

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS Y CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LECHE CRUDA (I)

Antimicrobial Resistance and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Enterobacteriaceae* Isolated from Raw Milk

José Faría*
Zulbey Rivero**
Belizario Gallegos***
Aleida García*

* Facultad de Ciencias Veterinarias
** Facultad Experimental de Ciencias
*** Facultad de Medicina
Universidad del Zulia, Apartado 526
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

RESUMEN

A 416 muestras de leche cruda, recolectadas aleatoriamente a nivel de cántaras en 5 receptorías ubicadas en la Cuenca del Lago de Maracaibo del estado Zulia, Venezuela, se les determinó la presencia de antibióticos mediante el Delvotest-P (Gist-Brocades) y el método del Disco Ensayo (Difco Laboratories). Las leches positivas fueron sembradas para obtener crecimiento de Enterobacterias, procediéndose a realizar las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de las cepas. Posteriormente se realizaron pruebas de susceptibilidad frente a 13 antimicrobianos y se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para 27 antibióticos. Se encontró que 48 muestras de leche contenían antibióticos, aislándose de éstas 75 Enterobacterias, siendo 30 *Enterobacter sp.*, 20 *Klebsiella sp.*, 17 *E. coli*, 4 *Serratia marcescens*, 3 *Citrobacter freundii* y 1 *Proteus myxofaciens*. Las cepas mostraron resistencia a varios de los antimicrobianos usados comúnmente en el tratamiento de la mastitis, siendo el patrón de resistencia común: penicilina, cloxacilin y novobiocina. La mayoría de los aislamientos mostraron cifras de CIMs bajas frente a los antimicrobianos considerados de primera elección para el tratamiento de las infecciones humanas causadas por ellos. Los valores más elevados de CIM dentro de los betalactámicos se obtuvo con oxacilin, penicilina, ampicilina, cefazolín y cefalotin,

también se encontraron CIMs elevados frente a vancomicina, eritromicina y clindamicina.

Palabras clave: Enterobacterias, resistencia, antibióticos, leche cruda.

ABSTRACT

416 raw milk samples, randomly collected from tank of five collection centers, located in the basin of Maracaibo lake of Zulia state, Venezuela, were examined for the presence of antibiotics using the Delvotest-P (Gibbs-Brocades) and Disk Assay (Difco Laboratories) methods. The milk samples positives were cultured for growing of *Enterobacteriaceae*, the strains were isolated and identified. The MIC (27 antibiotics) and determinations of resistance to 13 antibiotics were performed on all *Enterobacteriaceae* isolates. 48 samples had antibiotics and were isolated 75 *Enterobacteriaceae*: 30 *Enterobacter sp.*, 20 *Klebsiella sp.*, 17 *E. coli*, 4 *Serratia marcescens*, 3 *Citrobacter freundii* and 1 *Proteus myxofaciens*. The strains were resistant to several antimicrobials commonly used in the mastitis therapy; being the common pattern of resistance: penicillin, cloxacilin and novobiocyn. A big quantity of the isolations had lows MICs with the antimicrobials considered of first choice in human infections caused by them; the highest values of MIC were obtained with oxacilin, penicillin, ampicilin, cefazolin and cephalotin inside

betalactámicos; just as with vancomycin, erythromycin and clindamycin.

Key words: *Enterobacteriaceae*, resistance, antibiotics, raw milk.

INTRODUCCIÓN

El uso de quimioterápicos en dosis subterapéuticas para el tratamiento de una infección, propicia el desarrollo de resistencia a éstos por parte de los microorganismos. Se ha señalado, que dicho proceso puede también desencadenarse en la leche cuando en ella se encuentran frecuentemente residuos de antibióticos [15].

La presencia de bacterias antibiótico-resistentes en leche cruda y productos lácteos sin pasteurizar ha sido ampliamente reportada [1,2,8,10,11,16,17,19,29] enfocándose recientemente, la atención hacía la importancia que, desde el punto de vista de salud pública, implica la transmisión al hombre a través de los alimentos de bacterias resistentes a la acción de los antibióticos.

Algunas enterobacterias se han señalado como productoras de enfermedades al hombre y animales [12, 14, 20, 22]. La producción de mastitis por coliformes se ha incrementado en los últimos años [12, 33, 34], y se ha demostrado que cepas antibiótico-resistentes de *E. coli*, de origen animal, pueden colonizar el intestino humano y transferir su resistencia a las bacterias allí presentes, incluso a patógenos sensibles con los cuales el hospedero esté infectado; debido al transporte por muchas cepas de *E. coli* de determinantes de resistencia a antibióticos que son transferibles a otras bacterias [17].

La resistencia antimicrobiana ha alcanzado niveles significativos en el mundo [2, 26, 29, 32], particularmente en lugares con pocas restricciones al uso de antibióticos, como ocurre en Venezuela; ya en 1994 [13] se reportó una elevada incidencia de antimicrobianos en leche cruda producida en diversas zonas del estado Zulia, con un probable desarrollo de resistencia a los antibióticos por las cepas presentes en ella.

El objetivo de esta investigación fue determinar la resistencia a los antimicrobianos de Enterobacterias aisladas de leche cruda producida en el estado Zulia, así como establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antibióticos de uso común frente a estas bacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y detección de antibióticos

416 muestras de leche cruda fueron recolectadas aleatoriamente en 5 receptorías ubicadas en la Cuenca del Lago de Maracaibo del estado Zulia. 30 ml de leche se tomaron en forma aséptica directamente de las cántaras y se transportaron bajo refrigeración hasta el Laboratorio de Industrias Lácteas

de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. La presencia de antimicrobianos se detectó con las técnicas del Delvotest-P (Gist Brocades USA.Inc., Charlotte,NC) [9], y el método del Disco Ensayo usando *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* según la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) [4].

Aislamiento bacteriano

Las muestras que resultaron positivas a la detección de antibióticos se diluyeron en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 a 25°C, a concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , sembrándose luego por profundidad en agar rojo violeta bilis (ARVB) e incubándose a 37°C por 24 horas.

Identificación

Las colonias fermentadoras de la lactosa obtenidas del ARVB se caracterizaron morfológicamente y se sembraron en agar TSI, caldo indol, agar úrea, agar citrato, agar motilidad, agar fenilalanina y caldos ornitina y lisina descarboxilasa, los que se incubaron a 37°C por 24 horas; para ser clasificadas por sus reacciones bioquímicas [6,22]. En los casos necesarios se realizaron pruebas complementarias para identificar especie, entre ellas utilización de azúcares, crecimiento en KCN, descarboxilación de arginina, rojo de metilo y Voges-Proskauer.

Antibiogramas

Los microorganismos identificados se sembraron en caldo soya tripticasa (CST) e incubaron a 37°C por 24 horas. El crecimiento obtenido se diluyó en solución salina fisiológica estéril (SSF), hasta obtener una densidad equivalente al estándar N^o 0,5 de McFarland. Posteriormente el método de difusión en agar de Bauer y Kirby [5] fue realizado utilizando discos comerciales (BBL, DIFCO, OXOID) de las drogas más utilizadas en el tratamiento de la mastitis, TABLA I. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y el criterio de sensibilidad o resistencia a cada agente se determinó según las especificaciones.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

De un cultivo puro en agar MacConkey se tomaron colonias de la cepa ya identificada y se suspendieron en 5 ml de SSF, hasta obtener una turbidez equivalente al estándar N^o 0,5 de McFarland. De esta suspensión se tomaron 250 microlitros y se agregaron a 24,75 ml de SSF. La concentración final del inóculo fue aproximadamente 1×10^6 ufc/ml. Esta solución fue utilizada para sembrar las placas de microtitulación del método de microdilución en caldo UNISCEPT MIC type 3 (Analytab Products Plainview, NY) la cual se realizó según las instrucciones del fabricante. Luego fue calculado el MIC₉₀ y comparado con los criterios de interpretación de la NCCLS [25]. La TABLA II muestra la lista de antimicrobianos incluidos en el equipo UNISCEPT/MIC type 3.

TABLA I
CONCENTRACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS USADOS
EN LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR

Antimicrobianos	Contenido del Disco
Penicilina G	10 unidades
Cloxacilin	5 µg
Ampicilina	10 µg
Cefotaxime	30 µg
Triple Sulfa	250 µg
Estreptomocina	10 µg
Gentamicina	10 µg
Neomicina	30 µg
Tetraciclina	30 µg
Nitrofurantoina	300 µg
Polimixina B	300 unidades
Acido Nalidixico	30 µg
Novobiocina	30 µg

Análisis estadístico

El análisis de los antibiogramas se efectuó comparando los porcentajes de resistencia de las cepas mediante la prueba Z, utilizando el MICROSTAT (Ecosoft Inc.1978-85) y por el análisis de la varianza con el STATISTIX (NH Analytical Software.1987 version 2.02) del paquete estadístico SAS [31]. Con la Prueba de Tukey se establecieron diferencias entre medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resistencia a los antimicrobianos

Se detectaron antibióticos en 48 de las 416 muestras de leche cruda, aislándose de éstas un total de 75 Enterobacterias, siendo 30 cepas *Enterobacter sp.*, 20 *Klebsiella sp.*, 17 *E. coli*, 4 *Serratia marcescens*, 3 *Citrobacter freundii* y 1 *Proteus myxofociens*.

Dentro del género *Enterobacter* se encontró que el 56,6% de las cepas eran *E. cloacae*, 33,4% *E. agglomerans* y 10% *E. aerogenes*. Los porcentajes de resistencia frente a los antibióticos para estas especies, así como, la resistencia media del género se muestran en la TABLA III. El análisis de la varianza permitió establecer diferencias significativas ($p < 0,05$) en la resistencia según el tipo de antibiótico empleado y, ausencia de éstas ($p > 0,05$) entre especies.

Las *Enterobacter* presentaron resistencia máxima (100%) frente a cloxacilin, penicilina y novobiocina. Las drogas más efectivas fueron: el ácido nalidixico y la gentamicina. Cabe destacar que la gentamicina es recomendada para el tratamiento de la mastitis producida por *Enterobacter* [24].

TABLA II
ANTIMICROBIANOS INCLUIDOS EN EL EQUIPO
UNISCEPT/MIC TYPE 3

Antimicrobiano	Rango de Concentr. (µg/ml)
Betalactámicos	
Penicilinas naturales:	
Penicilina G	0.03-8
Penicilinas resistente a la penicilinas:	
Oxacilin	0.50-4
Aminopenicilinas:	
Ampicilina	0.12-16
Ureidopenicilinas:	
Mezlocilfn	16-128
Piperacilina	8-128
Carbapenemos:	
Imipenem	1-8
Monobactámicos:	
Aztreonam	2-16
Betalactámicos e inhibidores de Betalactamasa:	
Amoxicilina/Ac. Clavulánico	2/1-16/8
Ampicilina/sulbactam.	2/1-16/8
Ticarcilina/Ac. Clavulánico	16/2-128/2
Cefalosporinas 1 ^{ra} generación:	
Cefalotin	2-16
Cefazolfn	2-16
Cefalosporinas 2 ^{da} generación:	
Cefoxitfn	2-16
Cefuroxime	2-16
Cefalosporinas 3 ^{ra} generación:	
Cefotaxime	4-32
Ceftriaxone	4-32
Cefalosporinas 3 ^{ra} generación con aumentada actividad antipseudomonas:	
Cefoperazona	4-32
Ceftazidime	2-16
Aminoglicósidos:	
Gentamicina	1-8
Amikacina	4-32
Tobramicina	1-8
Fluoroquinolonas:	
Norfloxacin	4-16
Ciprofloxacina	0.5-4
Macrólidos:	
Eritromicina	0.5-4
Lincomicinas:	
Clindamicina	0.5-4
Glucopéptidos:	
Vancomicina	2-16
Combinación Sulfonamidas:	
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0.5/9.5-8/152

TABLE III
 PORCENTAJE DE RESISTENCIA DEL GENERO *Enterobacter* FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrobiano	Resistencia (%)			\bar{X}
	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	
Cloxacilin	100	100	100	100,0 ^a
Penicilina	100	100	100	100,0 ^a
Novobiocina	100	100	100	100,0 ^a
Ampicilina	50	60	85	65,0 ^{ab}
Tetraciclina	10	60	40	36,7 ^{bc}
Nitrofurantoina	10	60	40	36,7 ^{bc}
Triple sulfá	8	60	12	26,7 ^{bc}
Neomicina	0	25	0	8,3 ^{cd}
Polimixina B	20	0	0	6,7 ^{cd}
Estreptomcina	20	0	0	6,7 ^{cd}
Cefotaxime	14	0	0	4,7 ^{cd}
Ac. nalidíxico	0	0	0	0,0 ^d
Gentamicina	0	0	0	0,0 ^d

a,b,c,d Medias que posean diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0,05$).

TABLE IV
 PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE *E. coli* FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrobiano	Resistencia (%)
Cloxacilin	100,0 ^a
Penicilina	100,0 ^a
Novobiocina	100,0 ^a
Ampicilina	20,0 ^b
Tetraciclina	40,0 ^b
Nitrofurantoina	6,6 ^{bc}
Triple sulfá	20,0 ^b
Neomicina	0,0 ^c
Polimixina B	0,0 ^c
Estreptomcina	0,0 ^c
Cefotaxime	0,0 ^c
Ac. nalidíxico	0,0 ^c
Gentamicina	0,0 ^c

a,b,c Medias que posean diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0,05$).

Las cepas de *E. coli* mostraron total resistencia a cloxacilin, penicilina y novobiocina (100%); siendo altamente sensibles a cefotaxime, polimixina B, ácido nalidíxico, estreptomcina, gentamicina y neomicina TABLA IV. Rahman [28] reportó aislamientos de *E. coli*, obtenidos a partir de leche mastíticas, que fueron altamente sensibles a neomicina y gentamicina. También Kahlon [18] aisló cepas de *E. coli*, de leche cruda y pasteurizada, sensibles a polimixina B y estreptomcina. Es de

TABLE V
 PORCENTAJE DE RESISTENCIA DEL GÉNERO *Klebsiella* FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrobiano	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	\bar{X}
Cloxacilin	100	100	100,0 ^a
Penicilina	100	100	100,0 ^a
Novobiocina	100	100	100,0 ^a
Ampicilina	65	100	82,5 ^a
Nitrofurantoina	0	38	18,9 ^b
Estreptomcina	24	0	12,0 ^b
Triple sulfá	24	0	12,0 ^b
Neomicina	0	20	20,0 ^b
Tetraciclina	0	20	20,0 ^b
Polimixina B	0	0	0,0 ^b
Cefotaxime	0	0	0,0 ^b
Ac. nalidíxico	0	0	0,0 ^b
Gentamicina	0	0	0,0 ^b

a,b Medias que posean diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0,05$).

resaltar que la resistencia de *E. coli* a ampicilina, tetraciclina, triple sulfá y nitrofurantoina fue mayor a la reportada por otros autores [3,17].

Dentro del género *Klebsiella* se identificaron dos especies; *K. pneumoniae* (40%) y *K. oxytoca* (60%). Ambas especies presentaron resistencia elevada a cloxacilin, penicilina, novobiocina y ampicilina, TABLA V. La resistencia a ampicilina de *Klebsiella* ya ha sido reportada [27]. Ante los demás anti-

TABLA VI
PORCENTAJE DE RESISTENCIA FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS DE *S. marcescens*, *C. freundii* y *P. myxofaciens*

Antimicrobiano	<i>S. marcescens</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. myxofaciens</i>
Cloxacilin	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Penicilina	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Novobiocina	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Ampicilina	75 ^a	65 ^{ab}	100 ^a
Nitrofurantoina	75 ^a	0 ^c	100 ^a
Estreptomycin	0 ^b	0 ^c	0 ^b
Triple sulfa	0 ^b	33 ^{bc}	0 ^b
Neomicina	0 ^b	0 ^c	0 ^b
Tetraciclina	75 ^a	30 ^b	0 ^b
Polimixina B	50 ^a	0 ^c	0 ^b
Cefotaxime	0 ^b	0 ^c	0 ^b
Ac. nalidíxico	0 ^b	0 ^c	0 ^b
Gentamicina	0 ^b	0 ^c	0 ^b

^{a,b,c}Medias en una misma columna que posean diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0.05$).

crobianos se detectaron bajos porcentajes de resistencia o ausencia de ésta. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las especies.

Serratia marcescens presentó altos porcentajes de resistencia a cloxacilin, ampicilina, penicilina, novobiocina, polimixina B, nitrofurantoina y tetraciclina, TABLA VI, a pesar de que los últimos tres medicamentos incluyen en su espectro de acción a esta bacteria. La resistencia a tetraciclina se ha asociado con la presencia de plásmidos que causan reflujo del agente antimicrobiano del citoplasma del microorganismo, y ha sido reportada en cepas aisladas de humanos en porcentajes similares a los obtenidos en esta investigación [7]. Resalta el hecho de que las cepas de *S. marcescens* no fueron resistentes a estreptomycin, gentamicina, neomicina y cefotaxime, como se ha observado en otros reportes [19].

Las cepas de *Citrobacter freundii*, TABLA VI, presentaron resistencia a penicilina, cloxacilin, ampicilina, novobiocina, tetraciclina y triple sulfa, a pesar de que las sulfas son consideradas de amplio espectro. Se ha reportado la disminución de la resistencia a las sulfas en nuestro país debido al poco uso dado en los últimos años.

La cepa de *Proteus myxofaciens*, TABLA VI, mostró resistencia a penicilina, cloxacilin, ampicilina, novobiocina y nitrofurantoina. Es ampliamente conocida la resistencia a nitrofurantoina por estos microorganismos, y aunque la ampicilina es recomendada contra *Proteus* (excepto *P. vulgaris*) [23], en este aislamiento se observó una total resistencia a ella; igualmente ocurrió con la novobiocina, a pesar de tener un espectro de acción reducido que incluye algunas cepas de *Proteus* [23]. Aunque se señala a tetraciclina y polimixina B, como poco activas frente a *Proteus sp.* [23] la especie aislada fue sensible a ellos.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La CIM se define como la concentración más baja del antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible del inoculo bacteriano, y se considera que una bacteria es altamente resistente a una droga cuando la concentración del antimicrobiano necesaria para inhibirla *in vitro* (CIM) es mayor que la concentración alcanzada por el mismo en suero o tejidos [25].

Para determinar la CIM de un grupo de bacterias de la misma especie ante un antimicrobiano, se calcula la CIM90; la cual es definida como la máxima concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento del 90% de las cepas [25].

En la TABLA VII se muestran los resultados de la CIM90 para las cepas aisladas; se observa, que *E. coli* exhibió CIM90 elevados (resistencia absoluta) sólo frente a 5 antimicrobianos: oxacilin, penicilina, vancomicina, clindamicina y eritromicina, los que no se incluyen entre los medicamentos recomendados para el tratamiento contra este microorganismo en humanos. Así mismo, se encontró que la resistencia de *E. coli* a ampicilina (CIM90=8µg/ml) fue menor que la reportada a nivel hospitalario [21]. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* presentaron CIMs>16µg/ml frente a cefazolin, cefoxitin, cefuroxime y cefalotin, así como una cepa con CIM>128/2µg/ml para ticarcilina/ac. clavulánico, situación ésta que alerta sobre el desarrollo de resistencia por *E. coli* a antibióticos a los que solía ser susceptible.

S. marcescens mostró resistencia a 12 de los 27 antibióticos probados, exhibiendo altos valores de CIM90 frente a los betalactámicos oxacilin, penicilina, ampicilina, cefazolin, cefuroxime, cefalotin e imipenem. Así mismo, se obtuvo total resistencia a eritromicina, clindamicina y vancomicina, y a las combinaciones de betalactámicos: amoxicilina/ácido clavulánico y ampicilina/sulbactam (CIM90> 16/8µg/ml). La resistencia a

TABLA VII
VALORES DE CIM90 ($\mu\text{g/ml}$) PARA *E. coli*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *P. myxofaciens* y ESPECIES DE *Enterobacter* Y *Klebsiella* AISLADAS DE LECHE CRUDA

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. myxofaciens</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Oxacilina	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
Penicilina G	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
Ampicilina	8	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Mezlocilina	16	16	16	16	>128	16	16	16	16
Piperacilina	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Cefazolina	2	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	2
Cefoperazona	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Cefotaxima	4	4	4	>32	4	4	4	4	4
Cefoxitina	2	8	>16	16	>16	>16	8	2	2
Ceftazidima	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ceftriaxona	4	4	4	>32	4	4	4	4	4
Cefuroxima	2	>16	4	>16	2	16	>16	2	2
Cefalotina	8	>16	>16	>16	>16	>16	>16	2	>16
Aztreonam	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Imipenem	1	>8	1	4	1	1	>8	1	1
Gentamicina	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Amikacina	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Trobamicina	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Eritromicina	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
Clindamicina	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
Vancomicina	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Ciprofloxacina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Norfloxacina	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Trimetropin/ sulfametoxazol	0.5/9.5	0.5/9.5	0.5/9.5	0.5/9.5	0.5/9.5	0.5/9.5	0.5/9.5	0.5/9.5	0.5/9.5
Amoxicilina/ ac. clavulánico	4/2	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	2/1	>16/8
Ampicilina/ sulbactam	2/1	>16/8	2/1	16/8	8/4	8/4	2/1	4/2	8/4
Ticarcilina/ ac. clavulánico	16/2	16/2	16/2	16/2	16/2	16/2	16/2	16/2	16/2

Resistencia Absoluta. CIM90 Superior a la alcanzable en tejidos o suero.

este último medicamento se deriva de que *Serratia sp.* generalmente, posee betalactamasas que pertenecen a la clase I de la clasificación de Richmond-Sykes sobre las que no actúan los nuevos inhibidores de la betalactamasas, entre ellos el sulbactam [27].

Para *C. freundii* se encontró CIMs elevados con oxacilina, penicilina, ampicilina, cefoxitina, cefazolina y cefalotina, a pesar de que los dos últimos antibióticos incluyen a *Citrobacter* dentro de su espectro de acción. También frente a eritromicina, clindamicina, y vancomicina presentaron alta resistencia; y frente

a amoxicilina/ácido clavulánico se encontró un CIM90 elevado (>16/8 $\mu\text{g/ml}$). Las cepas de *C. freundii* aisladas en este estudio mostraron mayor sensibilidad frente a los aminoglicósidos y a las cefalosporinas de segunda y tercera generación que los reportes para cepas de origen hospitalario [21].

A pesar de que *P. myxofaciens* no ha sido aislado a partir de humanos, no se puede ignorar la posibilidad de que en algún momento ocurra su transmisión a través de los alimentos. Para este microorganismo se encontraron MICs elevados frente a los betalactámicos oxacilina, penicilina, ampicilina, ce-

fazolin, cefotaxime, ceftriazone, cefuroxime y cefalotin. Presentó además resistencia a la mayoría de las cefalosporinas probadas; aunque cefotaxime, ceftriazone y cefuroxime son antibióticos recomendados contra *Proteus sp.* [23]. Tampoco la eritromicina, clindamicina, vancomicina y amoxicilina/ácido clavulánico fueron efectivos contra la cepa de *P. myxofaciens* aislada.

Para las especies de *Enterobacter* se encontraron cifras de CIM90 bastante homogéneas. Dentro de los betalactámicos se observaron las mayores CIMs con oxacilin, penicilina, ampicilina, cefazolin y cefalotin, debido probablemente a la producción de betalactamasas por parte de las cepas. Destaca la elevada resistencia de *E. aerogenes* a imipenem y cefuroxime a pesar de señalarse a imipenem como antibiótico de elección para este microorganismo [24]. También para *E. agglomerans* se encontró un elevado CIM90 frente a mezlocilin (128 µg/ml). A pesar, de que cefoxitin no incluye a *Enterobacter* en su espectro de actividad, las cepas de *E. aerogenes* se mostraron sensibles a él (CIM90=8µg/ml). Los aminoglicósidos trimetropin/ sulfametoxazol y fluoroquinolonas resultaron muy efectivos contra todas las especies aisladas de *Enterobacter*; lo que los confirma como antibióticos de primera elección según Sanford [30]. También las combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas fueron bastante efectivas; a excepción de amoxicilina/ácido clavulánico.

Las cepas de *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* presentaron valores de CIM90 muy similares, con excepción de *K. oxytoca* frente a cefazolin y la de *K. pneumoniae* frente a cefalotin y amoxicilina/ácido clavulánico; todas con alta resistencia, a pesar de que cefazolin es uno de los medicamentos de primera elección para el tratamiento de estas dos especies de *Klebsiella*. Los valores del CIM90 más elevados se encontraron dentro de los betalactámicos con oxacilin, penicilina y ampicilina así como con vancomicina, eritromicina y clindamicina. Para los demás antimicrobianos se encontraron cifras de CIM90 bajas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABBARF, F.M.; KADDER, H.K. Incidence of antibiotic resistance *E. Coli* in Iraqú Milk Products. **J. Food Prot.** 53 (10):846-848. 1990.
- [2] ALBRIGHT J.L.; TICKEY, S.L.; WOODS, G.T. Antibiotics in Milk, a review. **J. Dairy Science.** 44:779-807. 1961.
- [3] ANDRADE, L.F. Prevalencia de Coliformes en Mastitis Bovina, Sensibilidad y Resistencia *in vitro*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. (Trabajo de Ascenso). 39 pp. 1979.
- [4] ASSOC OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. **Milk NE** 982:16. 1990.
- [5] BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45:493-496. 1966.
- [6] **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** Eighth Edition. Edit. A. Williams & Wilkins Company, USA: 290-324. 1974.
- [7] BEZANSON, G.S.; KHAKHRIA, R.; BOLLEGRAAF, E. Nosocomial outbreak caused by antibiotic resistant strain of *Salmonella typhimurium* acquired from dairy cattle. **Can. Med. Assoc. J.** 128 (4):426-427. 1983.
- [8] BRADY, M.S.; KATZ, S.E. Antibiotic/Antimicrobial residues in milk. **J. Food Prot.** 51 (1):8-11. 1988.
- [9] CARLSSON, A.; BJORCK, L. Charm Test II for Confirmation of Inhibitory Substances Detected by Different Microbial Assays in Herd Milk. **J. of Food Protection.** Vol. 54. Nº 1:32-36. 1991.
- [10] CHAGONDA L.S.; NDIKUWERA, J. Antibiotic in milk supplies in Zimbabwe. **J. Food Prot.** 52 (10):731-777. 1989.
- [11] DIAS, J.C.; HOFER, E. Bacterias Gram negativas resistentes a antimicrobianos en alimentos. **Men. Inst. Oswaldo Cruz.** 80 (4):411-421. 1985.
- [12] EBERHART, R.J. Coliform mastitis. **J.A.V.M.A.** 170 (10):1160-1163. 1977.
- [13] FARÍA, J.F.; RIVERO, Z.; SANTOURO, R. Aislamiento de Gram negativos en Leches Crudas con Antibióticos. **Revista Científica, FCV-LUZ.** Vol IV, Nº 1:11-16. 1994.
- [14] GLATZ, B.A.; BRUDVIG, S.A. Enterotoxin production in milk by enterotoxigenic *E. coli*. **J. Food Prot.** 43:298-299. 1980.
- [15] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Ecología microbiana de los alimentos.** Volumen II. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 989 pp. 1980.
- [16] JONES, A.M. *E. coli* in retail samples of milk and their resistance to antibiotics. **Lancet** ii: 347-350. 1971.
- [17] JONHSTON, D.W.; BRUCE, J.; HILL, J. Incidence of antibiotic resistance *E. coli* in milk produced in the west of Scotland. **Appl. Bacteriol.** 54:77-83. 1983.
- [18] KAHLONS, S.; JOSHI, V.K. A note of antibiotics sensitivity of *E. coli* isolated from market milk of Ludhiana city. **J. of Food Sci. and Tech. India.** 20 (2):86-88. 1983.
- [19] LANGLOIS, B.E.; FIZENSTAT, J.; BULL, L.S.; HEMKEN, R.W. Antibiotic resistance of enteri bacteria isolated from milk and faeces. **J. Dairy Sci.** 63 (Suppl.1):124. 1980.
- [20] LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; TRUANT, J.P. **Microbiología Clínica.** Editorial Panamericana. 3era Edición. 1260 pp. 1982.

- [21] LUGO, L.; HARRIS, B.; CONTRERAS, I.; LUGO, I. **Gérmenes prevalentes y sensibilidad *in vitro* a la ciprofloxacina**. Serie Clínica. Editorial Panamericana. NE 8:13-16. 1989.
- [22] MARTÍNEZ, A. Familia *Enterobacteriaceae*. Universidad del Zulia. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. (Trabajo de Ascenso). 50 pp. 1990.
- [23] MARTINEZ, J.L.; MARTINS, I.S. Inhibidores bacterianos no leite tipo B comercializado no Municipio de Sao Paulo, SP (Brazil). **Rev. Saude Pública**. 19(5):421-430. 1985.
- [24] MOGOLLÓN, E. **Terapéutica Veterinaria**. Editorial América C.A. 2da Edición. 626 pp. 1987.
- [25] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Zone diameter interpretative standards and equivalent Minimum Inhibitory Concentration (MIC). **Break point for organism other than *Haemophilus***. Vol 8, N1 7. 30 pp. 1988.
- [26] O'BRIENT, T.F. and the members of Task Force 2. Resistance of bacteria to antimicrobial agent: Report of Task Force 2. **Rev. Infect. Dis**. 9 (suppl.3): S244. 1987.
- [27] PFIZER S.A. Laboratorios. **Inhibición de la Resistencia en Bacterias Productoras de Betalactamasas. Estudio *in vitro***. Venezuela. 13 pp. 1992.
- [28] RAHMAN, H.; BORO, B.R. Isolation and antibiogram of bacterial pathogens producing mastitis. **J. of Animal Health**. 29 (1): 49-52. 1990.
- [29] RIEDNER, S.; ALBUQUERQUE, A.J.D.; BADKE, M.R.; WEIBLEN, R. Resistencia de bacterias isoladas do leite de vacas frente a doze drogas antibacterianas. **Rev do-centro-de Ciencias Rurais**- Universidade Federal de Santa Maria. 17 (3): 251-260. 1987.
- [30] SANFORD, J.P. **Guide to antimicrobial therapy**. Antimicrobial Therapy INC. USA February 1991. 126 pp. 1991.
- [31] SAS Institute INC. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS User's Guide: Statistics. Cary. North Caroline. USA. Version 2.02. 1986.
- [32] SUAREZ, B.; FERREIROS, C.M. Psychotropic flora of raw milk: resistance to reversal common disinfectants. **J. of Dairy Research**. 58 (1):127-136. 1991.
- [33] TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. Serratia species isolated from bovine intramammary infections. **J. Dairy Sci**. 74:1860-1865. 1991.
- [34] TYLER, J.; SPEARS, H.; CULLOR, J.; SMITH W.; NELSON R.; MARTIN, J. Antigenic homology among Gram negative organisms isolated from cattle with clinical mastitis. **J. Dairy Sci**. 74:1235-1242. 1991.