



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

*Escherichia coli* COMO BACTERIA INDICADORA  
EN EL MONITOREO DE LA RESISTENCIA A  
ANTIMICROBIANOS DE USO EN GANADO BOVINO

**MACARENA ANDREA FIGUEROA MERY**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUIA: DRA. BETTY SAN MARTÍN, MV; DMV  
PROYECTO ENLACE DID 2002, CÓDIGO ENL-02/02  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**SANTIAGO, CHILE**  
2004

*A la memoria de mi Padre, a mi Mamá e Ignacio  
y con todo mi amor a Jaime.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Quiero darle las gracias a mi Madre, quien ha sido un ejemplo de fortaleza y perseverancia para mí, por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida. A mi hermano Ignacio quien siempre me ha alentado a ser una mejor profesional. A ambos los quiero mucho y estoy feliz que sean mi familia.*

*Al gran hombre que esta a mi lado Jaime, sin ti no habría logrado esta meta, siempre alentándome y acompañándome en cada paso que he dado durante estos años junto a ti.*

*A la Dra. Betty San Martín, por darme la oportunidad de realizar esta tesis y confiar en mí.*

*A la Dra. Daniela Iragüen por comprenderme, sin su apoyo nunca habría comenzado esta etapa.*

*A la Dra. Consuelo Borie, gracias a sus consejos logre un gran trabajo.*

*A las secretarias del laboratorio de farmacología Odette y Patricia, que siempre estuvieron dispuestas a colaborar conmigo, ayudándome en lo que necesite.*

*Muchas gracias. Las voy a extrañar.*

*Al personal del laboratorio de farmacología, especialmente a Patricia Hernández y Carolina Molins que lograron que la parte práctica no fuera tan lenta.*

*Y finalmente a mis amigos y personas que lograron que mi estadía en la facultad fuera más entretenida y divertida.*

## INDICE

▪ Resumen	
▪ Summary	
▪ Introducción .....	1
▪ Revisión Bibliográfica	
Generalidades .....	2-3
Mecanismos de Resistencia Bacteriana .....	3-8
Transferencia de los Genes de Resistencia .....	8-9
Causas en el incremento de la Resistencia Bacteriana .....	10-12
Problemas de la Resistencia Bacteriana .....	12
Medidas para disminuir la Resistencia Bacteriana .....	13-14
Monitoreo de la Resistencia Bacteriana .....	14-18
Situación Nacional de la Resistencia Bacteriana .....	18 -19
▪ Objetivos .....	20
▪ Material y método .....	21
▪ Resultados .....	24
▪ Gráficos y Cuadros .....	27
▪ Discusión .....	35
▪ Conclusiones .....	44
▪ Bibliografía .....	45

## RESUMEN

La terapia antimicrobiana en medicina humana y veterinaria es la principal herramienta terapéutica frente a los microorganismos patógenos causantes de enfermedades infecciosas, sin embargo, con el paso de los años se ha visto que estos inducen mecanismos de resistencia con la consecuente aparición de cepas multirresistentes. A nivel mundial, dentro de las medidas utilizadas para enfrentar este riesgo, están el uso de antimicrobianos bajo receta médico veterinaria y la instauración de programas permanentes de monitoreo de la resistencia bacteriana.

El objetivo fundamental de este trabajo fue realizar un monitoreo de la resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos de mayor uso en el ganado bovino nacional, utilizando *Escherichia coli* como bacteria indicadora y lograr definir perfiles de resistencia de las cepas aisladas tanto de ganado lechero y ganado destinado a carne.

Para evaluar la resistencia bacteriana, se utilizó el Método de Dilución en Placa con el fin de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de cada cepa bacteriana.

Se trabajó con dos tipos de animales, bovinos destinados a carne faenados en el Frigorífico Lo Valledor S.A. y bovinos de lecherías de la Región Metropolitana. A partir de las 200 muestras obtenidas de ambos grupos, se aislaron y tipificaron 50 y 72 cepas de *E. coli* en ganado lechero y en ganado destinado a carne respectivamente.

Las cepas de *E. coli* presentaron un comportamiento diferente en ambos grupos, observando una fuerte resistencia en ganado lechero, situación que difiere con ganado destinado a carne el cual mostró que la mayoría de sus cepas fueron sensibles al menos a un antimicrobiano del total que se utilizó para el estudio, no observándose resistencias superiores al 11%. Los comportamientos de las cepas frente a cada antimicrobiano en estudio sigue el mismo patrón anterior, siendo la mayor resistencia en ganado lechero para oxitetraciclina (84%) y la asociación sulfametoxazol/trimetoprim (10%) en ganado destinado a carne.

De estos resultados se concluye, que el ganado bovino nacional, sobretudo el lechero presenta elevados niveles de resistencia para determinados antimicrobianos, no estando ajeno de la problemática mundial de la resistencia, junto a esto se hace necesario la instauración de programas permanentes de monitoreo nacional y sería recomendable que la adquisición de fármacos se realice a través de receta médico veterinaria, exigiendo a los profesionales que sea obligatorio su uso.

## SUMMARY

Antimicrobial therapy in human and veterinary medicine is one of the most important therapeutic tool against pathogenic agents causing infectious diseases; nevertheless, the development of multiple resistant strains during the last years has been reported. Worldwide some of the measures adopted to control this issue, are the use of antimicrobial agents under prescription and the establishment of permanent bacterial resistance monitoring programs.

The goal of this investigation was to make a bacterial resistance monitoring that included antimicrobial agents most commonly used in herds in Chile, using *E. coli* as indicator bacteria and to study resistance profiles of isolated strains from dairy herds bred in Región Metropolitana and cows destined for human consumption.

In order to evaluate bacterial resistance, Dilution Plate Method was used to determine the minimal inhibitory concentrations of each isolated strain.

The study was carried out with 2 groups of animals. One corresponding to bovines slaughtered in cold-storage plant Lo Valledor S.A. and dairy herds from Región Metropolitana. Two hundred faecal samples obtained from dairy herds and slaughtered animals, 50 and 72 strains of *E. coli* were isolated and typified, respectively.

*E. coli* strains showed different behaviour in both groups. The resistance of strains obtained from dairy herds were higher than that shown by strains isolated from slaughtered animals. Were the most of the isolated strains exposed to the drugs used in this study, were sensitive, with no resistance values higher than 11%.

Each isolated strain behaved according the same pattern described above, being for with the higher resistance (84%) against oxitetracycline in dairy herds and sulfamethoxazole-trimethoprim (10%) in slaughtered animals.

From these results, we conclude that dairy herds from Región Metropolitana, has high levels of bacterial resistance against some antimicrobials agents, wich tell us that we are not excluded from the world resistance problem. Beacuse of this, the estabilishment of permanent national monitoring programs are needed and it would be suggested that the adquisition of veterinary drugs be made under prescription of a veterinarian.

## **INTRODUCCIÓN**

Aún cuando los antimicrobianos son actualmente la principal herramienta terapéutica para el tratamiento de infecciones bacterianas en el hombre y los animales, el uso inadecuado de estos fármacos a lo largo del siglo XX, ha inducido la aparición de bacterias resistentes a uno o varios de ellos obligándose a replantear su utilización.

Por otro lado, diversas investigaciones han demostrado que cada vez son menores las barreras para el paso de genes de resistencia entre diversas poblaciones bacterianas; a su vez, las bacterias resistentes son capaces de transferirse de un animal a otro, al medio ambiente y al hombre, incrementando el riesgo de la resistencia.

Son diferentes los mecanismos que desarrollan las bacterias para crear resistencia, pero básicamente lo hacen por inactivación de los antimicrobianos a través de enzimas, por impermeabilización de la membrana bacteriana de forma que se impida la entrada y acción del fármaco, por alteración de los receptores celulares a los que se une el antimicrobiano o bien, por aparición de enzimas con escasa afinidad por los fármacos. La resistencia a los antimicrobianos conlleva varias consecuencias, entre ellas se puede mencionar el incremento de la incidencia de infecciones causadas por patógenos resistentes y el potencial fallo terapéutico del antimicrobiano tanto en medicina humana como en veterinaria, frente a infecciones que podrían considerarse leves.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y otros organismos internacionales como el Codex Alimentarius, señalan que debe realizarse un esfuerzo por parte de los médicos humanos y veterinarios, autoridades sanitarias e industrias farmacéuticas, para abordar este problema en forma integral, para que juntos adopten las medidas de control necesarias con el fin de disminuir la resistencia.

Dentro de estas medidas está la utilización de antimicrobianos bajo receta médica y la instauración de programas de monitoreo de resistencia bacteriana a nivel nacional e internacional. Esto último permite establecer líneas de trabajo orientadas al uso adecuado de estos fármacos con relación a las realidades y objetivos de cada país.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### I. GENERALIDADES.

El problema de la resistencia bacteriana y su incremento en el ámbito mundial está bien estudiado. En términos genéricos, se puede hablar de resistencia cuando un antimicrobiano que es eficaz frente a una determinada especie bacteriana se hace ineficaz para esa misma especie.

Cada antimicrobiano tiene un espectro natural de actividad que lo caracteriza; este espectro comprende especies bacterianas que en su estado natural, sufren una inhibición de su crecimiento a determinadas concentraciones del fármaco alcanzadas *in vivo*. A estas especies bacterianas se les denomina naturalmente sensibles a dicho antimicrobiano y a las que se encuentren excluidas de dicho espectro se denominan naturalmente resistentes.

En términos generales, la resistencia bacteriana a los antimicrobianos se comienza a observar en 1940 cuando se aisló y se caracterizó una enzima de *Escherichia coli* capaz de hidrolizar la penicilina. En 1944 se informó la presencia de una enzima similar tipo penicilasa en *Staphylococcus aureus*. En 1959, se observó la resistencia a múltiples drogas en cepas de *Shigella dysenteriae* en Japón, descubriéndose después que esta resistencia se podía transferir a una cepa de *E. coli* vía célula-célula (Akiba *et al.*, 1960).

A finales de los años 60 y comienzos de los 70 emerge la resistencia múltiple en *S. aureus* y más tarde, en una amplia variedad de bacterias gramnegativas. Todo esto llevó a que tanto médicos humanos como médicos veterinarios tomaran conciencia del peligro de las terapias empíricas, es decir, sin conocimiento previo del agente etiológico y por ende de la sensibilidad de éste frente a los antimicrobianos.

Posteriormente, con la esperanza que la fabricación de nuevos agentes antimicrobianos, tales como cefalosporinas y fluoroquinolonas pudiesen dar solución al problema de la resistencia, a partir de la década del 80 comenzó la utilización de fluoroquinolonas en medicina veterinaria con un gran éxito terapéutico, sin embargo se desarrollaron cepas resistentes a ellas (Tenover y Hughes, 1996).

En el año 1984, la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló la necesidad de establecer programas de vigilancia de resistencia a antimicrobianos, recomendando que se fijen políticas gubernamentales orientadas al uso racional de estos medicamentos en medicina humana y veterinaria (San Martín y Cañon, 2000).



## **II. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA.**

Cuando las bacterias son expuestas a un antimicrobiano, los microorganismos sensibles mueren, pero aquellos no sensibles pueden sobrevivir y crecer. Así, las bacterias resistentes evaden con éxito la acción de los antimicrobianos y se vuelven predominantes.

Las bacterias denominadas resistentes a los antimicrobianos no son más virulentas que las susceptibles, ya que se requiere la misma cantidad de microorganismos para producir la enfermedad. Sin embargo, las formas resistentes son más difíciles de eliminar, ya que una vez finalizada la terapia antimicrobiana pueden persistir.

La terapia antimicrobiana puede ser ineficaz por diferentes causas como por ejemplo que el fármaco no llegue a la biofase en concentraciones adecuadas, el medicamento sea inactivado, se altere el sitio de acción del fármaco, siendo la resistencia bacteriana la causa más importante actualmente (Davies, 1994; Nikaido, 1994; Spratt, 1994). Una vez que la droga ha llegado al sitio predeterminado, éste debe ejercer un efecto sobre el agente patógeno. La variación natural o los cambios adquiridos en el sitio de acción de las bacterias que impiden la unión o la activación del fármaco pueden culminar en resistencia. La resistencia natural o intrínseca es un carácter constante de todas las cepas de una misma especie bacteriana. Del punto de vista clínico, la resistencia adquirida es la más importante y se debe a la modificación de la carga genética de la bacteria pudiendo aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La resistencia transmisible mediada por plásmidos, transposones o integrones puede pasar de una bacteria a otra (García y García, 1997).

La resistencia implica un cambio genético en la bacteria. Se denomina gen de resistencia a aquel que posee una bacteria y que le otorga la capacidad de resistencia a un antimicrobiano. Se puede adquirir por una mutación y se transmite en sentido vertical a la población bacteriana. Con mayor frecuencia, dicho fenómeno se adquiere por transferencia horizontal de los determinantes de resistencia de una célula donante hacia una receptora mediante procesos de transformación, transducción o conjugación.

## MODALIDADES DE TRANSFERIR LA RESISTENCIA BACTERIANA

### I.- MUTACIONES

Las mutaciones en el sentido más amplio del término, se definen como un cambio brusco y heredado en el cromosoma de la célula que da lugar a una variación fenotípica. Las mutaciones son heredables a la descendencia, en la medida que no sean reparadas antes que ocurra la división bacteriana. Pueden afectar al gen que codifica una proteína blanco o predeterminada, y alterar su estructura al grado que ya no se una al fármaco; pueden también alterar una proteína que interviene en el transporte de la droga o a un promotor regulador que altere la expresión de un blanco, o simplemente, genera una enzima inactivadora (Chambers y Sande, 1996).

Además, son eventos aleatorios que confieren una ventaja selectiva al microorganismo frente a nuevas exposiciones al medicamento. En algunas situaciones, las mutaciones pueden ser en una sola fase, lo que genera un alto grado de resistencia, es el caso cuando *E. coli* o *S. aureus* se exponen a rifampicina, surgen mutantes fuertemente resistentes (Wehrli, 1983). En otros casos se requieren varias fases y cada una genera sólo mínimas alteraciones en la sensibilidad. Un ejemplo de esto es la resistencia de neumococos a la cefotaxima, que se transmite *in vitro* ante concentraciones cada vez mayores del fármaco (Laible *et al.*, 1989).

#### Tipos de Mutaciones

Ya en el año 1989, William definió diferentes formas de mutaciones dentro de las cuales encontramos:

a.- Las mutaciones pueden ser espontáneas, esta situación ocurre sin intervención directa del investigador ni de una causa conocida del exterior de la célula. De ahí que esta forma de mutación probablemente sea la que con mayor frecuencia se produce debido a errores en la copia del ADN durante la replicación del cromosoma (William, 1989).

La frecuencia de las mutaciones espontáneas varía para cada uno de los diferentes caracteres, así como para un mismo carácter en especies diferentes. Es importante destacar que para una especie o cepa dadas, la frecuencia de este tipo de mutación puede ser diferente para cada uno de los genes y que la presentación de una determinada mutación es independiente de todas las demás.

b.- Mutaciones puntuales: consisten en la adición, delección o simplemente un cambio de una sola base en la secuencia que constituye un único gen estructural o regulador. La expresión o no expresión fenotípica en esta forma de mutaciones depende de la base que ha sido sustituida o deletada y además del lugar del gen donde se produce.

c.- Las mutaciones por delección son aquellas en la que se ha eliminado un fragmento de una hebra del ADN. Cuando son detectables fenotípicamente no pueden ser restauradas mediante una mutación posterior (William, 1989).

d.- Mutaciones retrógradas, estas se caracterizan por que es necesaria una segunda mutación para que se restaure un carácter original. Muchas mutaciones son reversibles, pudiendo tener la reversión de diversas formas. Por ejemplo, una mutación de este tipo puede tener lugar en el mismo sitio de la mutación original producido por una delección de escasa importancia.

e.- Mutaciones silentes; el año 1999, Venkatarama las definió como una variación a nivel de ADN que no conduce a ningún cambio de aminoácido en la proteína codificada. Tales mutaciones no tienen efecto fenotípico demostrado, ya que muchos codones codifican el mismo aminoácido.

## II.- TRANSDUCCIÓN

Se define como la transferencia de genes entre cepas bacterianas emparentadas y son mediada por bacteriófagos, además deben presentar los mismos receptores para el bacteriófago, (Venkatarama, 1999). En términos de transferencia de material genético, la transducción realiza la misma función que la transformación, excepto que la transducción suele ser consecuencia de errores que algunas veces tienen lugar durante la replicación de algunos bacteriófagos. Aunque casi siempre ha sido estudiada en *E. coli*, se ha demostrado en una amplia variedad de bacterias, y se cree que en la naturaleza juega un rol importante en el intercambio genético entre ellas (William, 1989).

La transducción puede ser especializada, cuando sólo son transferidos unos pocos genes y siempre son los mismos o puede ser generalizada, cuando casi todos los genes del cromosoma pueden ser transferidos de la célula dadora a la receptora (William, 1989).

Desde el punto de vista veterinario, la mayor importancia de la transducción reside en la posible utilización de los fagos como vehículos para introducir genes

animales en células bacterianas y la consiguiente utilización de cultivos bacterianos transducidos para producir a bajo costo genes animales (William, 1989).

### III.- TRANSFORMACIÓN

De los mecanismos de recombinación que utilizan las bacterias, este es el único que se desarrolló con el único objetivo de intercambiar ADN cromosómico. Para que ocurra se debe disponer de dos elementos principales: una fuente adecuada de ADN libre (célula donadora) y células receptoras capaces de unir, traslocar e integrar dicho ADN en su propio ADN cromosómico (William, 1989).

Existen dos formas de transformación; la natural y la artificial. La primera consiste en la capacidad que posee una célula para interactuar con el ADN exógeno y captarlo (Venkatarama, 1999).

La transformación artificial se refiere al hecho que muchas bacterias no han desarrollado la capacidad natural para captar el ADN. En estos casos se han creado mecanismos químicos para inducir artificialmente la competencia.

### IV.- CONJUGACIÓN

Es un proceso que ocurre entre bacterias sin parentesco, es un apareamiento que requiere el contacto célula-célula y da lugar a la transferencia de material genético (ADN) de una célula dadora a una receptora. El material transferido puede ser un plásmido o bien parte del cromosoma de la célula dadora que ha sido movilizado por un plásmido (William, 1989).

Se debe recordar que el genoma bacteriano puede estar constituido por un cromosoma y elementos no cromosómicos llamados plásmidos, transposones e integrones, los cuales le otorgan la gran capacidad adaptativa a la mayoría de las bacterias.

Los plásmidos no suelen codificar funciones esenciales para la bacteria y, por tanto, son innecesarios para el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, contienen información genética adicional responsable de la aparición de nuevas propiedades fenotípicas en la célula bacteriana.

Por ejemplo, pueden codificar la resistencia a antimicrobianos y la producción de toxinas, así como contener genes capaces de proporcionar a la bacteria la capacidad de metabolizar determinados sustratos (Venkatarama, 1999). Por su parte los transposones codifican caracteres también no esenciales, son extremadamente móviles,

se transfirieren y ayudan a transferir genes de plásmidos y cromosómicos. Los integrones tienen la capacidad de capturar y liberar genes de resistencia y poseen promotores fuertes para su expresión (Chartone de Souza, 1999).

En 1959, se identificó por primera vez en Japón la importancia clínica de la conjugación después de un brote de disentería bacilar causada por *Shigella flexneri* resistente a cuatro clases de antimicrobianos (Watanabe, 1966).

La transferencia genética por conjugación surge más bien entre bacilos gramnegativos donde el plásmido de conjugación codifica la producción de pilis sexuales y algunas otras proteínas necesarias en la transferencia de ADN (William, 1989).

La conjugación, puede ocurrir en las vías intestinales entre microorganismos apatógenos y patógenos. De este modo, en los últimos treinta años, ha aumentado de manera inexorable la proporción de bacterias entéricas que portan plásmidos de resistencia a múltiples fármacos.

Un fenómeno grave que constituye una amenaza para el amplio uso de antimicrobianos es la reciente aparición de multiresistencia en bacterias patógenas a nivel nosocomial y también comunitario.

Un problema grave en la actualidad es la resistencia que presentan las bacterias frente a los betalactámicos, pues es probablemente el grupo de antimicrobianos más utilizado. Las bacterias desarrollan al menos tres mecanismos para hacerse resistentes a ellos, que son independientes entre sí pero que pueden actuar sinérgicamente:

- Alteración de las enzimas blanco PBP's (penicillin binding proteins)
- Alteración de la membrana externa
- Producción de enzimas inactivantes como las betalactamasas.

Las PBP's son necesarias para que la bacteria forme su pared celular; los antimicrobianos betalactámicos se fijan en estas enzimas impidiendo la formación de ésta. Si la bacteria modifica sus PBP's se hará resistente (Daza, 1998).

La modificación de la membrana externa cuando es el único mecanismo implicado, no suele ser importante, pero sí cuando se asocia a la producción de betalactamasas, siendo especialmente decisiva en los gramnegativos, pues los betalactámicos entran a través de las porinas, que al modificarse o desaparecer pueden causar resistencia en *E. coli*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* y *Gonococo* (García y García, 1997).

La producción de enzimas inactivantes es sin duda el mecanismo más importante de resistencia a los betaláctamicos, ya que la adquisición de betalactamasas, ya sean plasmídicas o cromosómicas, es la causa más frecuente de resistencia (Daza, 1998).

Las betalactamasas plasmidiales de gramnegativos producen un alto nivel de resistencia y están muy extendidas sobre todo entre las enterobacterias. Algunas son de espectro muy amplio y confieren resistencia a la totalidad de los betalactámicos. Desde que se puso de manifiesto la importancia de las betalactamasas, se buscaron inhibidores de estas enzimas (Gómez-Luz *et al*, 1992), incluyéndose en este término diferentes compuestos químicos, entre los que destacan ácido clavulánico, sulbactan y tazobactan.

### **III. TRANSFERENCIA DE LOS GENES DE RESISTENCIA ENTRE BACTERIAS.**

Las bacterias disponen de varios mecanismos por los que adquieren genes de resistencia. Los genes de resistencia se pueden localizar en el cromosoma bacteriano y en elementos extracromosómicos autónomos que se denominan plasmidios, transposones e integrones.

Habitualmente, los plasmidios tienen la capacidad de transferirse o donarse de una bacteria a otra por el mecanismo de conjugación bacteriana, siendo un mecanismo general de transferencia genética y un vehículo para la diseminación de los genes de resistencia entre bacterias sin parentesco.

Actualmente se señala que las barreras para el intercambio de genes de resistencia entre microorganismos de origen animal y humano son cada vez menores, ya que en el intestino de los animales los distintos genes de resistencia pueden ser transferidos entre microorganismos, luego ser adquiridos por microorganismos saprófitos del intestino humano ya sea directamente o vía cadena alimentaria y, posteriormente ser transmitidos a patógenos que podrían ser diseminados al hombre (Amabile-Cuevas y Chicurel, 1992; Van den Bogaard y Stobberingh, 2000).

Así existen diversos estudios internacionales que señalan la transferencia de *E. coli* resistentes entre diversos animales y el hombre; Linton *et al* (1977), demostraron la transferencia de *E. coli* resistente a sulfonamidas desde canales de pollo a la flora cecal de cinco voluntarios humanos que manipulaban estos animales.

Otro ejemplo que demuestra que las bacterias resistentes pueden transmitirse desde los animales a la población humana es en los procesos de faenamiento, donde el hombre puede contaminarse con *E. coli* multiresistente de origen fecal y en el intestino

humano, ésta puede transferir sus patrones de resistencia a la flora intestinal normal. Ya en el año 1986, Okolo, aisló coliformes resistentes desde las canales, carne fresca y cocinada, manipuladores de alimentos y trabajadores de planteles pecuarios.

En 1992, estudios realizados con cepas de *E. coli* marcadas bioquímicamente e inoculadas en un animal, fueron encontradas, posteriormente en el intestino de otros animales y de humanos. Con esto, quedó demostrado que a pesar que existe cierta especificidad de huésped, las bacterias pueden intercambiarse entre animales y hombre, bien directamente o a través de la cadena alimentaria (Levy, 1994).

Otro estudio *in vitro* de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), orientado a evaluar el espectro de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de poblaciones humanas y animales, comprobó que un 41% de los aislados fueron multiresistentes a los mismos antimicrobianos, concluyendo que el intercambio de este microorganismo entre ambas poblaciones era posible, dejando claro que la resistencia en cepas de origen animal es un factor de riesgo para la población humana (Singh *et al.*, 1992).

También se describió la transferencia de *E. coli* multiresistente a diversos antimicrobianos desde pollos a granjeros (Levy *et al.*, 1996) y en Dinamarca, en el año 1999 se registró un brote por *Salmonella typhimurium* DT 104 resistentes a las fluoroquinolonas; la epidemiología y datos de los pacientes indicaron claramente que la primera fuente fue un criadero de cerdos (Molbak *et al.*, 1999).

Otro problema respecto a la transmisión de genes de resistencia es que estos microorganismos resistentes pueden persistir en el animal, y posteriormente pueden formar parte de la flora colonizadora normal de otros animales, de modo que no es infrecuente aislar microorganismos, como el caso de *E. coli*, que son resistentes a uno o más antimicrobianos aunque el animal nunca haya recibido terapia antimicrobiana (Radostitis *et al.*, 2002).

#### **IV. CAUSAS EN EL INCREMENTO DE LA RESISTENCIA BACTERIANA.**

Aunque existen muchos factores que pueden desencadenar resistencia bacteriana, los principales son:

1. Uso inadecuado de antimicrobianos, cuando se utilizan en enfermedades que no son de carácter bacteriano, también al administrarlos en cantidades mayores a lo necesario, es decir, una sobredosis y también en dosis subterapéuticas.

2. Uso sin la responsabilidad de un profesional a cargo de la administración de éstos.
3. Uso como medida profiláctica para la prevención de enfermedades, es el caso cuando se utilizan después del transporte.
4. Uso como promotores de crecimiento: lo cual permite mejorar la ganancia de peso y el índice de conversión alimenticia, favoreciendo el engorde de los animales.

De los cuatro factores señalados anteriormente, el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento en animales de producción fue una práctica muy extendida en la crianza intensiva, sobre todo en pollos, pavos, cerdos y ganado vacuno. El año 1999, Anadón *et al* señala que los antimicrobianos ejercían su actividad promotora del crecimiento por diversos mecanismos tales como:

*a.- Supresión de bacterias que producen toxinas específicas.*

En el caso de supresión de bacterias que producen toxinas específicas, está bien establecido que el índice de crecimiento y la eficacia alimenticia se reducen como una secuela de infección. Los agentes antimicrobianos pueden controlar la enfermedad actuando sobre las bacterias y como consecuencia sobre sus toxinas que afectan adversamente a la mucosa intestinal. Muchos de los antimicrobianos promotores de crecimiento actúan previniendo que las bacterias se adhieran al epitelio intestinal, lo que significa que las toxinas bacterianas se liberarían dentro del lumen intestinal donde se denaturalizarían por las enzimas digestivas; el efecto neto es que se desperdicia menos alimento manteniéndose la integridad del epitelio intestinal (Fiems *et al.*, 1991).

*b. Ahorro de nutrientes alimentarios.*

Los antimicrobianos bajo estas condiciones también son capaces de controlar el número de bacterias y su metabolismo reduciendo el consumo de nitrógeno y de energía, y permitiendo además que mayor cantidad de nutrientes esté disponible para su absorción. También se ha observado que estos aditivos reducen peso y el espesor de la pared intestinal y aumentan la renovación de células de la mucosa, efectos ligados a una mejor absorción de nutrientes (Stutz *et al.*, 1983). En el caso de los rumiantes, se espera que el antimicrobiano promotor de crecimiento no se altere en el medio ruminal, siendo el efecto global la suma del efecto sobre los microorganismos del retículo-rumen y del intestino delgado, y posiblemente también del ciego y colon (Armstrong, 1984).



*c. Modificación de mecanismos de la respuesta inmune.*

Por otra parte la respuesta inmune frente a cualquier proceso infeccioso puede verse disminuida, lo cual además significa un estrés para el animal. El proceso infeccioso puede o no manifestarse clínicamente dependiendo de la patogenicidad y del estado inmune del animal. Una demanda del sistema inmune puede reducir el índice de crecimiento y la eficacia alimenticia. Esta respuesta es mediada por citoquinas, las cuales inducen varias hormonas que incluyen la hormona liberadora de corticotrofina, prostaglandinas, glucagón, insulina y corticoides (Grunfeld *et al.*, 1996). En este contexto, de especial interés es la liberación de la hormona liberadora de corticotrofina y corticoides ya que tienen un efecto catabólico reduciendo la masa de tejido muscular.

Respecto a la situación internacional de los antimicrobianos como promotores de crecimiento, el año 1986, el gobierno Sueco prohibió el uso de los antimicrobianos con estos fines. Los antimicrobianos y quimioterapéuticos solamente pudieron ser incorporados en las raciones animales para aliviar o curar enfermedades, no para propósitos de promoción de crecimiento o rendimiento.

La historia reciente de la prohibición de promotores de crecimiento antimicrobianos en la Unión Europea (UE) ocurre entre los años 1995 al año 2000. Cuando Suecia se unió a la UE en 1995, el Tratado de Adhesión le permitió a este país no aprobar el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento por un período de 4 años, es decir, fines de 1998. Durante este período otros estados miembros de la UE como Dinamarca, Alemania y Finlandia impusieron varias cláusulas de protección en contra de ciertos antimicrobianos como avoparcina, tilosina, espiramicina y virginamicina los cuales eran autorizados en la nutrición animal con propósitos de promoción del crecimiento. La Comisión de la UE prohibió el uso de avoparcina en nutrición animal en 1997 y el Consejo de Ministros de la UE suspendió la autorización para el uso como aditivos de fosfato de tilosina, espiramicina, zinc-bacitracina y virginamicina al final de 1998 (Brufau, 2003).

Hoy, la posición de la UE en el campo de los promotores de crecimiento soporta su reglamentación en las directivas 70/524, donde se establecen las bases para la regulación de los aditivos alimenticios: promotores de crecimiento, anticoccidiales, antioxidantes, saborizantes, aditivos tecnológicos (compactantes de pellet, emulsificadores), pigmentantes, preservantes, provitaminas, elementos traza, enzimas y probióticos. Más adelante, las directivas 96/51 y 87/53 (1987) y su revisión de 1998

especifican más detalles acerca del establecimiento de consumo diario aceptable(ADI) y límite máximo de residuos (MRL), (Comisión de Las Comunidades Europeas, 2002).

También se fijaron fechas para la revisión de las marcas aprobadas antes del primero de enero de 1998 y reevaluación de los mismos cada tres años (30/09/00). Para el año 2003 se establecerán las marcas aprobadas para los próximos diez años. Por otro lado, se establecen nuevos criterios para la aprobación de nuevos promotores, siendo para la UE muy importante que no sean explotados aquellos que se han utilizados con fines terapéuticos en medicina humana o se le conoce resistencia cruzada con algún medicamento utilizado en humanos (CCE, 2002).

Caso contrario ocurre con la posición de los Estados Unidos, donde el Servicio de Investigaciones Económicas del Departamento de Agricultura (ERS), en comunicación expandida el 17 de mayo de 2001, sugiere que el uso de antimicrobianos en animales, además de salvaguardar la salud de los mismos, muestra beneficios económicos a los consumidores y a los productores. El impacto económico de la hipoteca de la prohibición en el uso de los promotores de crecimiento podría costar mas de US\$45 millones.

## **V. PROBLEMAS DE LA RESISTENCIA BACTERIANA EN ANIMALES DE PRODUCCIÓN.**

De acuerdo a lo señalado, el realizar una terapia antimicrobiana en animales de compañía y producción requiere un conocimiento clínico de los fármacos y agentes microbiológicos comprometidos incluyendo datos actualizados de sensibilidad (Chambers y Sande, 1996).

Al respecto, el médico veterinario no siempre puede identificar la bacteria involucrada antes de emprender un tratamiento; en estos casos, el comienzo de una terapia empírica óptima, exige conocer los microorganismos infectantes más frecuentes y su sensibilidad frente a los antimicrobianos disponibles en el mercado nacional.

Seleccionar un antimicrobiano frente al cual la bacteria es resistente, además de provocar un fracaso terapéutico, conlleva a grandes pérdidas económicas al productor, ya que debe comenzar una segunda o tercera terapia con el consiguiente incremento de los tiempos de descarte, es decir, la permanencia de los animales en el plantel y por otro lado, eliminar mayor cantidad de huevos o leche que no pueden ser enviados a consumo de la población. Por otro lado, la presencia de antimicrobianos en la leche genera

grandes pérdidas económicas en la industria láctea, ya que éstos provocan inhibición completa o parcial del desarrollo de cultivos bacterianos productores de ácido láctico dificultando la elaboración de productos como el queso y el yogurt (Morétain, 1997). Además, hay que tomar en cuenta el siguiente hecho; la leche proveniente de un predio generalmente es mezclada con la de otros, por lo que los residuos de antimicrobianos de una vaca pueden contaminar grandes volúmenes de producción lechera (McEwen y McNab, 1997).

## **VI. MEDIDAS PARA DISMINUIR LA RESISTENCIA BACTERIANA.**

En el año 1984, la OMS sugirió que frente a una terapia con antimicrobianos se tengan presente las siguientes recomendaciones:

- a. Realizar tratamientos con monodrogas, ya sea frente a un diagnóstico empírico o en una terapia definitiva donde ya hay conocimiento del agente etiológico.
- b. El antimicrobiano seleccionado debe ser de espectro reducido.
- c. La administración debe ser por la vía apropiada.
- d. La utilización de estas drogas sea por el menor tiempo posible.

Para disminuir la resistencia bacteriana en animales de producción se debe recordar que el desarrollo de resistencia bacteriana está basado principalmente en la presencia de genes y presión selectiva debido al uso de antimicrobianos (Levy, 1994).

Con relación a este último punto, existe consenso mundial que debe disminuirse la cantidad de antimicrobianos empleados en animales de producción, ya que en la prevención de enfermedades infecciosas de origen bacteriano deben considerarse estrategias como son: vacunas, optimización de la higiene, manejo del medio ambiente, alimentación equilibrada, y manejo del stress, entre otras. Los antimicrobianos deben usarse cuando estas medidas han fallado y no como un reemplazo de ellas. Sólo cuando se manifiesta un cuadro clínico de origen bacteriano, la terapia antimicrobiana es sin duda, el primer método de elección (Wierup, 2000).

Dentro de las medidas tomadas por los países para disminuir la resistencia bacteriana en el ámbito mundial, se considera el uso de antimicrobianos sólo bajo receta médica veterinaria y la instauración de programas permanentes de monitoreo de resistencia. Al respecto, Aarestrup (1999) señala que los mayores porcentajes de resistencia se pueden observar en países donde no existe vigilancia ni políticas de restricción en el uso de estos fármacos.

Por otro lado, para que un país pueda establecer líneas de trabajo orientadas a controlar y disminuir la resistencia bacteriana, debe tener información sobre la prevalencia de resistencia microbiana por droga, especie animal y de los cambios que ocurren a través del tiempo; esto se logra mediante programas permanentes de monitoreo y los resultados obtenidos de ellos deben ser periódicamente informados a los médicos veterinarios.

Otra medida que permite disminuir el problema de la resistencia es no utilizar los antimicrobianos como promotores de crecimiento. Debe considerarse además el hecho que la situación a nivel internacional sobre el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento es algo ya dilucidado; la Comunidad Europea considerando que no se debe incrementar el reservorio de bacterias resistentes en los animales de producción, prohíbe utilizar como aditivos en los alimentos para los animales, antimicrobianos que se utilizan en enfermedades graves en humanos y/o que generen resistencia cruzada con antimicrobianos de primera línea de elección en medicina humana. Es así que en el año 1997 prohíbe la utilización como promotores del crecimiento la avoparcina (Directiva 97/6/CE) y en 1998 de zinc-bacitracina, espiramicina, virginiamicina y fosfato de tilosina (Directiva 70/524/CCE).

## **VII. MONITOREO DE LA RESISTENCIA BACTERIANA.**

En el año 1996, España puso en funcionamiento la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antimicrobianos (VAV), cuyo objetivo es obtener datos de sensibilidad antimicrobiana en el ámbito animal con el fin de valorar su contribución al problema global de la resistencia bacteriana. La iniciativa española se encuentra dentro de las pioneras en Europa, junto con el programa Danés DANMAP iniciado en 1995, el programa sueco SVARM en el año 2000 y las redes francesas de *Salmonella* y bacterias patógenas del ganado bovino de mediados de los años noventa (Moreno *et al.*, 2000).

La red VAV comprende tres programas de vigilancia que se ocupan de bacterias procedentes de animales sanos (PAS), bacterias procedentes de animales enfermos (PAE) y bacterias procedentes de alimentos de origen animal (PAOA); el primero que entró en funcionamiento fue el programa PAE cuyos primeros resultados se remontan a 1997; sin embargo, el que mayor interés tiene desde el punto de vista de la Salud Pública es el programa PAS que se inició a finales de 1998.

Actualmente la red VAV incluye tres tipos bacterianos, las bacterias zoonóticas que se transmiten por alimentos de origen animal tales como *Salmonella*, *Campylobacter yeyuni* y *Campylobacter coli*, las bacterias intestinales indicadoras entre las cuales se encuentran *E. coli*, *Enterococcus faecium* y enterococos resistentes a vancomicina y por último, bacterias patógenas de los animales como por ejemplo *Staphylococcus aureus* (Moreno *et al.*, 2000).

La principal ventaja para los médicos veterinarios es que el sistema de vigilancia permite orientar la terapéutica empírica, ya que en muchos casos no es posible esperar a que se reciban del laboratorio los resultados de un antibiograma para instaurar un tratamiento, pero sí puede ser que el tratamiento más adecuado no sea el mismo en todas las zonas geográficas, siendo los datos locales de una red de vigilancia los que permiten adecuar continuamente los tratamientos empíricos, aumentando así el éxito terapéutico (Moreno *et al.*, 2000).

En 1995, en beneficio de la seguridad de los consumidores y la salud de los animales, el Ministerio Danés de Agricultura y Pesca y el Ministerio de Sanidad solicitaron a los Laboratorios Veterinarios de Dinamarca, a la Agencia Veterinaria y Alimentaria de este mismo país y al “Statens Serum Institut” su colaboración en la vigilancia e investigación de las resistencias bacterianas a los agentes antimicrobianos. Esta petición dio lugar al desarrollo del Programa Integral Danés para la Monitorización e Investigación de Resistencias Antimicrobianas, denominado DANMAP. El programa se centra principalmente en el control de las resistencias en bacterias de animales destinados al consumo y en los riesgos de transmisión de enteropatógenos resistentes y bacterias comensales al hombre a través de los alimentos (Monnet *et al.*, 2000).

Dentro de sus objetivos destacan los siguientes:

- a. Monitorear la ocurrencia de resistencia bacteriana en animales de abasto, alimentos y humanos.
- b. Monitorear el consumo de agentes antimicrobianos por parte de la población humana y animal.
- c. Detectar y cuantificar la propagación de bacterias resistentes y genes de resistencia desde los animales al hombre.
- d. Proporcionar pautas para la quimioterapia en humanos y animales, para asegurar así su uso de manera prudente (Wegener *et al.*, 1997).

El “Statens Serum Institut” es el organismo encargado de la vigilancia de la resistencia en aislamientos bacterianos patógenos e indicadores procedentes de humanos

y de su asociación con el uso de antimicrobianos para el tratamiento de infecciones humanas. La vigilancia de la resistencia en aislamientos bacterianos de ganado la realiza el “Danish Veterinary Laboratory” el cual debe realizar monitoreos en el ganado y asociarla al uso de agentes antimicrobianos en éste; el programa utiliza *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus coagulasa negativo*. Dentro de las bacterias zoonóticas incluyen *Salmonella spp.*, *Campylobacter coli/jejuni* y *Yersinia*, y como bacterias indicadoras utilizan *E. coli* y *Enterococcus*.

Tanto las bacterias zoonóticas e indicadoras se aíslan de muestras de heces recogidas en la matanza de terneros, cerdos, y pollos. Se recogen doscientas muestras al azar procedentes de cerdos y pollos y para el caso de terneros se recogen setenta y cinco cada tres meses. En los mataderos de todo el país, los inspectores de carne recogen muestras aleatorias proporcionales al número de animales sacrificados.

Por otro lado, el “Danish Zoonosis Centre” encargado de analizar todos los datos y difundir un informe de los resultados, actualmente tiene en estudio el efecto de la presión selectiva de agentes antimicrobianos sobre la flora microbiana intestinal y el desarrollo de resistencia utilizando modelos animales y modelos *in vitro*. Los mecanismos y antecedentes genéticos de resistencia están siendo investigados en aislamientos bacterianos resistentes con el uso de técnicas genético moleculares (Wegener *et al.*).

Así también, en noviembre de 1999, la Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos organizó un simposio sobre “Resistencia Bacteriana en Animales de Producción” en el cual participaron todos los países de la Comunidad Europea con el fin de armonizar y definir estrategias en común sobre el monitoreo de la resistencia bacteriana en las especies animales de producción. Dado que tanto en animales como en humanos, el uso de antimicrobianos no sólo causa incremento de resistencia en bacterias patógenas, sino también en la flora endógena intestinal, uno de los principales acuerdos tomados en esa reunión fue que el monitoreo debería involucrar siempre tres grandes grupos de bacterias en aves, cerdos y bovinos: bacterias zoonóticas, bacterias patógenas y bacterias indicadoras. Además, se enfatizó que los resultados deberían ser permanentemente informados a las autoridades y médicos veterinarios, ya que son una herramienta de gran utilidad para desarrollar líneas de trabajo orientadas al uso prudente de los antimicrobianos en medicina veterinaria (Sanders, 1999).

## **BACTERIAS A MONITOREAR**

### *I.- MONITOREO DE BACTERIAS ZOONÓTICAS*

Con relación a las bacterias zoonóticas, cuando los antimicrobianos son administrados en animales productores de alimentos (cerdos, aves y vacunos) ya sea como medida terapéutica, profiláctica o como promotores de crecimiento, favorecen la resistencia en bacterias existentes en la flora intestinal que son patógenas para el animal y para el humano. Por ejemplo, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* y *E. coli*. Dentro de estas bacterias, se señala que todos los países deberían incluir obligatoriamente *S. typhimurium* y *S. enteritidis* y los otros serotipos dependerán de su importancia epidemiológica (Wray y Gnanou, 2000).

El monitorear este tipo de bacterias permite dar a conocer a los Médicos Veterinarios, cuales antimicrobianos usados en medicina veterinaria y de importancia en medicina humana están generando resistencia, con el fin de evitar la utilización de éstos en los animales de producción.

### *II.- MONITOREO DE BACTERIAS PATÓGENAS*

Con relación a las bacterias patógenas, en todos los programas de monitoreo un gran número de este tipo de bacterias son analizadas, ya que son las que están expuestas a mayor presión de selección, presentando determinantes de multiresistencia no sólo a antimicrobianos de una misma familia, sino que también a sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. Para el caso de *Staphylococcus spp.* se señalan porcentajes de resistencia hasta un 8% para penicilina y de un 7 a un 100% para ampicilina, dependiendo de los predios muestreados (Owens y Watts, 1998).

En países de la Comunidad Europea el número de antimicrobianos analizados en este grupo de bacterias van de 5 a 37 en promedio, siendo los más comunes estreptomicina, gentamicina, neomicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclinas y sulfonamidas (Caprioli *et al.*, 2000). La OMS recomienda además incluir las fluoroquinolonas debido a su potencial impacto en la salud humana.

### *III.- MONITOREO DE BACTERIAS INDICADORAS*

La importancia de las bacterias indicadoras se debe a que son un reservorio de genes de resistencia, que podrían ser transmitidos a bacterias patógenas y zoonóticas. En España, la bacteria utilizada como indicadora en cerdos, bovinos y aves es *E. coli*

(Moreno *et al.*, 2000). La elección de *E. coli* se justifica fundamentalmente por su elevada frecuencia de aislamiento e identificación en los laboratorios de Sanidad Animal. Además, en los programas de animales sanos que utiliza la red VAV en Europa se emplea por ser el mejor indicador entre las bacterias gramnegativas. El mismo papel, entre las bacterias grampositivas, lo desempeñan los enterococos y especialmente *E. faecium*, razón por la que también forma parte de los programas de vigilancia.

El monitoreo de bacterias indicadoras permite conocer cuales antimicrobianos están generando mayores porcentajes de resistencia, para no utilizarlos como herramientas terapéuticas en medicina veterinaria.

### **VIII. SITUACIÓN NACIONAL REPECTO A LA RESISTENCIA BACTERIANA.**

En Chile, al igual que en otros países, los antimicrobianos son la principal herramienta terapéutica en el tratamiento de enfermedades bacterianas en medicina veterinaria. A partir del año 1996 el Servicio Agrícola Ganadero del Ministerio de Agricultura aumentó las exigencias para el Registro Farmacéutico, logrando instaurar recién el año 1999 un Plan Nacional de Control de Residuos de Medicamentos en productos de origen animal (para salmones de exportación se instauró a partir del año 1997). A pesar de este esfuerzo no existen actualmente programas de monitoreo sistemático para la resistencia en bacterias indicadoras, zoonóticas y patógenas aisladas de bovinos, cerdos y aves, que entregue información frente a los antimicrobianos que ofrece el mercado nacional. Tampoco existe restricción del uso de estos fármacos por especies o sistemas de producción, pudiendo adquirirse y emplearse en muchos casos, sin la supervisión de un médico veterinario.

A pesar de la situación en la que se encuentra nuestro país, existen algunos estudios locales de sensibilidad (San Martín *et al.*, 1991; Borie *et al.*, 1993; León, 1997; San Martín *et al.*, 2000). Por ejemplo, el año 2000, tanto San Martín como Borie detectaron en nuestro país que los porcentajes de resistencia para cepas de *E. coli* aisladas de mastitis clínica, son de 2,2 - 3,9 - 6,7% para cefquinoma, cefoperazona y ceftiofur respectivamente.

Tomando en consideración los aspectos planteados en esta revisión, referente al problema actual de la resistencia bacteriana y su control, la ausencia a nivel nacional de programas de monitoreo, la falta de conciencia del rol actual que cumple el médico



veterinario en cuanto a las prescripciones de antimicrobianos, y por las características mencionadas para la bacteria *Escherichia coli*, esta memoria tiene como objetivo utilizar esta bacteria como indicadora en el monitoreo de la resistencia bacteriana frente a antimicrobianos utilizados en la terapia de infecciones bacterianas en ganado bovino.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Realizar un monitoreo de la resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos de mayor uso en el ganado bovino, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a.- Determinación de la sensibilidad *in vitro* de las cepas de *E. coli* aisladas de ganado lechero y ganado destinado a carne frente a los diferentes antimicrobianos.
  
- b.- Definir perfiles de resistencia de las cepas aisladas de ganado lechero y ganado destinado a carne.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **I. Animales utilizados.**

Bovinos de producción de carne, faenados en el Frigorífico Lo Valledor S.A. y vacas de lecherías de la Región Metropolitana.

### **II- Tamaño de la muestra.**

Para el cálculo del número de cepas a aislar se consideraron valores estimados del porcentaje de resistencia nacional obtenidos del proyecto Fondecyt N° 1000782 denominado “Farmacovigilancia de la resistencia bacteriana en el ganado lechero”. Estos valores son 31,9%, con un nivel de confianza del 95% y un error máximo estimado en  $\pm 10$ . De acuerdo a lo señalado y considerando una eficiencia de aislamiento de 80%, el número mínimo de muestras fue de 106 y el número de cepas totales a estudiar es de al menos 84. El 50% de las muestras se tomaron de ganado lechero y el 50% restante de ganado destinado a carne.

### **III- Obtención, aislamiento e identificación de cepas bacterianas.**

A nivel de planta faenadora se tomaron aproximadamente 10 g. de contenido cecal (intestino grueso) en frascos de vidrio estériles que contenían 50 ml de medio de transporte Cary y Blair (BBL®). En el caso de las lecherías, se realizó extracción de contenido rectal mediante el uso de mangas de palpación. En ambos casos, las muestras fueron mantenidas a temperatura de refrigeración hasta el momento de su análisis en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, el que comenzó dentro de 6 horas de haber sido obtenida.

Para el aislamiento e identificación de *E. coli* se utilizaron las pautas recomendadas por Orskov, (1984) en el Manual de Sistemática Bacteriana Bergey's. Para ello, se sembraron las heces, previamente diluidas en suero fisiológico, en 2 medios de cultivo selectivo-indicadores para coliformes: Agar M<sup>c</sup> Conkey (BBL®) y Agar XLD (DIFCO®) incubados a 37° C por 24 horas, hasta lograr desarrollo bacteriano.

Las colonias sospechosas fueron identificadas mediante una batería de 4 pruebas bioquímicas, que son diferenciales para enterobacterias. Estas pruebas son: prueba del indol, prueba del rojo de metilo, desarrollo en agar citrato y agar Kligler.

Una vez identificadas, las cepas fueron mantenidas en agar común semitendido hasta su posterior análisis de sensibilidad a los antimicrobianos.

#### **IV- Test de sensibilidad *in vitro*.**

Todas las cepas aisladas fueron sometidas al método de sensibilidad *in vitro* denominado Método de Dilución en Placa frente a cada antimicrobiano, método reconocido internacionalmente como oficial. Esto se realizó en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

##### **a.- Método de Dilución en Placa:**

Para la utilización de este método se siguieron las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 1999). Con este método se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y, por ser cuantitativo, es el que se utilizó para determinar los perfiles de resistencia.

Los estándares de antimicrobianos (droga pura) se obtuvieron directamente de los laboratorios proveedores, los cuales señalaron su potencia. Con cada uno de ellos, se prepararon soluciones stock de 2000 µg/ml, los cuales se mantuvieron refrigerados a 4°C hasta por una semana. A partir de ellas se prepararon diluciones de antibiótico en el momento del análisis. Preparadas las diluciones, éstas se mezclaron con agar Mueller-Hinton en una proporción de 1:10.

Por otro lado, las cepas bacterianas previamente aisladas se sembraron en caldo común y la suspensión se ajustó con agua ultra pura estéril a 0,5 del nefelómetro de M<sup>c</sup> Farland. A partir de esa suspensión, se prepararon los inóculos en una relación de 1:10. Para inocular las placas se utilizó el inóculo-replicador de Steers. La inoculación del medio comenzó por las placas control sin antimicrobiano, luego las de menor concentración de antimicrobiano, dejando para el final las placas de mayor concentración.

Todas las determinaciones de MIC se realizaron por duplicado y se incubaron a 36°C ± 1 por 18 a 24 horas. Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922. Como cada cepa de una misma especie bacteriana se comporta individualmente frente a las

diferentes concentraciones de un antimicrobiano determinado, las MIC se expresaron en valores absolutos ( $\mu\text{g/ml}$ ). Se definió la  $\text{MIC}_{50}$  y  $\text{MIC}_{90}$  para esta especie bacteriana frente a cada antimicrobiano estudiado.

La lectura de las MIC se realizó basándose en los puntos de corte que presenta cada antimicrobiano los cuales se extrajeron del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 1999). Basándose en lo anterior, para cada cepa bacteriana se determinó su sensibilidad, definiéndola como sensible o resistente, la sensibilidad intermedia se señaló con fines prácticos como resistente, por que del punto de vista clínico una cepa con sensibilidad intermedia se trata como resistente, en base a los puntos de corte que presentan los antimicrobianos.

**b.- Antimicrobianos:**

- Cefquinoma (Cb)
- Cefoperazona (CFP)
- Ceftiofur (XNL)
- Sulfametoxazol + Trimetoprim (SXT)
- Gentamicina (CN)
- Oxitetraciclina (OT)
- Enrofloxacino (ENR)
- Ciprofloxacino (CIP)

## **RESULTADOS**

Del total de muestras, se aislaron y tipificaron 50 y 72 cepas de *E. coli* en ganado lechero y en ganado destinado a carne respectivamente. Los resultados se detallan en los siguientes puntos:

### **I-. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de las cepas de *E. coli* aisladas de ganado lechero y ganado destinado a carne frente a los diferentes antimicrobianos.**

Para cada cepa bacteriana se determinó su sensibilidad, definiéndola como sensible o resistente (la sensibilidad intermedia se señaló con fines prácticos como resistente).

Para el análisis de sensibilidad, las cepas aisladas se desafiaron a los siguientes antimicrobianos: sulfametoxazol-trimetoprim, oxitetraciclina, enrofloxacino, ciprofloxacino, cefquinoma, cefoperazona, ceftiofur y gentamicina.

En el Gráfico N° 1 se indican el porcentaje de resistencia que presentan las cepas a lo menos a un antimicrobiano; siendo de un 86% y 11% ganado lechero y ganado destinado a carne respectivamente.

Las determinaciones de las MIC como valores absolutos para cada cepa aislada y su respectiva determinación de MIC<sub>50</sub> y MIC<sub>90</sub> se señalan en el Cuadro N° 1 para ganado lechero y en el Cuadro N° 2 para ganado destinado a carne, siendo los resultados los siguientes:

Para ganado lechero las MIC<sub>50</sub> fluctuaron entre  $\leq 0,125\text{ug/ml}$  y  $\geq 128\text{ug/ml}$  en el siguiente orden decreciente: oxitetraciclina y ceftiofur con  $\geq 128\text{ug/ml}$ , ciprofloxacino con  $8\text{ug/ml}$ , enrofloxacino con  $4\text{ug/ml}$ , sulfametoxazol-trimetoprim con  $2\text{ug/ml}$ , gentamicina con  $0,5\text{ug/ml}$ , cefoperazona con  $0,25\text{ug/ml}$  y cefquinoma con  $\leq 0,125\text{ug/ml}$ .

Para la MIC<sub>90</sub> el rango estuvo entre  $\leq 0,125\text{ug/ml}$  y  $\geq 128\text{ug/ml}$  y los resultados en orden decreciente fueron los siguientes: oxitetraciclina, enrofloxacino, ciprofloxacino y ceftiofur con  $\geq 128\text{ug/ml}$ , sulfametoxazol-trimetoprim con  $8\text{ug/ml}$ , cefoperazona y gentamicina con  $0,5\text{ug/ml}$ , con  $0,25\text{ug/ml}$  y cefquinoma con  $\leq 0,125\text{ug/ml}$ .

Por otro lado, las determinaciones para MIC<sub>50</sub> en ganado destinado a carne presentaron un rango entre  $\leq 0,125\text{ug/ml}$  y  $2\text{ug/ml}$  cuyo orden decreciente fue:

oxitetraciclina y sulfametoxazol-trimetoprim con 2ug/ml, ceftiofur y gentamicina con 0,5ug/ml, cefoperazona con 0,25ug/ml y finalmente ciprofloxacino, enrofloxacino y cefquinoma con  $\leq 0,125$ ug/ml.

Para MIC<sub>90</sub>, el rango estuvo entre  $\leq 0,125$ ug/ml y 8ug/ml, los resultados en orden decreciente fueron: oxitetraciclina con 8ug/ml, sulfametoxazol-trimetoprim con 2ug/ml, cefoperazona, ceftiofur y gentamicina con 0,5ug/ml y por ultimo enrofloxacino, ciprofloxacino y cefquinoma con  $\leq 0,125$ ug/ml.

Otro punto importante de analizar es el que dice relación con la resistencia que presentan las cepas de *E. coli* frente a cada antimicrobiano en estudio. Los resultados como porcentaje de cepas resistentes a cada antimicrobiano, se exponen en el Gráfico N° 2 para ganado lechero y en el Gráfico N° 3 para ganado destinado a carne.

Si se analiza el Gráfico N° 2 se observa que la resistencia en ganado lechero a los antimicrobianos en estudio, presentan el siguiente orden de manera decreciente: el antimicrobiano al cual las cepas presentaron mayor resistencia es oxitetraciclina con un 84%, seguida de enrofloxacino con un 56% y ciprofloxacino y ceftiofur con 54%. Más distante se ubica sulfametoxazol-trimetoprim con 16% de resistencia. Todas las cepas fueron sensibles a gentamicina, cefquinoma y cefoperazona.

El análisis del Gráfico N° 3 que corresponde a ganado destinado a carne, se observa que la resistencia en un plano global es menor que en ganado lechero. El orden decreciente de resistencia de cada antimicrobiano es: sulfametoxazol-trimetoprim con 10%, oxitetraciclina con 4%, y ceftiofur con 3%. Un 1% de las cepas fue resistente a cefquinoma, cefoperazona, ciprofloxacino y gentamicina. Frente a enrofloxacino el total de cepas fue sensible.

## **II.- Perfiles de resistencia.**

En el Cuadro N° 3 se observa el porcentaje de cepas resistente a 1, 2 y 3 o más antimicrobianos y en el Cuadro N° 4 los perfiles de resistencia.

El análisis del Cuadro N° 3, permite observar que en ganado lechero el mayor porcentaje de resistencia fue a cuatro antimicrobianos con un 46%, seguido del perfil a un antimicrobiano con un 26% siendo el más bajo para tres antimicrobianos con un 2% de cepas resistentes.

En ganado destinado a carne sólo se encontraron cepas resistentes a 1, 2 y más de 5 antimicrobianos, siendo el mayor porcentaje el perfil a 1 antimicrobiano con un 7% de las cepas; para 2 antimicrobianos con un 2,8% y para más de 5 antimicrobianos un 1,4% de cepas resistentes. En este último caso, este porcentaje corresponde solo a una cepa que fue resistente a 7 antimicrobianos de los 8 estudiados.

• ***Análisis de los perfiles de resistencia***

Este análisis se presenta en el Cuadro N° 4, observándose en las cepas aisladas de ganado lechero los siguientes perfiles:

- Para 1 antimicrobiano: Sulfametoxazol-trimetoprim, 1 cepa.  
Oxitetraciclina, 12 cepas.
- Para 2 antimicrobianos: Sulfametoxazol-trimetoprim/ oxitetraciclina, 2 cepas.
- Para 3 antimicrobianos: Sulfametoxazol-trimetoprim/ oxitetraciclina/  
enrofloxacino, 1 cepa.
- Para 4 antimicrobianos: Oxitetraciclina/ enrofloxacino/ ciprofloxacino/  
ceftiofur, 23 cepas.
- Para 5 o más antimicrobianos: Oxitetraciclina/ enrofloxacino/ ciprofloxacino/  
ceftiofur/ sulfametoxazol-trimetoprim, 4 cepas.

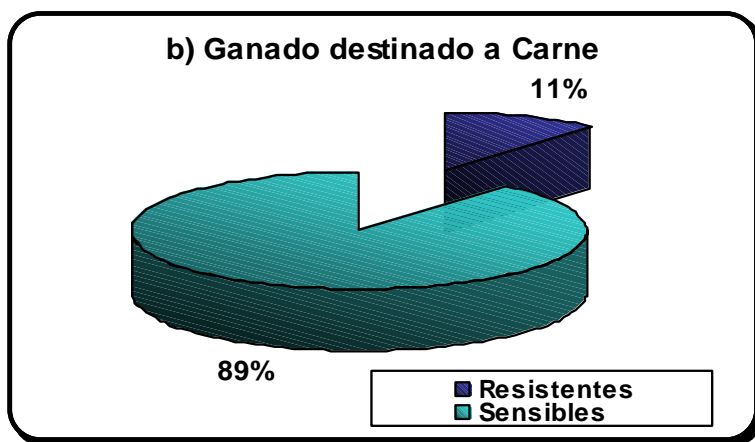
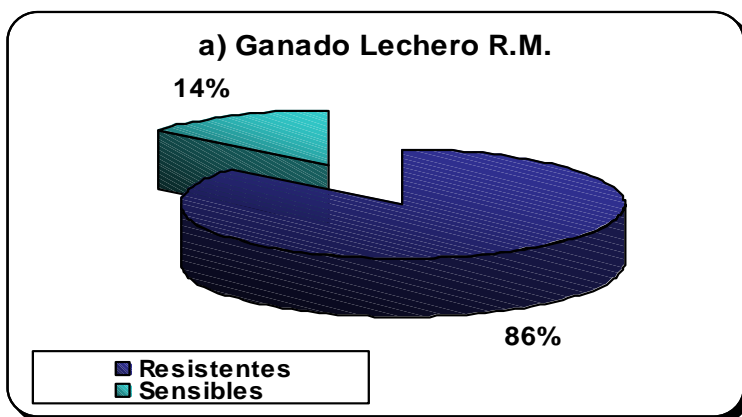
En las cepas aisladas de ganado destinado a carne se presenta una situación un poco diferente (Cuadro N°4), observándose lo siguiente:

- Para 1 antimicrobiano: Sulfametoxazol-trimetoprim, 4 cepas.  
Ceftiofur, 1 cepa.
- Para 2 antimicrobianos: Sulfametoxazol-trimetoprim/ oxitetraciclina, 2 cepas.
- Para más de 5 antimicrobianos: Oxitetraciclina/  
ceftiofur/ cefquinoma/ cefoperazona/ Sulfametoxazol-trimetoprim/ enrofloxacino  
/ciprofloxacino, 1 cepa.



**Gráfico N° 1**

Porcentajes de cepas de *E. coli* aisladas de a) ganado lechero y b) ganado destinado a carne resistentes al menos a un antimicrobiano.



**Cuadro N° 1**

Valores de MIC de las 50 cepas de *E. coli* aisladas de ganado lechero.

AB	n	Concentración ug/ml											MIC 50 ug/ml	MIC 90 ug/ml
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128		
OT	50					6	2		3		4	35	≥ 128	≥ 128
ENR	50	22					5	1		4	3	15	4	≥ 128
CIP	50	22			1		1	3	1			22	8	≥ 128
STX	50				20	21	1	6	2				2	8
XNL	50	1	20	1	1					1		26	≥ 128	≥ 128
Cb	50	48	2										≤ 0.125	≤ 0.125
CFP	50	14	19	16		1							0.25	0.5
CN	50	1	15	34									0.5	0.5

LEYENDA	ANTIMICROBIANOS
OT	OXITETRACICLINA
ENR	ENROFLOXACINO
XNL-Cb-CFP	CEFTIOFUR-CEFQUINOMA-CEFOPERAZONA
CIP	CIPROFLOXACINO
STX	SULFAMETOXAZOL+TRIMETOPRIM

**Cuadro N° 2**

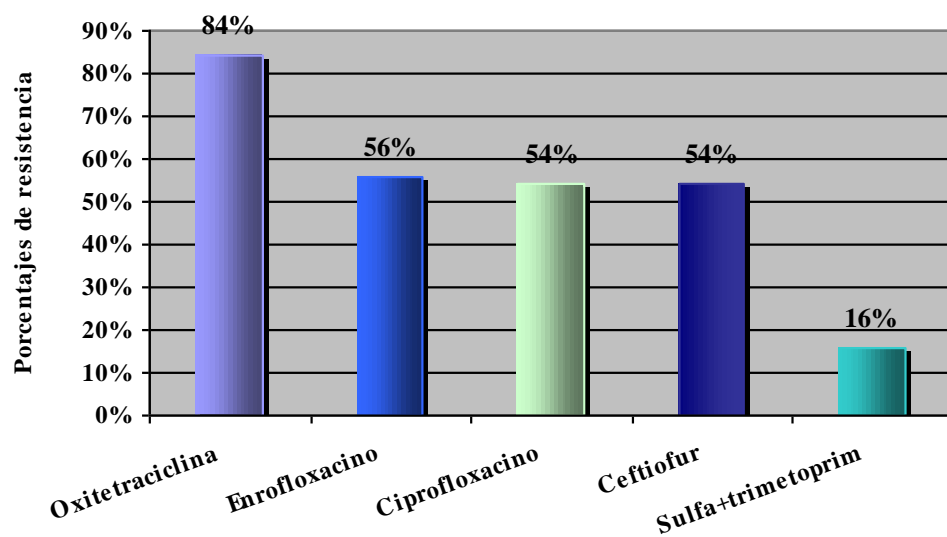
Valores de MIC de las 72 cepas de *E. coli* aisladas de ganado destinado a carne.

AB	n	Concentración ug/ml											MIC 50 ug/ml	MIC 90 ug/ml
		0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128		
OT	72				20	49		1				2	2	8
ENR	72	70	1		1								≤ 0.125	≤ 0.125
CIP	72	71				1							≤ 0.125	≤ 0.125
STX	72				26	39	5	2					2	2
XNL	72	7	21	38	4			1				1	0.5	0.5
Cb	72	67		3					1			1	≤ 0.125	≤ 0.125
CFP	72	12	31	23	2	2			1			1	0.25	0.5
CN	72			70	2								0.5	0.5

LEYENDA	ANTIMICROBIANOS
OT	OXITETRACICLINA
ENR	ENROFLOXACINO
XNL-Cb-CFP	CEFTIOFUR-CEFQUINOMA-CEFOPERAZONA
CIP	CIPROFLOXACINO
STX	SULFAMETOXAZOL+TRIMETOPRIM

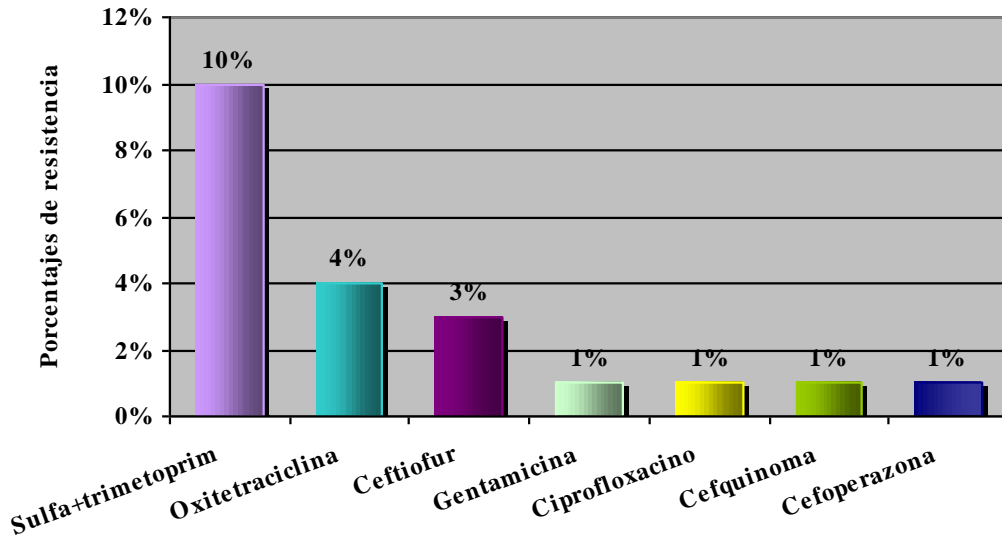
**Gráfico N° 2**

Porcentajes de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de ganado lechero frente a cada antimicrobiano en estudio.



**Gráfico N° 3**

Porcentajes de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de ganado destinado a carne frente a cada antimicrobiano en estudio.



**Cuadro N° 3**

Porcentajes de cepas de *E. coli* resistentes a uno o más antimicrobianos, según tipo de propósito(\*).

<b>GRUPO</b>	<b>1 AB</b>	<b>2AB</b>	<b>3 AB</b>	<b>4 AB</b>	<b>5 AB O MÁS</b>
<b>GANADO LECHERO</b>	26%	4%	2%	46%	8%
<b>GANADO CARNE</b>	7%	3%	–	–	1,40%

\* Ganado lechero y Ganado destinado a carne

<b>LEYENDA</b>	
<b>1 AB</b>	<b>Resistente a un antimicrobiano</b>
<b>2 AB</b>	<b>Resistente a dos antimicrobianos</b>
<b>3 AB</b>	<b>Resistente a tres antimicrobianos</b>
<b>4AB</b>	<b>Resistente a cuatro antimicrobianos</b>
<b>5 AB o más</b>	<b>Resistente a cinco o más antimicrobianos</b>

**Cuadro N°4**

Perfiles de resistencia de *E. coli* aislada de ganado lechero y ganado  
destinado a carne.

<b>GRUPO</b>						<b>N° de cepas y Perfiles</b>					
<b>GANADO LECHERO</b>		1 STX 12 OT	2 STX-OT	1 STX-OT-ENR	23 OT-ENR-CIP-XNL	4 OT-ENR-CIP-XNL-STX					
<b>GANADO CARNE</b>		4 STX 1 XNL	2 STX-OT	-	-	1 XNL-Cb-CFP-OT-ENR-CIP-STX					

<b>LEYENDA</b>	<b>ANTIMICROBIANOS</b>
OT	OXITETRACICLINA
ENR	ENROFLOXACINO
XNL-Cb-CFP	CEFTIOFUR-CEFQUINOMA-CEFOPERAZONA
CIP	CIPROFLOXACINO
STX	SULFAMETOXAZOL+TRIMETOPRIM





## **DISCUSIÓN**

El método para definir la resistencia en este trabajo es reconocido como oficial para los análisis de sensibilidad a nivel internacional; para su aplicación se siguieron las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 1999); tiene un carácter cuantitativo, determinando de manera exacta la concentración a la cual el antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano.

Como se puede observar de estos resultados la situación entre ambos grupos de animales es diametralmente opuesta; para el ganado lechero existe un alto porcentaje de resistencia, en cambio para el ganado destinado a carne se observa un bajo porcentaje de resistencia. La diferencia entre ambos grupos puede atribuirse a diversas causas; entre las cuales es importante destacar algunas de ellas:

a.- Se puede explicar en parte por la variación de la carga animal que se observa en ambos sistemas productivos. Es así, que en los sistemas de producción de ganado lechero de la Región Metropolitana el manejo es principalmente de tipo intensivo en confinamiento, favoreciendo así la diseminación de las bacterias. Por otro lado, los sistemas de producción de carne tienen un manejo a potrero, lo cual es una ventaja comparativa porque se disminuye el riesgo de transmisión de patologías de origen bacteriano lo que puede tener como consecuencia una disminución en la aplicación de terapias antimicrobianas.

b.- La presentación de enfermedades y la edad de ambos grupos de animales es otro punto que permite discutir el por qué de la diferencia de sensibilidad entre ambos tipos de ganado. La crianza en lecherías presenta una mayor incidencia de enfermedades bacterianas y por ende un uso mayor de los antimicrobianos. Respecto a la diferencia de edad entre ambos grupos, por un lado el ganado destinado a carne tiene una edad de faenamiento en promedio de 24 meses, existiendo un rango que, dependiendo de la raza puede ser de 13 a 30 meses. A su vez en ganado lechero las vacas adultas de tres o más partos son la que presentan altas probabilidades de un uso mayor de antimicrobianos, esto por que están expuestas a más casos de mastitis tanto clínicas como subclínicas, endometritis y metritis dentro de su vida reproductiva versus una vaquilla de primer parto. Para el caso de las metritis, su presentación en ganado lechero es más frecuente en vacas adultas productoras de leche a los 2-4 días post parto. Los factores que se relacionan estrechamente con una elevada incidencia de esta patología son: rebaños grandes, distocias y retención de membranas fetales entre otras, aún cuando en estos

cuadros clínicos existen diferentes alternativas terapéuticas, los antimicrobianos siguen siendo una de las principales.

Las patologías podales, es otro motivo de exponer a los animales a antimicrobianos, casi la totalidad de las lecherías de la Región Metropolitana están en confinamiento y en muchas ocasiones con un suelo en mal estado favoreciendo aún más el desarrollo de este tipo de patologías.

Por otro lado, debemos señalar que la terapia de secado es otro factor que puede incidir en la alta resistencia encontrada en ganado lechero, ya que esta consiste en la aplicación intramamaria de antimicrobianos inmediatamente después de la última ordeña que persisten en la ubre por 45 a 60 días; estos pueden traspasar la barrera de la glándula mamaria y alterar así la microflora intestinal, generando en ella, diversos mecanismos de resistencia. En términos generales el tratamiento y control de las mastitis representan el mayor porcentaje de uso de antimicrobianos en la lechería (Radostits *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo señalado anteriormente se puede decir que el ganado lechero durante toda su vida productiva está siendo expuesto a antimicrobianos ya sea en forma terapéutica o profiláctica.

c.- Otro factor a considerar es que no todos los médicos veterinarios frente a la necesidad de utilizar antimicrobianos realizan antibiogramas; generalmente realizan una terapia empírica con antimicrobianos de amplio espectro favoreciendo el desarrollo de resistencia en las bacterias.

El alto porcentaje de resistencia observado era previsible, ya que en Chile a pesar que existen estudios locales de sensibilidad (San Martín *et al.*, 1991; Borie *et al.*, 1993; León, 1997; San Martín *et al.*, 2000), no hay programas organizados de monitoreo que informen de manera periódica y sistemática sobre los niveles de resistencia, con el fin de evitar el uso de los antimicrobianos que estén generando resistencia. Al respecto, los países que integran la Unión Europea, con el fin de disminuir este factor de riesgo, han instaurado programas permanentes de monitoreo de resistencia en todas las especies animales productoras de alimentos, y los resultados emanados de ellos son informados periódicamente a instituciones privadas y gubernamentales (Moreno *et al.*, 2000). Por otro lado, estos fármacos pueden ser adquiridos y administrados solo por médicos veterinarios.

Respecto a los resultados obtenidos al analizar cada antimicrobiano en particular, se debe considerar que en ganado destinado a carne, pese a no presentar una

eleva resistencia para oxitetraciclina, hay que considerarla como referencia para futuros estudios de sensibilidad. En cambio, presentó la mayor resistencia en las cepas de *E. coli* aisladas de ganado lechero; es importante señalar que ya en el año 2000 la resistencia que presentaban las cepas de *E. coli* aisladas de mastitis clínica y subclínica para este antimicrobiano era alta en nuestro país, con un 71,9% (San Martín *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2000). Estos resultados coinciden con otros trabajos internacionales; es así, que en países como Israel y Finlandia se han reportado altos valores de resistencia para tetraciclinas, siendo más altos en Israel que en Finlandia (Kaipainen *et al.*, 2001). También hay estudios en Suecia y Holanda, donde se midió la resistencia en cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales de cerdos (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000). Actualmente la oxitetraciclina es considerada como droga de segunda elección, debido a la gran capacidad que tienen las bacterias de generar resistencia a este fármaco (San Martín *et al.*, 2002).

Otro grupo de antimicrobianos que se incluyó en este estudio fue las fluoroquinolonas; al respecto enrofloxacino presentó un alto porcentaje de resistencia en ganado lechero, con un 56%. Esto contrasta con los resultados obtenidos el año 2000 en nuestro país, donde se evaluaron cepas de *E. coli* aisladas de mastitis clínica y subclínica, y la resistencia fue tan solo de 4,5% (San Martín *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2000) para este antimicrobiano. Posteriormente, otro estudio nacional, donde se aislaron cepas de *E. coli* en vacas lecheras con mastitis, reveló que la resistencia a enrofloxacino, fue mayor en la V Región y Región Metropolitana con 21,9% respecto a la X Región (San Martín *et al.*, 2002).

Debido a que la resistencia bacteriana es cruzada entre las distintas quinolonas (Campbell, 1992; Burns, 1995) en este estudio se incorporó a ciprofloxacino, que aún cuando no se utiliza en medicina veterinaria es importante conocer si el uso de las quinolonas en animales de producción pueden estar generando resistencia a antimicrobianos que solo se utilizan en medicina humana, como ha sido observado en otros países. Al respecto, las cepas de *E. coli* aisladas de ganado lechero presentaron un 54 % de resistencia a este antimicrobiano, este resultado debe ser considerado como una alarma, ya que en países de la Unión Europea se ha prohibido en animales de producción la utilización de antimicrobianos que generen resistencia cruzada con aquellos que se utilizan en medicina humana (Moreno *et al.*, 2000). Al respecto, en Estados Unidos de América con el apoyo del FDA (Food and Drug Administration), en

el año 2000 propusieron el retiro para el uso de los antimicrobianos del grupo de las fluoroquinolonas, especialmente enrofloxacino en aves de corral. Las razones que llevaron al FDA a tomar estas determinaciones se basaron en datos obtenidos de programas de monitoreo de resistencia a antimicrobianos a nivel nacional con la colaboración del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), junto a literatura publicada y otras fuentes. Como modo de ejemplo los datos indican que el uso de las fluoroquinolonas en aves de corral es una causa significativa de la resistencia en *Campylobacter spp.* en humanos (FDA, 2000).

Es importante destacar que del total de cepas de *E. coli* aisladas de ganado lechero, un 54% de ellas fue resistente tanto a enrofloxacino como ciprofloxacino, un 2% solo presentó resistencia a enrofloxacino y ninguna cepa fue resistente solo a ciprofloxacino.

A nivel internacional los resultados difieren; por ejemplo, en España los programas de monitoreo de resistencia bacteriana que incluyen antimicrobianos tales como ácido náldíxico y ciprofloxacino los niveles de resistencia detectados son bajos, aunque destacan que son más elevados en aves que en cerdos para ambos antimicrobianos (Moreno *et al.*, 2000).

Otros estudios realizados en Israel y Finlandia con cepas de *E. coli* aisladas de mastitis clínica bovina, señalaron que para ciprofloxacino no se detectó resistencia en ambos países (Kaipainen *et al.*, 2001).

Estudios realizados en otras especies animales, revelaron que la prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacino es significativamente alta no sólo en pavos y sus criadores, sino también en criadores de cerdos (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000).

Respecto a las sulfonamidas, existe resistencia en ambos tipos de ganado siendo mayor en el lechero. Debemos recordar que fueron el primer grupo de agentes antimicrobianos disponibles en la quimioterapia frente a enfermedades infecciosas, sin embargo, desde que aparecieron y comenzaron a utilizarse, se observó que los agentes patógenos fueron capaces de generar mecanismos de resistencia a éstas.

Posteriormente la solución a este problema fue la búsqueda de nuevas estructuras químicas con capacidad antimicrobiana, apareciendo así la asociación

sulfonamida con trimetoprim. Esta combinación, actualmente también está generando mecanismos de resistencia entre los diversos microorganismos patógenos.

Por otro lado, su empleo en animales mayores fue disminuyendo considerablemente, producto del desarrollo y promoción de un número cada vez mayor de antimicrobianos, por lo que; con frecuencia, no se les considera en la elección inicial para la terapia, aunque todavía tienen considerable valor en animales de engorde.

Para el grupo de las cefalosporinas, el único antimicrobiano al cual las cepas presentan resistencia fue ceftiofur y sólo en ganado lechero (con un 54%). Las otras cefalosporinas no presentaron resistencia. Trabajos anteriores realizados en nuestro país, señalan que los porcentajes de resistencia para cepas de *E. coli* aisladas de mastitis clínica, son de 2,2 - 3,9 - 6,7% para cefquinoma, cefoperazona y ceftiofur respectivamente (San Martín *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2000). Al comparar ambos trabajos es importante considerar el aumento significativo de la resistencia a ceftiofur en tan sólo 3 a 4 años. Cuando se realizó el primer estudio (2000-2001), ceftiofur era una de las moléculas de reciente incorporación al mercado nacional; de hecho sólo se podía tener acceso a ella por la distribución que realizaba un solo laboratorio farmacéutico. Esta situación fue revirtiéndose en estos últimos años, y su oferta de venta se expandió a otros laboratorios nacionales e internacionales, motivo por el cual ha aumentado su uso favorablemente por parte de los médicos veterinarios. Esta puede ser una de las razones que llevó al aumento de la resistencia.

Para el ganado destinado a carne el porcentaje de resistencia fue bajo para las cefalosporinas.

Dentro del grupo de antimicrobianos con espectro de acción reducido a gramnegativos, se analizaron los aminoglucósidos y dentro de ellos a gentamicina. En ganado lechero todas las cepas fueron sensibles a este antimicrobiano lo que implica que aún no se han generado mecanismos de resistencia a este fármaco. Similar es la situación en las cepas aisladas de ganado destinado a carne, aunque se encontró una cepa resistente, lo cual es muy bajo. Estos resultados coinciden con estudios internacionales, donde se observa un 100% de sensibilidad para este antimicrobiano en cepas de *E. coli* aisladas de mastitis clínicas (Kaipainen *et al.*, 2001).

La alta sensibilidad bacteriana a este fármaco se puede atribuir a que gentamicina sólo se utiliza frente a la sospecha de infecciones por *E. coli* y por vía

parenteral, ya que no existen presentaciones en pomos intramamarios, motivo que disminuye su uso en lecherías.

Respecto a las determinaciones de MIC como valores absolutos para cada cepa aislada y su respectiva determinación de MIC<sub>50</sub> y MIC<sub>90</sub>, se puede observar que para ganado lechero la situación nacional no es muy favorable producto que de los ocho antimicrobianos analizados, solo tres están en excelentes condiciones para seguir siendo utilizados, ellos son: dos cefalosporinas cuyas concentraciones a las cuales son capaces de ser efectivas en el 50% y 90% de la población son las más bajas, destacándose cefquinoma, en primer lugar y luego cefoperazona. Otro antimicrobiano que presentó una buena condición para seguir siendo utilizado en este tipo de ganado es el aminoglicósido, gentamicina. Esto era una situación esperable, ya que posee un espectro de acción reducida a gramnegativos, y concuerda con trabajos internacionales (Kaipainen *et al.*, 2001). Esto podría atribuirse al escaso uso que tiene en ganado por dos razones, la primera por la vía de administración y la segunda al ritmo horario que implica administrarla cada ocho horas, lo que puede considerarse engorroso y complicado.

Respecto al ganado destinado a carne, la situación es mucho mejor por que se observó tres antimicrobianos con valores de MIC<sub>50</sub> y MIC<sub>90</sub> más bajos; esto podría deberse a que este tipo de producciones poseen un manejo menos intensivo, con menor uso de antimicrobianos y de requerirlos, son en un número inferior al ganado lechero. La mejor respuesta fue con las quinolonas, lo cual llama la atención por que es una situación totalmente opuesta al ganado lechero. Esta situación particular permite poner en evidencia cómo un mismo grupo de quimioterapéuticos puede tener efectos diametralmente distintos, en dos producciones de manejo diferente.

También con excelente concentración para inhibir el crecimiento bacteriano fueron cefquinoma, cefoperazona, y gentamicina. Esto demuestra que para el tratamiento de infecciones bacterianas, el ganado bovino destinado a carne aún cuenta con varias alternativas terapéuticas y con diferentes grupos de drogas.

Otro punto importante de discutir, es la diferencia encontrada en los perfiles de resistencia. Para ganado lechero era previsible encontrar varios perfiles, producto del uso indiscriminado de antimicrobianos que se manejan a nivel nacional, incluso sin control médico veterinario. Esta razón explicaría la detección de seis tipos de perfiles,

siendo los antimicrobianos que más se repitieron aquellos que presentaron sus MIC más altas, entre ellos, oxitetraciclina, enrofloxacino y sulfametoxazol-trimetoprim; de estos tres, ya se conoce desde hace algún tiempo la resistencia a oxitetraciclina. Estudios realizados a nivel nacional revelaron altos valores para este antimicrobiano, como también para enrofloxacino (San Martín *et al.*, 2000; Borie *et al.*, 2000); en dicho estudio, realizado en cepas de *E. coli* aisladas de vacas lecheras con mastitis, se determinó que la resistencia fue mayor en la V Región y Región Metropolitana.

En el caso del ganado destinado a carne solo se detectaron cuatro perfiles, lo cual debería considerarse como una situación de nivel favorable.

La multiresistencia se puede explicar por varias vías, entre las cuales podemos señalar; muchos de los genes denominados “resistentes” se localizan en plásmidos y/o transposones, de manera que pueden transferirse fácilmente entre diferentes cepas y especies bacterianas (Chartone de Souza, 1999). Otra manera de que ocurra esta transferencia es mediante los integrones, los cuales acumulan genes de resistencia y por ende, podría explicar la constante aparición de enterobacterias multiresistentes a una amplia variedad de antimicrobianos, en los últimos años, se ha relacionado fuertemente la multiresistencia con la presencia de integrones ya que no es necesario que la bacteria acumule grandes cantidades de material genético como lo son los plásmidos, para lograr la resistencia frente a un determinado antimicrobiano, sino que con unos pocos segmentos de ADN en el interior del integrón se alcanza la resistencia (Martínez, 2004).

El gran número de posibilidades de recombinación e intercambio que poseen los integrones, hace que las bacterias los incluyan en su estructura, logrando así una gran versatilidad para hacer frente a los antimicrobianos. Sería importante en un futuro no muy lejano, saber si los niveles de resistencia nacional están relacionados con esta estructura extracromosómica y poder detectar que tipos de integrones son los que se encuentran en nuestro país, ya que se sabe que el más predominante en otros países como España es el tipo I (Arakawa *et al.*, 1995).

Estos resultados demuestran que la terapéutica antimicrobiana en ganado bovino en nuestro país no está ajena de la problemática mundial de resistencia bacteriana. Esto refuerza la idea de imponer en el corto plazo, el uso y control racional de los antimicrobianos, ya que son una fundamental herramienta terapéutica frente a enfermedades de origen bacteriano. Por otro lado, para que un país pueda establecer líneas de trabajo orientadas al control y disminución de la resistencia bacteriana, tiene

que poseer información respecto a la prevalencia de la resistencia microbiana por droga, especie animal y de los cambios que ocurren a través del tiempo; esto puede lograrse mediante la instauración de programas permanentes de monitoreo, cuyo objetivo principal sea que los resultados obtenidos sean periódicamente informados a los médicos veterinarios y organismos gubernamentales.

Por otro lado, una de las principales ventajas que ofrece un sistema de vigilancia para los médicos veterinarios, es orientar la terapéutica empírica, ya que en muchos casos no es posible esperar a que se reciban del laboratorio los resultados de un antibiograma para instaurar un tratamiento; así, los datos locales de una red de vigilancia permiten adecuar continuamente los tratamientos empíricos, aumentando así el éxito terapéutico (Moreno *et al.*, 2000).

Ya en el año 1998, Francia demostró la necesidad de instaurar un control racional de los antimicrobianos, realizando entre otras medidas programas de monitoreo sistemáticos coordinados por la Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los alimentos (AFSSA). Tomando como ejemplo el monitoreo de la especie bacteriana *Salmonella spp.*, el año 1998 recolectaron 22.100 datos; de estos un 64% fue desde animales de producción y sanos, un 31,4% desde alimentos procesados y un 4,3% desde el medio ambiente. De estos datos, 6600 cepas fueron aisladas y sometidas a análisis de sensibilidad. Del total de cepas estudiadas, se reveló que un 75,4% fueron resistentes al menos a un antimicrobiano y un 20% mostró sensibilidad intermedia. Un rango muy alto de resistencia fue observado para los antimicrobianos ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina y sulfonamidas. Esta resistencia fue más frecuente en ganado bovino (25,3%) que en cerdos (18,3%) y aves de corral (9%). Por otro lado, se detectó resistencia para los antimicrobianos ácido náldixico y sulfametoxazol-trimetoprim, para cada una de las especies de animales en estudio (Martel *et al.*, 2000).

Esto confirma la importancia que tienen los programas de monitoreo, siempre y cuando se informen sus resultados, ya que el objetivo es tomar medidas necesarias para controlar el avance de la resistencia bacteriana. Se debe recordar que ya en el año 1999, Aaerstrup señaló que los mayores niveles de resistencia se observan en países donde no existen normativas de restricción en el uso de antimicrobianos, como es también el caso de Argentina (Gentilini *et al.*, 2000), Brazil (Costa *et al.*, 2000) y Finlandia (Myllys *et al.*, 1998).



Actualmente, el tema de la resistencia bacteriana incluye también la problemática de la contaminación ambiental. Internacionalmente, la evaluación de la ecotoxicidad es un requisito obligatorio para toda solicitud de licencia de comercialización de productos de uso veterinario, incluyendo en éstos los antimicrobianos.

## **CONCLUSIONES**

Según los objetivos planteados en este estudio podemos decir:

- a) Las cepas de *E. coli*, indicadoras de resistencia bacteriana y aisladas de ganado bovino lechero de la Región Metropolitana, presentan altos niveles de resistencia; en cambio, las aisladas de ganado destinado a carne sus niveles de resistencia son bajos.
- b) El número considerable de cepas multiresistentes en ganado lechero, nos sugiere que se debería estar en alerta respecto al tipo de antimicrobianos que se utilizan en este tipo de explotación en la Región Metropolitana.
- c) De acuerdo a los resultados del presente trabajo y otros realizados a nivel nacional, es necesario que en un corto plazo Chile instaure programas de monitoreo de la resistencia bacteriana.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- AARESTRUP, F.M. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 12: 279-285.
- AKIBA, T.; KOYAMA, K.; ISHIKI, Y. 1960. On the mechanism of the development of multiple drug resistant clones of *Shigella*. *Jpn. J. Microbiol.* 4: 219-222.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; FREJO, M.T. 1999. Problemática actual de los antibióticos como promotores del crecimiento. *Anaporc* (188): 5-52.
- AMABILE-CUEVAS, C.F.; CHICUREL, M. E. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 70: 189-199.
- ARMSTONG, D.G. 1984. Antibiotics as feed additives for ruminant livestock. **In:** *Antimicrobials and Agriculture*. Edited by M. Woodbine. Butterworths, London, U.K., pp. 331-347.
- BORIE, C.; HERNÁNDEZ, P.; SIERRA, G.; SAN MARTÍN, B. 2000. Patógenos mastitogénicos: etiología bacteriana y monitoreo de resistencia en lecherías de las regiones V y Metropolitana. **In:** XXII Congreso Chileno de Microbiología. Olmué, 5-7 de diciembre 2000.
- BORIE, C.; SAN MARTÍN, B.; GUERRA, L.; ZURICH, L. 1993. Estudio de sensibilidad frente a diferentes antimicrobianos y concentraciones mínimas inhibitorias de tres cefalosporinas en cepas de *E. coli* aisladas de mastitis séptica bovina. *Av. Cs. Vet.* 8: 134 - 137.
- BRUCELAS. COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS; CCE. 2002. Propuesta de Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los aditivos en la alimentación animal. 22 marzo 2002. pp 2-43.
- BRUFEAU, J. 2003. La Prohibición de la Comunidad Económica Europea del Uso de Antibióticos como Promotores de Crecimiento y sus Consecuencias: Alternativas Potenciales. [en línea]. Reus, España.  
[Http://www.saf-agri.com/spanish/INFORTEC/cerdos1.htm](http://www.saf-agri.com/spanish/INFORTEC/cerdos1.htm) [consulta: 09-10-03]

- BURNS, J.L. 1995. Mecanismos de resistencia bacteriana. Actualización sobre antimicrobianos. *Ped. Clin. North. Am.* 5: 463-472.
- CAMPBELL, B.A. 1992. Penicilinas. Uso de antibióticos en obstetricia y Ginecología. *Med. Clin. North. Am.* 3: 427-439.
- CAPRIOLI, A.; BUSANI, L.; MARTEL, J.L.; HELMUTH, R. 2000. Monitoring of Antibiotic Resistance in bacteria of animal origin: Epidemiological and microbiological methodologies. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14: 295-301.
- CHAMBERS, H.; SANDE, M. 1996. Fármacos antimicrobianos. **In:** HARDMAN, J.; LIMBIRD, L.; MOLINOFF, P.; RUDDON, R.; GOODMAN GILMAN, A. Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Novena edición. Editorial Interamericana. Vol 2. pp. 1095-1121.
- CHARTONE de SOUZA. E. 1999. Las bacterias resistentes, una guerra casi perdida. (Resumen). *Ciencia Hoy.* 9(50).
- COSTA, E. O., BENITES, N.R.; GUERRA, J. L.; MELVILLE, P. A. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus spp.* Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public health.* 47: 99-103.
- DAVIES, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Sci.* 264: 375-382.
- DAZA, R.M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud.* 22: 57-67.
- ESTADOS UNIDOS. FDA. 2000. FDA/CVM Proposes to Withdraw Poultry Fluoroquinolones Approval. 26 octubre 2000.
- FIEMS, L.O.; COTTYN, B.G.; DEMEYER, D.I. 1991. Animal Biothecnology and the Quality of Meat Production. OECD workshop, 7-9 November 1990, Belgium. Published as Developments in animal and Veterinary Science 25, Elsevier, Amsterdam.
- GARCÍA, J.A.; GARCÍA, E. 1997. Resistencias Bacterianas y antibioterapia. **In:** Eficacia *in vivo* Eficacia *in vitro*. Ed. Doyma. Madrid-Barcelona. pp 39-50.

- GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; GODALY, S.; REBUELTO, M.; DeGREGORIO, O. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphilococcus spp.* Isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy. Sci.* 83: 1224-1227.
  
- GÓMEZ-LUS, R.; GIL, J.; CASTILLO, J.; RUBIO, M.C. 1992. Impacto de los inhibidores de betalactamasas en la susceptibilidad antibiótica de los patógenos más frecuentes. **In:** *Betalactamasas: su importancia para el clínico.* Smith Kline & french. S.A.E. Madrid. pp. 109-127.
  
- GRUNFELD, C.; ZHAO, C.; FULLER, J.; POLLOCK, A.; MOSER, A.; FRIEDMAN, J. 1996. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product in hamsters. *Clinical Investigation* 97: 2152-2156.
  
- KAIPAINEN, T.; SCHWIMMER, A.; SHPIGEL, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; PYÖRÄLÄ, S. 2001. *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* isolates originating from Clinical Bovine Mastitis in Finland and Israel. **In:** 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality. Vancouver, Canada. 13 – 15 september 2001. National Mastitis Council - American Association of Bovine Practitioners. pp. 279-282.
  
- LAIBLE, G.; HAKENBECK, R.; SICARD, M. A.; JORIS, B.; GHUYSEN, J.M. 1989. Nucleotid sequences of the *pbpX* genes encoding the peniciling binding proteins from *Streptococcus pneumoniae* R6 and cefotaxime resistant mutant, C506. *Mol. Microbiol.* 3: 1337-1348.
  
- LEVY, S. 1994. Balancing the drug resistance equation. *Trends Microb* 2: 341-342.
  
- LEVY, S. 1996. Antibiotic resistance an ecological imbalance. **In:** *Proceedings of Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread.* London, England. 16-18 julio 1996. Ciba Foundation Symposium 207. Wiley, Chichester, pp 1-9.
  
- LEÓN, B. 1997. Frecuencia de aislamiento de los principales agentes de mastitis en el sur de Chile. **In:** *II Seminario Calidad de Leche Bovina.* Osorno, Chile. 15- 16 de Julio 1997. Consejo Regional Osorno. pp. 34-44.
  
- LINTON, A.H.; HOWE, K.; BENNETT, P.M.; RICHMOND, M.H. 1977. The colonization of human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. *J. Appl Bacteriol* 43(3): 465-469.

Comentario [JM1]:

- MARTEL, J.L.; TARDY, F.; BRISABOIS, A.; LAILLER, R.; COUDERT, M.; CHASLUS-DANCLA, E. 2000. The French antibiotic resistance monitoring programmes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14: 275-283.
- MARTÍNEZ, P. 2004. Nueva cuasa de resistencia a antibióticos. [en línea]. <[http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq)> [consulta: 13/04/04].
- McEWEN, S.A.; McNAB, W.B. 1997. Contaminants of non-biological origin in foods from animals. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 16(2): 684-693.**
- MYLLYS, V.; ASPLUND, K.; BROFELDT, E.; HIRVALA-KOSKI, V.; ONKANEN-BUZALSKI, T.; JUNTTILA, J.; KULKAS, L.; MYLLYKANGAS, O.; NISKANEN, M.; SALONIEMI, H.; SANDHOLM, M.; SARAMPAA, T. 1998. Bovine mastitis in Finland in 1998 a 1995 changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.* 39: 119-126.
- MOLBAK, K.; BAGGESEN, D.L.; AARESTRUP, F.M. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype thyphimurium DT 104. *N. Engl. J. Med.* 341: 1420-1425.
- MONNET, D.L.; EMBORG, H.D.; ANDERSEN, S.R.; SCHÖLLER, C.; SORENSEN, T.L.; BAGER, F. 2000. Surveillance of antimicrobial resistance in Denmark. *Euro Surveill.* 5(12): 129-132.
- MORENO, M.A.; DOMÍNGUEZ, L.; TESHAGER, T.; HERRERO, I.A.; PORRERO, M.C. 2000. Antibiotic resistance monitoring: The Spanish programme. The VAV Network. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14(4): 285-290.
- MORETAIN, J.P. 1997. Eliminación de los medicamentos veterinarios en la leche. *Producción Animal, España* 123: 11-22.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1999. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. Vol 19 (11). pp. 1-32.
- NIKAIDO, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Sci.* 264: 382-388.
- OKOLO, M.I. 1986. Bacterial drug resistance in meat animals: a review. *Int. J. Zoonoses.* 13(3): 143-152.

- ORSKOV, F. 1984. Genus I *Escherichia*. **In:** Krieg, N.; Holt, J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Editorial Board. Vol 1. pp 420-423.
- OWENS, W.E.; WATTS, J.L. 1998. Antimicrobial Susceptibility and B-Lactamase Testing of Staphylococci isolated from Dairy Herds. J. Dairy. Sci. 71: 1934-1939.
- RADOSTITIS, O.; GAY, C.; BLOOD, D.; HINCHCLIFF, K. 2002. Mastitis clinica **In:** Medicina Veterinaria, tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Novena edición. Editorial Interamericana. Vol 1. pp. 712-828.
- SANDERS, P. 1999. European Symposium. Antibiotic resistance in bacteria of animal origin. Paris. France. 29-30 November 1999. Institut Pasteur-CIS.
- SAN MARTIN, B.; BORIE, C.; ZURICH, L. 1991. Estudio de resistencia bacteriana frente a diferentes antibióticos usados en mastitis clínica bovina. Monogr. Med. Vet. 13: 49-52.
- SAN MARTIN, B.; CAÑÓN, H. 2000. Resistencia Bacteriana: Un problema Mundial en Medicina Veterinaria y Humana. Monogr. Med. Vet. 20(2): 18.
- SAN MARTÍN, B.; KRUIZE, J.; LEÓN B.; BORIE, C.; CAÑÓN, H.; SIERRA, G.; HERNÁNDEZ, P. 2000. Concentraciones mínimas inhibitorias para *Escherichia coli* aisladas de vacas con mastitis clínica de la Región Metropolitana. XI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Santiago. Octubre 25-27.
- SAN MARTÍN, B.; KRUIZE, J.; MORALES, M. A.; AGÜERO, H.; LEÓN B.; ESPINOZA, S.; IRAGÜEN, D.; PUGA, J., BORIE, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. Arch. Med. Vet. XXXIV (2): 221-234.
- SINGH, M.; CHAUDHRY, M.A., YADAVA, J.N., SANYAL, S.C. 1992. The spectrum of antibiotic resistance in human and veterinary isolates of *Escherichia coli* collected from 1984-86 in northern India. J. Antimicrob. Chemother. 29(2): 159-168.
- SPRATT, B.G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Sci. 264: 388-393.

- STUTZ, M.W.; JOHNSON, S.L.; JUDITH, F.R.; MUIR, L.A. 1983. Effect of the antibiotic thiopepton on *Clostridium perfringens* and growth and feed efficiency of broiler chicks. *Poultry Sci.* 62: 1633-1638.
  
- TENOVER, F.C.; HUGHES, J.M. 1996. The Challenges of Emerging Infectious Diseases. Development and Spread of Multiply-Resistant Bacterial Pathogens. *JAMA.* 275(4): 300-304.
  
- VAN DER BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14(4): 315-319.
  
- VENKATARAMA, K. 1999. Genética Bacteriana. **In:** Murray, P.; Kobayashi, G.; Pfaller, M.; Rosenthal, K. *Microbiología Médica.* 2 Edición. ed. Harcourt Brace de España S.A. pp. 28-45.
  
- WATANABE, T. 1966. Infectious drug resistance in enteric bacteria. *N. Engl. J. Med.* 275: 888-894.
  
- WEGENER, H.C.; BAGER, F.; AAERESTRUP, F.M. 1997. Surveillance of antimicrobial resistance in humans, food stuffs and livestock in Denmark. *Euro. Surveill.* 2(3): 17-19.
  
- WEHRLI, W. 1983. Rifampin: Mechanisms of action and resistance. *Rev. Infect. DIS.* 5: s407-s411.
  
- WIERUP, M. 2000. The control of microbial diseases in animals: Alternatives to the use of antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14: 315-319.
  
- WILLIAM, G. 1989. Genética molecular y variación genética en bacterias y en virus bacterianos. **In:** Carter, G. R. *Fundamentos de Bacteriología y Micología Veterinaria.* Ed. ACRIBIA, S. A. Zaragoza, España. pp. 47-76.
  
- WRAY, C.; GNANOU, J. 2000. Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14: 291-294.



