerir que existe una asociación entre serotipo y la resistencia o que no se ha utilizado este antimicrobiano en los últimos años en esta zona quizás debido a fracasos terapéuticos que influyeron en cambios en los antimicrobianos a usar. Es interesante poder seguir monitoreando esta tendencia en el tiempo, para así con mayores datos establecer conclusiones basadas en la evidencia.

Con respecto a la familia de las quinolonas y fluoroquinolonas, en nuestro trabajo se observó un 43%, 20% y 20% de resistencia a Ác. Nalidíxico, Ciprofloxacino y Enrofloxacino respectivamente, índices de resistencia mayores a los resultados obtenidos por Li *et al.*, (2014), el cual obtuvo 100% de sensibilidad a Ciprofloxacino y Ác. Nalidíxico, en 51 cepas de *Salmonella* aisladas de aguas superficiales en el Sureste de EE.UU. Briceño *et al.*, (2007), obtuvieron un porcentaje de cepas resistentes a Ácido Nalidixico en un 73,3%, en una planta procesadora de pollos en Venezuela. Según Lertworapreecha *et al.*, (2013) en los últimos años, existe evidencia que ha disminuido la susceptibilidad a las fluoroquinolonas en el género *Salmonella*, lo que debe recibir una atención especial, ya que las fluoroquinolonas son medicamentos eficaces contra la salmonelosis en tratamientos clínico y en especial, cuando existen casos en el que hay riesgo vital.

En relación a las cefalosporinas de tercera generación, la Ceftriaxona es el antimicrobiano de elección para el tratamiento de salmonelosis invasiva, particularmente en niños donde las quinolonas están contraindicadas (Mejia *et al.*, 2008). En este estudio, se obtuvo un 94% de sensibilidad para Ceftriaxona. Sin embargo, se logró detectar un 91% de cepas con sensibilidad disminuida al Ceftiofur (intermedias), por lo que este antibiótico no sería útil

en estas cepas. Ceftiofur es una cefalosporina de tercera generación que se utiliza exclusivamente en medicina veterinaria, por lo que los desechos fecales de los animales domésticos, pueden ser fuente de contaminación y dispersión de cepas patógenas y resistentes a los canales y ríos, lo que podría sugerir el alto porcentaje de resistencia a Ceftiofur y no así a Ceftriaxona, siendo este último antibiótico utilizado exclusivamente en medicina humana. Es importante disminuir el uso de Ceftiofur por la posible resistencia cruzada, entre ambas cefalosporina que pueda observarse en el futuro.

En cuanto al perfil de la cepa Typhimurium DT104, siendo este un patógeno virulento para humanos y animales, particularmente de ganado, es comúnmente penta resistente: Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Sulfamidas y Tetraciclina. Nosotros no obtuvimos este perfil de resistencia en las 6 cepas de *S. Typhimurium*, sin embargo, una de ellas fue resistente a: Estreptomicina, Sulfamidas, Ampicilina y Tetraciclina. Las otras cepas del serotipo Typhimurium son resistentes a 1 o 2 antimicrobianos de los anteriormente mencionados.

Del total de cepas de *Salmonella* spp. analizadas, se identificaron 31 cepas multirresistentes (89%), lo que es un valor preocupante, situación que se ha observado en otros estudios como los de Briceño *et al.*, (2007) observando un 65%. Este autor, además menciona que cada vez son más frecuentes cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes, las que han sido detectadas en muchos países europeos, en particular clones de *S. Typhimurium* DT104, lo que agrava más la situación de la resistencia a los antimicrobianos.

Los perfiles de resistencia encontrados en este estudio fueron 28, siendo dos los más frecuentes, Estreptomicina, Azitromicina, Gentamicina, Cefadroxilo, Ceftiofur, Amikacina, Kanamicina, Sulfisoxazole (17%) y Estreptomicina, Cefadroxilo, Ceftiofur, Kanamicina, Sulfisoxazole (14%). Dentro de los antimicrobianos identificados en estos perfiles de resistencia, no se observan los antibióticos que se utilizan en terapias de salmonelosis invasiva en humanos. 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 multi-resistencia (Dargatz *et al.*, 2003). 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 (Thomas *et al.*, 2013).

Ahora bien, en la asociación entre perfiles de resistencia y área geográfica resultó ser que no existe relación. Similares resultados fueron obtenidos por Thomas *et al.*, (2013), en los serotipos de las cuencas agrícolas/rurales en comparación con las cuencas urbanas. Sin embargo, estos autores sí encontraron relación entre el serotipo de *Salmonella* y la resistencia a los antimicrobianos, análisis que se realizó también en nuestro estudio obteniéndose un $p > 0,05$ (Anexo 2), por lo que no existe relación entre los fenotipos de resistencia y los serotipos de *Salmonella*.

En lo que se refiere a los fenotipos de resistencia, solo existió asociación en los fenotipos Ácido Nalidíxico y Ciprofloxacino con el área rural. Esto se puede deber a que en las zonas rurales existe mayor explotación de animales de producción, por lo que puede existir un uso y abuso de estos antibióticos de la familia de las quinolonas. Es por ello que es imprescindible continuar con otros estudios para lograr encontrar la causa de esta asociación y conocer cuánto se utilizan estos antibióticos en los animales.

Finalmente, es alarmante la proporción de aislamientos multirresistentes, lo que justifica investigaciones futuras para poder evaluar cómo evoluciona esta situación en la Región Metropolitana, y expandir el estudio a nivel nacional.

Por la evidencia expuesta anteriormente, se hace necesario establecer una red de vigilancia de la resistencia bacteriana integrada que monitoree aislados obtenidos desde animales, humanos y ambientes en nuestro país. Esta información debe ser representativa de la realidad nacional, confiable y estandarizada, lo que permitirá obtener un diagnóstico del problema de la resistencia bacteriana en Chile, y que luego tenga el rol de evaluar la efectividad de las medidas implementadas, con el fin de proteger la salud humana, animal y medioambiental.

8. CONCLUSIONES

1. Existe una gran variedad de serotipos de *Salmonella* en las muestras obtenidas de algunos cauces de río y canales de la Región Metropolitana, siendo el serotipo predominante *S. Typhimurium*.
2. Todas las bacterias del género *Salmonella* aisladas desde los cauces de río y canales de la Región Metropolitana fueron resistentes al menos a 1 antimicrobiano, y el 89% presentó multirresistencia.
3. Los antimicrobianos que exhibieron los mayores porcentajes de cepas resistentes fueron: Estreptomicina, Ceftiofur y Kanamicina.
4. No se detectaron cepas resistentes a Cloranfenicol.
5. La naturaleza ubicua de *Salmonella* en el agua y el predominio de serotipos de importancia para la salud humana y/o veterinaria, sugieren que la exposición del medio ambiente a través del consumo o contacto con agua contaminada es un riesgo para la población y para los animales, ya que estas corrientes pueden actuar como un vehículo para la difusión de estos organismos patógenos y sus genes de resistencia entre diferentes hospedadores o entornos.
6. Finalmente, la hipótesis de nuestro trabajo se descarta luego del análisis estadístico, si bien es cierto hay presencia de cepas multirresistentes, pero no están asociadas al área geográfica.

9. BIBLIOGRAFÍA

ASOCIACIÓN NACIONAL DE EMPRESAS DE SERVICIOS SANITARIOS (ANDESS A.G.). 2013. Informe de gestión de la sequía 2014. [en línea] <
<http://www.andess.cl/descargas/noticias/201401-INFORME-GREMIAL-SEQUIA-ANDESS-ENERO-2014.pdf>> [Consulta: 12-04-2015].

BADA-ALAMBEDJI, R.; FOFANA, A.; SEYDI, M.; AKAKPOM, A. 2006. Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Poultry Carcasses in Dakar (Senegal). *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(4):510-515.

BAGUDO, A.; TAMBUWAL, F.; FALEKE, O.; EGWU, O.; ALIERO A. 2014. Prevalence of *Salmonella* serotypes in Sokoto abattoir effluents and vegetables cultivated around the abattoir. *Microbiology Research International*. Sokoto, Nigeria. 2(2): 13-17.

BRICEÑO, L.; NARVÁEZ, C.; RODAS, A.; WITTUM, T.; HOET, A. 2007. Resistencia a las fluoroquinolonas y otros antimicrobianos en cepas de *Salmonella* spp. aisladas en el procesamiento de pollo entero. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, Venezuela*. 17(5): 521 – 528.

CARDOSO, M. 2012. Revisión de la definición del espacio rururbano y sus criterios de delimitación. *Contribuciones Científicas GÆA*. 24: 27-39.

CEBRIAN, L.; RODRÍGUEZ, J.C.; ESCRIBANO, I.; RUIZ, M.; ROYO, G. 2006. Disminución de la actividad bactericida del ciprofloxacino en mutantes de *Salmonella* generados tras exposición repetida a diversas fluoroquinolonas. *Revista Española de Quimioterapia*. 19(4): 363-366.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2011. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food -- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996--2010. [en línea] <
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6022a5.htm>> [Consulta: 22-04-2015].

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. 27(3): 1-182.

COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (CONICYT). 2008. Manual de normas de bioseguridad. [en línea]. <http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/09/articles-30555_recurso_1.pdf> [Consulta: 26-05- 2015].

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. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 753-761.

DUFFY, E.; LUCIA, L.; KELLS, J.; CASTILLO, A.; PILLAI, S.; ACUFF, G. 2005. Concentration of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas. *Journal of Food Protection*. 68:70-79.

DORNER, S.; HUCK, O.; SLAWSON, R.; GAULIN, T.; ANDERSON, W. 2004. Assessing levels of pathogenic contamination in a heavily impacted river used as a drinking-water source. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 67:1813–1823

FAO/OIE/OMS. 2008. Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Nota informativa N° 2/2008 – Resistencia a los antimicrobianos: “Resistencia a los antimicrobianos transferida por animales productores de alimentos”. [en línea] <
http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_02_Antimicrobial_Mar08_ES.pdf> [Consulta: 07-05-2015].

JOHNSON, J.; THOMAS, J.; GRAHAM, T.; TOWNSHEND, I.; BYRNE, J.; SELINGER, L.; GANNON, V. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in surface waters of southern Alberta and its relation to manure sources. *Canadian Journal of Microbiology*. 49(5):326-335.

- LERTWORAPREECHA, M.; SUTTHIMUSIK, S.; TONTIKAPONG, K.** 2013. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated From Pork, Chicken, and Vegetables in Southern Thailand. Jundishapur. Journal of Microbiology. 6(1): 36-41.
- LEVANTESI, C.; BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; GROHMANN, E.; TOZE, S.; TANDOI, V.** 2012. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. Food Research International. 45: 587–602.
- LI, B.; VELLIDIS, G.; LIU, H.; JAY-RUSSELL, M.; ZHAO, S.; HU, Z.; WRIGHT, A.; ELKINS, C.** 2014. Diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from surface water in southeastern United States. Applied and Environmental Microbiology. 80(20): 6355–65.
- LÓPEZ, O.; LEÓN. J.; JIMÉNEZ, M.; CHAIDEZ. C.** 2009. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia Coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. Revista Fitotecnia Mexicana. 32 (2): 119-126.
- MARSHALL, B.; LEVY, S.** 2011. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. Clinical Microbiology Reviews. 24(4): 718-733.
- MEJIA, W.; CALATAYUD, D.; ZAPATA, D.; QUINTERO, A.; SANCHEZ, A.; MATEU, E.** 2008. Sensibilidad a los antimicrobianos de cepas de *salmonella* aisladas en granjas porcinas del estado Zulia. Revista Científica, Maracaibo. 18(6): 674-681.
- MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 2014. Informe Situación Epidemiológica Brotes enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) SE 29 2014. Santiago, Chile.
- NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM (NARMS).** 2012. Human Isolates Final Report. [en línea] <<http://www.cdc.gov/narms/pdf/2012-annual-report-narms-508c.pdf>> [consulta: 13- 07- 2015].
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO).** 2013. Reutilización del agua en la agricultura: ¿beneficios para todos?. [en línea] <<http://www.fao.org/docrep/017/i1629s/i1629s.pdf>> [consulta: 02- 05-2015].

PACHEPSKY, Y.; SHELTON, D.; MCLAIN, J.; PATEL, J.; MANDREL, R. 2011. Irrigation Waters as a Source of Pathogenic Microorganisms in Produce: A Review. **In:** Advances in Agronomy. Elsevier, USA. 113: 73-138.

PARRY, C.; VU, N.; DOLECEK, C.; KARLEY, A.; GUPTA, R.; TURNER, P.; DANCE, D.; MAUDE, R.; HA, V.; TRAN, R.; LE, P.; VAN BE, B.; THI, L.; NGOC, R.; GHOSE, A.; DONGOL, S.; CAMBELL, J.; THANH, D.; THANH, T.; MOORE, C.; SONA, S.; GAIND, R.; DEB, M.; ANH, H.; VAN, S.; TINH, H.; DAY, N.; DONDORP, A.; THWAITES, G.; FAIZ, M.; PHETSOUVANH, R.; NEWTON, P.; BASNYAT, B.; FARRAR, J.; BAKER, S. 2015. Clinically and Microbiologically Derived Azithromycin Susceptibility Breakpoints for *Salmonella enterica* Serovars Typhi and Paratyphi. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 59 (5): 2756-2764.

PATCHANEE, P.; MOLLA, B.; WHITE, N.; LINE, D.; GEBREYES, W. 2010. Tracking *Salmonella* contamination in various watersheds and phenotypic and genotypic diversity. Foodborne Pathogens and Disease. 7 (9):1113-1120.

RADHOUANI, H.; SILVA, N.; POETA, P.; TORRES, C.; CORREIA, S.; IGREJAS, G. 2014. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. Frontiers in Microbiology. 5 (23): 3-8.

THOMAS, J.; SLAWSON, R.; TAYLOR, W. 2013. *Salmonella* serotype diversity and seasonality in urban and rural streams. Journal of Applied Microbiology .114 (3): 907–922.

TORO, M.; SERAL, C.; ROJO, B.; TORRES, C.; CASTILLO, F.; SAENZA, Y. 2014. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 32(1): 4-10.

ANEXO

Anexo 1: Certificado de Bioseguridad



CERTIFICADO N° 62

Santiago, 26 de octubre de 2015

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto de memoria de título denominado: "DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS Y CARACTERIZACIÓN DEL ENTORNO GEOGRÁFICO EN CEPAS DE Salmonella spp. AISLADAS DESDE CAUCES DE AGUA DE LA REGION METROPOLITANA.", del alumno Sr. Javier Valenzuela F, cuyo profesor guía es la Dra. Lisette Lapierre.

En el proyecto se estipulan entre otras, las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El Personal recibirá una inducción en normas de bioseguridad. Se utilizará vestimenta adecuada para realizar el trabajo en el laboratorio, delantal, guantes etc. Restricción de acceso al laboratorio.
- 2.- Los mesones y dependencias se desinfectaran con alcohol previo y posterior a su uso.
- 3.- Los desechos biológicos serán autoclavados previo a su eliminación.

El proyecto de memoria de título fue revisado por el comité en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.


DR. JOSÉ PIZARRO

Integrante del Comité de Bioseguridad
FAVET



Anexo 2. Antimicrobianos evaluados y significancia (valor de p) para su asociación con los serotipos en estudio.

| Antimicrobiano | p |
|------------------------------|------|
| Ampicilina | 0,39 |
| Amoxicilina/ Ác. Clavulánico | 0,99 |
| Gentamicina | 0,13 |
| Tetraciclina | 0,96 |
| Sulfametazol/Trimetoprim | 0,99 |
| Estreptomicina | 0,99 |
| Enrofloxacino | 0,1 |
| Cefadroxilo | 0,46 |
| Ceftiofur | 0,18 |
| Cloranfenicol | 0,6 |
| Amikacina | 0,28 |
| Azitromicina | 0,19 |
| Ceftriaxona | 0,45 |
| Ciprofloxacino | 0,22 |
| Kanamicina | 0,53 |
| Ácido Nalidíxico | 0,26 |
| Sulfisoxazole | 0,34 |