

CAPTURA Y PROCESAMIENTO DIGITALIZADO DE IMÁGENES PARA LA DETECCIÓN MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS EN LECHE

NAGEL, O.¹; BASILICO, J.²; ZAPATA, M.²; MOLINA, P.³; GAPEL, C.¹ & ALTHAUS, R.¹

RESUMEN

Para la detección de residuos de antibióticos betalactámicos en leche, se propone un método basado en la captura y su posterior procesamiento digitalizado del halo de inhibición del crecimiento del *Geobacillus stearothermophilus* en un medio agarizado que contiene púrpura de bromocresol. Se estudiaron los niveles de detección de cuatro antibióticos betalactámicos (penicilina, ampicilina, cloxacilina y cefalexina) en leche siguiendo las directrices establecidas por Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). Se midió la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo con un pie de rey. Además, se tomaron fotografías digitales de cada placas de Petri y se realizó el procesamiento digitalizado de las imágenes mediante el software Image proPlus 3.0.1[®]. Se utilizó el modelo de regresión lineal para establecer relaciones entre los diámetros de los halos y las transformaciones logarítmicas de las concentraciones de antibióticos. Se observa que concentraciones de 2 µg/kg penicilina, 5 µg/kg de ampicilina, 29 µg/kg de cloxacilina y 100 µg/kg de cefalexina producen un halo inhibitorio de 10 mm. Para detectar residuos de betalactámicos en leche a niveles de sus Límites Máximos de Residuos (LMR) mediante el método de captura y procesamiento digital de imagen se debe establecer un diámetro de inhibición de 12 mm. Se concluye que el procesamiento digitalizado presenta buenos resultados cuando se utiliza púrpura de bromocresol como indicador de contraste.

Palabras claves: Betalactámico, método microbiológico, captura de imagen, nivel de detección.

SUMMARY

Captures and digitized processing of images for the microbiological detection of betalactam antibiotics in milk.

For the detection of beta lactam antibiotic residues in milk, a method based on the capture and its later digitized processing of the inhibition halo of the *Geobacillus stearothermophilus* growth in an agar medium containing bromocresol purple indicator is set out. Four detection levels of the beta

1. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. Kreder 2805. (3080) Esperanza.
E-mail: ralthaus@fcv.unl.edu.ar.

2. Facultad de Ingeniería Química, UNL. Santiago del Estero 2829. (3000) Santa Fe.

3. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14 Apartado 22012. (46071) Valencia, España.

Manuscrito recibido el 12 de octubre de 2007 y aceptado para su publicación el 29 de marzo de 2008.

lactam antibiotics (penicillin, ampicillin, cloxacillin and cephalexin) in milk were studied following the guidelines established by the Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). The inhibition zone of the microorganism growth was measured with a caliber. In addition, digital photographs were taken from each plates of Petri and a digitized processing of the images was made by means of the software Image proPlus 3.0.1[®]. A linear regression model was used to establish relations between the diameters of halos and the logarithmic transformations of the antibiotic concentrations. It is observed that concentrations of 2 µg/kg penicillin, 5 µg/kg of ampicillin, 29 µg/kg of cloxacillin and 100 µg/kg of cephalexin produce an inhibitory halo of 10 mm. In order to detect beta lactam residues in milk at levels of their Maximum Residues Limits (LMR) employing the capture method and digital processing of image, an inhibition diameter of 12 mm should be established. Its conclude that a digitized processing displays good results when purple of bromocresol is used as contrast indicator.

Key words: Betalactam, microbiological method, image capture, detection level.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas) son compuestos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de la pared de la célula bacteriana. Se caracterizan por presentar adecuada inhibición contra las bacterias gram-positivas, presentando además algunas subfamilias, acción contra bacterias gram-negativas. Estos antibióticos presentan en su estructura básica un anillo betalactámico que es responsable de su actividad antibacteriana y cadenas de tamaño variable que establecen una mayor diferenciación de sus propiedades químicas y farmacológicas (Botsoglou & Fletouris, 2001). Estos antibióticos se utilizan ampliamente en la medicina veterinaria y son las drogas que se emplean normalmente para el tratamiento o prevención de mastitis del ganado bovino durante el periodo de secado.

Además de la mastitis, los antibióticos betalactámicos que se emplean en los tratamientos de otras infecciones bacterianas pueden causar residuos en leche, a través de sus moléculas madres y/o metabolitos. Aunque estos antibióticos no son intrínsecamente muy tóxicos, ellos pueden provocar severas reacciones alérgicas en las personas sensibles a estas moléculas (EMEA, 2007)

así como el desarrollo de resistencias antimicrobianas (Witte, 2000; Teuber, 2001.). Además, a niveles superiores a sus LMRs, puede inhibirse el desarrollo de las bacterias utilizadas por las industrias lácteas en sus procesos fermentativos (Tamime & Robinson, 1999; Grunwald & Petz, 2003).

Existen en el mercado una amplia variedad de métodos de cribado, comercializados por diferentes laboratorios y empresas que permiten detectar en forma rápida y precisa la presencia de residuos de agentes antimicrobianos en leche. En el boletín N° 258 de la Federación Internacional de Lechería (FIL, 1991) se presenta una recopilación de las características (principio, sensibilidad, niveles de detección, metodología, etc.) de un número de métodos comercializados para el análisis de la leche.

Actualmente, son muy populares los métodos basados en *Geobacillus stearothermophilus* o *Streptococcus thermophilus*, tanto en versión de difusión en tubo como en ensayos de disco, sin embargo anteriormente, se empleaba ampliamente el *Bacillus subtilis*, en versiones de pocillos en agar y principalmente como ensayos de disco (FIL 258/1991; Botsoglou & Fletouris, 2001).

Dependiendo de cada test, la presencia de una sustancia antimicrobiana en la muestra se detectará por cambios de color o por ob-

servación en el medio de zonas de inhibición del crecimiento, que luego serán medidas con ayuda de algún instrumento de medida (ej. calibre).

Este trabajo propone utilizar un nuevo instrumento de medición del área inhibitoria en el método de difusión en placa, basado en la captura fotográfica y posterior procesamiento digitalizado de la imagen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental: En el presente trabajo se siguieron las directrices establecidas por la AOAC (1995) para métodos microbiológicos de detección de antibióticos. Para cada agente antimicrobiano se prepararon 12 placas de Petri. En cada una de ellas se ensayaron 6 perforaciones cilíndricas distribuidas en forma radial y separadas en un ángulo de 60° entre cada una de ellas.

Además, se prepararon 5 disoluciones de cada fármaco en leche, como se detalla en Cuadro 1. La concentración intermedia (C₃) se consideró como testigo y se sembró por triplicado en forma alternada en cada placa (36 réplicas por cada antimicrobiano), mientras que cada una de las cuatro concentraciones restantes se sembraron en tres placas, utilizando los tres pocillos restantes (9 réplicas por cada concentración de antimicrobiano).

Disoluciones fortificadas de antibióti-

cos: Se prepararon muestras de leche fortificadas con las concentraciones de antibióticos betalactámicos detalladas en el Cuadro 1. En cada fármaco se contempló un nivel equivalente al LMR (4 µg/kg para penicilina y ampicilina, 30 µg/kg de cloxacilina y 100 µg/kg de cefalexina).

Las disoluciones de antimicrobianos fueron preparadas a partir de su respectiva disolución stock (1000 mg/kg) utilizando muestras de leche libre de agentes antimicrobianos según el método Delvotestâ «SP». La concentración final de cada fármaco en leche se alcanzó después de realizar sucesivas disoluciones seriadas, de modo tal de no emplear un volumen de disolución acuosa superior al 1 % (FIL; 1999).

Preparación de las placas: Para la preparación del medio de cultivo se disolvió triptona caseína (5 g/l), extracto de levadura (2.5 g/l), glucosa (1 g/l) y agar (15 g/l) en agua destilada mediante calor y agitación. Inmediatamente se esterilizó en autoclave (121± 1°C, 15'). A continuación se ajustó a el pH a un valor de 8.0 ± 0.1 y se inoculó con la suspensión de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* e indicador púrpura de bromocresol de forma tal de ajustar la concentración final en placa a un valor de 10⁵ esporas/ml y 0.05 mg/ml, respectivamente (Nagel *et al.*, 2005).

Para obtener un espesor de 2,2 mm de medio agarizado, se depositó en cada placas

Cuadro 1. Concentraciones de antibióticos betalactámicos utilizadas en el experimento

Antibiótico betalactámico	Número del producto	Concentración (µg/kg)				
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Penicilina G	Sigma PEN-Na	2	4	8	16	32
Ampicilina	Sigma A-9518	4	8	16	32	64
Cloxacilina	Sigma C-9393	30	60	120	240	480
Cefalexina	Sigma C-4895	50	100	200	400	800

de Petri (90 mm de diámetro) un volumen de 15 ml de medio de cultivo. Seguidamente se realizaron 6 perforaciones de 8 mm de diámetro y se dispusieron en cada una de ellas 80 ml de muestras de leche fortificadas con antimicrobianos, según los pasos del diseño experimental. Las placas se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para que tuviera lugar la predifusión, colocándolas luego en una estufa a $65 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un tiempo de 6 horas.

Lectura de los halos de inhibición

Los halos de inhibición se midieron por duplicados mediante dos procedimientos:

I.- Con calibre Pie de Rey con sensibilidad de 0.05 mm

II.- Mediante captura digital de la imagen y posterior procesamiento informático de los mismos.

Con el propósito de corregir las diferencias en los diámetros de los halos inhibitorios debidas a la variabilidad en la preparación de cada placa de Petri, se siguió el procedimiento descrito por AOAC (1995). Para ello, se calcularon los promedios de los diámetros correspondientes a los triplicados de la concentración intermedia (C_3) en cada placa (12 valores) y el promedio general de las 36 mediciones de las concentraciones intermedias de las 12 placas. Las diferencias entre los promedios correspondientes a cada placa y el promedio total se utilizó para corregir los diámetros de los halos inhibitorios de las demás concentraciones (C_1 , C_2 , C_4 y C_5). De este modo, se sumó o restó a cada halo las pequeñas diferencias de diámetros debidas a la variabilidad en la preparación de las placas.

Medición con calibre: Las zonas de inhi-

bición (incluido el pocillo de 8 mm) fueron medidas por duplicado con el calibre en aquellas partes más definidas de la circunferencia. Se consideró como zona inhibitoria, aquella que produce un incremento en el halo de al menos 1 mm de radio (diámetro=10 mm).

Captura fotográfica del área inhibitoria y posterior procesamiento de la imagen: Se tomaron fotografías de las placas de Petri con una cámara digital Olympus D390 (Fig. 1). La imagen obtenida fue procesada mediante el software Image Pro-Plus 3.0.1[®] system (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). En este caso, el programa analizador transformó las zonas de inhibición en valores de pixeles de tamaño e intensidad (en función de tonalidad de grises) definida, las cuales se interpretaron como áreas de inhibición (A), a partir de los cuales se obtuvieron diámetros (D) de inhibición estimados según la siguiente expresión $D = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}}$

Análisis estadístico: Para establecer una relación entre el halo de inhibición y la concentración de antibiótico presente en la leche, se aplicó el siguiente modelo de regresión lineal:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \log C_i + e_{ij}$$

Donde: Y_{ij} = diámetro del halo de inhibición medido en mm; β_0 = ordenada al origen de la recta; β_1 = pendiente de la recta; $\log C_i$ = logaritmo decimal de la concentración de antibiótico en mg/kg ($i = 5$); e_{ij} = error residual.

El análisis estadístico se realizó mediante el procedimiento REG del paquete estadístico SAS[®] (SAS, 1998).

A partir de dichas ecuaciones se calcularán las concentraciones necesarias para obtener halos inhibitorios de 10 mm y 12 mm.

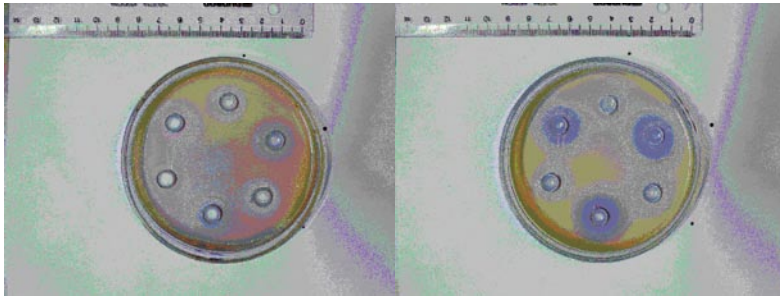


Fig. 1. Fotografías de placas de Petri utilizadas en el método de captura y procesamiento digitalizado de imagen para la detección de residuos de Penicilina en leche. (Izquierda). Concentración $C_1 = 2 \mu\text{g/kg}$ - $C_3 = 8 \mu\text{g/kg}$. (Derecha). Concentración $C_5 = 32 \mu\text{g/kg}$ - $C_3 = 8 \mu\text{g/kg}$.

Cuadro 2. Resultados del análisis de regresión de antibióticos betalactámicos por diferentes métodos de medición de los halos inhibitorios

Método de Lectura	Antibióticos	β_0	β_1	R
Medición con calibre	Penicilina "G"	6,46	10,05	0,98
	Ampicilina	2,79	9,47	0,97
	Cloxacilina	-4,99	10,19	0,99
	Cefalexina	1,35	4,32	0,98
Medición digital	Penicilina "G"	10,63	5,98	0,91
	Ampicilina	7,26	6,76	0,93
	Cloxacilina	2,34	7,53	0,94
	Cefalexina	6,95	4,44	0,94

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la aplicación del modelo de regresión lineal que relaciona el diámetro del halo de inhibición de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* obtenido a partir del método de lectura con calibre y captura de imagen, con los logaritmos decimales de las concentraciones de betalactámicos presentes en muestras de leche se muestran en el Cuadro 2.

Se aprecia en dicho Cuadro que penicilina y cloxacilina presentan mayores valores en sus coeficiente " β_1 " por ambos métodos de

lectura, debido a que *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* es más sensible a estos antimicrobianos, tal como lo señalan otros autores cuando utilizan bioensayos de difusión en placa (Nouws *et al.*, 1999; Montero, 2004).

Los coeficientes de regresión fueron buenos ya que se encuentran comprendidos entre 0,98 (cefalexina) y 0,99 (cloxacilina) para el método de lectura con calibre, mientras que, para la medición mediante captura y procesamiento digital el rango fue de 0,91 (penicilina) a 0,94 (cloxacilina y cefalexina). Sin embargo, en todos los casos se aprecia

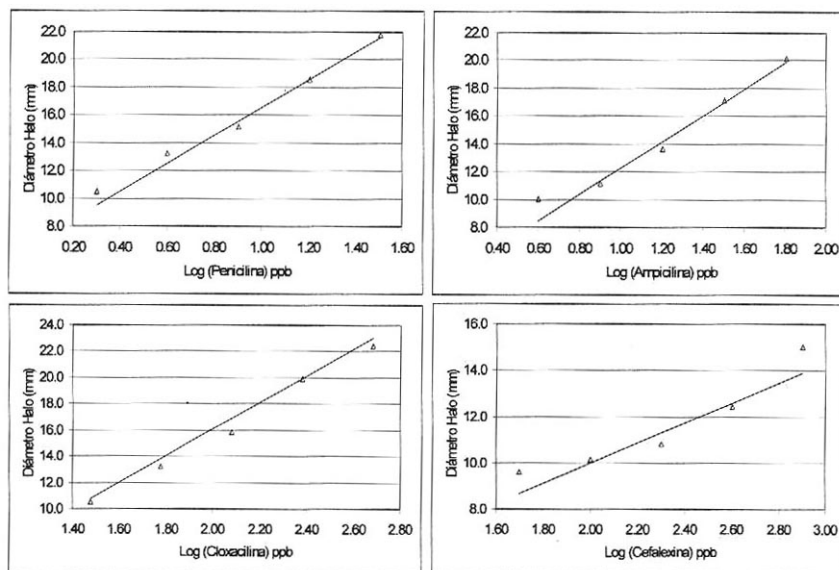


Fig. 2. Relación entre la concentración de antibióticos betalactámicos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* determinado con calibre.

que las mediciones con calibre presentaron mejores ajustes que las obtenidas mediante determinaciones digitales. Por ello, el método de captura y posterior procesamiento de la imagen debería mejorarse a fin de disminuir la dispersión sobre la recta modelizada.

También se deduce del Cuadro 2 que cloxacilina, ampicilina y penicilina presentan los valores más elevados de coeficiente β_1 cuando se utiliza la captura digital, pero resultan inferiores cuando se los compara a los obtenidos por el método de calibre. En el caso de cefalexina, dicho coeficiente β_1 no presenta demasiada diferencia al aplicar ambos métodos.

Es de destacar que el coeficiente β_0 de la penicilina obtenida por el método alternativo, permitirá calcular solamente concentraciones cuyo diámetro sea mayor a 10,6 mm, a pesar de que las perforaciones se hallan

realizado con cilindros de 8 mm.

Con el objetivo de exponer de un modo gráfico el efecto de las concentraciones de betalactámicos sobre el tamaño del halo de inhibición, se confeccionaron las Fig. 2 (medición con calibre) y Fig. 3 (medición digital), donde se representa los diámetros de los halos de inhibición en función de las transformaciones logarítmicas de sus concentraciones.

En dichas figuras se puede observar que, aunque existan diferencias numéricas en los valores de las pendiente entre ambos métodos de lectura, el comportamiento del microorganismo se mantiene prácticamente lineal. Se puede resumir que los incrementos en los tamaños de los halos de inhibición para iguales cambios en las concentraciones de anti-bióticos betalactámicos resultan similares para las tres penicilinas, mientras

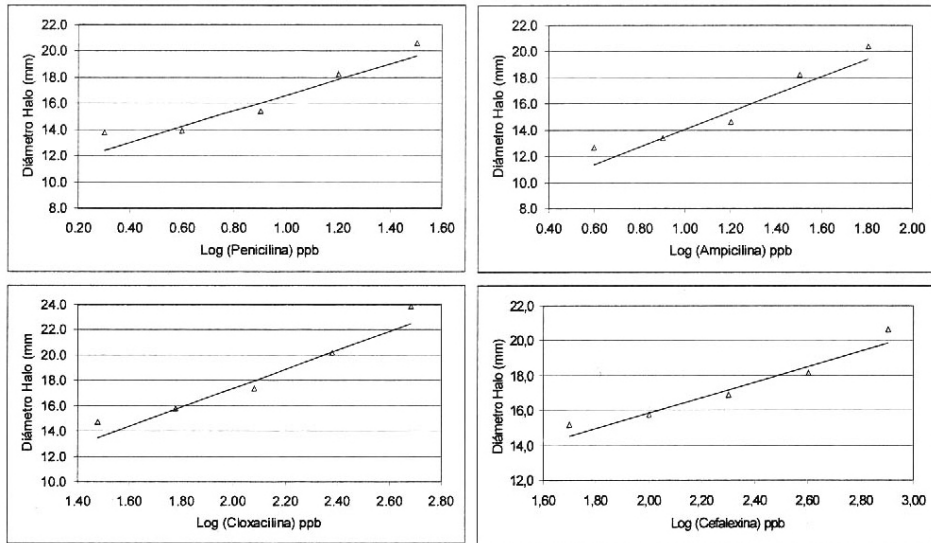


Fig. 3. Relación entre la concentración de antibióticos betalactámicos (mg/kg) en leche y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* determinado por método digital .

Cuadro 3. Concentraciones de antibióticos betalactámicos que producen halos inhibitorios de 10 y 12 mm de diámetro calculados mediante el modelo de regresión

Método de Lectura	Antibióticos	C ₁₀ mm	C ₁₂ mm	LMR ¹
Medición con calibre	Penicilina "G"	2	3	4
	Ampicilina	5	9	4
	Cloxacilina	29	46	30
	Cefalexina	100	290	100
Medición digital	Penicilina "G"	Nd	1,7	4
	Ampicilina	2,5	5,0	4
	Cloxacilina	10,4	19,8	30
	Cefalexina	4,86	13,7	100

Nd: no detectable; ¹ LMRs establecidos por la Unión Europea µg/kg).

que la cefalexina mostró menor valor en su pendiente (Cuadro 2), debido a que posee un espectro de actividad bactericida diferente.

Haciendo uso de los coeficientes obtenidos mediante la aplicación del modelo de regresión lineal (Cuadro 2), se calcularon

las concentraciones de antibióticos betalactámicos que producen incrementos apreciables en los diámetros de los halos de inhibición de 2 mm (C₁₀ mm) y 4 mm (C₁₂ mm), que se resumen en el Cuadro 3. También se muestran los respectivos Límites Máximos de

Residuos (LMRs) establecidos por Unión Europea.

Nouws *et al.* (1999), cuando ensayan perforaciones de 14 mm en el Sistema Microbiológico Multiplaca para la detección de residuos de penicilina en leche de vaca, obtienen un incremento en el radio del halo de inhibición de 3 mm para idéntica concentración de penicilina (3 µg/kg, Cuadro 3). También dichos autores, requieren concentraciones similares de cloxacilina (30 µg/kg) para obtener el mismo aumento en el halo inhibitorio.

Las concentraciones de cefalexina, obtenidas mediante la lectura con calibre, que producen un halo de inhibición menor o igual a 11 mm, fueron superiores a las calculadas por Nouws *et al.* (1999) cuando utiliza el método multiplaca con leche de vaca (80 µg/kg).

Los niveles de decisión del Cuadro 3 para el método de difusión en placa resultaron en general, levemente inferiores a los límites de detección estimados cuando se utilizan métodos de inhibición microbiológicos tales como BRT-AiMâ (Heeschen & Blüthgen, 1991; Charm & Ruth, 1993) o Delvotestâ «SP» (Charm & Ruth, 1993; Honkanen-Buzalski & Reybroeck, 1995; Gardner *et al.* 1996; Suhren & Reichmuth, 1998).

Para detectar residuos a niveles similares a los LMRs establecidos por la Unión Europea, se puede establecer un nivel de decisión de 10 mm y 12 mm para los métodos de calibre y captura digital de imagen, respectivamente.

En caso de utilizar el método digital de lectura, concentraciones muy bajas de penicilina (1,7 µg/kg), cloxacilina (19,8 µg/kg) y cefalexina (13,7 µg/kg) acusarían interpretaciones positivas dando lugar a resultados «falsos violativos», por presentar un límite de detección inferior al LMR (100 µg/kg, Cuadro 3).

CONCLUSIONES

A modo de síntesis se puede establecer que la utilización de indicador púrpura de bromocresol resulta adecuado para la utilización del método de captura y procesamiento digitalizado de imagen, aunque presentó coeficientes de regresión más bajos que los alcanzados mediante la utilización del Pie de Rey. Por ello, se considera que dicho procedimiento debería mejorarse mediante un ajuste más adecuado con el método de referencia usando Pie de Rey. Además, resulta conveniente implementar la utilización de un procedimiento digital de imagen que permita definir el tamaño y tonalidad de grises de los píxeles a fin de lograr una mayor nitidez de los bordes del medio sin crecimiento (transparente) con la opacidad que dan las colonias bacterianas.

De todos modos, el método digitalizado presenta una adecuada linealidad en su respuesta en la medida que se incrementa la concentración de antibióticos betalactámicos en las muestras de leche.

Para un diámetro inhibitorio de 12 mm, éste método permite obtener un nivel adecuado de detección para los residuos de ampicilina en leche, aunque los niveles de detección para penicilina, cloxacilina y cefalexina son inferiores a sus respectivos LMRs, llevando a resultados «falsos violativos».

BIBLIOGRAFÍA

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1995. Official methods of analysis, 5:33-36. 16Th edition Ed. AOAC. Arlington.
- BOTSOGLOU, N. & D. FLETOURIS. 2001. Drug residues in foods Food Science and technology. Marcel Dekker, Inc. New York 73-84.

- CHARM, S. E. & G. P. RUTH.** 1993. Advances in Charm technology for Antimicrobial residues in milk. Pages: 32-46. In *Inhibitory Substances in Milk-Current Analytical Practice*. IDF Bull. N° 283. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- FIL 258/1991.** Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. Bull FIL n° 258.
- GRUNWALD, L. & M. PETZ.** 2003. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yogurt, 483: 73-79.
- EUROPEAN MEDICINES EVALUATION AGENCY.** EMEA/CVMP/457/03- CONSULTATION. Points to consider regarding availability of veterinary medicinal products-Extrapolation of MRLs. Available online at: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/regaffair/045703en.pdf> (20 august 2007).
- GARDNER, I. A.; J. S. CULLOR; F. D. GALEY; W. SISCHO; M. SALMAN; B. SLENNING; H. ERB & J. W. TYLER.** 1996. Alternatives for validation of diagnostic assays used to detect antibiotic residues in milk. *JAVMA* 209:46-52.
- HEESCHEN, W. H. & A. BLÜTHGEN.** 1991. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. Pages: 16-39. In *Residues and contaminants in milk products*. IDF Special Issue N° 9101. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- HONKANEN-BUZALSKI, T. & W. REYBROECK.** 1995. Antimicrobials. Pages: 26-35. In *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*. IDF Special Issue N° 9505. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF).** 1999. Guidance for the standardized evaluation of microbial inhibitor test. IDF Standard N° 183. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- MONTERO, A.** 2004. Aplicación de Métodos Microbiológicos en la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de oveja. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 180 pp.
- NAGEL, O.; P. MOLINA; J. BASÍLICO; M. L. ZAPATA & R. ALTHAUS.** 2005. Using experimental design to optimize a bioassay based on inhibition of *Bacillus stearothermophilus* for penicillin detection in milk. EFFoST. Intradfood 2005 (ISBN: 84-9705-879-8). ELSEVIER. Proceedings 73-76.
- NOUWS J.; H. Van EGMOND; I. SHULDERS; G. LOEFFEN; J. SCHOUTEN & H. STEGEMAN.** 1999. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue level. *Int. Dairy J.* 9:85-90.
- SAS Institute Inc.,** 1998. SAS Users guide: statistics version 6.12. Cary, NC.
- SUHREN, G. & J. REICHMUTH.** 1998. Nachweis von b-laktamantibiotika-rückständen in milk-Erfahrungen mit dem SNAP-Beta-Laktamtest. *D.M.Z. Lebensmittelindustrie und Milchwissenschaft* 119: 674-681.
- TAMIME, A. & R. ROBINSON.** 1999. *Yoghurt - Science and Technology*, 2nd ed., Woodhead Publishing, Cambridge, 1999, p. 406.
- TEUBER, M.** 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curri. Opin Microbiol.* 4: 493-499.
- WITTE, W.** 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int. J. Antimicrob. Age.* 16:19-24.

