



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

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA A  
ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE  
MUESTRAS DE HECES DE BOVINOS DE COMUNAS RURALES DE  
LA REGIÓN METROPOLITANA DE CHILE**

**Belén Monserrat Agüero Aguirre**

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

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL MERINO  
Universidad de Chile

Financiamiento Proyecto FONIS SA15I10094

SANTIAGO, CHILE  
2018



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

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE RESISTENCIA A  
ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE  
MUESTRAS DE HECES DE BOVINOS DE COMUNAS RURALES DE  
LA REGIÓN METROPOLITANA DE CHILE**

**Belén Monserrat Agüero Aguirre**

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

**Nota Final: .....**

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

SANTIAGO, CHILE  
2018

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi familia, por haber creído en mí mucho antes de lo que yo misma comencé a hacerlo;  
por su paciencia y sacrificio que me acompañarán siempre.*

*A la familia Berríos Oyarzún, por haber hecho mi viaje más tranquilo con su comprensión  
e infaltable apoyo.*

*Y a mis amigos, a todos. El camino es siempre mejor cuando se recorre acompañado.*

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<i>Salmonella spp.</i> .....	7
Prevalencia en animales .....	8
Prevalencia en humanos.....	8
Resistencia a antimicrobianos .....	9
<b>HIPÓTESIS</b> .....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
Obtención de muestras .....	12
Aislamiento e identificación de <i>S. enterica</i> .....	12
Resistencia a antimicrobianos .....	13
<b>RESULTADOS</b> .....	15
<b>DISCUSIÓN</b> .....	21
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	24
<b>ANEXOS</b> .....	25
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	28

## RESUMEN

*Salmonella enterica* es rutinariamente encontrada en el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de animales y generalmente no causa enfermedad en ellos. Sin embargo, cuando causa enfermedad, las manifestaciones comunes de salmonelosis en el ganado incluyen diarrea, neumonía, abortos y muerte. En humanos, normalmente se presenta como gastroenteritis autolimitada; no obstante, en niños, pacientes inmunodeprimidos o ancianos, puede llevar a la muerte, si no es tratada apropiadamente. Esta investigación busca detectar y caracterizar la resistencia antimicrobiana de *S. enterica* en muestras de heces de bovinos de comunas rurales de la Región Metropolitana, Chile. Para ello se obtuvieron 670 muestras de heces ambientales de bovinos de lechería, en un total de 14 muestreos en 4 localidades: María Pinto, Peñaflo, Melipilla e Isla Maipo. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde se realizó el aislamiento y confirmación por PCR, y posteriormente se analizaron en cuanto a su resistencia a antimicrobianos.

Se registró un 6,7% de detección, de las cuales un 54% correspondió a *S. enterica* ser. Livingstone, 39% a *S. enterica* ser. Typhimurium y 7% a *S. enterica* ser. Infantis; con una detección de 6,7% en Isla Maipo, 9,2% en Peñaflo y 0% para Melipilla y María Pinto. Los mayores índices de resistencia antimicrobiana se presentaron contra ciprofloxacino, tetraciclina y cefotaxima, expresados en 8 perfiles distintos. Se encontró asociación estadísticamente significativa entre las variables lugar de detección, perfiles de resistencia y serotipos detectados. Si bien los valores de resistencia y multiresistencia a antimicrobianos encontrados no son excepcionalmente altos, es importante destacar que esto no debe ser motivo de disminución de la atención a esta bacteria, debido a los índices y alertas internacionales.

## ABSTRACT

*Salmonella enterica* is routinely found in the gastrointestinal tract of a wide variety of animals and generally does not cause disease. However, when it causes, common manifestations of salmonellosis in cattle include diarrhea, pneumonia, abortions and death. In humans, it usually presents as self-limited gastroenteritis; but, in children, immunosuppressed or elderly patients, it can lead to death, if not treated properly. This research seeks to detect and characterize the antimicrobial resistance of *S. enterica* in stool samples of bovines from rural communes of the Metropolitan Region, Chile. For this, 670 samples of environmental feces of dairy cattle were obtained, in a total of 14 samplings from dairies located in 4 localities: María Pinto, Peñaflor, Melipilla and Isla Maipo. The samples were processed in the Laboratory of Infectious Diseases, in the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the University of Chile, where the isolation and confirmation was carried out by PCR, and later they were analyzed in terms of their antimicrobial resistance.

There was a 6.7% detection, of which 54% corresponded to *S. enterica* ser. Livingstone, 39% to *S. enterica* ser. Typhimurium and 7% to *S. enterica* ser. Infantis; obtaining a detection of 6.7% in Isla Maipo, 9.2% in Peñaflor and 0% for Melipilla and María Pinto. The highest resistance indices were presented to ciprofloxacin, tetracycline and cefotaxime, expressed in 8 different profiles. A statistically significant association was found between the variables detection site, resistance profiles, and serotypes detected. Although the values of resistance and multiresistance to antimicrobials found are not exceptionally high, it is important to emphasize that this should not be the reason for diminishing attention to this bacterium, in response to international indicators and alerts.

## INTRODUCCIÓN

La historia de contacto entre animales y humanos siempre ha involucrado enfermedades infecciosas, y hoy más de la mitad de las enfermedades infecciosas de los humanos son zoonóticas en su origen; por lo que es evidente plantear y actualizar constantemente la investigación en esta área como un importante aporte a la salud pública.

Por otra parte, el desarrollo de resistencia a antimicrobianos en poblaciones bacterianas es actualmente un problema grave en el área de la salud. En este ámbito es necesario el poder detectar y caracterizar poblaciones bacterianas con fenotipos de resistencia, en especial aquellas que presentan altas probabilidades de afectar a seres humanos, como son los microorganismos zoonóticos presentes en animales de granja.

Los enteropatógenos constituyen un grupo de gran relevancia, cuya situación epidemiológica requiere una caracterización permanente, pues sólo con información actualizada se pueden desarrollar planes eficaces de vigilancia y control de las enfermedades que éstos causan. Esta investigación se centra en un enteropatógeno de reconocido impacto en la salud pública, como es *Salmonella enterica*. Para ello, se tomarán muestras ambientales de heces de animales de granja en comunas rurales de la Región Metropolitana de Chile con el fin de detectar la posible resistencia fenotípica a antimicrobianos que posee; enmarcado dentro del proyecto FONIS SA15I10094 “Identificación de factores de riesgo asociado a la contaminación de predios agrícolas con agentes patógenos zoonóticos”

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### *Salmonella spp.*

El género *Salmonella* contiene 2 especies, *S. bongori* y *S. enterica* (Dykes, 2016); éste se subdivide en más de 2500 serovares basados en características antigénicas. *S. enterica* y sus serovares son las más comúnmente asociadas con enfermedades humanas (Fanning *et al.*, 2015). Las células de *Salmonellae* tienen 2–3,4 µm de longitud y 0,7–9,0 µm de diámetro, con los extremos redondeados. La mayoría tiene flagelos peritricos. El crecimiento óptimo se produce dentro de un rango de pH desde 6,5 a 9,0 y en un rango de temperatura de 30-37°C; no crece a pH <3,5 y >9,5 como tampoco a temperaturas <10°C y >42°C. Es ácido tolerante y puede crecer en el límite inferior de pH de 3,7-4,4 (Fanning *et al.*, 2015).

*S. enterica* es rutinariamente encontrada en el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de animales y generalmente no causa enfermedad en ellos, sin embargo, cuando causa enfermedad, las manifestaciones clínicas comunes de infección por *Salmonella* en el ganado incluye diarrea, neumonía, abortos y muerte. Esta infección en ganado lechero es también asociada con disminución en la producción de leche (Valenzuela *et al.*, 2017).

En la mayoría de los casos humanos, se presenta como gastroenteritis autolimitada (ISP, 2014); sin embargo, en los lactantes, en los ancianos, en los pacientes inmunodeprimidos o en programa de hemodiálisis puede acompañarse de bacteriemia y producir osteoartritis, endocarditis o infección de prótesis vasculares (Pérez *et al.*, 2014). Anualmente, en Estados Unidos se producen 100.000 casos de infecciones aprox. por cepas resistentes de *Salmonella* no tifoidea. Los costos médicos directos son estimados en \$365 millones de dólares anuales (CDC, 2013). La mayor parte de las infecciones se adquieren por ingesta de alimentos contaminados, siendo las aves, los huevos y los productos lácteos los más frecuentes; mientras que en los niños se produce por una transmisión directa vía fecal-oral (Pérez *et al.*, 2014). En seres humanos, *S. enterica* causa enfermedades incluyendo fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea e intoxicaciones de origen alimentario. La salmonelosis no

tifoidea es transmitida por alimentos, y consecuentemente, la cadena alimentaria es una ruta de infección para los humanos. Signos clínicos asociados con salmonelosis incluyen diarrea, deshidratación, fiebre y dolor abdominal de hasta 7 días (Fanning *et al.*, 2015).

### **Prevalencia en animales**

En Estados Unidos, en un estudio realizado en 57 rebaños de vacas lecheras, la prevalencia de *Salmonella* en heces dentro de rebaño varió en un rango de 0 a 53%; y la resistencia a antimicrobianos presentó un rango de 0 a 9 antimicrobianos, donde 14 (32%) de las granjas positivas mostraron aislados multiresistentes, considerando la multiresistencia como resistencia *in vitro* a cinco o más agentes antimicrobianos (Cummings *et al.*, 2010).

Por otra parte, el análisis de presencia de *Salmonella spp.* en rebaños lecheros de Francia realizado por Lailier *et al.* (2005) indicó que, de 489 rebaños analizados, 35 tenían estiércol o purines contaminados con *Salmonella*. Cepas multiresistentes a antimicrobianos fueron aisladas en 9 de los 35 rebaños contaminados. La prevalencia de *Salmonella spp.* y las estimaciones de prevalencia de cepas multiresistentes en estos rebaños fue, respectivamente de, 8,1% y 1,9%.

En Chile, el estudio en 28 rebaños lecheros de la Región de Los Lagos, realizado por Barrientos (2005) consideró muestras fecales de terneros entre 1 semana y 3 meses de vida, arrojando 4 predios positivos a *Salmonella spp.*, correspondiendo al 28% de los predios estudiados; aparte de esta información, en Chile existe una escasez de conocimiento de *Salmonella* en granjas lecheras (Dueñas *et al.*, 2017).

### **Prevalencia en humanos**

*Salmonella* no tifoidea causa aproximadamente 1.2 millones de casos de enfermedad, 23.000 hospitalizaciones y 450 muertes cada año en Estados Unidos. Cerca del 5% de las cepas de *Salmonella* no tifoidea testeadas en “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), son resistentes a 5 o más antimicrobianos (Anexo 1) (CDC, 2013).

En Chile, en el periodo enero 2009 a julio 2014, se confirmaron 16.214 cepas de *Salmonella spp.* provenientes de aislamientos de origen clínico, de los cuales, el 23,0% fue identificado en niños de 0 a 4 años, seguido por el grupo de 5 a 9 años con el 14,2% del total. En el periodo de estudio, el 65,3% de las cepas confirmadas de *Salmonella spp.* correspondió a *S. enterica* ser. Enteritidis, el 12,7% a *S. enterica* ser Typhimurium, el 2,2% a *S. enterica* ser Typhi y el 2,0% a *S. enterica* ser Paratyphi (Anexo 2) (ISP, 2014). Durante el año 2015 se notificaron 1.086 brotes de ETA, de estos, un 27% de ellos cuenta con confirmación diagnóstica específica para un determinado agente, en los que en primer lugar se encuentra la infección por *Salmonella spp.* con 74 brotes por esta causa (Anexo 3) (MINSAL, 2016).

### **Resistencia a antimicrobianos**

La transmisión de bacterias resistentes de animales a humanos puede ocurrir a través del contacto directo con heces animales que portan cepas resistentes, así como también indirectamente a través de productos alimenticios o agua contaminada (Silberged *et al.*, 2008). El género *Salmonellae* es considerado en prioridad 2: Elevada por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos (OMS, 2017). La resistencia a antimicrobianos en serotipos de *Salmonella* no-tifoidea, es un problema en expansión. El surgimiento y diseminación de cepas bacterianas resistentes y multiresistentes constituyen un riesgo para la salud humana y animal debido al incremento en morbilidad, mortalidad y en el costo asociado al tratamiento de las infecciones (EFSA, 2014).

Según los datos publicados en el Reporte Resumido de la Unión Europea (EUSR) sobre Resistencia a Antimicrobianos (AMR) en Bacterias Zoonóticas e Indicadoras en Humanos, Animales y Alimentos 2015, la proporción de *Salmonella spp.* multiresistente, aisladas de carcasas de bovinos menores a un año de edad, varían desde cero de los aislados examinados en Bélgica, aunque sólo se testearon tres aislados, hasta niveles muy altos

(54,5-55,6%) en aquellos aislados testeados en Croacia y España (Anexo 4). Dentro del mismo estudio, se puede ver que los resultados de aislados en humanos indican que la más alta proporción de resistencia en *Salmonella spp.* en 2015 fue para sulfonamidas/sulfamethoxazole (32,4%), tetraciclinas (28,1%) y ampicilina (27,8%); la resistencia a ciprofloxacino fue reportada en 13,3% de los aislados, y la resistencia a cefotaxima o ceftazidima en un 0,9%. Estos antimicrobianos representan las clases clínicamente más importantes (fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación) para el tratamiento de salmonelosis (EFSA y ECDC, 2017).

En una investigación reciente en la Región Metropolitana de Chile, realizada por Martínez *et al.* (2016), se obtuvieron 35 aislamientos de cepas de *Salmonella spp.* a partir de muestras de agua, de 19 sitios de muestreo, en los que la frecuencia de detección fue mayor en las zonas rurales (61,9%) que en los sitios urbanos o periurbanos (31,6%). Pulsotipos de siete cepas de *Salmonella spp.*, que pertenecen a los serotipos Enteritidis, Typhimurium e Infantis, eran idénticos a los aislados clínicos de brotes detectados en humanos; por lo que se sugiere una posible dispersión ambiental de las cepas a través de las aguas residuales o el escurrimiento desde las granjas de producción animal. Con estos datos, resulta evidente la necesidad de realizar investigaciones actualizadas sobre *Salmonella spp.* en animales de granja, en especial en zonas agropecuarias de importancia a nivel nacional, y su caracterización respecto a la resistencia a antimicrobianos.

## **HIPÓTESIS**

Existen cepas de *S. enterica* con fenotipos de multiresistencia antimicrobiana en heces de bovinos de comunas rurales de la Región Metropolitana de Chile.

## **OBJETIVO GENERAL**

Detectar y caracterizar la resistencia antimicrobiana de *S. enterica* en muestras de heces de bovinos de comunas rurales de la región Metropolitana, Chile.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la presencia de cepas de *S. enterica* en muestras de heces de bovinos de comunas rurales de la región Metropolitana, Chile.
2. Caracterizar la resistencia a antimicrobianos de cepas de *S. enterica* en muestras de heces de bovinos de comunas rurales de la región Metropolitana, Chile.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de muestras**

Para la realización de esta Memoria de Título, se obtuvieron 670 muestras de heces ambientales de bovinos de lechería, en un total de 14 muestreos, entre mayo de 2016 y abril de 2017. Este número fue calculado mediante el programa “EpiTools epidemiological calculators” (Sergeant, 2017), considerando la detección de al menos 20 cepas de *Salmonella spp.*, en una población con un 5% de prevalencia y una confianza de 95%. Estas muestras fueron tomadas desde lecherías ubicadas en 4 localidades: María Pinto, Peñaflores, Melipilla e Isla Maipo, todas dentro de la Región Metropolitana, las cuales son consideradas zonas de riesgo al presentar *Salmonella spp.* en cauces de agua, tomando en cuenta los resultados obtenidos por Martínez *et al.* (2016) (Anexo 5).

Las muestras recolectadas proceden de animales de granja que beben agua de los canales considerados de riesgo. Estas muestras fueron tomadas con tómulas con medio Cary Blair y bolsas, luego transportadas debidamente etiquetadas y a temperatura de refrigeración, hasta el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, del departamento de Medicina Preventiva Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile, donde fueron procesadas.

### **Aislamiento e identificación de *S. enterica***

Siguiendo el protocolo utilizado por Marchant *et al.* (2016), las muestras tomadas fueron resuspendidas en suero fisiológico, para luego ser pre-enriquecidas en agua peptonada tamponada (Difco™ Buffered Peptone Water), a la cual se le agregó 20 µg/ml de novobiocina estéril, y fueron incubadas a 37°C por 24 hrs. Una alícuota de esta suspensión se inoculó sobre el medio semisólido Rappaport Vassiliadis (Difco™ MSR) suplementado con novobiocina a 20 µg/ml, para luego ser incubado a 41,5°C por 24 a 48 hrs.

Los crecimientos que presentaron una zona de migración fueron considerados sospechosos, traspasados a medio Xylose Lysine Deoxycholate (Difco™ XLD) e incubados a 37°C por 24 hrs. Las colonias sospechosas, de color rosadas con centro negro o sin él, se analizaron por PCR considerando una colonia por muestra, para detección del gen *invA*. Para ello, una colonia seleccionada de la placa de XLD, fue transferida a un tubo con 100 microlitros de agua libre de nucleasas. Este tubo fue incubado a 100°C en un baño de agua durante 10 minutos y posteriormente refrigerado. El posterior procesamiento en termociclador y lectura de gel de agarosa, se hizo siguiendo los lineamientos indicados por Marlony *et al.* (2003).

### **Resistencia a antimicrobianos**

Las cepas, considerando una por cada muestra, que fueron identificadas como *S. enterica* según los pasos mencionados anteriormente, se sometieron al ensayo Kirby-Bauer, según protocolo indicado por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2015).

Para la preparación del inóculo se utilizaron placas cultivadas, de las que se seleccionaron 3 a 5 colonias bien aisladas que fueron transferidas, como pool mediante un asa estéril, a un tubo con 5ml de agua peptonada tamponada (Difco™ Buffered Peptone Water), el cual fue posteriormente incubado a 37°C por 24 hrs. Luego del cultivo, se ajustó la turbidez del caldo, hasta alcanzar la turbidez standard de 0,5 McFarland, correspondiente a una OD<sub>600</sub> de 0,25 (1-5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Una vez alcanzada la turbidez indicada en el caldo, se procedió a sembrar un inóculo de esta solución en placas de agar Mueller-Hinton (MHA Difco™), estandarizadas a una profundidad de 4mm. aprox. En estas placas ya sembradas, se dispusieron los discos antimicrobianos, y se cultivaron a 37°C por 16-18hrs.

Los antimicrobianos testeados fueron: cefotaxima 30µg (Oxoid®), ceftiofur 30µg (Oxoid®), gentamicina 10µg (Oxoid®), ciprofloxacino 5µg (Oxoid®), sulfametoxazol mas trimetoprim 10µg (Oxoid®), tetraciclina 30µg (Oxoid®), cloranfenicol 30µg (Oxoid®), amoxicilina con ácido clavulánico 30µg (Oxoid®), amikacina 30µg (Oxoid®) y kanamicina 30µg (Oxoid®); seleccionados en base al uso de estos fármacos en medicina

humana y veterinaria a nivel nacional, y a lo señalado en el CLSI. Todo lo anterior, considerando como cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para la lectura de resultados se examinó cada placa, midiendo las zonas de inhibición resultantes con un piedemetro. Los valores fueron interpretados según referentes internacionales (Anexo 6) (NCCLS, 2002) (CLSI, 2015), y se clasificaron como cepas sensibles (S) o resistentes (R). Los valores que correspondían a sensibilidad intermedia (SI) fueron considerados como resistentes para la presentación de resultados. Se evaluó multiresistencia, considerando a una cepa como multiresistente en caso que presente resistencia a 3 o más familias de antimicrobianos. Con estos resultados se agruparon las distintas cepas según sus perfiles de resistencia.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa Infostat® (v2010) en tablas de contingencia para análisis de datos categóricos, utilizando el estadístico de X<sup>2</sup>.

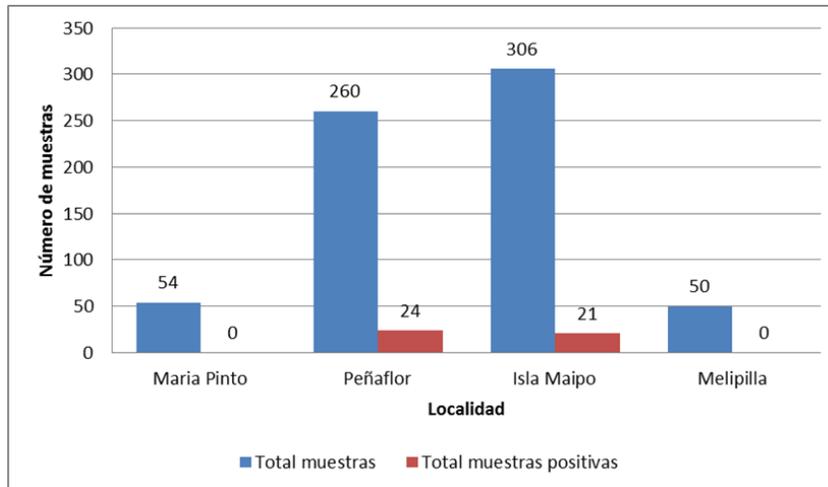
## RESULTADOS

Se obtuvo un total de 670 muestras de heces, descrito en la tabla 1. La mayor proporción de muestras positivas se encontró en la comuna de Peñaflores (figura 1). Se registró un total de 45 (6,7%) muestras positivas a *Salmonella spp.*; una cepa sin serotipificación, y las 44 restantes correspondieron en un 54% a *S. enterica* ser. Livingstone, 39% a *S. enterica* ser. Typhimurium y 7% a *S. enterica* ser. Infantis.

**Tabla 1: Detalle de muestreos de heces en distintas localidades rurales de la región Metropolitana, para la detección de *Salmonella spp.*, entre mayo de 2016 y abril del 2017.**

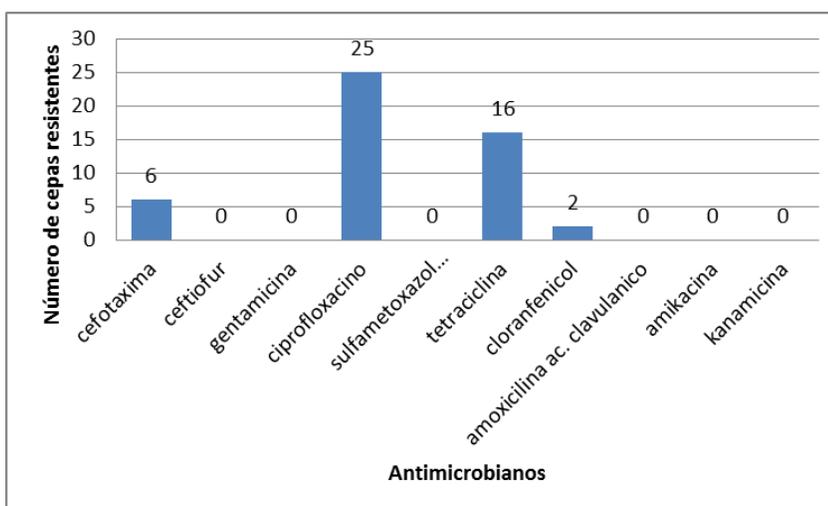
Fecha del muestreo	Localidad	N° muestras tomadas	N° muestras positivas	Serotipificación
02-05-2016	María Pinto	26	0	
02-05-2016	Peñaflores	50	0	
28-06-2016	Isla Maipo	68	1	Sin Serotipificación
18-07-2016	Isla Maipo	38	0	
05-09-2016	Peñaflores	60	0	
12-09-2016	Isla Maipo	50	0	
21-11-2016	Isla Maipo	50	0	
28-11-2016	Peñaflores	50	0	
09-01-2017	María Pinto	28	0	
18-01-2017	Peñaflores	50	14	<i>S. enterica</i> ser. Livingstone
23-01-2017	Melipilla	50	0	
13-03-2017	Isla Maipo	50	3	<i>S. enterica</i> ser. Infantis
27-03-2017	Peñaflores	50	10	<i>S. enterica</i> ser. Livingstone
04-04-2017	Isla Maipo	50	17	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium
	<b>Totales</b>	<b>670</b>	<b>45</b>	<b>3 serotipos</b>

**Figura 1: Número de muestras por localidad y número de detecciones de *Salmonella spp.* en heces de bovinos de zonas rurales de la región Metropolitana; entre mayo de 2016 y abril de 2017.**

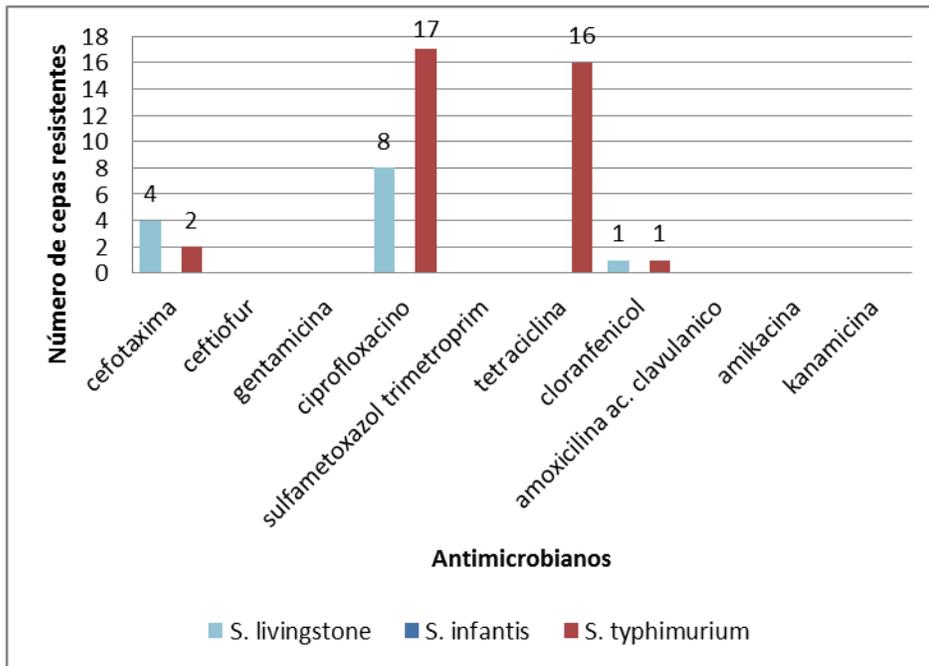


Se detectó resistencia a ciprofloxacino, seguido por tetraciclina, cefotaxima y cloranfenicol (figura 2), siendo el serotipo Typhimurium el que presenta mayores índices de resistencia (figura 3).

**Figura 2: Número de cepas resistentes por antimicrobiano de cepas detectadas de *Salmonella spp.* en heces de bovinos de zonas rurales de la región Metropolitana; entre mayo de 2016 y abril de 2017.**

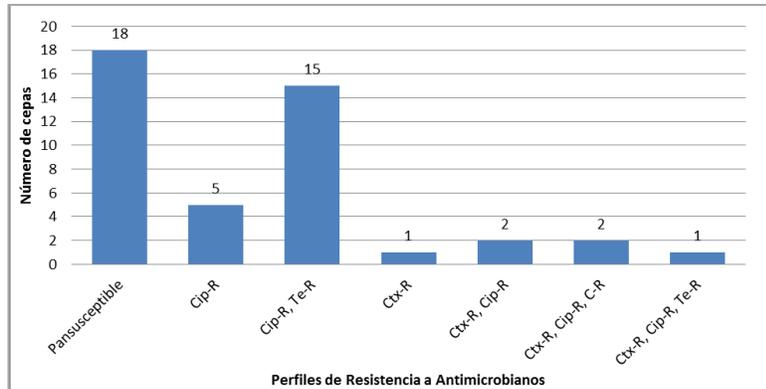


**Figura 3: Número de cepas resistentes por antimicrobiano en relación a los serotipos de las cepas detectadas de *Salmonella spp.* en heces de bovinos de zonas rurales de la región Metropolitana; entre mayo de 2016 y abril de 2017.**



En la agrupación de perfiles de resistencia, se observa la predominancia del perfil pansusceptible, seguido por el perfil resistente a ciprofloxacino y tetraciclina. A partir de los resultados obtenidos, se aprecia un 59% de resistencia a antimicrobianos (26/44), y un 6,8% de cepas que presentan multiresistencia (3/44) (Figura 4).

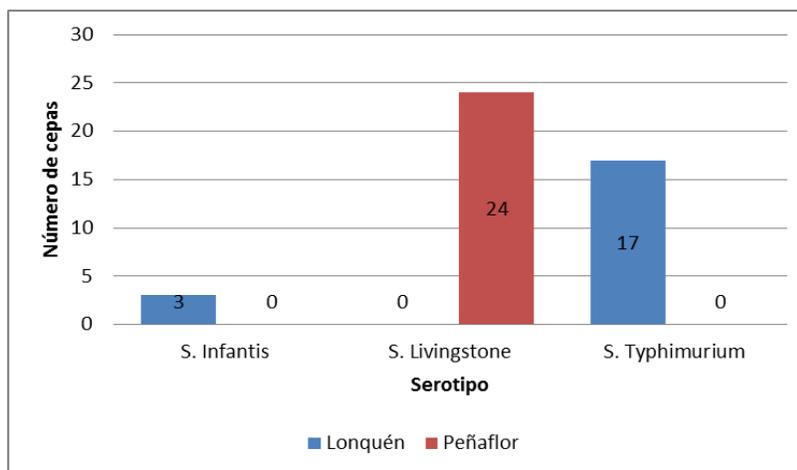
**Figura 4: Perfiles de resistencia a antimicrobianos de cepas detectadas de *Salmonella spp.* en heces de bovinos de zonas rurales de la región Metropolitana; entre mayo de 2016 y abril de 2017.**



\*CTX, cefotaxima; EFT, ceftiofur; CN, gentamicina; CIP, ciprofloxacino; ENR, enrofloxacin; STX, sulfametoxazol mas trimetoprima; TE, tetraciclina; C, cloranfenicol; AMC, amoxicilina con ácido clavulánico; AK, amikacina; K, kanamicina. S, sensible; R, resistente.

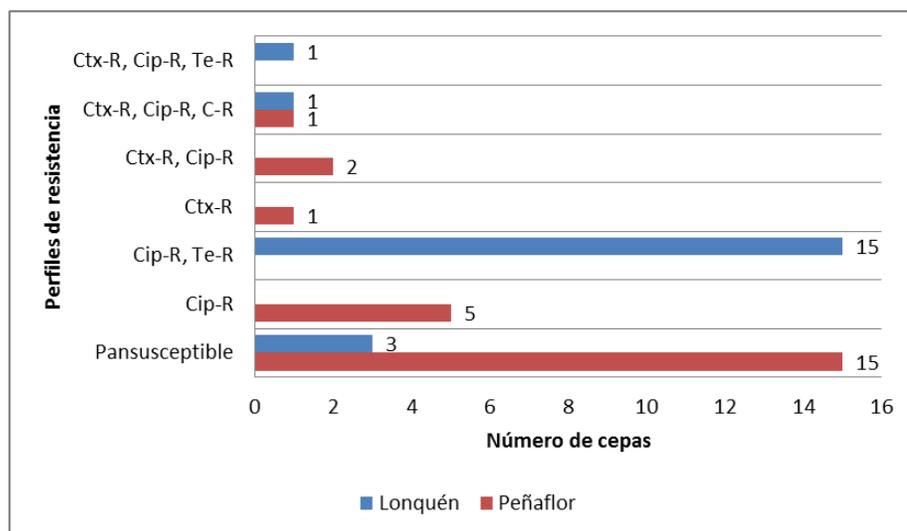
En el análisis estadístico se encontró asociación significativa ( $p < 0,05$ ) entre las variables serotipo de las cepas y lugar de detección, como se aprecia en la figura 5.

**Figura 5: Serotipos de *Salmonella spp.* detectados en heces de bovinos de zonas rurales de la región Metropolitana; entre mayo de 2016 y abril de 2017, en relación a su lugar de detección.**



En cuanto al análisis del lugar de detección y los perfiles de resistencia a antimicrobianos detectados, se encuentra que también existe asociación significativa ( $p < 0,05$ ) (figura 6).

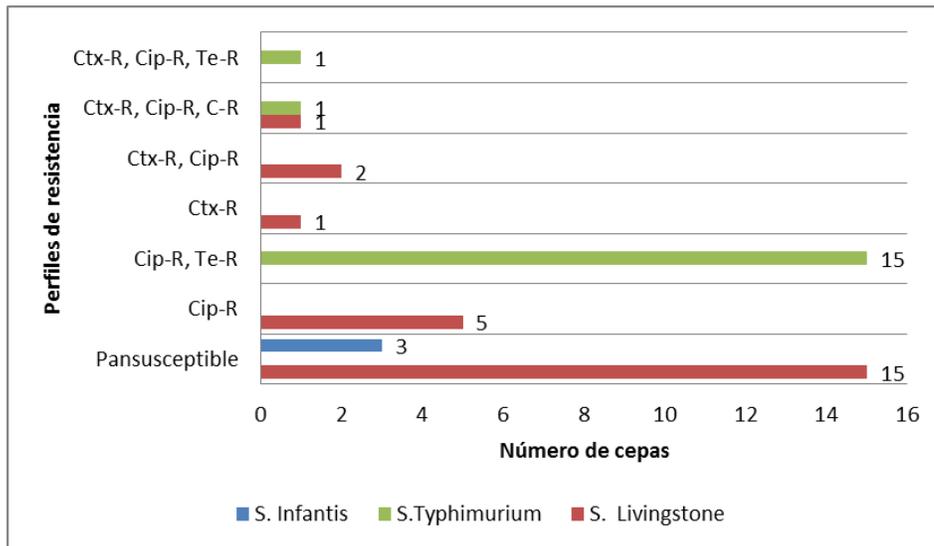
**Figura 6: Perfiles de resistencia a antimicrobianos de cepas de *Salmonella spp.* detectadas en heces de bovinos de zonas rurales de la región Metropolitana; entre mayo de 2016 y abril de 2017, en relación a su lugar de detección.**



\*CTX, cefotaxima; EFT, ceftiofur; CN, gentamicina; CIP, ciprofloxacino; ENR, enrofloxacino; STX, sulfametoxazol mas trimetoprima; TE, tetraciclina; C, cloranfenicol; AMC, amoxicilina con ácido clavulánico; AK, amikacina; K, kanamicina. S, sensible; R, resistente.

Por último, en el análisis de perfiles de resistencia a antimicrobianos y serotipos de las cepas detectadas también se encontró asociación ( $p < 0,05$ ). Destaca que las tres cepas del serotipo Infantis se presentan completamente susceptibles, mientras que para el serotipo Typhimurium se presentan todas sus cepas con resistencia a dos o más antimicrobianos (figura 7).

**Figura 7: Perfiles de resistencia a antimicrobianos pertenecientes a cepas de *Salmonella spp.* detectadas en heces de bovinos de zonas rurales de la región Metropolitana; entre mayo de 2016 y abril de 2017, en relación a sus serotipos.**



\*CTX, cefotaxima; EFT, ceftiofur; CN, gentamicina; CIP, ciprofloxacino; ENR, enrofloxacin; STX, sulfametoxazol mas trimetoprima; TE, tetraciclina; C, cloranfenicol; AMC, amoxicilina con ácido clavulánico; AK, amikacina; K, kanamicina. S, sensible; R, resistente.

## DISCUSIÓN

Al analizar los resultados obtenidos, se puede ver que los valores de prevalencia de *Salmonella spp.* (6,7%) en predios bovinos no difieren mayormente de los publicados anteriormente para otros países, considerando valores como los publicados por Laillier *et al.* (2005), quienes indican un 8,1% de detección en rebaños lecheros de Francia.

En cuanto a predominancia de serotipos, a nivel internacional en bovinos, *S. enterica* ser. Typhimurium alcanza prevalencias del 14-15% (Laillier *et al.*, 2005) (Callaway *et al.*, 2005), y *S. enterica* ser. Livingstone y *S. enterica* ser. Infantis no fueron detectados (Cummings *et al.*, 2010) (Laillier *et al.*, 2005) (Callaway *et al.*, 2005), mientras que en esta memoria *S. enterica* ser. Typhimurium se encuentra en un 38,6%, y los serotipos Livingstone e Infantis alcanzan valores de 54,5% y 6,8% respectivamente.

En relación a la marcada resistencia a antimicrobianos que presenta el serotipo Typhimurium con respecto a los otros dos detectados, se observa que mantiene la tendencia mundial. Este serotipo se presenta en la literatura como portador de múltiples elementos genéticos móviles y numerosos genes de resistencia y virulencia (De Toro *et al.*, 2013), razón por la cual está en permanente observación e investigación. Los datos obtenidos en esta memoria no difieren de ello, mostrando a este serotipo como el que requiere mayor vigilancia actualmente. Respecto al serotipo infantis, se ha encontrado un creciente número de cepas multiresistentes aisladas de diferentes fuentes en Italia (Dionisi *et al.*, 2011). Los valores encontrados en este estudio indican pansusceptibilidad de las tres cepas encontradas, sin embargo, ante la baja detección de cepas de este serotipo, se requerirían futuros estudios que refuercen la aparente ausencia de tales cepas en nuestro país.

Ante la falta de datos nacionales en ganado bovino respecto a *Salmonella enterica*, cabe mencionar la investigación en cauces de aguas de la R. Metropolitana de Chile de Martínez *et al.* (2016) para contrastar resultados. En primer lugar se puede observar una gran diferencia entre los valores de resistencia y multiresistencia obtenidos; mientras que para la investigación en cauces de agua se presenta un 100% de resistencia a antimicrobianos y, de ésta, la mayoría con fenotipo de multiresistencia, en este estudio se obtuvo un 59% de

resistencia y, de estas un 6,8% con fenotipo de multiresistencia. Los mayores valores de resistencia se presentan ante ciprofloxacino (56,8%) y tetraciclina (36,4%); mientras que los valores para estos mismos antimicrobianos en la investigación de cauces de agua son considerablemente más bajos, siendo 20% para ciprofloxacino y 8,5% para tetraciclina. Es importante mencionar que la resistencia a fluoroquinolonas resultaba todavía infrecuente en *S. enterica* de aislados humanos, según la literatura, probablemente supondría un alto costo energético para la bacteria (De Toro *et al.*, 2013). Según O'Regan *et al.* (2010), la evolución de las cepas, en ausencia de presión selectiva del antibiótico, podría provocar eventos mutacionales que favorezcan la reversión a un fenotipo con niveles menores de resistencia. Sería oportuno, por lo tanto, considerar la restricción del uso de fluoroquinolonas en el ganado nacional.

En cuanto a la diversidad de serotipos encontrados, se observan más diferencias con el estudio de cauces de agua, en el que se encontraron 18 serotipos distintitos, siendo predominantes *S. enterica* ser. Typhimurium, *S. enterica* ser. Grupo C1 y *S. enterica* ser. Enteritidis (Martínez *et al.*, 2016); mientras que en este estudio, se aprecian sólo 3 serotipos, de los cuales, *S. enterica* ser. Livingstone se destaca como predominante. La diferencia encontrada en la predominancia de serotipos de *S. enterica* tanto en el estudio de cauces de agua como en valores internacionales, motiva a una investigación más amplia a nivel nacional, con el fin de conocer si los serotipos predominantes en este estudio corresponden a valores del ganado bovino nacional, o si en cambio, comprenden valores propios de la zona rural de la Región Metropolitana.

Por otro lado, cabe preguntar si las cepas de *Salmonella spp.* detectadas en estos bovinos podrían ser fuente de contaminación de aguas, como sugiere Martínez *et al.* (2016), y como ocurre en Ghana y Bangladesh (Wardrop *et al.*, 2018), donde se encontró asociación entre cantidad de ganado y contaminación fecal de agua potable. También se describe en la literatura que, aun cuando no haya descarga directa de los residuos al cauce de agua, podría haber contaminación, pues cuando grandes volúmenes de aguas residuales son aplicadas a la superficie del suelo las bacterias pasan a través de la zona vadosa y actúan como un reservorio potencial para la contaminación del agua subterránea, caso especialmente

riesgoso en épocas lluviosas, donde grandes lluvias facilitan el transporte de bacterias patógenas, estableciendo un riesgo para la salud pública (Jang-Cheon, *et al.*, 2000). Ante esto, sería interesante en un futuro determinar la presencia de enteropatógenos río abajo de tales producciones, y comparar los resultados con los obtenidos en zonas río arriba, con el fin de establecer si estas empresas estarían aportando a la contaminación de las aguas de zonas rurales.

Finalmente, es prudente mencionar que la detección de *S. enterica* realizada en este estudio podría haber alcanzado valores más altos, si se toma en cuenta que existen cepas de *S. enterica invA* negativas, como las reportadas por Turki *et al.* (2012) en Tunisia, sin embargo, como sugiere Marlony *et al.* (2003), la aparente ausencia de este gen indica que aquellas cepas son no invasivas o utilizan mecanismos de invasión alternativos, razón por la cual, no constituirían un riesgo para la salud animal ni pública en la actualidad. A pesar de ello, es necesario mantener una mirada atenta a las nuevas publicaciones que buscan minimizar este error, tales como la posibilidad de agregar un segundo marcador al PCR (González-Escalona *et al.*, 2012) o la propuesta de otro gen marcador, como el gen *siiA* (Hassena *et al.*, 2015).

## CONCLUSIÓN

*Salmonella enterica* se encuentra presente en el ganado lechero rural de la Región Metropolitana, presentando fenotipos de multiresistencia, principalmente contra ciprofloxacino, tetraciclina y cefotaxima, representando un riesgo potencial para la sanidad del rebaño y para la salud pública.

## ANEXOS

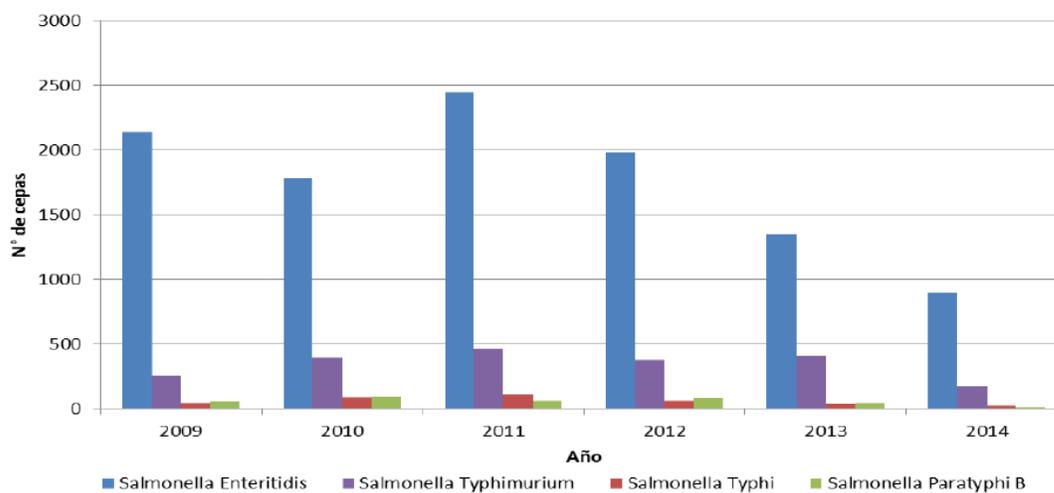
### Anexo 1:

Percentage of antimicrobial resistance and number of cases of disease and death for non-typhoid *Salmonella* in the United States, 2009-2011 (CDC, 2013).

	Percentage of all non-typhoidal <i>Salmonella</i> *	Estimated number of illnesses per year	Estimated illnesses per 100,000 U.S. population	Estimated number of deaths per year
Ceftriaxone resistance	3%	36,000	12.0	13
Ciprofloxacin resistance or partial resistance	3%	33,000	10.9	12
Resistance to 5 or more antibiotic classes	5%	66,000	21.9	24
Any resistance pattern above	8%	100,000	34.1	38

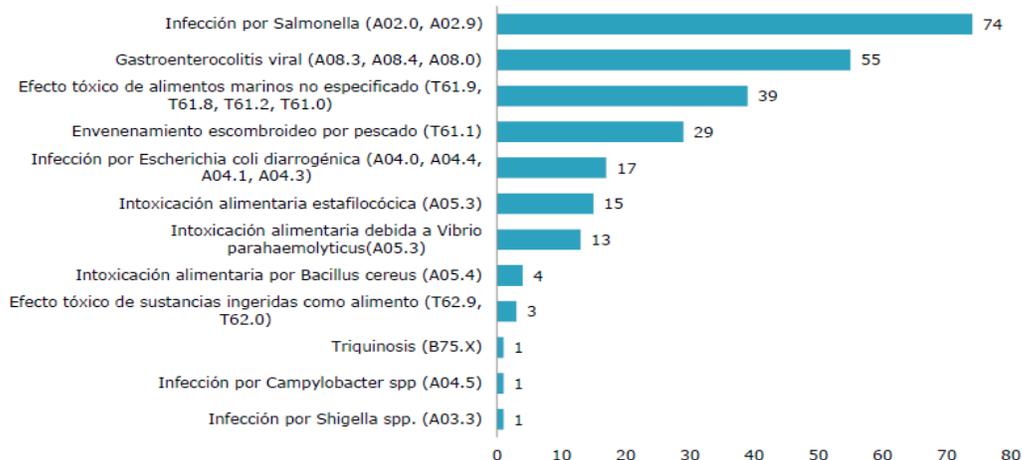
### Anexo 2:

Número de cepas de *Salmonella spp.* por serotipos más frecuentes y año, Chile 2009-2014 (ISP, 2014).



### Anexo 3:

Distribución de brotes de ETA notificados, según tipo de diagnóstico, Chile año 2015 (MINSAL, 2016)



### Anexo 4:

Ocurrencia de resistencia a antimicrobianos seleccionados para *Salmonella spp.* en aislados de carcasas bovinas menores de un año de edad en países de Europa, 2015 (EFSA y ECDC, 2017).

Country	Ampicillin		Azithromycin		Cefotaxime		Ceftazidime		Chloramphenicol		Ciprofloxacin		Colistin <sup>(a)</sup>	
	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res
Belgium	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
Croatia	11	54.5	11	0	11	0	11	0	11	0	11	18.2	11	0
Czech Republic	11	36.4	11	0	11	0	11	0	11	18.2	11	0	11	0
Denmark	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
France	43	34.9	43	0	43	0	43	0	43	11.6	43	0	43	2.3
Portugal	2	50	2	50	2	0	2	0	2	50.0	2	0	2	0
Spain	9	66.7	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0	9	0
<b>Total (7 MSs)</b>	<b>80</b>	<b>40.0</b>	<b>80</b>	<b>1.3</b>	<b>80</b>	<b>0</b>	<b>80</b>	<b>0</b>	<b>80</b>	<b>10.0</b>	<b>80</b>	<b>2.5</b>	<b>80</b>	<b>1.3</b>

Country	Gentamicin		Nalidixic acid		Sulfamethoxazole		Tetracycline		Tigecycline <sup>(b)</sup>		Trimethoprim	
	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res
Belgium	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
Croatia	11	0	11	0	11	54.5	11	54.5	11	0	11	27.3
Czech Republic	11	9.1	11	0	11	45.5	11	36.4	11	0	11	9.1
Denmark	1	0	1	0	1	100	1	100	1	0	1	0
France	43	0	43	0	43	51.2	43	51.2	43	4.7	43	4.7
Portugal	2	0	2	0	2	50	2	100	2	0	2	50.0
Spain	9	0	9	0	9	55.6	9	66.7	9	0	9	11.1
<b>Total (7 MSs)</b>	<b>80</b>	<b>1.3</b>	<b>80</b>	<b>0</b>	<b>80</b>	<b>50.0</b>	<b>80</b>	<b>51.3</b>	<b>80</b>	<b>2.5</b>	<b>80</b>	<b>10.0</b>

All *Salmonella* isolates tested were susceptible to meropenem. N: number of isolates tested; % Res: percentage of microbiologically resistant isolates; -: no information available; MSs: Member. (a): A number of colistin-resistant isolates are undergoing testing for the presence of the *mcr-1* gene. The reported occurrence of colistin resistance does not equate to the occurrence of *mcr-1*. (b): ECOFF applied 2 mg/L.

(b): ECOFF applied 1 mg/L.

**Anexo 5:**

Nombre y ubicación de cauces de agua positivos a la presencia de *Salmonella spp.* en la Región Metropolitana de Chile (Martínez *et al.*, 2016).

Nombre	Dirección	Coord. UTM punto muestreo	Comuna
Aguas Claras	Puente Pelvin	6279855	Peñaflor
Canal Picano	Camino El Tránsito. Pomaire.	6272943	Melipilla
Canal Carampangue	Camino carampangue (compuertas)	6270383	Isla Maipo
Estero Puangue	Puente Isla de Rojas	6292889	Maria Pinto

**Anexo 6:**

Estándares interpretativos de zonas de diámetro de completa inhibición para prueba de resistencia a antimicrobianos mediante discos de difusión (CLSI, 2015) (NCCLS, 2002).

Antibiótico	Código	Estándar zona de Diámetro (mm)			Control (mm)
		Resistente	Intermedio	Susceptible	<i>E.coli</i> (25922)
Amikacina	AK-30	≤14	15-16	≥17	19-26
Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC-30	≤13	14-17	≥18	18-24
Cefotaxima	CTX-30	≤22	23-25	≥26	29-35
Ceftiofur	EFT-30	≤17	18-20	≥21	26-31
Ciprofloxacino	CIP-5	≤20	21-30	≥31	30-40
Cloranfenicol	C-30	≤12	13-17	≥18	21-27
Gentamicina	CN-10	≤12	13-14	≥15	19-26
Kanamicina	K-30	≤13	14-17	≥18	17-25
Sulfametoxazol - trimetoprima	STX-25	≤10	11-15	≥16	23-29
Tetraciclina	TE-30	≤11	12-14	≥15	18-25

## BIBLIOGRAFÍA

**BARRIENTOS, L.** 2005. Detección de *Salmonella spp.* en fecas de terneros de predios lecheros de tamaño superior a 100 hectáreas en la comuna de Paillaco. Memoria Título profesional Médico Veterinario. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. 29pp.

**CALLAWAY, T.; KEEN, J.; EDRINGTON, T.; BAUMGARD, L.; SPICER, L.; FONDA, E.; GRISWOLD, K.; OVERTON, T.; VAN AMBURGH, M.; ANDERSON, R.; GENOVESE, K.; POOLE, T.; HARVEY, R.; NISBET, D.** 2005. Fecal Prevalence and Diversity of *Salmonella* Species in Lactating Dairy Cattle in Four States. *J. Dairy Sci.* 88(10): 3603-3608.

**CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** 2013. Drug-resistant non-typhoidal *Salmonella*. [En línea]. United States. Pág. 71. **In:** Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf#page=71><http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>> . [Consulta: 20/04/2017].

**CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).** 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA, USA. Vol 35(3): 240pp.

**CUMMINGS, K.; WARNICK, L. D.; ELTON, M.; GRÖHN, Y. T.; MCDONOUGH, P. L.; SILER, J. D.** 2010. The Effect of Clinical Outbreaks of Salmonellosis on the Prevalence of Fecal *Salmonella* Shedding Among Dairy Cattle in New York. *Foodborne Pathog. Dis.* 7(7):815-823.

**DE TORO, M.; SERAL, C.; ROJO-BEZARES, B.; TORRES, C.; CASTILLO, F.; SÁENZ, Y.** 2013. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enferm. Infec. Micr. Cl.* 32(1):4-10.

**DIONISI, A.; LUCARELLI, C.; BENEDETTI, I.; OWCZAREK, S.; LUZZI, I.** 2011. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Infantis from humans, animals and the environment in Italy. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 38: 384-389.

**DUEÑAS, F.; RIVERA, D.; TOLEDO, V.; TARDONE, R.; HERVÉ-CLAUDE, L.; HAMILTON-WEST, C.; MORENO, A.** 2017. Short communication: Characterization of *Salmonella* phages from dairy calves on farms with history of diarrhea. *J. DAIRY SCI.* 100(3): 2196-2200.

**DYKES, G.A.** 2016. *Salmonella*: Detection. **In:** Caballero, B.; Finglas, P.; Toldrá, F. *Encyclopedia of Food and Health.* Elsevier. Oxford, United Kingdom. pp. 545- 551.

**EFSA (European Food Safety Authority).** 2014. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *Eur. Food. Saf. Auth. Eur. Centre. Dis. Prev. Control. EFSA J.* 12:3590. Citado por CLEMENTE, L.; MANAGEIRO, V.; JONES-DIAS, D.; CORREIA, I.; THEMUDO, P.; ALBUQUERQUE, T.; GERALDES, M.; MATOS, F.; ALMENDRA, C.; FERREIRA, E.; CANIÇA, M. 2015. Antimicrobial susceptibility and oxymino-b-lactam resistance mechanisms in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from different animal sources. *Res. Microbiol.* 166: 574- 583.

**EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control).** 2017. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA J.* 15(2): 06-191.

**FANNING, S.; ROGERS, L.; POWER, K.; Ó GAORA, P.** 2015. *Escherichia coli* and Other Enterobacteriaceae: Occurrence and Detection. **In:** Caballero, B.; Finglas, P.; Toldrá, F. *Encyclopedia of Food and Health.* Elsevier. Oxford, United Kingdom. pp. 545- 551.

**GONZÁLEZ-ESCALONA, N.; BROWN, E.; ZHANG, G.** 2012. Development and evaluation of a multiplex real-time PCR (qPCR) assay targeting *ttrRSBCA* locus and *invA* gene for accurate detection of *Salmonella spp.* in fresh produce and eggs. *Food Res. Int.* 48: 202-208.

**HASSENA, A.; BARKALLAH, M.; FENDRI, I.; NOEL, N.; IDRIS B.; GAUTIER, M.; GDOURA, R.** 2015. Real time PCR gene profiling and detection of *Salmonella* using a novel target: The *siiA* gene. *J. Microbiol. Meth.* 109:9-15.

**ISP (Instituto de Salud Pública de Chile).** 2014. Vigilancia de Laboratorio *Salmonella* spp. 2009-2014. Boletín. 4(10):2-18.

**JANG-CHEON, C.; HONG, C.; SANG-JONG, K.** 2000. Heavy contamination of a subsurface aquifer and a stream by livestock wastewater in a stock farming area, Wonju, Korea. Environ. Pollut. 109(1): 137-146.

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

**MARCHANT, P.; HIDALGO-HERMOSO, E.; ESPINOZA, K.; RETAMAL, P.** 2016. Prevalence of *Salmonella enterica* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in zoo animals from Chile. J. Vet. Sci. 17(4): 583-586.

**MARLONY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R.** 2003. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. Appl. Environ. Microb. 69(1): 290-296.

**MARTÍNEZ, M; RETAMAL, P; ROJAS, J; FERNÁNDEZ, J; FERNÁNDEZ, A; LAPIERRE, L.** 2016. Multidrug Resistant Outbreak-Associated *Salmonella* Strains in Irrigation Water from the Metropolitan Region, Chile. Zoonoses Public Health. 64: 299-304.

**MINSAL (Ministerio de Salud).** 2016. Brotes de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos Situación Epidemiológica, Enero-Diciembre 2015. [En línea]. Informe anual de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. <<http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/03/Informe ETA 2015 3.pdf>>. [Consulta: 12/08/2016].

**NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).** 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition. Document M31-A2 [ISBN 1- 56238-461-9]. Wayne, PA, USA. Vol 22(6): 107pp.

**NEWELL, D.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; VAN DER GIESSEN, J.; KRUSE, H.** 2010. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food. Microbiol.* 139 (suppl): S3-S15.

**OMS (Organización Mundial de la Salud).** 2017. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Comunicado de prensa. [en línea]. <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>>. [consulta: 10-06-2017].

**O'REGAN, E.; QUINN, T.; FRYE, J.; PAGÈS, J.; PORWOLLIK, S.; FEDORKA-CRAY, P.; MCCLELLAND, M.; FANNING, S.** 2010. Fitness Costs and Stability of a High-Level Ciprofloxacin Resistance Phenotype in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis: Reduced Infectivity Associated with Decreased Expression of Salmonella Pathogenicity Island 1 Genes. *Antimicrob. Agents Ch.* 54(1): 367-374.

**PEREZ, P.; GALÁN, F.; GUTIÉRREZ, D.; GUERRERO, I.** 2014. Infecciones por enterobacterias. *Medicine.* 11(55): 3276-3282.

**SERGEANT, E.** 2017. Epitools epidemiological calculators. [en línea]. <<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home>>. [consulta: 10-06-2017].

**SILBERGED, EK.; GRAHAM, J.; PRICE, LB.** 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual Review of Public Health.* 29:151–69. (Citado por ROUG, A.; BYRNE, B.; CONRAD, P.; MILLER, W. 2013. Zoonotic fecal pathogens and antimicrobial resistance in county fair animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 303- 308).

**TURKI, Y.; OUZARI, H.; MEHRI, I.; BEN AISSA, R.; HASSEN, A.** 2012. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. *Food Res. Int.* 45: 940-946.

**VALENZUELA, J.R.; SETHI, A.K.; AULIK, N.A.; POULSEN, K.P.** 2017. Antimicrobial resistance patterns of bovine *Salmonella enterica* isolates submitted to the Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory: 2006–2015. *J. Dairy Sci.* 100(2): 1319-1330.

**WARDROP, N.; HILL, A.; DZODZOMENYO, M.; ARYEETAY, G.; WRIGHT, J.**  
2018. Livestock ownership and microbial contamination of drinking-water: Evidence from nationally representative household surveys in Ghana, Nepal and Bangladesh. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 221(1): 33-40.