

DICNE
\$500"

24 FEB. 1981

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

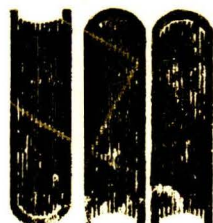
Vencido el plazo, el lector pagará 1.00 peso por cada día que pase.

(11-013)

--	--	--

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



**UNIVERSIDAD
DE MONTERREY**

Clasif.
040.54
H557d
1980
C.1

Título:

DETERMINACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD
DE SALMONELLA SP. A DIVERSOS AGENTES
ANTIMICROBIANOS

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION
FINAL QUE PRESENTAN

Autor: VIOLA EUGENIA HERNANDEZ TANNER
MIREYA LOZANO VARGAS

Vo. Bo.
Mrs. Lourdes Mtz. M.

EN OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD EN
ANALISIS CLINICOS

MONTERREY, N. L.

folia . 881253

MAYO DE 1980

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

*Con cariño a nuestros PADRES, en reconocimiento a su cons
tante dedicación.*

*A nuestros MAESTROS, por brindarnos además de sus ense-
ñanzas su amistad.*

A los AMIGOS, que forman parte de nosotros.

*Con especial agradecimiento a la Srita. QFB Ma. de Lour-
des Martínez Macouzet, quien nos proporcionó un eficaz
asesoramiento y nos alentó al otorgarnos su confianza.*

*Agradecemos a la Srita. LQOI Milagros
Saro Boardman por su interés y valiosa
cooperación en este estudio.*

INDICE

	<u>Página</u>
<i>Introducción</i>	1
<i>Material y Métodos</i>	6
<i>Resultados</i>	14
<i>Discusión y Conclusiones</i>	19
<i>Resumen</i>	24
<i>Bibliografía</i>	25

INTRODUCCION

En 1940 fueron reconocidos los efectos antimicrobianos de la penicilina y con ello se marcó el inicio de la era de los antibióticos. Gracias a esto, el control de las enfermedades bacterianas presentó un futuro prometedor; sin embargo, aunque muchas infecciones responden exitosamente a la quimioterapia, la tuberculosis, la disentería, la fiebre tifoidea y otras enfermedades, continúan siendo endémicas en muchas partes del mundo. Una de las principales razones es que los organismos causantes de estas enfermedades han desarrollado una resistencia a las drogas. El constante incremento de este fenómeno

meno y la aparición de brotes epidémicos ocasionados por cepas patógenas resistentes, constituyen una importante preocupación en la investigación médico-biológica.

Las primeras investigaciones de bacterias resistentes a los antibióticos proponían como única explicación las mutaciones cromosómicas espontáneas, las cuales permiten a los organismos soportar los efectos letales de los agentes antimicrobianos. La resistencia no es inducida por la droga, sino que resulta de una mutación al azar; cuando ocurre, altera la sensibilidad de la célula ante una droga determinada o tal vez ante dos drogas relacionadas.

Sin embargo, las mutaciones no proporcionan una explicación satisfactoria para los casos en que se presenta resistencia a varias drogas (resistencia múltiple). Fue en 1959, cuando investigadores japoneses aclararon este fenómeno al descubrir determinantes genéticos que proporcionan a las bacterias resistencia a un cierto número de drogas.(16) Estos determinantes se transfieren juntos y a un mismo tiempo, desde una cepa bacteriana resistente a una cepa bacteriana sensible de la misma especie, o de especie diferente. El mecanismo está mediado por factores de resistencia o factores R, los cuales son elementos genéticos extracromosómicos, llamados plás

midos, que residen en el citoplasma bacteriano y son transferidos de una célula a otra ya sea por conjugación (contacto directo entre ambas), o por transducción (mediada por fagos). Estos factores contienen uno o más genes que codifican para enzimas que directamente inactivan al antibiótico o suministran a la célula impermeabilidad a sus efectos. En cambio, la resistencia determinada cromosómicamente (mutación) está asociada con cambios estructurales en los componentes celulares de la bacteria, Ej. ribosomas o paredes celulares.

Estudios más recientes proponen una explicación a la rápida adquisición de nuevos factores R. Ponen en evidencia la existencia de segmentos específicos de DNA dentro de un plásmido, llamados transposones, que usualmente codifican la resistencia a un solo antibiótico y tienen la capacidad de pasar de un plásmido a otro en la misma célula, incrementando la oportunidad de diseminación de los genes de resistencia.(9,13)

Las enterobacterias con plásmidos de resistencia al cloranfenicol son conocidas desde tiempo atrás; sin embargo, nunca se habían reportado brotes de infección por Salmonella typhi resistente a este antibiótico sino hasta los años 1972 y 1973, cuando se presentó una epidemia de fiebre tifoidea en México. Este brote fue segui

do por otros en India, Vietnam y Tailandia. En todos se comprobó que la resistencia de las cepas involucradas era mediada por plásmidos.(1,3)

Estos hechos, sumados a otros estudios que comprueban la existencia de factores R en Salmonella typhi (1,5,10,11, 15), tienen un especial valor tanto porque la fiebre tifoidea mantiene aún una alta tasa de morbilidad, como por la gran frecuencia de resistencia presentada al clo^ranfenicol, que es la droga de elección y a la ampicilina que es la droga alternativa. La adquisición de factores R por Salmonella typhi y otras especies de Salmonella ha sido relacionada al uso indiscriminado de antibióticos en el ambiente.

En México, las enfermedades infecciosas han sido el mayor problema de salud por muchos años. En vista de esto, el objetivo del presente estudio es probar la susceptibilidad de Salmonella sp. a 5 de los medicamentos más comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias de este género. Trabajos de este tipo actualizan la información en la que se fundamenta el médico para seleccionar el tratamiento que tenga mayores probabilidades de éxito.

En este estudio se ha utilizado el método de dilución

en placa de agar ya que se considera de fácil interpretación y confiable exactitud en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la mínima concentración de la droga que inhibe el crecimiento bacteriano, es decir, es una medida del efecto bacteriostático del agente en la bacteria.(6)

MATERIAL Y METODOS

En el presente estudio se determinó la susceptibilidad a agentes antimicrobianos, que comprendían a 4 antibióticos y un sulfaderivado, en 95 cepas del género Salmonella las cuales fueron aisladas en la Ciudad de Monterrey y áreas circunvecinas en el período comprendido entre los años 1974 y 1980. Sesenta y ocho de las salmonelas fueron aisladas de muestras clínicas y 27 provenían de derivados de productos cárnicos (tacos) adquiridos en locales fijos y ambulantes del área metropolitana y sus alrededores. Las cepas fueron tipificadas por Magaña Aguilar, correspondiendo 6 a Salmonella typhi y 89 a Salmo-

nella enteritidis.(Tablas 1 y 2)

Este trabajo se efectuó en el Laboratorio de Análisis Clínicos, de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey, en el transcurso de Enero a Abril de 1980.

Los agentes antimicrobianos ante los cuales se expusieron las bacterias fueron los siguientes: cloranfenicol (C), ampicilina trihidratada (A), clorhidrato de tetraciclina (T), sulfato de estreptomicina (E) y mezcla de trimetoprin-sulfametoxazol (T-S) en una relación 1:20.

(3) (+)

METODO UTILIZADO

Preparación del inóculo

Se tomó una asada de cada cepa de Salmonella sp. a probar, y se inoculó en 2.5 ml de caldo trypticaseína y soya. Se incubó durante la noche a 35°C y se hizo dilución 1:100 transfiriendo 0.01 ml del cultivo a 1 ml de solución salina buffer de fosfatos a pH 7.4.(R2)

(+) Química y Farmacia, S.A.

Tabla 1

Procedencia de las cepas de Salmonella

Procedencia	Muestra clínica			Tacos	Cepas estudiadas
	Heces	Orina	Sangre		
Hospital de Ginecología IMSS	4	-	-	-	4
Depto. Microbiología Facultad de Medicina UANL	50	-	8	-	58
Depto. de Biología DICNE UDEM	5	1	-	27	33
Totales	59	1	8	27	95

Tabla 2

Especie y fecha de aislamiento de las cepas de Salmonella

Especie	1974	1977	1978	1979	1980	Cepas estudiadas
<u>S. typhi</u>	1	1	1	1	2	6
<u>S. enteritidis</u>	4	7	14	36	28	89
Totales	5	8	15	37	30	95

Preparación de las diluciones de las drogas

Se prepararon soluciones stock de 2500 µg/ml de cada una de las drogas, así como diluciones a partir de éstas. Para el stock de cloranfenicol y el de sulfaderivado fue necesario utilizar alcohol como solvente y aforar con buffer de fosfatos pH 6 (R1) y pH 7.4 (R2) respectivamente. La ampicilina fue preparada con agua, la tetraciclina con ácido clorhídrico 0.1N y la estreptomycinina con solución salina buffer a pH 8. La tetraciclina y la ampicilina fueron renovadas semanalmente y el resto cada 30 días. Para las diluciones de los stock utilizadas en cada ciclo de trabajo se empleó en todos los casos solución buffer de fosfatos a diferente pH. (14) (Tabla 3)

En frascos individuales se hizo la mezcla droga-medio en la relación necesaria para obtener de cada agente antimicrobiano las siguientes concentraciones expresadas en µg/ml: 250.00, 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.95, 0.97, 0.48, 0.24 y 0.12. El medio utilizado fue agar Mueller Hinton cuidándose que la temperatura al agregar el fármaco no fuese mayor de 50°C.

La mezcla fue vertida en cajas Petri de 14 cm de diámetro a un espesor uniforme de 4 mm. Se previno el exceso de humedad acondicionando las tapas de las cajas con una

Tabla 3

Preparación de las soluciones stock y las diluciones de prueba de las drogas empleadas

<i>Drogas</i>	<i>Stock</i>		<i>Diluciones</i>	<i>Estabilidad (días)</i>
	<i>Solvente</i>	<i>Diluyente</i>	<i>Diluyente</i>	
<i>Cloranfenicol</i>	<i>Alcohol</i>	<i>R1</i>	<i>R1</i>	<i>30</i>
<i>Ampicilina</i>	<i>Agua</i>	<i>Agua</i>	<i>R3</i>	<i>7</i>
<i>Tetraciclina</i>	<i>HCl 0.1N</i>	<i>HCl 0.1N</i>	<i>R4</i>	<i>1</i>
<i>Estreptomicina</i>	<i>R3</i>	<i>R3</i>	<i>R3</i>	<i>30</i>
<i>Trimetoprin-Sulfametoxazol</i>	<i>Alcohol</i>	<i>R2</i>	<i>R2</i>	<i>30</i>

cubierta de papel filtro. Se utilizaron como controles placas con medio sin droga. Para comprobar esterilidad, las cajas se incubaron durante una noche a 35°C.

Inoculación de las placas

En las cajas conteniendo la mezcla droga-medio y en las de control se sembró con asa calibrada 0.001 ml del inóculo previamente descrito (que contiene 10^8 organismos). (7) Las placas se mantuvieron en reposo durante 30 minutos para permitir la completa absorción del inóculo. Después se invirtieron e incubaron a 35°C por 18 horas.

Interpretación

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los diferentes agentes antimicrobianos para cada cepa. Esta fue establecida como la más baja concentración en la cual aparecieron menos de 50 colonias. Las cepas con una CMI mayor o igual a 62.50 µg/ml fueron consideradas resistentes.

REACTIVOS

(R1) Solución buffer de fosfatos pH 6

Fosfato de potasio dibásico 2.0 g
Fosfato de potasio monobásico 8.0 g
Agua destilada 1000.0 ml

Disolver el fosfato de potasio dibásico y el fosfato de potasio monobásico en el agua. Ajustar el pH con ácido fosfórico 18N o hidróxido de potasio 10N a 6.0 ± 0.05 . Conservar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

(R2) Solución buffer de fosfatos pH 7.4

Fosfato de potasio dibásico 16.730 g
Fosfato de potasio monobásico 0.523 g
Agua destilada 1000.000 ml

Disolver el fosfato de potasio dibásico y el fosfato de potasio monobásico en el agua. Ajustar el pH con ácido fosfórico 18N o hidróxido de potasio 10N a 7.4 ± 0.05 . Conservar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

(R3) Solución buffer de fosfatos pH 8

Fosfato de potasio dibásico 16.730 g
Fosfato de potasio monobásico 0.523 g

Agua destilada1000.000 ml

Disolver el fosfato de potasio dibásico y el fosfato de potasio monobásico en el agua. Ajustar el pH con ácido fosfórico IBN o hidróxido de potasio ION a pH 8.0 ± 0.1 . Conservar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

(R4) Solución buffer de fosfatos pH 4.5

Fosfato de potasio monobásico 13.61 g

Agua destilada1000.00 ml

Disolver el fosfato de potasio monobásico en el agua. Ajustar el pH con ácido fosfórico IBN o hidróxido de potasio ION a 4.5 ± 0.05 . Conservar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

RESULTADOS

De las 95 cepas del género Salmonella estudiadas, 27 (28.4%) presentaron resistencia a uno o más de los agentes antimicrobianos a los cuales fueron expuestas. En la Tabla 4 se aprecian 24 casos de resistencia simple y 3 de multirresistencia distribuidos en las especies de S. typhi y de S. enteritidis. Los patrones de resistencia múltiple incluyen con mayor frecuencia a cloranfenicol, tetraciclina y ampicilina. Dos de las cepas multirresistentes fueron aisladas en 1980 y 1 en 1978. (Tabla 5)

Tabla 4

Distribución según especie de las cepas resistentes

Especie	Resistencia		
	Triple	Doble	Simple
<u>S. typhi</u>	1	-	2
<u>S. enteritidis</u>	1	1	22
Totales	2	1	24

Tabla 5

Fecha de aislamiento y patrón de resistencia múltiple

Patrón de resistencia	Número de cepas	Fecha de aislamiento
C,A,T-S	1	1980
A,T,E	1	1978
C,T	1	1980

En la Tabla 6 se observa que la resistencia a la ampicilina fue predominante en una relación 20/24 del total de cepas con resistencia simple, mientras que la diferencia (4/24) apareció distribuida entre la estreptomocina, el cloranfenicol y la tetraciclina. En ningún caso se mostró resistencia al sulfaderivado. La resistencia a la ampicilina se presentó en las cepas aisladas a partir de 1977. Para los otros antibióticos se observó solo en las obtenidas en 1980, con excepción de un caso de resistencia a la estreptomocina mostrado por una cepa de 1978.

La concentración mínima inhibitoria para las cepas resistentes a un solo agente antimicrobiano se expone en la Tabla 7, en la que se aprecia una CMI de ampicilina mayor o igual a 250 µg/ml en todos los casos, mientras que para los antibióticos restantes fue igual o menor de 125 µg/ml.

La Tabla 8 muestra, que 7 de las 27 cepas procedentes de tacos presentaron resistencia a una o más de las drogas y de las 68 cepas aisladas de muestras clínicas el número de resistentes asciende a 20. Esto significa una frecuencia de resistencia de 25.9% para las cepas aisladas de tacos y de 29.4% para las que provienen de muestras clínicas.

Tabla 6

*Número de cepas de Salmonella resistentes a un
antibiótico*

<i>Fecha</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>B</i>
<i>1974</i>	-	-	-	-
<i>1977</i>	-	7	-	-
<i>1978</i>	-	1	-	1
<i>1979</i>	-	9	-	-
<i>1980</i>	1	3	1	1
<i>Totales</i>	1	20	1	2

Tabla 7

Concentración mínima inhibitoria obtenida para cepas con resistencia simple (CMI).

CMI μg/ml	A	C	T	E
>250.0	18	-	-	-
250.0	2	-	-	-
125.0	-	1	1	1
62.5	-	-	-	1

Tabla 8

Número de cepas resistentes en relación a su procedencia

Tipo de muestra.	Número de cepas estudiadas	Resistencia		Total
		Simple	Múltiple	
Taco	27	5	2	7(25.9%)
Muestra clínica	68	19	1	20(29.4%)

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Como se mencionó anteriormente, la ampicilina se ha considerado por muchos años como la droga alternativa en el tratamiento de infecciones por Salmonella sp., mientras que al cloranfenicol se le reconoce como la de elección. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta evaluación de la susceptibilidad de Salmonella sp. a agentes antimicrobianos, demuestran una alarmante frecuencia de resistencia a la ampicilina. Su predominio en los casos de resistencia simple fue evidente y apareció en 2 de los 3 casos de multirresistencia. Además, su concentración mínima inhibitoria en todas las ocasiones fue

mayor o igual a 250 µg/ml, valor nunca igualado en este estudio por las concentraciones mínimas inhibitorias de las otras drogas a las que se presentó resistencia.

En cuanto al cloranfenicol, en esta evaluación solo 3 cepas se mostraron resistentes a él, aisladas todas en 1980, y aunque estos datos no son estadísticamente significativos de un aumento en la aparición de cepas resistentes a esta droga, confirman los resultados obtenidos en trabajos publicados recientemente.(1,2,8)

Es notable también, que el patrón de resistencia múltiple en las 3 cepas que la presentaron, incluían como marcadores al cloranfenicol o la ampicilina, e inclusive en un caso a ambos antibióticos, es decir, que en una infección causada por esa cepa ninguna de las dos drogas más importantes en la terapia tendría utilidad.

La susceptibilidad a tetraciclina y estreptomicina resultante en esta experiencia fue equivalente a la del cloranfenicol, es decir, lo suficientemente alta para tener aceptación en el cuadro terapéutico para este tipo de infecciones; no obstante, el incremento constante de resistencia a los mismos ha sido evidente en los últimos años.(1,8,11)

Si a lo hasta aquí expuesto, se agrega que los marcadores cloranfenicol, ampicilina y tetraciclina se presentan preferentemente en los factores R, conocidos como responsables de la expansión de la resistencia, que son transferidos a cepas receptoras sensibles (10), el cuadro terapéutico en cuestión, va siendo progresivamente desplazado y esto ha obligado a buscar nuevas perspectivas para el tratamiento de enfermedades causadas por Salmonella sp. resistentes a los fármacos aludidos.

La mezcla trimetoprin-sulfametoxazol demostró una alta efectividad, pues además de solo obtenerse una cepa resistente a ella, la concentración mínima inhibitoria para las cepas restantes fue igual o menor de 3.90 µg/ml. Esto concuerda con datos publicados que sugieren a este sulfaderivado como alternativa en el tratamiento de cepas resistentes. Más recientemente, la amoxicilina y cefazolin han sido empleados con éxito en casos similares. (3, 4, 12, 15)

El matiz tranquilizante que nuevos fármacos puedan proporcionar, se desvanecerá rápidamente si no se toman medidas correctivas, pues definitivamente, la presión selectiva intensa aplicada por el extenso uso de antibióticos es un factor esencial en la proliferación de organismos resistentes. La explicación de este fenómeno es

simple; las cepas resistentes que contienen factores R se convierten en los microorganismos dominantes al perecer las cepas sensibles durante la exposición a una droga. Una vez que ha ocurrido esto, se incrementa la probabilidad de transferencia de factores R a otros organismos.

La única forma de combatir las cepas resistentes es cultivar el agente causante de la enfermedad, determinar su resistencia a las diferentes drogas e instituir una terapia con una droga a la que no sea resistente, repitiendo periódicamente la prueba de susceptibilidad ya que no son raros los casos en que la sensibilidad a la droga utilizada desaparece.(5)

El método empleado en el presente estudio para determinar la sensibilidad a drogas, ofrece al médico la ventaja de conocer la concentración mínima inhibitoria de los medicamentos probados, y de esta manera establecer si el compuesto es activo a concentraciones que puedan ser alcanzadas en los tejidos, y en base a esto, ajustar la dosis necesaria.

Por último, este estudio arroja un hallazgo importante que cabe mencionar; el hecho de que la frecuencia de resistencia en las cepas aisladas de derivados de produc-

tos cárnicos es casi tan alta como la observada para las que provienen de muestras clínicas. Esto significa que a la preocupación por la diseminación a través de portadores de bacterias patógenas, en este caso Salmonella sp., se suma el riesgo de que tales cepas presenten resistencia a uno o más fármacos (nótase que en este estudio 2 de las 3 cepas multirresistentes provenían de tacos).

En el intento por controlar las enfermedades infecciosas, el esfuerzo humano debe concentrarse en una urgente cientización de minimizar la diseminación y evolución de los factores R, limitando al mismo tiempo el uso de ciertos antibióticos, pues en el presente se constata lo que Louis Pasteur una vez afirmó: "Los microbios tendrán siempre la última palabra".

RESUMEN

Se determinó la susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos, por el método de dilución en placa de agar, en 95 cepas de Salmonella sp. aisladas de 1974 a 1980 en la Cd. de Monterrey y áreas circunvecinas.

Las drogas empleadas fueron: cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina, estreptomina y trimetoprin-sulfametoxazol, demostrándose 24 casos de resistencia simple y 3 de multiresistencia. Frente al sulfaderivado todas las cepas fueron sensibles con excepción de una, mientras que para la ampicilina se presentó resistencia simple en 20 cepas de un total de 24.

BIBLIOGRAFIA

1. Alfaro, G., Martuscelli, J. and Mendoza-Hernández, P. 1978. Antibiotic resistance and phage-types of Salmonella typhi strains isolated in Mexico City. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 20:5-11.
2. Anónimo. 1979. Un caso de Salmonella typhi resistente en Jamaica. *Bol. Of. Sanit. Panam.* LXXXVI: 82-83.
3. Butler, T., et al. 1977. Therapy of antimicrobial-resistant typhoid fever. *Antimicrob. Agents Chem*

other. 11:645-650.

4. Calderon, E. 1974. Amoxicillin in the treatment of typhoid fever due to chloramphenicol-resistant Salmonella typhi. *J. Infect. Dis.* 129:S219-S221.
5. Cherubin, Ch. E., Neu, H. C., Rahal, J. J. and Sabbath, L. D. 1977. Emergence of resistance to chloramphenicol in Salmonella. *J. Infect. Dis.* 135:807-812.
6. Finegold, S. M., Martin, W. J. and Scott, E. G. 1978. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 5th Ed. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, Mo.
7. Haltalin, K. C., et al. 1973. Agar plate dilution method for routine antibiotic susceptibility testing in a hospital laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* 60:384-394.
8. Olarte, J. y Galindo, E. 1970. Factores de resistencia a los antibióticos encontrados en bacterias enteropatógenas aisladas en la ciudad de México. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 12:173-179.
9. Richards, H., Sajka, W. J., Datta, N. and Wray, C.

1978. Trimethoprim resistance plasmids and transposons in Salmonella. The Lancet. 2:1194-1195.
10. Rodríguez, M., Rebollo, M. C., Pichuantes, S., Fernández, M. E. y Palomino, C. 1977. Factor de resistencia transferible a antibióticos en enterobacteriaceae con especial referencia a Salmonella typhi. Rev. lat-amer. Microbiol. 19:127-139.
11. Tanaka, T., et al. 1976. Drug resistance and distribution of R factors in Salmonella strains. Antimicrob. Agents Chemother. 9:61-64.
12. Then, R. and Angehrn, P. 1973. Nature of the bacterial action of sulfonamides and trimethoprim alone and in combination. J. Infect. Dis. 128: S498-S501.
13. Tompkins, L. S. and Falkow, S. 1979. The growing problem of bacterial resistance. Drug Therapy. 9:39-46.
14. United States Pharmacopeia. 1976. Biological tests and assays; antibiotics-microbial assays. 19th Ed. 595-600.

15. Virgilio, R. y Cordano, A. M. 1977. Susceptibilidad de Salmonella typhi a cloranfenicol y otros antibióticos. Primeras cepas chilenas multirresistentes. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 19:62-72.

16. Watanabe, T. 1967. Infectious drug resistance. *Scientific Am.* 217:19-27.

· 801253