



UNIVERSIDAD DE CHILE

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

**SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA: UN TEST RAPIDO
PARA EL ANALISIS DE RESISTENCIA BACTERIANA EN
CEPAS AISLADAS DE MASTITIS CLINICA**

CLAUDIA MARIOM ACEVEDO GONZALEZ

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

PROFESOR GUIA: DRA. BETTY SAN MARTIN, MV, DMV.

**SANTIAGO, CHILE
2006**

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA: UN TEST RAPIDO PARA EL ANALISIS DE RESISTENCIA BACTERIANA EN CEPAS AISLADAS DE MASTITIS CLINICA

CLAUDIA MARIOM ACEVEDO GONZALEZ

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

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	: BETTY SAN MARTIN N.
PROFESOR CONSEJERO	: CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CONSEJERO	: HERNAN AGÜERO E.

SANTIAGO, CHILE
2006

INDICE

1	RESUMEN.....	v
2	SUMMARY.....	vii
3	INTRODUCCION.....	1
4.	REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
4.1.	Resistencia bacteriana.....	3
4.2.	Programas de monitoreo y vigilancia de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos.....	8
4.3.	Terapias antimicrobianas en las mastitis clínicas del ganado bovino...	13
4.4.	Situación nacional sobre el uso de antimicrobianos en animales de producción.....	17
4.5.	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	18
4.6.	Método de tiras reactivas de MIC.....	19
4.7.	Mecanismos de resistencia bacteriana.....	21
5.	OBJETIVOS.....	26
5.1.	Objetivo general.....	26
5.2.	Objetivos específicos.....	26
6.	MATERIALES Y METODOS.....	27
6.1.	Materiales.....	27
6.1.1.	Muestras.....	27
6.1.2.	Material Fungible.....	27
6.1.3.	Equipos.....	28
6.2.	Métodos de determinación de sensibilidad.....	29
6.2.1.	Método de dilución en placa (DP).....	29
6.2.2.	Método de las tiras reactivas (Etest®).....	30

6.3.	Detección de enzimas relacionadas con la resistencia a antimicrobianos β -lactámicos.....	32
6.3.1.	Detección de β -lactamasas mediante técnicas cromogénicas.....	32
6.3.2.	Detección de β -lactamasas de espectro expandido (BLEE).....	32
6.3.3.	Detección de <i>Staphylococcus spp.</i> resistentes a oxacilina.....	33
6.4.	Análisis de resultados.....	33
7.	RESULTADOS.....	35
7.1.	Resistencias bacterianas obtenidas por los métodos E-test y DP.....	35
7.2.	Resistencia a antimicrobianos β -lactámicos.....	36
8.	DISCUSION.....	38
8.1.	Comparación de los métodos E-test y DP.....	38
8.2.	Estudio de resistencias bacterianas a antimicrobianos β -lactámicos...	42
9.	CONCLUSIONES.....	47
10.	BIBLIOGRAFIA.....	48
11.	ANEXOS	55
Anexo 1	Puntos de corte para la clasificación de las cepas de <i>E. coli</i> , estafilococos y estreptococos como resistentes frente a diferentes antimicrobianos.	55
	Anexo 2.a Valores de MIC determinados por los métodos E-test y DP en cepas bacterianas gramnegativas de <i>E.coli</i>	56
Anexo 2.b	MIC determinados por E-test y DP en cepas bacterianas grampositivas de <i>Staphylococcus spp.</i> y <i>Streptococcus spp.</i>	58
Anexo 2.c	Análisis de susceptibilidad bacteriana frente a diferentes antimicrobianos y porcentajes totales de cepas resistentes y sensibles obtenidas por las técnicas de E-test y DP.....	59
Anexo 3	Presencia de β -lactamasas por test cromogénico y detección de BLEE en cepas de <i>E. coli</i>	60

Anexo 4	Presencia de β -lactamasas por test cromogénico y resistencia al disco de oxacilina en cepas de <i>Staphylococcus</i> seleccionadas por ser resistentes a cloxacilina y/o amoxicilina y/o ampicilina.....	61
Anexo 5	Ejemplos de lecturas de MIC donde la elipse de inhibición intercepta la escala de MIC de la tira reactiva de E-test.....	63

FIGURAS

Figura N°1.	Rutas de transmisión de bacteria y genes resistentes a antimicrobianos.....	6
Figura N°2.	Tiras Reactivas E-test.....	20
Figura N°3.	Método para aplicar las tiras reactivas de E-test.....	21
Figura N°4.	Lectura de MIC por método de tiras reactivas de MIC.....	21
Figura N°5.	MIC igual al valor leído en la tira reactiva.....	31
Figura N°6.	MIC mayor que la concentración más alta que se encuentra en la escala de la tira reactiva.....	31
Figura N°7.	MIC menor que la concentración más baja que se encuentra en la escala de la tira reactiva.....	31

TABLAS

Tabla N°1.	Análisis comparativo de susceptibilidad bacteriana obtenidas por las técnicas de E-test y DP.....	35
------------	---	----

1. RESUMEN

Los antimicrobianos son la principal herramienta en el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias en humanos y animales. El excesivo y mal uso de estos compuestos ha causado la aparición de resistencia bacteriana y uno de los problemas de interés público es el posible traspaso de estas resistencias de los animales al hombre. Es así que a nivel mundial, los Programas de Armonización y Globalización Internacional han hecho énfasis en el uso racional de los antimicrobianos en animales de producción, a través de programas de monitoreo de resistencia bacteriana.

El método de determinación bacteriana más utilizado y aceptado mundialmente es el método de dilución en placa, que da valores de MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) para un determinado antimicrobiano. Otro método que está siendo utilizado estos años en medicina humana, por su rapidez y sencillez es el de las Tiras Reactivas de MIC (E-test®).

En este trabajo se evaluó la utilización de este método como base para un plan de monitoreo de resistencia bacteriana en Medicina Veterinaria.

Siendo las mastitis una de las principales causas de uso de antimicrobianos en el ganado bovino, se evaluó la susceptibilidad a 178 cepas aisladas de mastitis clínica de bovinos de leche por métodos de dilución en placa y E-test. Se encontró concordancia de resistencia. No se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de MIC obtenidos por ambos métodos con cefoperazona, ampicilina, amoxicilina, bencilpenicilina y enrofloxacino, excepto con gentamicina. Estos resultados indicarían que E-test podría ser utilizado como método de screening por ser simple y rápido, pero faltan estudios con algunos antimicrobianos utilizados en Medicina Veterinaria.

Por otro lado, una de las resistencias mas conocidas es a los compuestos β -lactámicos. Es así, que en este trabajo también se estudió la presencia de

enzimas β -lactamasas en cepas de *E. coli* y estafilococos. Además, se estudió la presencia de β -lactamasas de espectro expandido (BLEE) y la resistencia a meticilina, en ambos tipos de cepas respectivamente, ya que son causas de fallas terapéuticas comunes en humanos y posibles mecanismos de resistencia a las bacterias de mastitis bovina evaluadas. Se encontró la presencia de β -lactamasas en el 100% de las cepas de *E. coli* y no se detectaron BLEE. En las cepas de estafilococos se detectó un 34% de presencia de β -lactamasas: 1/26 en *Staphylococcus aureus*, 6/26 en *Staphylococcus* coagulasa negativos y 4/10 en *Staphylococcus spp.*, fueron resistentes a meticilina. Estos resultados sugerirían que la presencia de β -lactamasas y mecanismos de resistencia más complejos, como lo son a meticilina, podrían dar cuenta de las resistencias observadas a diferentes antimicrobianos del tipo β -lactámicos en aislados de mastitis bovina.

2. SUMMARY

Antimicrobial agents are the main tool for the treatment of diseases caused by bacteria in humans and animals. The excessive and misuse of these agents has caused the appearance of bacterial resistance and one of the problems regarding public interest is the possible transfer of these resistance from animals to humans. Thus, at a global scale, the Harmonization and International Globalization Programs have emphasized the rational use of antimicrobial agents in food producing animals, through programs for the monitoring of bacterial resistance.

The most used and accepted method to determine bacterial resistance at a global scale is the method of dilution in plates that will show MIC scores (Minimum Inhibitory Concentration) for an antimicrobial agent in particular. Another method that has being used during the past few years in human medicine, preferred for its simplicity and speed, is that of MIC reactive strips (E-test®). In this study, the use of this method was evaluated as the foundation for a plan to monitor bacterial resistance in veterinary medicine.

Because mastitis is one main causes for the use of antimicrobial agent in livestock, the susceptibility of 178 isolated stubs of clinical bovine mastitis by means of the dilution in plates and the reactive strip method (E-test) was evaluated.

An agreement has been found with the result obtained through both methods when used for the determination of bacterial resistance. Except with gentamicin, no significant differences among the MIC values were obtained through both methods with cefoperazone, ampicillin, amoxicillin, benzylpenicillin and enrofloxacin. These results suggest that E-test might be utilized as a screening method because its simplicity and quickness. However,

studies with other antimicrobial agent used in veterinary medicine are still necessary.

On the other hand one of the most know resistances is to β -lactam agent. Therefore, we also study the presence of β -lactamases enzymes in *E. coli* and Staphylococcus stubs and the presence of Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and the resistance to methicillin in both stub respectively, which are the common causes for therapeutic failures in humans and potential resistance mechanisms in bacteria of evaluated bovine mastitis.

We found the presence of β -lactamases in the 100% of *E. coli* analyzed with no detection of ESBLs. In Staphylococcus only a 34% of β -lactamases was detected and 1/26 *S. aureus*, 6/26 SCN and 4/10 *Staphylococcus spp.* were methicillin resistance stubs.

These results will suggest that the presence of β -lactamases and more complexes resistance mechanisms, like methicillin, might account for the resistance observed to different antimicrobial agents β -lactam-like agents observed in isolated of mastitis cow.

3. INTRODUCCION

Los antimicrobianos y sulfas han sido y son una de las principales herramientas terapéuticas en el control y en algunos casos en la erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Estas drogas además de ser usadas en humanos y animales de compañía, han sido utilizadas por muchos años en la producción pecuaria con múltiples propósitos. El uso intensivo de estos agentes antimicrobianos, han inducido la aparición de microorganismos patógenos multiresistentes.

En Medicina Humana, la aparición de resistencia bacteriana es un fenómeno común, poniendo de manifiesto la necesidad de aumentar la vigilancia para asegurar la detección temprana y respuesta rápida, frente a enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes relacionadas con la resistencia bacteriana. En Medicina Veterinaria esta situación no deja de ser diferente, sumándose a ello, el riesgo que bacterias multiresistentes de procedencia animal se transmitan a la población humana. Es así, que en esta última década los Procesos de Armonización y Globalización Internacional abordan con especial énfasis el uso racional de antimicrobianos y sulfas en animales de producción, incluyendo en ellos programas de monitoreo de resistencia, con el fin de disminuir el riesgo de contagio a la población humana, asegurar la eficiencia en las especies de destino, así como también que los productos originados de los animales tratados con antimicrobianos (leche, huevos y carne), lleguen sin residuos de estos fármacos a la población humana.

Si bien es cierto, en Chile a partir del año 1994 las exigencias para el registro de productos farmacéuticos veterinarios han aumentado por parte del Servicio Agrícola Ganadero, actualmente no existen programas de monitoreo de

resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos que ofrece el mercado nacional.

La necesidad de buscar un método alternativo a los estándares, rápido y de fácil utilización en el monitoreo de la resistencia bacteriana a nivel de campo son la base de este estudio.

4. REVISION BIBLIOGRAFICA

4.1. Resistencia bacteriana

Antes del descubrimiento del primer antimicrobiano, millones de personas alrededor del mundo, morían a causa de enfermedades infecciosas que hoy son tratadas fácilmente. El descubrimiento de la penicilina en 1928 fue la solución a estos males y uno de los principales hechos en la historia de la humanidad.

El desarrollo de éste y nuevos antimicrobianos, ha permitido controlar muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso intensivo de estos antimicrobianos por muchos años en humanos, animales y plantas, ha resultado en la aparición de bacterias patógenas resistentes a estas drogas. Es así por ejemplo, cuando se masificó el uso de penicilina en los años 40, casi todas las cepas de *Staphylococcus aureus* eran susceptibles a este antimicrobiano. Hoy, más del 90% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a penicilina y otros antimicrobianos beta-lactámicos que fueron los tratamientos comunes en enfermedades tales como abscesos, bronquitis, osteomielitis y neumonías (ASM, 2002).

El primer mecanismo de resistencia fue observado en 1940 por Abraham y Chain, los que aislaron y caracterizaron una enzima de *Escherichia coli*, que era capaz de hidrolizar la penicilina. En 1944 fue informado por Kirby la presencia de una enzima similar, tipo penicilinasas en *S. aureus*. En 1959 en Japón, se observó la existencia de resistencia a múltiples drogas en cepas de *Shigella dysenteriae*, descubriéndose después que esta resistencia se podía pasar a una cepa de *E. coli* vía célula-célula (Akiba *et al.*, 1960).

A fines de 1960 y comienzo de 1970, la resistencia múltiple emergió nuevamente en *S. aureus*, y luego en una gran variedad de gramnegativos (Murray,

1991). Estos hechos requirieron que los médicos humanos y veterinarios tomaran conciencia del peligro de realizar terapias empíricas (sin conocer el agente etiológico). Posteriormente, los temores sobre brotes de microorganismos multiresistentes se aplacaron con la aparición de nuevos agentes antimicrobianos, como cefalosporinas y fluoroquinolonas. Estas últimas, se comenzaron a utilizar con gran éxito terapéutico en Medicina Veterinaria en la década del 80 y 90; sin embargo, rápidamente se descubrieron cepas resistentes a ellas (OMS, 1998). Uno de los últimos antimicrobianos generados contra *S. aureus* fue la vancomicina, pero las primeras cepas resistentes a vancomicina aparecieron en Japón en 1987, siguiendo rápidamente los primeros casos en USA. En sólo cuatro años (1989-1993), la resistencia a vancomicina se incrementó en 20 veces en bacterias entéricas grampositivas (ASM, 2002).

El desarrollo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos está basado principalmente en dos factores: (1) la presión de selección por el prolongado contacto de la población bacteriana con el agente selector (antimicrobiano) con o por concentraciones inadecuadas de éste en el medio, que permiten la supervivencia de las bacterias; y (2) la presencia de genes resistentes a antimicrobianos producidos por mutaciones en los propios genes bacterianos o por la adquisición de genes foráneos que codifican para estas resistencias (Acar y Röstel, 2001).

Las resistencias debidas a mutaciones cromosomales no son las más frecuentes y afecta a antimicrobianos como rifampicina y quinolonas con los que se ha observado una alta frecuencia de mutación génica ($>10^{-8}$). En estos casos la mutación afecta una célula la que puede multiplicarse y diseminarse, lo que se conoce como transmisión de resistencia vertical. Los clones resistentes son frecuentemente observados durante el tratamiento de una enfermedad infecciosa

o poco después, por lo que son fácilmente detectables por médicos humanos y veterinarios.

El principal problema está relacionado con la selección y estabilización de mecanismos de resistencias adquiridos de genes de otras bacterias lo que se conoce como transmisión de resistencia horizontal. En estos casos, los genes que codifican para ciertas resistencias, son adquiridos a través de plasmidios, transposones o integrones. Los plasmidios conjugables pueden transferir varios mecanismos de resistencia contra diferentes antimicrobianos. Esta adquisición de resistencia a los antimicrobianos demora un tiempo, durante el cual numerosas bacterias están involucradas y en este período el fenómeno no es clínicamente visible. Los patógenos resistentes son detectados con posterioridad a la prescripción del antimicrobiano y tiempo después de la selección original (Acar y Röstel, 2001).

Por lo tanto, los microorganismos patógenos y no patógenos que adquieren estas resistencias, pueden ser un reservorio de genes que confieren resistencia a estos fármacos. Este reservorio puede dar la oportunidad de transferir estos genes, al ponerse en contacto con la población nativa de bacterias en animales y humanos.

Los distintos reservorios de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en humanos y animales, pueden interactuar por diferentes vías (Figura N°1). Los alimentos y el agua son probablemente los vectores de transmisión a la flora intestinal

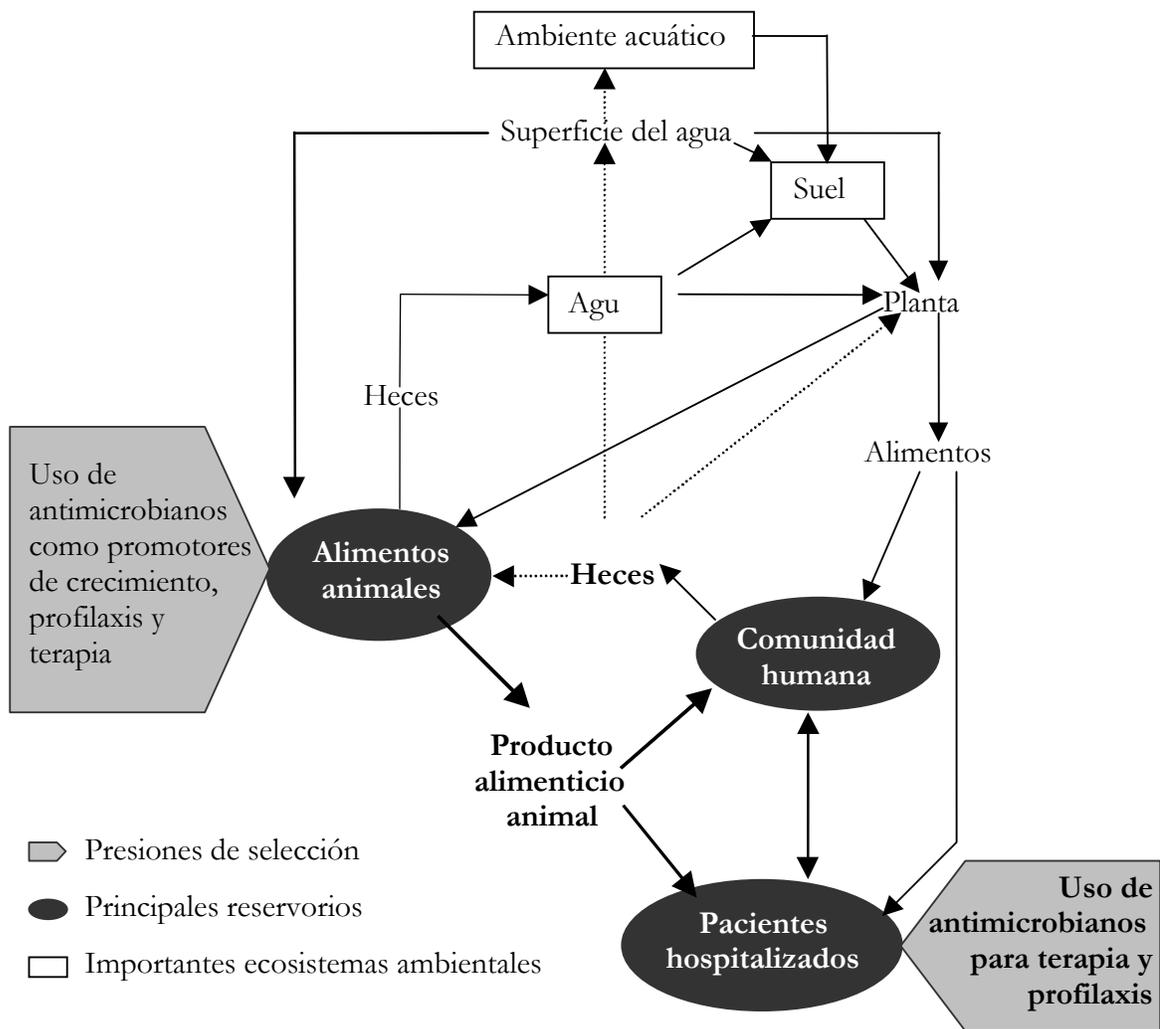


Figura N°1. Rutas de transmisión de bacterias y genes resistentes a antimicrobianos (Witte, 2000).

En los humanos existe cierta microflora normal que posee una alta capacidad para la adquisición y diseminación de genes de resistencia. Esta incluye *E. coli* y *Enterococcus faecium* en el tracto digestivo, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophiticus* en la piel y en membranas mucosas. En los ambientes acuáticos y terrestres se les ha conferido el mismo rol a *Pseudomonas spp.* (Witte, 2000).

Si bien la mayoría de las resistencias bacterianas observadas en medicina humana, son atribuidas a un uso inapropiado de antimicrobianos en los

pacientes, el uso de estos fármacos en medicina veterinaria y producción pecuaria también contribuye a acrecentar esta problemática.

En la agricultura, existe una variedad de formas de producción animal y por lo tanto, existen diferentes manejos y prácticas productivas, dependiendo de la especie animal y consecuentemente diferente uso de los antimicrobianos. Por ejemplo, en el caso de los bovinos, se utilizan en la alimentación de animales en feedlot, con el fin de prevenir infecciones inducidas principalmente por factores de estrés debido a la alta densidad animal. El uso de antimicrobianos en diferentes dosis (usualmente bajas), como promotores de crecimiento, o los tratamientos o prevención de mastitis en vacas de lechería, a través de la administración por infusión intramamaria o inyectable vía sistémica. Además, es importante destacar que los sistemas de producción animal son cada día más intensivos, aumentando considerablemente el contacto entre animales, haciendo que las presiones de selección de bacterias resistentes sean aún mayores.

Existen cerca de 30 antimicrobianos comunes para el tratamiento tanto de infecciones de animales como de humanos. Los genes que codifican la resistencia a algún antimicrobiano pueden ser transmitidos de los animales al hombre, por dos grupos diferentes de bacterias a través de los alimentos: agentes infecciosos (patógenos entéricos, ej. *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.*) y especies facultativas (ej. *E. coli* y *Enterococcus spp.*). Se ha informado que el uso de avoparcina como promotor de crecimiento ha creado en los animales un reservorio de *Enterococcus faecium*, con altos niveles de resistencia a este glicopéptido determinado por el gen *vanA*, el cual puede ser transmitido a los humanos y conferir resistencia a vancomicina, antimicrobiano que está reservado para el tratamiento de infecciones causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a

oxacilina y cepas de neumococos resistentes a penicilina y por lo tanto de mucha importancia en salud pública (Wagener *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha demostrado que los genes de resistencia a gentamicina en cepas de *Enterococcus spp.* de animales, también se encuentran en productos alimenticios de las mismas especies animales que están contaminados con estas bacterias. También se ha informado hallazgos similares en enterococos aislados de humanos, en alimentos procesados y animales de producción de diversas áreas geográficas, lo que constituye evidencia de la diseminación de la resistencia a gentamicina por enterococos (Donabedian *et al.*, 2003).

De acuerdo a estos antecedentes en el ámbito pecuario hay tres puntos muy importantes que considerar en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos: (1) que una de las causas de la aparición y amplificación de genes resistentes es el uso de estos fármacos; (2) que estos genes resistentes tienen un impacto negativo en la salud pública; y (3) que los genes de resistencia tienen un impacto negativo en la salud animal y en la producción animal.

4.2. Programas de monitoreo y vigilancia de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos

En relación a este tema, la OMS ya en el año 1984, estableció la necesidad que existan programas de vigilancia nacional e internacional de resistencia a los antimicrobianos, recomendando que se fijen políticas gubernamentales orientadas al uso racional de estos medicamentos en Medicina Humana y Veterinaria. Además, señaló que los países deberían fomentar la prohibición del uso terapéutico de nuevos antimicrobianos en animales de producción, que son requeridos para el tratamiento de infecciones graves en humanos. (WHO, 1984)

En la undécima sesión del Comité del Codex Alimentarius (OMS, 1998), se entregó antecedentes acerca de evidencias microbiológicas y clínicas de que las bacterias resistentes o los determinantes de resistencia, podrían ser transferidos de los animales a los seres humanos, y por lo tanto, infecciones con estas bacterias serían difíciles de tratar. Además, se enfatizó que cualquier antimicrobiano tiene la potencialidad de causar la selección de formas resistentes en el ecosistema, razón por la cual las acciones reglamentarias deben realizarse tanto en el ámbito de la Medicina Humana como Veterinaria, concluyendo que los antimicrobianos deben utilizarse en forma prudente en la ganadería y acuicultura.

Frente a esta problemática, profesionales de diferentes países han organizado numerosas reuniones y foros con el fin de establecer prioridades y estrategias para direccionar la investigación y educación frente al aumento de la resistencia bacteriana. Es así, que se ha hecho énfasis en la necesidad de instaurar programas de monitoreo de resistencia bacteriana, fomentando el uso prudente de antimicrobianos y sulfonamidas en los diferentes animales de producción (OMS, 1998).

En respuesta a esta inquietud, varios países han comenzado programas de vigilancia y monitoreo de bacterias zoonóticas patógenas y comensales entéricas en animales. En Bélgica, el Instituto Nacional de Estudios Veterinarios ha estudiado la resistencia en aislados de salmonelas de animales enfermos y sanos, alimento de uso animal y alimento de consumo humano. En Grecia el monitoreo es realizado por la Universidad de Atenas y la Escuela Nacional de Salud Pública, basado principalmente en aislados de humanos, y ocasionalmente en aislados de animales y alimentos. En Italia no sólo existe una institución que monitorea la resistencia bacteriana en humanos, animales y alimentos, sino que los

veterinarios colectan rutinariamente aislados clínicos del ganado que son analizados con propósitos diagnósticos, donde el ensayo de resistencia antimicrobiana es incluido. La información es coordinada por el Instituto de Salud Pública Veterinaria y la información es disponible sólo localmente a nivel regional (Surveillance Report, 1997). En Irlanda se ha desarrollado la Estrategia para el Control de Resistencia Antimicrobiana de Irlanda (SARI), que incluye la participación de médicos humanos, enfermeras, personal de salud pública, veterinarios y farmacéuticos, dirigidos por el Centro Nacional de Vigilancia de Enfermedades (NDSC, 2001).

Por otro lado, en Francia el monitoreo de la resistencia bacteriana en animales se basa en una Red Nacional de Laboratorios Veterinarios Locales, organizado por el CNEVA, el cual comenzó en el año 1969 un programa en salmonela, incorporándose en el año 1982 los principales patógenos del ganado bovino. En este último se seleccionaron las bacterias causantes de enfermedades entéricas, respiratorias y mamarias. Los resultados de estos programas gubernamentales constituyen la base de una epidemiología predictiva más real, necesaria para diseñar una política sobre el uso racional de antimicrobianos en Medicina Veterinaria (Martel y Coudert, 1993).

En los últimos años la OMS ha realizado varias reuniones en relación a esta problemática. En la reunión de Septiembre del 2001, la OMS recomienda el establecimiento de programas de monitoreo del uso de drogas antimicrobianas en la producción pecuaria y la obtención de datos tales como, especies en que se utilizan, tipo de producción, ruta de administración de la droga y propósito de uso (WHO, 2001). Un documento similar también ha sido publicado por la Oficina Internacional de Epizootias (Anthony *et al.*, 2001)

En estos documentos se enfatiza el uso prudente y adecuado de los antimicrobianos, incluyendo medidas prácticas y recomendaciones para prevenir y reducir la selección de resistencia en bacterias de origen animal, con los objetivos de (a) mantener la eficacia de los agentes antimicrobianos y asegurar el uso racional de éstos en animales, con el propósito de optimizar la eficacia y la seguridad del animal; (b) cumplir con las obligaciones éticas y necesidades económicas para mantener los animales en buenas condiciones de salud; (c) prevenir o reducir lo más posible la transferencia de bacterias (con sus determinantes de resistencia) entre la población animal, para mantener la eficacia de los agentes antimicrobianos usados en ganadería; (d) prevenir o reducir la transferencia de resistencia bacteriana o sus determinantes desde animales a humanos, para mantener la eficacia de los agentes antimicrobianos usados en medicina humana; (e) prevenir la contaminación de alimentos derivados de productos animales con residuos de antimicrobianos, para que no sobrepasen los límites residuales máximos establecidos; y (f) proteger la salud del consumidor asegurando la sanidad de los productos de origen animal para consumo humano (WHO, 2001, Anthony *et al.*, 2001)

También se indican ciertas responsabilidades en el uso de antimicrobianos en Medicina Veterinaria como: que el uso de estas drogas debe ser realizada por profesionales con conocimientos en el área y dirigidos por representantes científicos y técnicos; que los veterinarios y los ganaderos deben tener como prácticas la prevención de enfermedades, a través de vacunaciones y mejoras en las condiciones de manejo; reducir el uso de los antimicrobianos a menos que sea necesario y ajustar terapias cuando sea evidente; y su uso debe estar basado en los resultados de monitoreo y vigilancia de resistencia (test de sensibilidad a antimicrobianos). Además, la responsabilidad del manejo de los antimicrobianos incluye a varios profesionales, como autoridades científicas y administrativas,

industrias farmacéuticas veterinarias, distribuidores, veterinarios, farmacéuticos y productores ganaderos (Anthony *et al.*, 2001).

Por otro lado, cada día se hace más necesario inculcar la importancia del Médico Veterinario en la decisión de la utilización de drogas antimicrobianas, con el fin de ayudar a disminuir y controlar la resistencia. Por lo tanto, la selección de un antimicrobiano requiere de criterio clínico y conocimiento detallado de los factores farmacológicos y microbiológicos, incluyendo datos actualizados de sensibilidad. Es así, que el Médico Veterinario debe tener presente a lo menos los siguientes aspectos en el momento de seleccionar un antimicrobiano (Goodman, *et al.*, 1991):

- Los antimicrobianos deben ser siempre usados bajo la supervisión y dirección de un Veterinario.
- Etiología de la enfermedad (empírica o definitiva): Los antimicrobianos deben ser utilizados como tratamiento sólo cuando se conozca o se tenga certera sospecha que el agente etiológico primario o secundario de la patología es de origen bacteriano. Un hecho común en la práctica veterinaria, es que no siempre existe la posibilidad de identificar el agente etiológico antes de emprender el tratamiento. Esta situación, exige conocer los microorganismos infectantes más frecuentes, los que muchas veces están relacionados a los manejos de cada predio.
- Estudios de sensibilidad: Es necesario, conocer el patrón de sensibilidad del microorganismo infectante frente a los antimicrobianos disponibles en el mercado. Ya que es casi impracticable que los predios realicen diagnósticos de las enfermedades, tales como aislamientos del agente patógeno y estudios de

sensibilidad, se recomienda que a nivel predial e incluso zonal, existan programas de vigilancia a la resistencia.

- Factores farmacocinéticos del antimicrobiano seleccionado: Los buenos resultados de un tratamiento dependen además de la capacidad que tiene el fármaco de llegar al sitio de la infección, por lo que debe tenerse en cuenta la vía apropiada de administración. La concentración mínima de antimicrobiano que debe alcanzarse en el sitio de la infección, debe ser a lo menos igual a la concentración mínima inhibitoria (MIC) del microorganismo infectante determinada “*in vitro*”, aunque en mucho casos es conveniente obtener múltiplos de dicha concentración

- También deben considerarse los parámetros farmacocinéticos relacionados con los procesos de eliminación de medicamento, ya que éstos determinan los tiempos de descarte en leche, carne y huevo.

- Implementación de registros asociados al manejo de medicamentos: Esto implica que además de los registros productivos y reproductivos llevados en un plantel, deben existir registros relacionados con el manejo de antimicrobiano.

4.3. Terapias antimicrobianas en las mastitis clínicas del ganado bovino

Existe una gran variedad de publicaciones a nivel mundial que indican la presencia de resistencia bacteriana en animales de producción y compañía, situación que incluye el ganado bovino.

Uno de los principales problemas de salud que afectan al ganado bovino lechero son las enfermedades de la glándula mamaria. En Estados Unidos las mastitis representan una de las mayores causas de pérdidas económicas en las

lecherías, ya sea por pérdidas en la producción de leche, aumento en los costos de reemplazos, terapia medicamentosa, honorarios veterinarios, pérdidas de animales con alto potencial genético, entre otros. En Estados Unidos las pérdidas ascienden a US\$180/vaca/año y en Chile se ha estimado que las pérdidas anuales, en los años 80 eran del orden de 162 a 204 millones de litros (USDA, 2001; Moraga, 1988)

Dado que los principales agentes etiológicos en las mastitis clínicas del ganado lechero son bacterias, su tratamiento involucra como primera herramienta terapéutica los antimicrobianos y las sulfas. Los grupos de antimicrobianos frecuentemente utilizados en las mastitis clínicas, tanto a nivel internacional como nacional son β -lactámicos, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y sulfonamidas (Watt *et al.*, 1995). Entre ellos, los de mayor uso son penicilina, amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, cefoperazona, sulfadiazina+trimetoprim, noboviocina, gentamicina, dihidroestreptomicina, nafcilin, pirlimicina, lincomicina, neomicina y espiramicina (Sumano y Ocampo, 1992).

La selección del antimicrobiano más adecuado dependerá del agente etiológico. A nivel mundial los agentes bacterianos más comunes en los casos de mastitis clínica son *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Actinomyces pyogenes*. La frecuencia de aparición de estos patógenos ha ido variando con el tiempo, describiéndose a nivel internacional un aumento de las mastitis por patógenos ambientales (Philpot y Nickerson, 1991).

Okolo en 1986, señaló que terapias prolongadas de antimicrobianos vía oral y parenteral, desarrollan cepas de microorganismos resistentes y que éstas son capaces de transferir su resistencia a otras bacterias patógenas y no patógenas.

Owens y Watts (1988), evaluaron la susceptibilidad antimicrobiana a 700 aislados de *Staphylococcus spp.* de siete rebaños lecheros, encontrando marcadas diferencias en los patrones de sensibilidad antimicrobiana frente a varios antimicrobianos, resaltando la importancia del conocimiento epidemiológico de la mastitis de un rebaño lechero, para instaurar terapias adecuadas. En otro estudio, Mackie *et al.* (1988) midieron la susceptibilidad antimicrobiana a aislados de *S. aureus* de muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica durante 4 años, encontrando un incremento en la resistencia a ampicilina y neomicina en los coliformes.

Por otra parte, Owens y Nickerson (1990) estudiaron, 358 aislados de *Staphylococcus spp.* de leche proveniente de animales con mastitis clínica, mediante técnicas de MIC y difusión de disco, comprobando la presencia de cepas resistentes a cefalotina, eritromicina, tetraciclina, estreptomina y en menores porcentajes a penicilina y ampicilina. Brown y Scasserra (1990) analizaron 71 cepas de estreptococos, incluyendo *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, encontrando resistencias a oxitetraciclina y estreptomina, y resistencia múltiple en todas las especies. López y Moreno (1991), verificaron resistencia a cefoxistina y ceftriaxone por la técnica de MIC, en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche mastítica. Por otro lado, Watt *et al.* (1995), encontraron que la mayoría de cepas de *Staphylococcus spp.*, fueron susceptibles a los agentes antimicrobianos analizados, pero la susceptibilidad a dichos compuestos varió para *Streptococcus spp.*; además, señalaron que los compuestos disponibles como infusión intramamaria presentaron escasa actividad frente a organismos entéricos. Stephan y Rusch (1997), en aislados de muestras de leche mastítica bovina, determinaron un 29,5% de cepas de *E. coli* resistentes a cefoperazona, polimixina B, colicistina y gentamicina. Recientemente, De Oliveira *et al.* (2000) informó de la susceptibilidad antimicrobiana de 811 aislados de *S. aureus* de 11

países y concluyó que los niveles de resistencia a varias drogas de uso rutinario en terapias de mastitis fue en general baja. Es interesante mencionar que en Inglaterra y Gales, la Agencia de Laboratorios Veterinarios ha creado una base de datos a nivel nacional de todos los test de susceptibilidad antimicrobiana en la región y se pueden encontrar informes anuales de las resistencias para los principales agentes causantes de mastitis bovina (Craven, *et al.*, 1986 citado por Teale y David, 1999).

En nuestro país, en los años 50 el agente predominante en los casos de mastitis clínica, era *S. agalactiae* (Abel, 1953). 50 años después, *S. aureus* ocupó el primer lugar (Zurita, 1988). En estudios realizados en la zona sur (Kruze *et al.*, 1986) y en la Región Metropolitana (Montes *et al.*, 1989), también se ha descrito a *S. aureus* como el agente etiológico más frecuente. Posteriormente, se informa un aumento en la frecuencia de las bacterias gramnegativas, indicándose a *E. coli* como una de las principales (Donoso, 1997; San Martín *et al.*, 1991). En el año 2002, se informó que en la zona central predominaron las mastitis ambientales causadas principalmente por *E. coli*; en cambio, en la zona sur fueron más frecuentes las mastitis contagiosas producidas principalmente por *S. aureus*. Además, se describe un alto porcentaje de infecciones por *Staphylococcus coagulasa* negativo (SCN), situación que ha estado ocurriendo desde hace varios años en Chile (San Martín *et al.*, 2002). La variabilidad de los agentes etiológicos hace necesario estudios continuos de los agentes bacterianos y sus patrones de sensibilidad a los antimicrobianos utilizados.

4.4. Situación nacional sobre el uso de antimicrobianos en animales de producción

Existe escasa información nacional sobre los patrones de sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos y ninguna referente a valores cuantitativos como son las MIC. En el caso de mastitis clínica, San Martín *et al.* (1991), en un estudio de sensibilidad realizado en ganado lechero de la Región Metropolitana, señalaron que un 26% de aislados de *S. aureus* fueron resistentes a penicilina y un 21% a ampicilina; en el caso de *Streptococcus spp.*, hubo resistencia en un 6,2% de las cepas aisladas frente a penicilina. Estudios posteriores indicaron que las bacterias grampositivas, principalmente *S. aureus*, tienen alta resistencia a ampicilina, amoxicilina y penicilina. También se encontraron algunas cepas de *S. aureus* β -lactamasa positivas, resistentes a cloxacilina, antibiótico de primera elección frente a estas cepas. (San Martín *et al.*, 1991).

Por otro lado, a partir del año 1994 las exigencias para el Registro de Productos Farmacéuticos Veterinarios han aumentado por parte del Servicio Agrícola Ganadero y se ha implementado desde 1997 un Plan Nacional de Control de Residuos de Medicamentos en productos de origen animal, pero no existen programas de vigilancia de resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos que ofrece el mercado nacional.

Estos antecedentes indican la necesidad de realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los agentes asociados a las mastitis bovinas, debido a la variación que va ocurriendo en el tiempo. Frente a la información recopilada, se puede suponer que las terapias antimicrobianas en mastitis clínica del ganado lechero de nuestro país, enfrenta un alto porcentaje de fracaso terapéutico debido a la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos de

uso habitual en estas especies. En consecuencia, sería conveniente disponer de métodos rápidos de screening de susceptibilidad bacteriana, como herramienta para programas de monitoreo, continuos y permanentes, que sirvan de base para la implementación de normas de manejo en el uso y control de los antimicrobianos.

4.5. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Históricamente los veterinarios seleccionaron tratamientos antimicrobianos basados en las experiencias clínicas pasadas. Sin embargo, con la aparición de las resistencias de las bacterias, gradualmente se ha hecho más dificultosa la selección empírica del fármaco apropiado. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (PSA), se iniciaron en muchos países inmediatamente después del comienzo del uso de los antimicrobianos. La necesidad de identificar el apropiado antimicrobiano para su uso clínico condujo al desarrollo de sistemas rápidos de identificación bacteriana y mejoras en las PSA en humanos y en los laboratorios clínicos veterinarios. Además, mejoraron las PSA en la necesidad de tener resultados reproducibles, con el fin de generar datos precisos y consistentes técnicamente (White *et al.*, 2001)

La mayoría de los laboratorios han utilizado los métodos de difusión en disco para las PSA. Los resultados generalmente se informan cualitativamente, como susceptible, intermediario, o resistente, siendo este método uno de los más usados en la Comunidad Europea (Wray y Gnanou, 2000). Posteriormente, muchos laboratorios han adoptado los métodos de microdilución en caldo o métodos de dilución en agar. Los resultados de estos ensayos pueden ser cuantitativos, dando una concentración mínima de antimicrobiano necesario

para inhibir el crecimiento del organismo en estudio (MIC: Concentración mínima inhibitoria) y cualitativa (susceptible, intermedia o resistente). Ambos métodos tienen ventajas y desventajas, que han sido analizadas últimamente con el fin de estandarizar metodologías y lograr determinar los requerimientos epidemiológicos y microbiológicos mínimos, para establecer un sistema de monitoreo de resistencia bacteriana de origen animal (Caprioli *et al.*, 2000; White y McDermontt, 2001).

En los últimos años, se ha incorporado un nuevo método para medir la susceptibilidad bacteriana en Medicina Humana, el método de las Tiras Reactivas de MIC (Etest[®]). Este corresponde a una técnica cuantitativa para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aeróbicas gramnegativas y grampositivas, tales como *Enterobacteriaceas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*, entre otras (Bolmström *et al.*, 1988). Es una metodología simple y rápida que podría tener proyecciones en Medicina Veterinaria y un uso masivo en monitoreos de resistencia bacteriana.

4.6. Método de tiras reactivas de MIC

La mayoría de los métodos utilizados para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana están basados en técnicas de dilución o difusión. Las pruebas de dilución se basan en diluciones seriadas dobles del antimicrobiano a evaluar en un medio líquido o agar. Hasta ahora esta técnica provee el mejor estimador de MIC.

Las Tiras Reactivas de MIC están basadas en una combinación de los conceptos de dilución y difusión, en la cual se cuantifica la susceptibilidad antimicrobiana dando un valor discreto de MIC. Debido a que las tiras reactivas

de MIC poseen un gradiente predefinido y continuo de concentraciones del antimicrobiano, los valores obtenidos pueden ser más precisos que un MIC convencional realizado en varias diluciones.

Las tiras reactivas de MIC consisten en tiras delgadas de un plástico no porosas, inerte de unos 60 mm de largo, que por un lado se encuentran impregnadas en forma estable con un gradiente continuo exponencial de un determinado antimicrobiano y por el otro lado, están calibradas con una escala que se puede leer en $\mu\text{g/ml}$ (Figura N°2). Los rangos de concentración varían dependiendo del antimicrobiano utilizado.

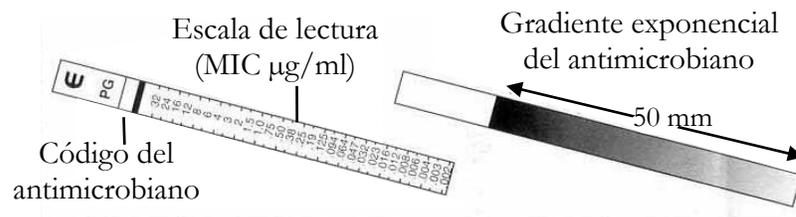


Figura N°2. Tiras Reactivas E-test.

Estas tiras se colocan sobre un agar preinoculado en superficie con la bacteria a estudiar, difundiendo el antimicrobiano en la matriz del agar (Figura N°3). De esta manera, se crea un gradiente continuo y exponencial de concentración de antimicrobiano directamente bajo la tira. Después de la incubación, se puede observar una inhibición simétrica y elíptica del crecimiento bacteriano a lo largo de la tira. El valor de MIC es leído en $\mu\text{g/ml}$, donde la elipse de inhibición intercepta la escala de MIC de la tira reactiva (Figura N°4).

Por las propiedades que poseen las tiras reactivas, éste es un método rápido (24 horas), en el cual se pueden evaluar varios antimicrobianos a la vez (5-6 tiras reactivas por placa de agar). Además, resulta económico por el poco material utilizado (placas de agar, cepas aisladas, estufa para cultivo, tiras reactivas) y la escasa mano de obra que requiere (Bolmström *et al.*, 1988).

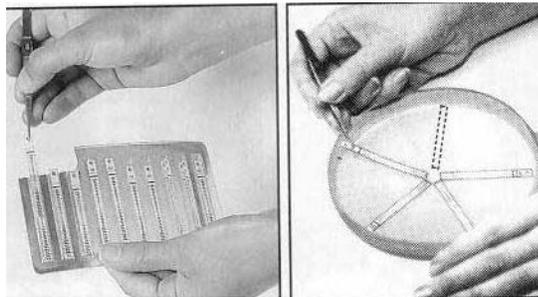


Figura N°3. Método para aplicar las tiras reactivas de E-test.

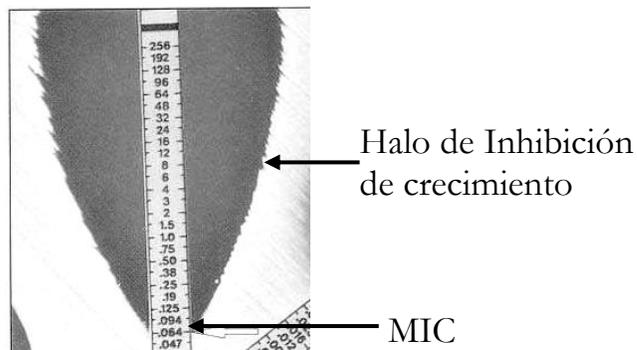


Figura N°4. Lectura de MIC por método de tiras reactivas de MIC.

4.7. Mecanismos de resistencia bacteriana

Como ya se ha mencionado, existen dos formas en que las bacterias pueden adquirir genes resistentes a antimicrobianos: por mutaciones o por la adquisición de genes extracromosomales que codifican para estas resistencias. La

transferencia de genes de resistencia de una célula a otra, es producida mediante elementos móviles de ADN extracromosomal, llamados plasmidios o por otros ADNs móviles, como transposones e integrones. El ADN foráneo puede ingresar a la bacteria frecuentemente en un plasmidio por contacto célula-célula (conjugación), por medio de un bacteriofago (transducción), o por integración de ADN desnudo (transformación), (Walsh, 2003).

Los mecanismos con los cuales las bacterias pueden sobrevivir a la presencia de los antimicrobianos son a) cambios en la permeabilidad de la membrana celular de la bacteria, limitando la entrada del antimicrobiano al interior de la célula; b) eliminación activa del antimicrobiano fuera de la bacteria (eflujo activo); c) alteración del sitio blanco de acción del antimicrobiano; d) inactivación enzimática o destrucción del antimicrobiano; y e) creación de vías enzimáticas alternativas en los lugares de acción del antimicrobiano. La mayoría de los antimicrobianos utilizados en medicina humana y veterinaria pueden ser inactivados o bloqueados por uno o más de estos mecanismos (Walsh, 2003).

Una de las resistencias bacterianas más conocidas es la resistencia a compuestos β -lactámicos, antimicrobianos muy utilizados en el tratamiento de enfermedades tanto en humanos como animales.

Estos antimicrobianos tienen como mecanismo de acción inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, evitando la transpeptidación entre las diferentes capas de peptidoglicano, provocando filamentación y lisis celular (Bush, 1996).

El mecanismo de resistencia más común a estos antimicrobianos, tales como penicilinas y cefalosporinas, es la producción de β -lactamasas, las cuales

son enzimas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de estos compuestos (Bush 1996).

Los genes que codifican β -lactamasas pueden encontrarse en el cromosoma o en plasmidios, y según la homología en sus secuencias aminoacídicas han sido agrupados en 4 clases (A, B, C y D). En la clase A, las β -lactamasas son codificadas en plasmidios y están distribuidas ampliamente en bacterias grampositivas como gramnegativas. En las bacterias gramnegativas la presencia de β -lactamasas es asociada a la presencia del gen cromosomal AmpC, pero en la mayoría de estas bacterias la resistencia a los β -lactámicos, se debe a la presencia de una β -lactamasa mediante la intervención plasmidial. En estas bacterias las más importantes β -lactamasas mediadas por plasmidios son llamadas TEM-1 y en menor grado SHV-1, y su diseminación es consecuencia de la presión selectiva ejercida por la introducción de ampicilina, carbernicilina y las primeras cefalosporinas en los años 60. TEM-1 fue detectada en un aislamiento de *E. coli* resistente a ampicilina en 1965, pero pronto fue frecuente en todas las enterobacterias. En 1969 se detectaron enzimas TEM en *P. aeruginosa* y de 1973 a 1975 en *H. influenzae*, *V. cholerae* y *N. gonorrhoeae*. Los plasmidios que codifican las enzimas TEM-1 ahora aparecen en 50-60% de las cepas de *E. coli* de todo el mundo y en 20-50% de los aislamientos de otras enterobacterias humanas (Petrosino *et al.*, 1998).

Las diversas mutaciones en los genes que codifican para estas enzimas dieron origen a las β -lactamasas de espectro expandido (BLEE), que confieren a la bacteria productora de la enzima cierta resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (tercera generación), (ej., cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona), y a monobactam (ej., aztreonam). Estas mutantes tienen de 1 a 4 sustituciones

aminoacídicas, en comparación con las enzimas originales que remodela el sitio activo de la enzima, aumentando con ello el espectro de la actividad hidrolítica hacia cefalosporinas de tercera generación (Petrosino *et al.*, 1998).

Debido a que estas enzimas se codifican en plásmidos, poseen una capacidad de diseminación a distintas cepas que ha hecho que se hayan difundido en pocos años. Las primeras BLEE fueron identificadas en aislados de *Klebsiella pneumoniae* y ocasionalmente en otras enterobacterias en hospitales de Europa. Más tarde, en Estados Unidos, así como en Europa, estos plásmidos que contienen los genes que codifican para BLEE se diseminaron en *Escherichia coli*. (Bush, 1996).

El aumento de la BLEE es un problema de salud pública nosocomial hasta la fecha, ya que las cefalosporinas de 3ª generación no están siendo efectivas en muchos casos de enfermedades intrahospitalarias, con las consiguientes fallas terapéuticas y muerte de pacientes. Además, existen muchos laboratorios de microbiología que aún no están informados sobre la presencia de estos microorganismos productores de BLEE. Por lo tanto, es claro que también se debe poner atención a la presencia de estos organismos en medicina veterinaria.

Por otro lado, en las bacterias grampositivas del tipo *Staphylococcus aureus*, se han descrito al menos tres mecanismos de resistencia a β -lactámicos como: la producción de β -lactamasas, fenómenos de tolerancia y resistencia por proteínas fijadoras de penicilina (PBP) modificadas, que se conocen como resistencia intrínseca a meticilina. Las penicilinas resistentes a penicilinasas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, entre otras) y las cefalosporinas, poseen una estructura que las protege del ataque de β -lactamasas; sin embargo, el género *Staphylococcus*

ha desarrollado mecanismos más complejos de resistencia. El mecanismo de resistencia a meticilina de los *S. aureus* (SARM), se ha relacionado a la síntesis de una nueva PBP asociada a un gen *mecA*, de baja afinidad por los β -lactámicos, lo que permite mantener la integridad de la pared celular bacteriana. También se ha informado de resistencias por hiperproducción de β -lactamasas y alteración de otras proteínas de fijación (Camarena y Sanchez, 1999). Una de las formas de determinar la presencia de esta resistencia es a través de la determinación de la sensibilidad a oxacilina. Si se comprueba la resistencia a esta droga en cepas de *S. aureus* o SCN, ningún antimicrobiano, como cefalosporina, combinación de β -lactámicos con o sin inhibidores de β -lactamasa, serían eficaces en el tratamiento de este microorganismo, independiente de si las cepas muestran *in vitro* sensibilidad a alguno de ellos (Canadian External Quality Assessment, 1998a).

En Canadá las primeras cepas SARM fueron reportadas en 1981; posteriormente se reportaron en varios hospitales de humanos a lo largo del mismo país (McAllister *et al*, 2001)

Mientras no se cuente mejores opciones terapéuticas, la única posibilidad válida que se tiene en estos tiempos para frenar esta tendencia, es la de asegurar una selección cuidadosa y apropiada de los antimicrobianos que se dispone en el mercado, y establecer programas de vigilancia epidemiológica con métodos rápidos de *screening* en la búsqueda de patrones de resistencia y medidas de control de las infecciones que limiten la diseminación de cepas resistentes. Además, es interesante determinar la presencia de β -lactamasas mediante un test cromogénico, la presencia de BLEE, y la resistencia a meticilina en bacterias gramnegativas y grampositivas, con el fin de tener una aproximación de cómo estos factores de resistencia están participando en la resistencia bacteriana.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la utilización del método de las tiras reactivas Etest[®] en un plan de monitoreo de resistencia bacteriana en Medicina Veterinaria.

5.2. Objetivos específicos

- Medir la sensibilidad de bacterias gramnegativas y grampositivas, por el método de las tiras reactivas (Etest[®]) y por el método de Dilución en Placas.
- Comparar los resultados de resistencia y sensibilidad bacteriana entre los métodos de E-test y Dilución en Placa.
- Comparar los valores de MIC obtenidos por ambos métodos.
- Detectar la presencia de β -lactamasas en bacterias gramnegativas y grampositivas resistente a los antimicrobianos β -lactámicos.

6. MATERIALES Y METODOS

6.2. Materiales

6.2.1. Muestras

- Cepario: Se utilizó un cepario de bacterias aisladas de muestras de leche provenientes de vacas con mastitis clínica, tipificadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y almacenadas a 4°C en el Laboratorio de Farmacología de la misma facultad.

- a) Para la evaluación del método de las tiras reactivas E-test[®], se utilizó un cepario que incluyó 42 cepas de *E. coli*, 17 cepas de *Staphylococcus spp.* y 4 cepas de *Streptococcus spp.*
- b) Para el estudio de enzimas relacionadas con la resistencia bacteriana, se utilizó 18 cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y 65 cepas de estafilococos resistentes a algún antimicrobiano β -lactámico del tipo cloxacilina, ampicilina o amoxicilina

- Cepas Controles: Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas controles: para gramnegativos *Escherichia coli* ATCC 25922, y para grampositivos *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

6.1.2. Material fungible

- Tiras Reactivas Etest[®] (AB BIODISK), las cuales se seleccionaron dependiendo del agente bacteriano a evaluar:

Cefoperazona (0,016-256 $\mu\text{g/ml}$)

Ampicilina (0,016-256 µg/ml)
Amoxicilina (0,016-256 µg/ml)
Bencilpenicilina (0,002-32 µg/ml)
Gentamicina (0,016-256 µg/ml)
Enrofloxacino (0,002-32 µg/ml)

- Drogas Puras

Cefoperazona, sal sódica (Sigma)
Ampicilina (Sigma)
Amoxicilina (Sigma)
Bencilpenicilina (Lab. Chile)
Gentamicina (Sigma)
Enrofloxacino (ArLab)

- Sensidiscos para la detección de β-lactamasas de espectro expandido (BLEE):

Cefotaxima 30 µg (CTX), BBL.
Ceftazidima 30 µg (CAZ), BBL.
Cefotaxima/Ac. Clavulánico 30/10 µg (CTX/CLA), BBL.
Ceftazidima/Ac. Clavulánico 30/10 µg (CAZ/CLA), BBL.

- Discos de Oxacilina, 1µg, BBL.
- Discos Cefinasa para la detección de β-lactamasas (BBL).
- Placas petri estériles.
- Agar Müeller Hinton (Difco).
- Tómulas estériles.
- Suero fisiológico estéril.
- Agua milliQ (calidad HPLC)

6.1.3. Equipos

- Estufa (Memmert).
- pH metro (pH537 WTW).
- Refrigerador Fresh Master (GR 392SV)
- Replicador de Steers.
- Pipetas graduadas estériles.
- Pinzas estériles, mechero, asa, tubos de ensayo estériles.

6.2. Métodos de determinación de sensibilidad

6.2.1. Método de dilución en placa (DP)

Se realizó la metodología siguiendo las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999).

Con cada antimicrobiano en su forma pura se prepararon soluciones stock de 2.000 µg/ml en agua milliQ; éstas se mantuvieron a 4°C hasta un mes. A partir de ellas se prepararon diluciones al doble decrecientes, las que se mezclaron en una proporción 1:10 con agar Müeller Hinton. Las diluciones finales fueron 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 y 0,125 µg/ml.

Cada bacteria del cepario se traspasó a caldo común y se pusieron en una estufa de cultivo a 37°C por 18 horas. La suspensión bacteriana se ajustó con suero fisiológico estéril a una turbidez del 0,5 del nefelómetro de McFarland. La inoculación de las cepas sobre la superficie del agar, se realizó utilizando un replicador de Steers, comenzando con las placas control (sin antimicrobiano), continuando con las placas de menor concentración para terminar con las de mayor concentración del antimicrobiano. Se incubaron las placas a 37°C por 20 horas. Cada cepa se analizó por duplicado. El valor de MIC correspondió a la

placa con la menor concentración de antimicrobiano, en la cual ocurre la inhibición completa del crecimiento bacteriano (Lennette, 1985).

6.2.2. Método de las tiras reactivas (Etest®)

Se realizó la metodología siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada cepa se traspasó a caldo común y se incubó en estufa a 37°C por 18 horas. La suspensión se ajustó con suero fisiológico a una turbidez 0,5 del nefelómetro de McFarland. Previamente se prepararon placas petri con medio de cultivo agar Müller Hinton, para el crecimiento de las cepas bacterianas.

Los cultivos bacterianos ajustados al 0,5 de McFarland se sembraron con tórula estéril sobre el agar, cubriendo completamente la superficie. Cuando la superficie del agar estuvo completamente seca se colocaron las tiras reactivas con una pinza estéril en posición equidistantes entre si (6 tiras como máximo en una placa de 150 mm) e inmediatamente se llevaron a incubar a 37°C por 20 horas.

Las tiras reactivas (Etest®), almacenadas a -20°C, se dejaron a temperatura ambiente 30 minutos previo a su uso.

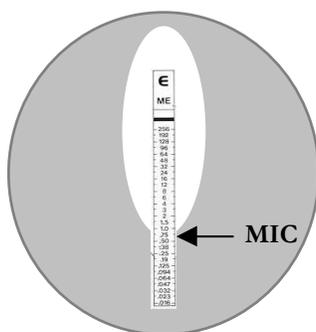
Después de la incubación se leyeron los valores de MIC en el punto de intersección entre el halo elíptico de inhibición del desarrollo bacteriano y la tira reactiva, y se informó:

MIC igual al valor leído en la tira reactiva: cuando el halo elíptico de inhibición interceptó un valor en la tira reactiva (Figura N°5).

MIC mayor que la concentración más alta que se encuentra en la escala de la tira reactiva: cuando existió crecimiento bacteriano lo largo de toda la tira reactiva y no existió elipse de inhibición (Figura N°6).

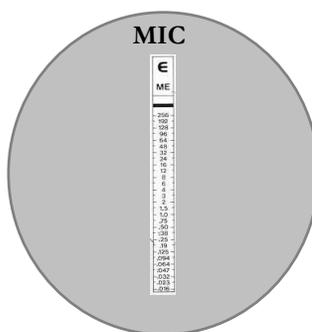
MIC menor que la concentración más baja que se encuentra en la escala de la tira reactiva: si no existió crecimiento bacteriano alrededor de la tira reactiva o la elipse de inhibición estuvo sobre ésta (Figura N°7).

Figura N°5



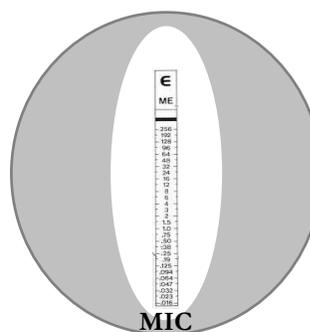
MIC = valor indicado en la tira reactiva.

Figura N°6



MIC > a la concentración más alta indicada en la tira reactiva.

Figura N°7



MIC < a la concentración más baja indicada en la tira reactiva.

Mediante ambas metodologías se analizaron los siguientes antimicrobianos: para las cepas de *E. coli*: cefoperazona, enrofloxacino y gentamicina; para las cepas grampositivas: cefoperazona, ampicilina, amoxicilina, bencilpenicilina y enrofloxacino.

Los puntos de corte con los cuales se clasificaron las cepas como resistentes (R) o sensibles (S), frente a cada antimicrobiano utilizado, se indican en el Anexo 1.

6.3. Detección de enzimas relacionadas con la resistencia a antimicrobianos β -lactámicos

Se seleccionaron cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (cefoperazona y/o cefquinoma), y cepas de *Staphylococcus spp.* resistentes a cloxacilina y/o ampicilina y/o amoxicilina.

6.3.2. Detección de β -lactamasas mediante técnicas cromogénicas

Esta determinación se realizó a todas las cepas seleccionadas (grampositivas y gramnegativas). En una placa petri estéril se puso el número necesario de discos de cefinasa (nitrocefina) a utilizar. Los discos se humedecieron con agua estéril y se les colocó una asa de cultivo bacteriano en la superficie del disco. Antes de una hora se observó si existía cambio de color del disco a rojo, lo cual señala la presencia de β -lactamasas. Los resultados negativos fueron aquellos en que no existió cambio de color en el disco.

6.3.2. Detección de β -lactamasas de espectro expandido (BLEE)

Esta prueba se realizó sólo a las cepas de *E. coli* que fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación. A partir de cepas puras se preparó cultivos en caldo común que fueron incubados a 37°C por 18 horas. Posteriormente se llevaron a una turbidez correspondiente al 0,5 del nefelómetro de McFarland con suero fisiológico estéril. Se sembró en placas con agar Müeller Hinton con tórula estéril, estriando la superficie en tres direcciones, girando la placa en 60 grados cada vez. Sobre la placa seca se aplicaron con pinza estéril, los discos impregnados con: CTX, CTX/CLA, CAZ, CAZ/CLA. Las placas se incubaron invertidas a 37°C por 24 horas y se midió los halos de inhibición alrededor de los discos. La lectura fue la siguiente:

- Resistentes a CTX: halo de inhibición ≤ 27 mm.

- Resistencia a CAZ: halo de inhibición ≤ 22 mm.

Cepa con BLEE: incremento ≥ 5 mm en el diámetro de la zona de inhibición con CTX y CAZ, al utilizarlos en combinación con ác. Clavulánico (CTX/CLA, CAZ/CLA), (Canadian External Quality Assessment, 1998b).

6.3.3. Detección de *Staphylococcus spp.* resistentes a oxacilina

A las cepas seleccionadas de *Staphylococcus spp.*, resistentes a β -lactamasas, se les determinó su sensibilidad al disco de oxacilina. A partir de cepas puras se preparó cultivos en caldo corriente que fueron incubados a 37°C por 18 horas. Posteriormente se llevaron a una turbidez correspondiente al 0,5 del nefelómetro de McFarland con suero fisiológico estéril. Se sembró con tórula estéril en placas con agar Müeller Hinton. Sobre la placa seca se aplicó con pinza estéril el disco de oxacilina. Las placas se incubaron invertidas a 37°C por 24 horas y se midió los halos de inhibición alrededor de los discos. Se clasificó como resistente si el halo de inhibición cumplía con las siguientes mediciones en relación a la cepa en estudio (Canadian External Quality Assessment, 1998a):

<i>S. aureus</i>	Resistente ≤ 10 mm
SCN	Resistente ≤ 17 mm
Otros <i>Staphylococcus</i>	Resistente ≤ 10 mm

6.4. Análisis de resultados

- Para cada método se calculó el porcentaje de resistencia y sensibilidad bacteriana frente a los antimicrobianos utilizados, de acuerdo a los cortes establecidos en el NCCLS (1999).
- Mediante una prueba de hipótesis de diferencia entre proporciones asociadas, prueba de Mc Nemar, que utiliza la distribución de X^2 , se comparó el método E-test con el método de Dilución en Placa.
- Mediante el test de t-Student se analizó la diferencia entre los valores de MIC obtenidos por ambas metodologías para cada cepa.
- En todas las cepas resistentes a los β -lactámicos se determinó el porcentaje de presencia de β -lactamasa, el porcentaje de β -lactamasas de espectro expandido y el porcentaje de *Staphylococcus spp.* resistentes a oxacilina.

7. RESULTADOS

7.2. Resistencias bacterianas obtenidas por los métodos E-test y DP

A las cepas bacterianas en estudio se les determinó la resistencia a diferentes antimicrobianos por los métodos de E-test y DP en paralelo, efectuándose en total 178 análisis por E-test y 178 análisis por DP (Anexos 2a, 2b).

En la Tabla N°1 se indican los porcentajes totales de análisis con resultado de resistentes (R) y sensibles (S), obtenidos con ambos métodos. Se determinaron 12,9 % y 16,3 % de resistencia, frente a los antimicrobianos utilizados por los métodos E-test y DP, respectivamente. Al realizar una tabla de contingencia y aplicar el test estadístico Chi-cuadrado (X^2) de Mc Nemar, se obtuvo un valor igual a 2,5, el cual es menor a 3,8 que es el valor obtenido utilizando una significancia $\alpha=0,05$; este resultado indica que ambos métodos son concordantes en lo referente a discriminar entre resistencia y sensibilidad de un ensayo (Zar, 1996). Para saber el grado de concordancia entre ambos métodos se calculó la sensibilidad y especificidad para el método E-test, cuyos valores alcanzarían a un 72,4 % y 98,7 %, respectivamente, considerando como positivos la resistencia (R). El valor predictivo positivo fue de 91,3% y el valor predictivo negativos de 94,8 %.

Tabla N°1. Análisis comparativo de susceptibilidad bacteriana obtenidas por las técnicas de E-test y DP.

Método	% de ensayos (N°)		N°
	R	S	
E-test	12,9 (23) _a	87,1 (155) _b	100 (178)
DP	16,3 (29) _a	83,7 (149) _b	100 (178)

R: resistentes. S: sensibles. N°: número de ensayos.

_{a,b}: no existe diferencia significativa entre ambos resultados ($p > 0,05$).

Con el fin de complementar el análisis comparativo entre ambos métodos, se comparó la diferencia entre los valores de MIC obtenidos por ambos métodos para cada antimicrobiano, a través del test estadístico t-Student para muestras pareadas. Los resultados obtenidos indicaron que no existieron diferencias significativas ($\alpha > 0,05$) entre los valores de MIC obtenidos por ambos métodos con cinco de los antimicrobianos utilizados (cefoperazona, ampicilina, amoxicilina, bencilpenicilina y enrofloxacino). Se encontró una diferencia significativa ($p = 0,027$) con gentamicina.

7.2. Resistencia a antimicrobianos β -lactámicos

En las 18 cepas de *E. coli*, seleccionadas por su resistencia a cefalosporinas de tercera generación, se determinó la presencia de enzimas β -lactamasas por el método de los discos de cefinasa (Anexo 3).

No se detectaron cepas con BLEE, por el método de la diferencia de halos de inhibición al utilizar los discos de CTX y CAZ y los mismos en combinación con ác. clavulánico (CTX/CLA, CAZ/CLA) (Anexo 3). Se observó que 4 cepas (22%) resultaron resistentes a cefotaxima (CTX) y 1 cepa (6%) al disco de ceftazidima (CAZ); esta última correspondió a una de las cepas que eran resistentes a cefotaxima.

65 cepas de estafilococos se seleccionaron por su resistencia a cloxacilina y/o amoxicilina y/o ampicilina, por el método de DP (Anexo 4). Se determinó en 22 cepas la presencia de β -lactamasas a través de discos de cefinasa, lo que correspondió a un 34%.

A todos los estafilococos se les determinó la susceptibilidad a oxacilina, utilizando la técnica de difusión en disco. La presencia de resistencia a oxacilina las clasifica como estafilococos resistentes a meticilina. De 29 cepas de *S. aureus* analizadas, sólo 1 cepa resultó ser *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), la que previamente también era resistente a cloxacilina y además se le determinó presencia de β -lactamasas (Anexo 4). Se encontró un mayor número de cepas (9), estafilococos coagulasa negativo resistentes a meticilina (SCN-RM); de ellas sólo 3 eran resistentes a cloxacilina y casi todas a amoxicilina y ampicilina. Del resto de *Staphylococcus spp.*, 4 de 10 cepas analizadas, resultaron resistentes a meticilina; las 4 cepas eran resistente a los 3 antibióticos β -lactámicos analizados.

8. DISCUSION

8.1. Comparación de los métodos E-test y DP

Para comparar los resultados se tomó como referencia el método de Dilución en Placa (DP), ya que es el método validado oficialmente a nivel internacional (NCCLS, 1999).

De las 178 determinaciones realizadas, 23 cepas (12,9%) y 29 cepas (16,3%) fueron resistentes por los métodos E-test y DP respectivamente (Tabla N°1). Un 3,4% de las cepas resistentes no fueron detectadas por el método E-test. Estas diferencias están dadas principalmente por la menor detección de cepas resistentes con cefoperazona, amoxicilina y enrofloxacino con las tiras reactivas (Anexo 2.c), lo que también se vio reflejado en un menor valor de sensibilidad obtenido para la metodología (72,4%). Sólo en 10 de las 178 determinaciones, hubo discordancia en la clasificación como cepa R o S por el método E-test, 8 cepas resultaron ser resistentes por el método DP y sensibles por E-test, y 2 cepas resultaron ser sensibles por DP y resistentes por E-test. A pesar que fueron pocos los datos discordantes, y el test estadístico X^2 de Mc Nemar indicó que ambos métodos son concordantes, es importante señalar que aquellas cepas resistentes que no fueron detectadas por E-test pueden ser un reservorio de resistencia aumentando las posibilidades de su perpetuidad en el medio y favoreciendo así el aumento de la resistencia bacteriana. Sin embargo, la especificidad del 94,8%, estaría indicando que la metodología de E-test estaría detectando la mayor parte de las cepas verdaderamente sensibles. Por otro lado, el valor predictivo positivo y negativo de 91,3% y 94,8% nos estaría indicando que existiría sobre un 90% de posibilidades que la detección de cepas sensibles por el método E-test sea correcto. Como se encontraron pocas las cepas

resistentes con los antimicrobianos utilizados, se hace difícil hacer alguna conclusión en particular con cada uno de ellos, sería interesante probar la capacidad de detección del E-test en un gran número de cepas resistentes con cada antimicrobiano.

Por otro lado, al comparar los valores de MIC obtenidos por ambos métodos, no se encontraron diferencias significativas aplicando el test estadístico de t-Student para muestras pareadas, con cinco de los seis antimicrobianos utilizados (cefoperazona, ampicilina, amoxicilina, bencilpenicilina y enrofloxacino), sólo con uno de ellos (gentamicina) se encontró diferencias que son de significación. Las diferencias observadas con gentamicina (40% de los valores de MIC obtenidos por el método E-test fueron menores que los obtenidos por el método DP, en promedio en dos rangos de dilución), podrían deberse a diferentes factores dentro de los cuales se pueden señalar al operador, o al propio método E-test.

Similares observaciones se encontraron en otros estudios en que compararon métodos analíticos, en los que incluyen E-test para medir susceptibilidad microbiana (Birinci *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2000). En algunos trabajos, se encontró buena correlación de los valores de MIC por E-test en comparación con otros métodos, en cambio en otros reportes se informaron discrepancias con algunos antimicrobianos, como es con gentamicina en este estudio, señalando que se requiere mayores estudios de la metodología de E-test (Chryssanthou y Cuenca-Estrella, 2002; Glupczynski *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que si bien ambos métodos son cuantitativos, existe una diferencia sustancial en la lectura de los resultados. En el método DP la no presencia de crecimiento bacteriano en la placa correspondiente señala

claramente la concentración en que el crecimiento se inhibe; en cambio en el método E-test, la formación del halo de inhibición en el punto de corte de la tira reactiva, en ocasiones se hace difuso y difícil de determinar con precisión, lo que puede conducir a errores. Esta dificultad es debida a que algunas bacterias tienen diferentes patrones de crecimiento en superficie, como bordes irregulares o difusos y/o crecimiento de pequeñas colonias en el área de inhibición (Anexo 5). Este es un factor que fácilmente puede llevar a errores si no se tiene un conocimiento previo y práctico en la lectura en este tipo de análisis.

Hay que agregar a las posibles causas de error, los propios del operador que se disminuyeron al mínimo, pero que siempre existen y la variabilidad de estar trabajando con sistemas biológicos.

Con el fin de disminuir los errores operacionales se observó que es fundamental el control de algunas variables como: a) la preparación de las soluciones “stock” del antimicrobiano a partir de droga pura en el método de DP, el cual es un paso inicial esencial en el resto de la metodología, que requiere trabajar con pipetas graduadas certificadas y matraces volumétricos grado A; b) el cuidado de las tiras reactivas del E-test en refrigeración, fuera de la exposición de luz y humedad, al igual que la mantención de las placas de agar con droga en el método de DP para evitar errores por pérdida de potencia de las drogas y c) la preparación de la suspensión bacteriana al patrón de 0,5 de Mc Farland, esto incluye controlar el patrón de turbidez, el cual debe estar adecuadamente preparado, evitando su deterioro y realizando una adecuada agitación del mismo ante de la preparación de la suspensión bacteriana.

El resto de las variables generales del laboratorio, estuvieron controladas ya que se trabaja bajo las normas ISO 17025, y por lo tanto las estufas de

incubación, pH-metro, refrigeradores, balanzas y otros equipos se mantienen con procedimientos que aseguran su buen funcionamiento.

Aún cuando existen discrepancias no significativas estadísticamente pueden señalarse ventajas y desventajas del método E-test como son:

- El método entrega valores de MIC intermedios a los valores de MIC determinados por el método de DP, método que utiliza diluciones seriadas al doble discontinuas. Por ejemplo, si se obtuvo un valor de MIC por DP de 2,0 $\mu\text{g/ml}$, el valor puede estar entre $2,0 \geq \text{MIC} > 1$. E-test puede determinar concentraciones intermedias como 1,5 $\mu\text{g/ml}$.

- E-test es rápidamente establecido al momento de ser requerido. En el método de DP es necesario preparar un set completo de al menos 10 concentraciones del antimicrobiano. Si se quiere evaluar más de una droga hay que multiplicar la preparación de placas y diluciones de cada droga por el número de antimicrobianos a evaluar, lo que requiere de varias horas de trabajo y materiales. Además no es recomendable almacenar las placas con el antimicrobiano por más de una semana, lo que implica que constantemente se tiene que estar preparando placas con droga. La ventaja de este método es que teniendo el material preparado, se puede evaluar hasta 37 cepas simultáneamente (36 cepas + 1 control), dentro de un plazo de 24 horas.

- Una de las desventajas de E-test que debe ser considerada actualmente es el costo económico. Actualmente 100 tiras reactivas de E-test para un antimicrobiano, tienen un costo de \$ 190.000 + iva (Promedar Ltda.), lo que implica que cada tira reactiva tiene un costo de aproximadamente \$ 2.242; si se quiere evaluar al menos 6 antimicrobianos por cepa el costo se eleva a \$ 13.452

sólo por el concepto de tiras reactivas. Esto hace difícil postularlo actualmente, como metodología de screening.

Tomando en cuenta los puntos anteriormente comentados, se podría recomendar el uso del método E-test en la necesidad de evaluar varias drogas en pocas cepas bacterianas. Es una buena alternativa en la clínica de animales pequeños, ya que generalmente se requieren de resultados rápidos de MIC para una bacteria, frente a varios antimicrobianos. Además, es una técnica que no requiere de equipamiento especial y por tanto puede ser fácilmente montada en una clínica de pequeños animales.

Sin duda el método de DP sigue siendo un método referencial, principalmente por su estandarización mundial (NCLLS), para la mayoría de los antimicrobianos existentes en medicina humana y veterinaria.

El método de E-test está siendo validado y estandarizado en muchos estudios alrededor del mundo frente a diferentes microorganismos incluyendo cepas de hongos (Chryssanthou y Cuenca-Estrella, 2002; Fernández *et al.*, 2000; Glupczynski *et al.*, 2002.; Grignon *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 2002) y se proyecta como una buena alternativa de trabajo. Posiblemente en un futuro cercano los costos de las tiras reactivas lleguen al alcance de su utilización masiva y sea una opción de screening para estudios de sensibilidad en bacterias que afectan las diferentes especies animales.

8.2. Estudio de resistencias bacterianas a antimicrobianos β -lactámicos

En el estudio de β -lactamasas realizado a cepas bacterianas gramnegativas seleccionadas por su resistencia a cefalosporinas de tercera generación, no se

encontraron BLEE por el método de la diferencia de halos de inhibición con discos de CAZ y CTX en ausencia y presencia de ác. Clavulánico (San Martín *et al.*, 2003). Es posible que por esta metodología no se detecten todas las BLEE, tal como ha sido señalado por otros autores, quienes indican que la eficacia de los métodos por sensidiscos van de un 66% utilizando una de las cefalosporina (CAZ o CTX) en forma individual para la detección, a un 93% cuando se utilizan ambas (M'Zali *et al.*, 2000).

Los resultados falsos negativos podrían deberse a que algunos organismos contienen otras lactamasas que pueden enmascarar el fenotipo detectado por este test. Estas lactamasas incluyen el gen *AmpCs* que también es plasmidial y que a diferencia de las otras BLEE no es inhibida por ác. clavulánico. También podría existir una hiperproducción de lactamasas TEM y/o SHV en organismos con múltiples lactamasas o una disminución de la permeabilidad de la membrana al paso del antimicrobiano. Una de las formas de confirmar la presencia de alguna de estas lactamasas y clasificar las mutantes de TEM y SHV, sería a través de técnicas de secuenciación de DNA o PCR confirmatorio para las enzimas en cuestión. Estos métodos moleculares pueden requerir mucho tiempo, equipos especializados y personal con experiencia, por lo tanto poco aplicables a la rutina de un laboratorio de diagnóstico (Seguin *et al.*, 1999).

La resistencia de las cepas de *Staphylococcus spp.* a β -lactámicos como ampicilina, amoxicilina o cloxacilina de un 34% (San Martín *et al.*, 2003), podría ser atribuida a la presencia de β -lactamasas ya que fueron positivas al test de cefinasa. También se encontró un 20% (13 cepas) de cepas resistentes a meticilina, de las cuales 1 fue *S. aureus* (SARM), 9 SCN (SCN-RM) y 3 otros *Staphylococcus*.

En humanos las cepas SARM son consideradas resistentes a todos los antimicrobianos beta-lactámicos incluidas cefalosporinas y beta-lactámicos, no importando su susceptibilidad *in vitro*. Esta resistencia está asociada al gen cromosomal *mecA* que codifica la proteína PBP2a (proteína fijadora de penicilina), de baja afinidad por meticilina y el resto de los β -lactámicos o por la presencia de hiperproducción de β -lactamasas que son cepas llamadas *borderline* que no poseen gen *mecA* (Seguín *et al.*, 1999).

Aún cuando lo señalado ha sido informado principalmente en *S. aureus* (SARM) aislados de humanos, también se debe considerar en los SCN en casos que se consideran causantes de procesos infecciosos. En este trabajo se encontró un 35% de cepas de SCN-RM, que es un porcentaje importante considerando que SCN es un patógeno común en las infecciones de la glándula mamaria del ganado lechero bovino; este tipo de resistencia podría ser una de las causas de fracasos terapéuticos. Lo mismo se aplica al resto de los estafilococos.

No se tiene información acerca de hallazgos o determinaciones similares en nuestro país, ya que no es habitual en los laboratorios de detección de resistencia, hacer la prueba a oxacilina. Normalmente se determina la resistencia a cloxacilina (que es de la misma familia) pero ésta no es capaz de detectar las cepas resistentes a meticilina, incluso la sensibilidad a esta última es menos eficiente que a oxacilina. En un estudio realizado en cepas aisladas de bovinos en el Reino Unido en 1986, se encontró un 69,8% de cepas productoras de β -lactamasas v/s un 34% encontrado en las muestras analizadas en este estudio. Por el contrario ellos no encontraron SARM (Craven, *et al.*, 1986 citado por Teale y David, 1999). Por otro lado, un estudio realizado a 1.921 estafilococos aislados de animales y alimentos en Hungría, encontraron 39 cepas con alguna resistencia a oxacilina y productoras de β -lactamasas. De estas cepas, 6 (5 *S.*

aureus y 1 de *S. epidermidis*) presentaron el gen *mecA* determinado por PCR las cuales provenían de un predio lechero (Kaszanyitzky *et al.*, 2004).

Si bien los SARM han sido confinados principalmente a ambientes humanos (*S. aureus* en flora normal nasofaríngea) e informados como uno de los principales causantes del aumento de enfermedades intrahospitalarias, últimamente también han sido identificados en algunas especies domésticas como equinos, perros y gatos. La presencia de SARM en algunos de estos animales se ha asociado al contacto con humanos, ya sea sus dueños o médicos veterinarios (Oughton, *et al.*, 2001). Esta información pone en alerta sobre el aumento de los niveles de resistencia bacteriana y lo difícil que se hace la comprensión de sus mecanismos de transmisión y expresión. Para poder comprender estos mecanismos existe una variedad de métodos de tipificación, como la electroforesis de pulso y caza, y amplificación por PCR, para demostrar similitud fenotípica y genética entre diferentes aislados, y se utilizan con el fin de definir el brote epidémico, fuente de contaminación o vía de transmisión.

La identificación de alguno de estos patrones de resistencia, como SARM o SCN-RM, β -lactamasas, en las cepas aisladas de mastitis clínica; y la posible aparición de cepas BLEE, tiene que alertar ante los tratamientos que se están utilizando frente a cuadros clínicos de mastitis con estos patógenos.

La detección rápida y principalmente efectiva de este tipo de resistencias, a través de métodos simple y de rutina en un laboratorio de microbiología, como los utilizados en este trabajo, conforman actualmente herramientas recomendadas para la detección de resistencias bacterianas en medicina humana, conducentes a tomar medidas de control y manejo. Esta es una de las recomendaciones frente al aumento de enfermedades intrahospitalarias y fallos

terapéuticos en una variedad de enfermedades infecciosas, métodos que pueden ser totalmente aplicables en Medicina Veterinaria.

El establecimiento de patrones y mecanismos de resistencia por métodos simples como los utilizados en este trabajo; estudios de detección de genes de resistencia por técnicas moleculares; estudios de traspaso de resistencia entre cepas bacterianas o de cepas bacterianas entre especies animales; documentación de los antimicrobianos utilizados, son parte de la información que es deseable obtener para poder plantear en forma adecuada métodos de vigilancia de la resistencia bacteriana en nuestro país. Pero el establecimiento de los niveles de resistencia basales, son esenciales para cualquier estudio de vigilancia.

Dada la amplia distribución de resistencia a antimicrobianos en animales y en el ambiente, y que su adquisición es un proceso dinámico, la determinación de niveles de resistencia en una región debe ser realizada en forma permanente y las técnicas a utilizar deben ser capaces de detectar el incremento o decrecimiento de la resistencia a los antimicrobianos. E-test se proyecta como una buena alternativa de utilización por su rapidez y simpleza, pero aún faltan estudios sobre algunos antimicrobianos muy utilizados en Medicina Veterinaria, entre los que se pueden señalar gentamicina, florfenicol, lincomicina, entre los más importantes de mencionar.

9. CONCLUSIONES

- Se encontró concordancia en los resultados de sensibilidad y resistencia obtenidos con los métodos de las tiras reactivas de E-test y de dilución en placas.
- Con excepción de gentamicina, no se observaron diferencias significativas en los valores de MIC obtenidos por ambos métodos.
- El método E-test se proyectaría como una buena alternativa para la medición de susceptibilidad bacteriana por su rapidez y simpleza, pero son necesarios estudios adicionales con otros antimicrobianos utilizados en Medicina Veterinaria.
- En todas las cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, se detectó la presencia de β -lactamasas, pero no se detectaron β -lactamasas de espectro extendido.
- No todos los estafilococos resistentes a β -lactámicos presentaron β -lactamasas.
- Por otro lado, la detección de cepas resistentes a meticilina sugiere que los programas de control de resistencia en Medicina Veterinaria deberían incluir rutinariamente el análisis de resistencia a meticilina.

10. BIBLIOGRAFIA

- **A. S. M.** 2002. MicrobeWorld. Microbiology Current Issues Antibiotic Resistance. [en línea] <http://www.microbeworld.org/htm/cissues/resist/resist_0.htm> [consulta: 30-11-2002].
- **Abel, R.** 1953. Investigación del *Streptococcus agalactiae* de los casos de mastitis crónica bovina en Chile. Agricultura Técnica. 13:48-61.
- **Abraham, E.P.; Chain, E.** 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature. 146:837-839.
- **Acar, J.; Röstel, B.** 2001. Antimicrobial resistance: an overview. Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 20(3):797-810.
- **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.
- **Anthony, F.; Acar, J.; Franklin, A.; Gupta, R.; Nicholls, T.; Tamura, Y.; Thompson, S.; Threlfall, E.; Vose, D.; van Vuuren, M.; White, D.** 2001. Antimicrobial resistance: responsible and prudent use antimicrobial agents in veterinary medicine. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 (3) 829-839. [en línea] <www.oie.int>. [consulta: 12-01-2003]
- **Birinci, A.; Coban, A.; Ekinci, B.; Durupinar B.** 2002. Comparison of the proportion method with mycobacteria growth indicator tube and E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 97(3):351-352.
- **Bolmström, A.; Arvidson, S.; Ericsson, M.; Karlsson, A.** 1988. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms. ICACC, poster 1209, Los Angeles.
- **Brown, M.; Scasserra, A.** 1990. Antimicrobial resistance in streptococcal species isolated from bovine mammary gland. Am. J. Vet. Res. 51:2015-2018.
- **Bush, K.** 1996. Is it important to identify extended-spectrum β -lactamase-producing isolates?. Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 5 (15): 361-364.

- **Camarena, J.; Sánchez, R.** 1999. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Control Calidad SEIMC. España. [en línea]. <http://www.seimc.org/control/revi_bacte/sarm.htm>. [consulta: 09-07-2002].
- **Canadian External Quality Assessment.** 1998a. Advisory group for antibiotic resistance. Laboratory Center for Disease Control. Guidelines for the testing and reporting of antimicrobial susceptibilities of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and commentary on methicillin resistant coagulase negative staphylococci (MR-CNS). [en línea]. <www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ceqa-pceeq/mrsa98_e.html> [consulta: 30-11-2002]
- **Canadian External Quality Assessment.** 1998b. Advisory group for antibiotic resistance. Laboratory Center for Disease Control. Guidelines on susceptibility testing of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* due to extended spectrum beta-lactamases (ESBLs). [en línea]. <www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/ceqa-pceeq/esbl98_e.html> [consulta: 30-11-2002]
- **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.
- **Chryssanthou E.; Cuenca-Estrella, M.** 2002. Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the european committee on antibiotic susceptibility testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungi susceptibility testing of yeast species. (Abstract). J. Clin. Microbiol. 40(10):3841-3844.
- **Craven, N.; Anderson, J.C.; Jones, T.O.** 1986. Vet. Record. (118) 290-291. (citado por Teale, C.; David, G. 1999. Antibiotic resistance in mastitis bacteria. Proceeding of the British Mastitis Conference . p 24-29.
- **De Oliveira, A.; Watts, S.; Salmon, S.; Aarestrup, F.** 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and United States. J. Dairy Sci. 83:855-862.
- **Donabedian, S.; Thal, L.; Hershberger, E.; Perri, M.; Chow, J.; Bartlett, P.; Jones, R.; Joyce, K.; Rossiter, S.; Gay, K.; Mackinson, C.; Debess, E.; Madden, J.; Angulo, F.; Zervos, M.** 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States:

- evidence of spread from animals to human through food. *J. Clin. Microbiol.* 41(3):1109-1113.
- **Donoso, M.** 1997. Mastitis clínica: Determinación de la flora microbiana patógena en vacas de lechería de la Región Metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.
 - **Fernández, H.; Mansilla, M.; González V.** 2000. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* assessed by E-test and double dilution agar method in Southern Chile. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 95(2):247-249.
 - **Glupczynski, Y.; Broutet, N.; Cantagrel, A.; Andersen, LP.; Alarcon, T.; Lopez-Brea, M.; Megraud, F.** 2002. Comparison of the E-test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. (Abstract). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21(7):549-552.
 - **Goodman, A.; Rall, T.W.; Nies, A.S.; Taylor, P.** 1991. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1751 p.
 - **Grignon B.; Tankovic J.; Megraud F.; Glupczynski Y.; Husson M.O.; Conroy M.C.; Emond J.P.; Loulergue J.; Raymond J.; Fauchere J.L.** 2002. Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Microb. Drug Resist.* 8(1): 61-66.
 - **Kaszanyitzky, E.J.; Egyed, Z.; Janosi, S.; Keseru, J.; Gal, Z.; Szabo, I.; Veres, Z; Somogyi, P.** 2004. *Staphylococcus* isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. *Acta Vet. Hung.* 52(1)7-17.
 - **Kirby, W.M.** 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin-resistant staphylococci. *Science.* 99: 452-455.
 - **Kruze, J.V.; Chuhán, E.; González V.; Santos, A.** 1986. Mastitis clínica. I. Estudio bacteriológico en rebaños bovinos de leche de la provincia de Osorno. **In:** Resúmenes VI Congreso Nac. Med. Vet. Santiago, Chile. SA-025.
 - **Lennette, E.H.** 1985. Manual of clinical microbiology. 4thed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. Chapter 100.

- **Lópes, C.A.; Moreno, G.** 1991. Comparative *in vitro* activity of three cephalosporins against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Res. Vet. Sci. 51(3):339-340.
- **M'Zali, F.H.; Chanawong, A.; Kerr, K.G.; Birkenhead, D.; Hawkey, P.M.** 2000. Detection of extended spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the E-test ESBL. J Antimicrob. Chemother. 45:881-885.
- **Mackie, D.; Logan, E.; Pollock, D.; Rodgers, S.** 1988. Antibiotic sensitivity of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolated over four years. Vet Rec. 123:515-517.
- **Martel, J.L.; Coudert, M.** 1993. Bacterial resistance monitoring in animals: the French national experiences of surveillance schemes. Vet. Microbiol. 35(3-4): 321-338.
- **McAllister, T.A.; Yanke, L.J.; Inglis, G.D.; Olson, M.E.** 2001. Is antibiotic use in dairy cattle causing antibiotic resistance? Adv. Dairy. Tec. (13) 229-247.
- **Montes, H.; Zurita, L.; Rivas, M.; Moraga, L.** 1989. Mastitis clínica. flora microbiana aislada de vacas provenientes de algunas lecherías del Area Metropolitana. Monografías Med. Vet. 11(1):45-49.
- **Moraga, L.** 1988. Pérdidas económicas atribuibles a las mastitis **In:** Curso Mastitis Bovina y su Impacto Económico. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Fac. de Cs. Vet. Y Pec., pp.146-153.
- **Murray, B.M.** 1991. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. J. Infect. Dis. 163:1185-1194.
- **NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).** 1999. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Third Edition; Approved Standard. NCCLS document M7-A3, Volume 13, Number 25.
- **NDSC (National Disease Surveillance Centre),** Junio 2001. A strategy for the control of antimicrobial resistance in Ireland (SARI). National Report o the subgroup of the scientific advisory committe of the National Disease Surveillance Centre, Ireland. ISBN 0-9540177-0-6.

- **Okolo, M.** 1986. Bacterial drug resistance in meat animals: a review. *Int. J. Zoonoses*. 13(3):143-52.
- **OMS (Organización Mundial de la Salud).** 1998. Organización Mundial de la Salud. Anteproyecto. Informe de la Undécima sesión del comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Comisión del Codex Alimentarius. ALINORM 99/31.
- **Oughton, M.; Dick, H.; Willey, B.; Brown, A.; McGeer, A.; Kreiswirth, B.; Low, D.** 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as cause of infections in domestic animals: Evidence for a new humanotic disease? Canadian Bacterial Surveillance Network (CBSN) Newsletter, Abril 2001.
- **Owens, W.; Watts, J.** 1988. Antimicrobial susceptibility and β -lactamase testing of Staphylococci isolated from dairy herds. *J. Dairy Sci.* 71:1934-1939.
- **Owens, W.E.; Nickerson, S.C.** 1990. Treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis with penicillin and novobiocin: antibiotic concentrations and bacteriologic status in milk mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 75:115-124.
- **Petrosino, J.; Cantu, C III.; Palzkill, T.** 1998. β -lactamases: protein evolution in real time. *Trend in Microbiology*. 6(8) 323-327.
- **Philpot N.; Nickerson, S.** 1991. Mastitis counter attack. A strategy to combat mastitis. Babson Bros. 150 p.
- **Prescott, J.F.; Baggot, J.D.** 1991. Terapéutica antimicrobiana veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 414p.
- **San Martín, B.; Borie, C.; Zurich, L.** 1991. Estudio de resistencia bacteriana frente a diferentes antibióticos utilizados en mastitis clínica bovina. *Monografías Med. Vet.* 13 (2): 49-52.
- **San Martín, B.; Kruze, J.; Morales, M.; Agüero, H.; Iragüen, D.; Espinoza, S.; León, B.; Borie, C.** 2003. Antimicrobial resistance in bacterial isolated from dairy herds in Chile. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Medi.* 1(1). <www.jarvm.com/articles/vol1Iss1/SANMAJVM.htm>
- **San Martín, B.; Kruze, J.; Morales, M.; 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.* 34 (2): 221-234.

- **Seguin, J.; Walter, R.; Caron, J.; Kloss, W.; George, C.; Hollis, R.; Jones, R.; Pfaller, M.** 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human to animal transmission. *J. Clin. Microbiol.* 37 (5): 1459-1463.
- **Stephan, R.; Rusch, P.** 1997. Current resistance status of *Escherichia coli* strains from bovine mastitis milk samples. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 139 (11): 495-499.
- **Sumano, H.; Ocampo, L.** 1992. The pharmacological basis for the treatment of bovine mastitis. *Isr. J. Vet. Med.* 47(4): 127-135.
- **Surveillance Report.** 1997. Monitoring antimicrobial resistance in humans and animals in Europe. *Eurosurveillance Monthly archives.* 2(5):42. [en línea] <<http://www.eurosurveillance.org/em/v02n05/0205-225.asp>> [consulta: 12-01-2002]
- **U.S.D.A.** 2001. Mastitis and the. EN-1009. Mastitis resistance to enhance dairy food safety. <<http://w3.aces.uiuc.edu/AnSci/USDA/EN112/PubsReport00.shtml>>
- **Wagener, H.; Aarestrup, F.; Jensen, L.; Hammerum, A.; Bager, F.** 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drug in Europe. *Emerging Infectious Diseases.* 5(3) [en línea] <<ftp://ftp.cdc.gov/pub/EID/vol5no3/ascii/wagener.txt>>
- **Wallace, F.M.; Cray, P.J.; Zimmermann, A.G.; Shryock, T.R.** 2002. Comparison of three methods of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter spp.* (Abstract). Agricultural Research Service.
- **Walsh, Ch.** 2003. Antibiotic: actions, origins, resistance. ASM Press, Washington, D.C. U.S.A. 335 p.
- **Watt, J.L.; Salmon, S.A.; Yancey, R.S.; Nickerson, S.C.; Weaver, L.J.; Hoemberg, C.; Pankey, J.W.; Fox, L.K.** 1995. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 78 (7): 1637-1648.
- **White, D.; McDermonntt, P.** 2001. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J. Dairy Sci.* 84, E. Suppl., E151.

- **White, D.; Acar, J.; Anthony, F.; Frankli, A.; Gupta, R.; Nicholls, T.; Tamura, Y.; Thompson, S.; Threlfall, E.; Vose, D.; van Vuuren, M.; Wegener, H.; Costarrica, M.** 2001. Antimicrobial resistance: standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 (3): 849-858. [en línea] <www.oie.int>. [consulta: 12-01-2003].
- **WHO (World Health Organization).** 1984. World Health Organization Scientific working group on antimicrobial resistance. Control of antibiotic-resistant bacterial: Memorandum from a WHO meeting. Am. J. Hosp. Pharm. 41:1329-1337.
- **WHO (World Health Organization).** 2001. Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health. Report of a WHO consultation. 10-13. Septiembre 2001. [en línea] <www.who.int/emc/diseases/zoo/antimicrobial.html> [consulta: 12-01-2003].
- **Witte, W.** 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. Int. J. Antimicrob. Agents. 14:321-325.
- **Wray, C.; Gnanou, J-C.** 2000. Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. Int. J. Antimicrob. Agents. 14: 291-294. [en línea] <www.vita-tech.com/MRSA%20animals%20vet2002%20.pdf> [consulta: 12-01-2003].
- **Zar, J.H.** 1996. Biostatistical analysis. 3rd ed. Prentice Hall, New Jersey.
- **Zurita, L.** 1988. Mastitis bovina, situación nacional. **In:** Curso de Mastitis del Bovino y su Impacto Económico. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Fac. de Cs. Vet. Y Pec., pp.1-15.

11. ANEXOS

Anexo 1

Puntos de corte para la clasificación de las cepas de *E. coli*, estafilococos y estreptococos como resistentes frente a diferentes antimicrobianos. Con asterisco (*) se indican los valores de corte para las cepas de estreptococos.

ANTIMICROBIANO	Puntos de Corte ($\mu\text{g/ml}$)
Cefoperazona	$\geq 8,0$
Ampicilina	$\geq 0,5$ $\geq 8,0^*$
Amoxicilina	$\geq 0,5$ $\geq 8,0^*$
Bencilpenicilina	$\geq 0,25$ $\geq 4,0^*$
Enrofloxacino	$\geq 2,0$
Gentamicina	$\geq 16,0$

Anexo 2.a

Valores de MIC ($\mu\text{g/ml}$) determinados por los métodos E-test y DP en cepas bacterianas gramnegativas de *E.coli*.

Cepa N°	R \geq 8		R \geq 16		R \geq 2	
	Cefoperazona		Gentamicina		Enrofloxacino	
	E-test	DP	E-test	DP	E-test	DP
6	1,000	1,000	0,250	0,250	0,094	<0,125
9	0,064	<0,125	0,125	1,000	0,032	<0,125
10	0,064	<0,125	0,380	0,250	0,047	<0,125
12	24,000	64,000	8,000	8,000	1,500	16,000
17	0,094	<0,125	0,250	0,250	0,094	<0,125
20	0,032	<0,125	0,750	0,500	0,064	<0,125
23	0,064	<0,125	0,190	8,000	0,094	1,000
24	0,023	<0,125	0,125	0,500	0,047	<0,125
26	0,047	<0,125	0,047	0,500	0,250	<0,125
28	0,047	<0,125	0,380	0,500	0,064	<0,125
29	0,064	0,500	0,190	0,500	0,064	<0,125
33	0,190	0,500	0,125	0,500	0,064	<0,125
34	0,047	<0,125	0,125	0,500	0,032	<0,125
55	0,094	<0,125	0,190	0,500	0,094	<0,125
56	0,047	<0,125	0,250	0,500	0,047	<0,125
59	0,125	<0,125	0,250	0,500	0,125	<0,125
66	0,125	<0,125	0,380	0,500	0,094	<0,125
74	0,064	<0,125	0,190	0,500	0,094	<0,125
75			0,250	0,500	0,125	<0,125
84			0,190	0,500	0,094	<0,125
117			0,190	1,000	0,064	<0,125
123			0,190	0,250	0,125	<0,125
128			0,190	0,250	0,125	<0,125
138			0,125	0,500	0,094	<0,125
139			0,190	1,000	0,064	<0,125
152			0,190	0,500	0,064	<0,125
186			0,125	0,500	0,047	<0,125
195			0,125	0,250	0,064	<0,125
212			0,047	1,000	0,094	<0,125

213			0,125	0,50	0,047	<0,125
243			0,125	0,500	0,064	<0,125
260			0,190	0,500	0,047	<0,125
449			0,125	0,500	0,094	<0,125
451			0,125	0,500	0,032	<0,125
524					0,094	<0,125
556					0,047	<0,125
574					0,094	<0,125
596					0,094	<0,125
599					0,094	<0,125
603					0,125	<0,125
604					0,125	<0,125
609					0,064	<0,125
<i>E. coli</i> ATCC25922	0,064	<0,125	0,047	<0,125	0,064	<0,125

Nº cepa: Número arbitrario de la cepa en e laboratorio.

R_≥: Punto de corte para los valores de MIC (µg/ml) que indican resistencia al antimicrobiano utilizado.

En negritas se encuentran los ensayos en los que el valor de MIC indica resistencia al antimicrobiano utilizado.

Anexo 2.b

MIC ($\mu\text{g/ml}$) determinados por E-test y DP en cepas bacterianas grampositivas de *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*

Cepa N°	Cefoperazona		Ampicilina		Amoxicilina		Bencilpenicilina		Enrofloxacino	
	R \geq 8		R \geq 0,5		R \geq 0,5		R \geq 0,25		R \geq 2	
Estafilococos	Etest	DP	Etest	DP	Etest	DP	Etest	DP	Etest	DP
35	1,500	2,000	0,064	<0,125	0,125	<0,125	0,032	<0,125		
36	3,000	4,000	0,064	<0,125	0,125	0,500	0,032	<0,125		
263	1,500	2,000	0,064	<0,125	0,094	<0,125	0,032	<0,125		
286	0,500	2,000	0,125	<0,125	0,032	<0,125	0,008	<0,125		
288	1,500	2,000	0,064	<0,125	0,094	<0,125	0,047	<0,125		
290	4,000	8,000	2,000	4,000	2,000	8,000	2,000	4,000		
295	64,000	8,000	8,000	4,000	16,000	8,000	32,000	2,000		
297	64,000	4,000	2,000	4,000	2,000	4,000	1,200	2,000		
301	4,000	0,250	1,500	2,000	1,500	1,000	1,500	16,000		
302	4,000	8,000	1,500	4,000	2,000	8,000	3,000	8,000		
410			0,190	<0,125	0,125	<0,125	0,094	<0,125	3,000	2,000
819			0,032	0,250	0,064	<0,125	0,023	<0,125	0,125	<0,125
822			0,064	<0,125	0,125	0,250	0,047	0,125	0,190	0,250
878			0,032	<0,125	0,047	<0,125	0,094	<0,125	0,125	<0,125
927			0,064	<0,125	0,190	0,250	0,047	<0,125	0,190	<0,125
931			0,047	<0,125	0,094	0,250	0,032	0,125	0,190	<0,125
989			0,064	<0,125	0,125	0,250	0,023	<0,125	0,190	<0,125
Estreptococos										
79	3,000	4,000	1,500	0,500	2,000	0,500	4,000	0,250		
80	4,000	8,000	128,000	>64	96,000	>64	96,000	>64		
271	2,000	4,000	0,125	<0,125	0,250	0,500	0,094	<0,125		
280	4,000	8,000	2,000	4,000	4,000	8,000	2,000	4,000		
<i>S.aureus</i> ATCC29213	1,500	2,000	0,190	0,250	0,750	0,500	0,190	0,250	0,047	<0,125

N° cepa: Número arbitrario de la cepa en el laboratorio.

R \geq : Punto de corte para los valores de MIC ($\mu\text{g/ml}$) que indican resistencia al antimicrobiano utilizado.

En negritas se encuentran los ensayos en los que el valor de MIC indica resistencia al antimicrobiano utilizado.

Anexo 2c

Análisis de susceptibilidad bacteriana frente a diferentes antimicrobianos y porcentajes de resultados resistentes y sensibles para el total de ensayos obtenidos con las técnicas de E-test y DP.

Antimicrobiano	n	E-test		DP	
		R	S	R	S
Cefoperazona	32	3	29	6	26
Ampicilina	21	6	15	6	15
Amoxicilina	21	6	15	8	13
Bencilpenicilina	21	7	14	7	14
Gentamicina	34	0	34	0	34
Enrofloxacino	49	1	48	2	47
Total	178	23	155	29	149
% de cepas	100	12,9	87,1	16,3	83,7

n: número de ensayos; **R**: resistentes; **S**: sensibles

Anexo 3

Presencia de β -lactamasas por test cromogénico y detección de BLEE en cepas de *E. coli*.

Cepa N°	β -lactamasas	Diferencia de Diámetros (mm)*	
		CTX/CLA-CTX	CAZ/CLA-CAZ
3	+	0	0
6	+	0	0
10	+	0	2
12	+	3	4
16	+	0	0
19	+	0	0
36	+	0	0
53	+	0	0
358	+	0	0
437	+	0	0
543	+	0	0
664	+	0	0
720	+	0	0
739	+	0	0
752	+	0	0
826	+	0	0
829	+	0	0
958	+	0	0

Cepa N°: Número arbitrario de la cepa en el laboratorio.

+: presencia de β -lactamasa.

*Cepas BLEE incrementan sobre 5 mm el diámetro de inhibición entre el antimicrobiano sólo y su combinación con ác. clavulánico.

Anexo 4

Presencia de β -lactamasas por test cromogénico y resistencia al disco de oxacilina en cepas de *Staphylococcus* seleccionadas por ser resistentes a cloxacilina y/o amoxicilina y/o ampicilina.

Cepa	Nº	Clox	Amx	Amp	β -lac	Ox Ø(mm)
<i>S. aureus</i>	86	-	R	R	+	18
<i>S. aureus</i>	131	-	R	R	-	20
<i>S. aureus</i>	160	-	R	R	-	16
<i>S. aureus</i>	165	-	R	R	-	20
<i>S. aureus</i>	167	-	R	R	-	22
<i>S. aureus</i>	178	-	R	R	-	18
<i>S. aureus</i>	200	R	R	R	-	20
<i>S. aureus</i>	201	R	R	-	-	16
<i>S. aureus</i>	203	R	R	-	-	18
<i>S. aureus</i>	208	-	R	R	-	18
<i>S. aureus</i>	252	R	R	R	-	20
<i>S. aureus</i>	254	-	R	R	-	18
<i>S. aureus</i>	296	R	R	R	-	18
<i>S. aureus</i>	298	R	R	R	-	20
<i>S. aureus</i>	313	R	R	R	+	R
<i>S. aureus</i>	314	-	R	R	+	18
<i>S. aureus</i>	316	-	R	R	+	17
<i>S. aureus</i>	317	-	R	R	-	18
<i>S. aureus</i>	406	R	R	R	-	18
<i>S. aureus</i>	444	R	R	R	-	23
<i>S. aureus</i>	473	R	R	-	-	16
<i>S. aureus</i>	658	R	R	R	+	14
<i>S. aureus</i>	808	-	R	R	-	20
<i>S. aureus</i>	822	-	R	R	-	17
<i>S. aureus</i>	871	R	R	R	-	24
<i>S. aureus</i>	882	-	R	-	-	22
<i>S. aureus</i>	927	-	R	R	-	22
<i>S. aureus</i>	931	-	R	R	-	20
<i>S. aureus</i>	989	-	R	R	-	20
SCN	89	-	R	R	+	21
SCN	92	R	R	R	+	20

...continuación anexo 4

SCN	126	R	R	R	-	26
SCN	132	-	R	R	-	26
SCN	135	-	R	R	-	22
SCN	307	R	R	R	+	17 R
SCN	319	R	R	R	+	18
SCN	320	-	R	R	+	18
SCN	323	-	R	R	-	19
SCN	324	-	R	R	+	24
SCN	427	R	R	R	+	21
SCN	435	-	R	R	-	R
SCN	513	-	R	R	+	22
SCN	518	R	R	R	+	10 R
SCN	531	-	R	R	+	12 R
SCN	602	-	R	R	+	23
SCN	659	-	R	R	+	17 R
SCN	675	-	-	R	-	18
SCN	732	-	R	R	+	R
SCN	771	-	R	R	+	R
SCN	778	-	R	R	-	R
SCN	814	-	R	R	-	19
SCN	878	-	R	R	-	22
SCN	898	R	R	-	+	12 R
SCN	993	-	R	R	-	19
SCN	1003	-	R	R	-	20
<i>Staphylococcus spp</i>	39	-	R	R	+	20
<i>Staphylococcus spp</i>	42	R	R	R	-	22
<i>Staphylococcus spp</i>	44	R	R	R	-	R
<i>Staphylococcus spp</i>	46	R	R	R	-	20
<i>Staphylococcus spp</i>	47	R	R	R	+	30
<i>Staphylococcus spp</i>	49	R	R	R	-	R
<i>Staphylococcus spp</i>	50	-	R	R	-	23
<i>Staphylococcus spp</i>	51	R	R	R	-	R
<i>Staphylococcus spp</i>	308	R	R	R	-	R
<i>Staphylococcus spp</i>	459	R	R	R	-	12

Abreviaciones: R:resistente; Clox:cloxacilina; Amp:ampicilina; Amx:Amoxicilina; Ø:diámetro; Ox: oxacilina. SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativo

Medida del halo de inhibición para el disco de oxacilina:

S. aureus Resistente ≤ 10 mm

SCN Resistente ≤ 17 mm

Otros *Staphylococcus* Resistente ≤ 10 mm

Anexo 5

Ejemplos de lecturas de MIC donde la elipse de inhibición intercepta la escala de MIC de la tira reactiva de E-test. A. MIC 0,5 $\mu\text{g/ml}$. B. MIC $\geq 256 \mu\text{g/ml}$. C. MIC $\geq 256 \mu\text{g/ml}$. D. MIC $\geq 256 \mu\text{g/ml}$. E. Subpoblación de macrocolonias. MIC 1 $\mu\text{g/ml}$. F. MIC 64 $\mu\text{g/ml}$.

