

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas de infecciones entéricas de porcinos provenientes de granjas de producción tecnificada

Phenotypic detection of antimicrobial resistance mechanisms of *Escherichia coli* isolates from enteric infections in pigs from technified farms

Michelle Monterroso C.^{1,3}, Guillermo Salvatierra R.², André Sedano S.¹,
Sonia Calle E.^{1,4}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue detectar fenotípicamente los mecanismos de resistencia antimicrobiana de 36 aislados de *Escherichia coli* a betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos mediante la técnica de Kirby-Bauer. Se utilizaron 36 aislados de *E. coli* procedentes de porcinos de granjas tecnificadas, obtenidos durante el periodo 2010-2015. Se utilizaron 15 antimicrobianos de importancia en medicina humana y veterinaria. Se detectó resistencia principalmente al ácido nalidíxico (89%, 32/36), cloxacilina (83%, 30/36) y amoxicilina-ácido clavulánico (69%, 25/36). Solo un 3% (1/36) presentó AmpC inducible, 42% (15/36) evidenció una posible mutación en *gyrA* y el 14% (5/36) al menos dos posibles mutaciones en *gyrA* o *gyrA+parC*. Además, el 33% (12/36) evidenció altas probabilidades de presencia de genes *qnr*. Las enzimas del mecanismo de resistencia a aminoglucósidos fueron positivas en un 39% (14/36) de AAC (6'), 28% (10/36) ANT (2'') y 11% (4/36) de AAC (3) IV.

Palabras clave: *Escherichia coli*; porcino; mecanismos de resistencia; resistencia antimicrobiana; salud pública

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Universidad San Ignacio de Loyola, Lima, Perú

³ E-mail: m.monterroso.c@gmail.com

⁴ E-mail: scallee@unmsm.edu.pe

Recibido: 28 de marzo de 2018

Aceptado para publicación: 10 de octubre de 2018

ABSTRACT

The aim of this study was to detect the antimicrobial resistance mechanisms of 36 *Escherichia coli* isolates to beta-lactams, quinolones and aminoglycosides using the Kirby-Bauer technique. Thirty-six *E. coli* isolates from pigs of technified production farms obtained during the 2010-2015 period were used. Fifteen antimicrobials of importance in human and veterinary medicine were tested. The isolates showed resistance mainly to nalidixic acid (89%, 32/36), cloxacillin (83%, 30/36) and amoxicillin-clavulanic acid (69%, 25/36). Only 3% (1/36) were AmpC producers, 42% (15/36) showed a possible mutation in *gyrA* and 14% (5/36) at least two possible mutations in *gyrA* or *gyrA+parC*. In addition, 33% (12/36) showed high probabilities of presence of *qnr* genes. The enzymes associated to aminoglycoside resistance mechanism were positive in 39% (14/36) to AAC (6'), 28% (10/36) to ANT (2") and 11% (4/36) to AAC (3) IV.

Key words: *Escherichia coli*; pigs; resistance mechanisms; antimicrobial resistance; public health

INTRODUCCIÓN

La aparición de cepas resistentes se ha convertido en un problema de índole mundial, tanto en medicina veterinaria como en el tratamiento de infecciones en humanos (Prescott, 2000; Stine *et al.*, 2007). Dada la importancia del problema se han puesto en marcha programas de vigilancia y monitoreo de la resistencia antimicrobiana (OIE, 2016).

Para medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos a antimicrobianos se utiliza la técnica de Kirby-Bauer (Cona, 2002). Esta técnica permite detectar β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas AmpC, resistencia a quinolonas por mutaciones en los genes de la DNA girasa, topoisomerasa IV o mediadas por plásmidos, así como los patrones de resistencia a aminoglucósidos debidos a la expresión de enzimas modificadoras (Martínez y Calvo, 2010).

Por esas razones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) recomien-

dan el monitoreo de microorganismos multidrogoresistentes entre los que destaca *Escherichia coli* (OMS, 2001; OIE, 2016). La prevalencia de este patógeno resistente es un buen indicador de la presión selectiva por el uso indebido de antimicrobianos y de problemas de resistencia ligado a bacterias patógenas (Van den Bogaard *et al.*, 2000). Las cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos pueden constituir un reservorio de genes transferibles a otras poblaciones bacterianas potencialmente patógenas (Lim *et al.*, 2010). Por ejemplo, plásmidos que confieren resistencia a múltiples antimicrobianos pueden transferirse desde *E. coli* a bacterias como *Salmonella* Typhimurium u otros patógenos de importancia, no sólo en el ámbito animal, sino además en la salud pública (Kikui *et al.*, 2007).

El objetivo del estudio fue detectar fenotípicamente los mecanismos de resistencia a betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos de 36 aislados de *E. coli* mediante la técnica de Kirby-Bauer siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Experimental

Se utilizaron 36 aislados de *E. coli* procedentes de porcinos, en su mayoría lechones, de granjas tecnificadas obtenidos durante el periodo 2010-2015. Las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. El tipo de muestra recibida fue de órganos derivados de necropsias (hígado, bazo, vesícula biliar, intestinos, pulmón y nódulos linfáticos). La identificación de las bacterias fue llevada a cabo mediante pruebas bioquímicas.

Los aislados fueron criopreservados en viales de 1.5 ml utilizando caldo de cultivo Tripticasa de Soya (TSB) y Glicerol al 87% en una proporción 50/50, y almacenados en el cepario del laboratorio a -20 °C. Los aislados fueron reactivados mediante siembra en agar nutritivo Tripticasa de Soya (TSA) y Agar MacConkey (MC) (Sánchez y Corrales, 2005).

Método Kirby-Bauer

Para la detección de la resistencia se utilizaron 15 antimicrobianos mediante la técnica Kirby-Bauer de difusión en agar. El procedimiento se realizó según recomendaciones del CLSI (2016). Los antimicrobianos utilizados fueron amoxicilina con ácido clavulónico (20/10µg), ceftazidima (30 µg/dl), cefotaxima (30 µg), cefepime (30 µg), aztreonam (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cloxacilina (1 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), neomicina (30 µg), amikacina (30 µg), kanamicina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg) y ciprofloxacina (5 µg).

Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Se utilizó el método de Jarlier (Jarlier *et al.*, 1988), colocando un disco de amoxicilina-

con ácido clavulánico en el centro de una placa de Petri y discos de ceftazidima, cefotaxima y cefepime rodeando a este a 25 mm de distancia. Adicionalmente se utilizó el disco de aztreonam. La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos generando el efecto cola de pez o balón de fútbol americano (Jarlier *et al.*, 1988; Famiglietti *et al.*, 2005; Lezameta *et al.*, 2010).

Detección de Betalactamasas Tipo AmpC

Las betalactamasas de la clase molecular C de Ambler hidrolizan cefalosporinas de primera (cefalotina) y segunda generación (cefuroxima), incluidas las cefamicinas (cefoxitina y cefotetán) y, en menor medida, las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) (Navarro *et al.*, 2011). No existen métodos fenotípicos estandarizados por el CLSI; no obstante, se han diseñado diversos procedimientos con elevada sensibilidad. Para el presente estudio se utilizaron dos métodos:

Método de aproximación de ^{CAZ}_{CRO} discos

Propuesto por Sanders y Sanders en 1979, aplicable a betalactamasas AmpC inducibles. Se utilizó cefoxitina (30 µg/dl)

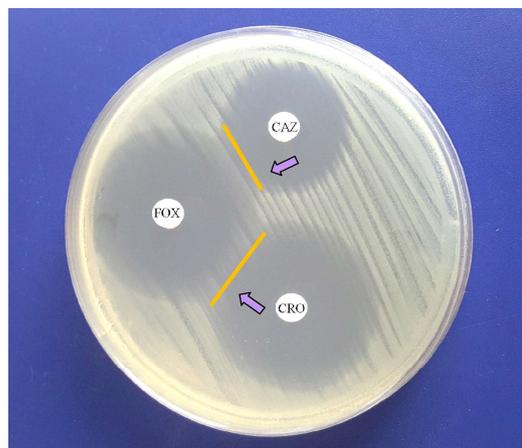


Figura 1. Método de detección de AmpC de tipo inducible según el método de aproximación de discos

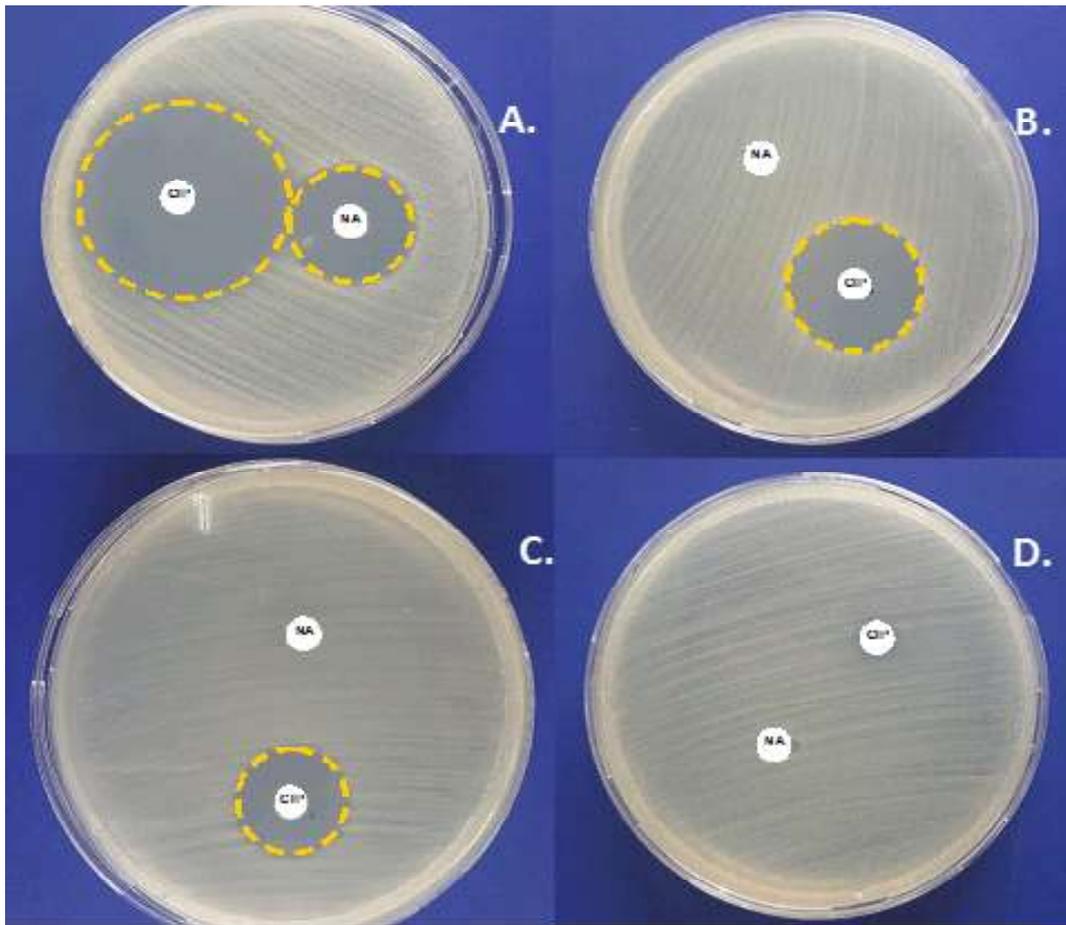


Figura 2. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana para quinolonas en aislados de *Escherichia coli*. CIP: Ciprofloxacina, NA: Ácido nalidíxico. A. Sensibilidad a CIP y NA, B. Resistencia a NA y sensibilidad a CIP, C. Resistencia a NA e intermedio para CIP, D. Resistencia a CIP y NA

como inductor a una distancia de 27 mm de centro a centro de la ceftazidima (30 µg/dl) y ceftriaxona (30 µg/dl) como reveladores (Figura 1). El microorganismo producirá una betalactamasa inducible si se observa un halo de inhibición truncado del antimicrobiano sustrato, testigo o revelador (Rojas y Valle, 2009).

Detección de AmpC usando inhibidores específicos

En caso de cepas AmpC plasmídicas constitutivas se utilizan técnicas que incluyan la utilización de inhibidores de AmpC. Se co-

loca un disco de cloxacilina (500 µg) y a una distancia de 25 mm de centro a centro se colocan discos de ceftazidima (30 µg) y cefotaxima (30 µg). La prueba da positiva para la producción de AmpC cuando se observa un halo de inhibición de las cefalosporinas adyacente a la cloxacilina (Mirelis *et al.*, 2006; Rojas y Valle, 2009).

Detección Fenotípica de Mecanismos de Resistencia a Quinolonas

La resistencia es debida a una acumulación de mutaciones en los genes de las topoisomerasas, sobre todo en *gyrA* y *parC*

(Ruiz, 2003; Jacoby, 2005; Navarro *et al.*, 2011) (Figura 2). Se utilizaron tres protocolos preestablecidos (Navarro *et al.*, 2011):

- Resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacino. Probablemente presentan una mutación en *gyrA*.
- Resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad intermedia a ciprofloxacino. Muy probablemente son aislados con al menos dos mutaciones en *gyrA* o *gyrA+parC*.
- Resistencia al ácido nalidíxico y ciprofloxacino. Alta probabilidad de presencia de genes *qnr* y de otros genes plasmídicos, sin alteraciones adicionales en las topoisomerasas.

Detección Fenotípica de Mecanismos de Resistencia a Aminoglucósidos

Existe una gran y diversa población de enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Su detección se basa en la lectura de los halos de inhibición generados por una gama de aminoglucósidos, obteniéndose según patrón de resistencia exclusivo de una enzima específica. Este método es denominado interpretación interpretativa (Cuadro 1) (Livermore, 2008).

RESULTADOS

Todos los aislados de *E. coli* (36/36) fueron resistentes a por lo menos un antimicrobiano (Cuadro 2). Las frecuencias más altas de resistencia fueron para el ácido nalidíxico (89%, 32/36), cloxacilina (83%, 30/36) y amoxicilina-ácido clavulánico (69%, 25/36). No se identificó fenotipo de resistencia compatible con BLEE.

El 3% (1/36) de los aislados presentó fenotipo de resistencia compatible con betalactamasas tipo AmpC. El 11% (4/36) no evidenció mecanismos de resistencia a quinolonas, siendo sensible a ambos antimicrobianos. Así mismo, se evidenció que el 42% (15/36) presentó una mutación en *gyrA*, el 14% (5/36) presentó al menos dos mutaciones en *gyrA* o *gyrA+parC*, y el 33% (12/36) presentó una alta probabilidad la presencia de genes *qnr* (Figura 3A).

De los 36 aislados estudiados, el 39% (14/36) presentó un patrón de resistencia para la enzima AAC (6'), el 28% (10/36) para la enzima ANT (2'') y el 11% (4/36) para la enzima AAC (3) IV. Solo el 3% (1/36) presentó

Cuadro 1. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a aminoglucósidos presentes en los aislados de *Escherichia coli*

Fenotipo	Clásico	AAC(3)I	AAC(3)II	AAC(3)IV	AAC(6')	ANT(2')	APH(3')
Gentamicina	S	R	R	R	S/r	R	S
Tobramicina	S	S	R	R	R	R	S
Amikacina	S	S	S	S	R	S	S
Kanamicina	S	S	R	R	R	R	R
Neomicina	S	S	S	R	R	S	R

AAC = Acetiltransferasa, ANT = Adeniltransferasa, APH = Fosfotransferasas, Clásico = fenotipo histórico de la especie sin resistencia adquirida, S = susceptible, R = resistente, r = zonas reducidas, pero es probable que permanezcan susceptibles en puntos de corte estándar (Adaptado de Livermore, 2008)

Cuadro 2. Frecuencia absoluta y relativa de la susceptibilidad de *Escherichia coli* a los antimicrobianos

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Ácido nalidíxico (AN)	4	11	0	0	32	89
Amikacina (MK)	30	83	0	0	6	17
Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)	11	31	0	0	25	69
Aztreonam (AZ)	22	61	3	8	11	31
Cefepime (FEP)	20	56	3	8	13	36
Cefotaxima (CTX)	21	58	2	6	13	36
Cefoxitina (FOX)	27	75	2	6	7	19
Ceftazidima (CAZ)	19	53	5	14	12	33
Ceftriaxona (CRO)	24	67	1	3	11	31
Ciprofloxacina (CIP)	19	53	5	14	12	33
Cloxacilina (CX)	5	14	1	3	30	83
Gentamicina (GE)	20	56	1	3	15	42
Neomicina (N)	15	42	11	31	10	28
Tobramicina (NN)	1	3	1	3	34	94
Kanamicina (K)	26	72	0	0	10	28

N: Número absoluto, %: Porcentaje

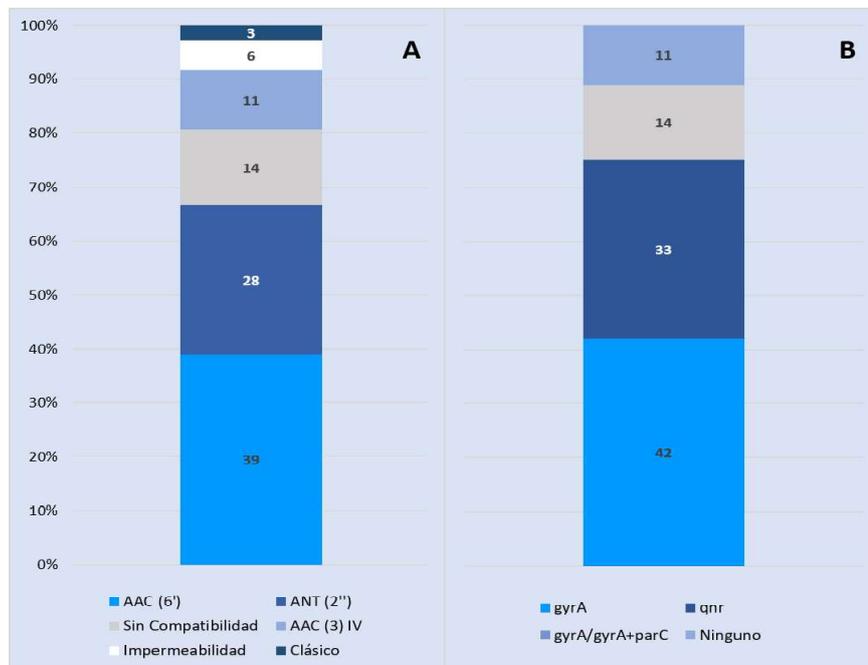


Figura 3. Distribución porcentual de mecanismos de resistencia antimicrobiana a aminoglucósidos (A) y quinolonas (B) en aislados de *Escherichia coli*

un patrón clásico sin resistencia adquirida, mientras que un 6% (2/36) presentó resistencia a todos los antimicrobianos (impermeabilidad). El 14% (5/36) no presentó compatibilidad con ninguno de los patrones preestablecidos (Figura 3B).

El 86% de los aislados presentó fenotipo multidrogoresistente (MDR), debido a la resistencia a tres o más familias de antimicrobianos.

DISCUSIÓN

El estudio evidenció altos porcentajes de resistencia los aislados de *Escherichia coli* provenientes de porcinos al ácido nalidíxico, cloxacilina y amoxicilina-ácido clavulánico. El ácido nalidíxico rara vez se utiliza hoy en día debido a su toxicidad (Rubinstein, 2001); sin embargo, es usado en estudios de resistencia para evidenciar posibles mutaciones en genes como *gyrA* o *parC*. El alto porcentaje de resistencia encontrado fue similar a lo descrito por Ruiz *et al.* (2004), quienes reportaron 91% de resistencia, donde la mutación en *gyrA* es suficiente para generar la resistencia a este antimicrobiano.

Seral *et al.* (2010) describieron que la sensibilidad a la amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) descarta de manera inicial la presencia de alguna betalactamasa de tipo AmpC y que posiblemente una BLEE se la causa de la resistencia. De manera similar, se encontró un alto porcentaje de resistencia para AMC (69%) y la detección de betalactamasa de tipo AmpC en un 3%. Sin embargo, la resistencia a esta combinación pudo deberse a otras razones como una elevada producción de BLEE o su resistencia a inhibidores, IRTs, enzimas OXA, hiperproducción de SHV-1, TEM-1, K1, etc.

Los altos niveles de resistencia (69%) a AMC detectados generan una gran preocupación desde el punto de vista clínico y epidemiológico, ya que esta combinación de antimicrobianos es el tratamiento de primera

elección para muchas infecciones por *E. coli*. La resistencia a los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico en enterobacterias se ha convertido en un problema de emergencia mundial (Oteo *et al.*, 2008; Di Conza *et al.*, 2014).

Solo el 3% (1/36) presentó un fenotipo de resistencia compatible a AmpC inducible. Este tipo de betalactamasa puede ocasionar fracasos terapéuticos descritos en infecciones causadas por aislados hiperproductores de AmpC inducible en tratamientos con betalactámicos (Navarro *et al.*, 2011).

El 42% (15/36) de los aislados presentó resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacina, evidenciando así una posible mutación en *gyrA*. Esta mutación se da en el codón 87 de *gyrA*, sin que se hayan detectado mutaciones en *parC*, lo cual produce un descenso en la susceptibilidad a fluoroquinolonas. No obstante, se requieren mutaciones adicionales en *gyrA*, *gyrB* y *parC* para la generación de resistencia frente a fluoroquinolonas (Miró *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2004).

Estudios iniciales en *E. coli* demostraron que la resistencia a las quinolonas se produce naturalmente por mutaciones en regiones definidas de las proteínas *gyrA* y en menor medida en *gyrB* (Yoshida *et al.*, 1991). Además, se ha determinado que mutaciones en las regiones equivalentes de las proteínas ParC o ParE (topoisomerasa IV) producen resistencia a quinolonas (Heisig, 1996). Se ha descrito que una sola mutación no da como resultado una resistencia clínicamente relevante; sin embargo, la combinación de mutaciones en los genes *gyrA* o *gyrB* y *parC* o *parE* que codifican para las subunidades A y B de topoisomerasas II y IV, respectivamente, genera resistencia (Talens-Visconti *et al.*, 2002).

El 33% (12/36) presentó resistencia al ácido nalidíxico y ciprofloxacino lo cual sugiere una alta probabilidad de la presencia de genes *qnr*. Rodríguez-Martínez *et al.* (2011)

observaron que las proteínas *qnr* facilitan la selección de mutantes resistentes a quinolonas de alto nivel.

Martínez-Martínez y Ruiz de Alegría (2009) detallaron los fenotipos implicados en los mecanismos de resistencia asociados a enzimas modificadoras de aminoglucósidos, muchos de los cuales se detectaron en este estudio. Se conocen tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos: O-fosfotransferasas [APHs, genes *aphA*, *strA*, *strB*], N-acetiltransferasas [ACCs, genes *aac* (3"), *aac* (6")], y O-adeniltransferasas [ANTs, genes *aadA*, *aadB*, también denominados ANT (Michael *et al.*, 2006; van Hoek *et al.*, 2011). La eficacia de los aminoglucósidos disminuye por el surgimiento de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) presentes en casi todos los géneros bacterianos (Ramírez y Tolmasky, 2010).

El estudio evidenció un alto porcentaje de aislados de *Escherichia coli* con diversos mecanismos que brindan resistencia a un amplio rango de antimicrobianos. La aparición de enterobacterias resistentes se encuentra relacionada al uso de estos agentes en las producciones pecuarias (WHO, 2014). Por ello, la detección de aislados de *E. coli* resistentes en porcinos en granjas resalta la necesidad de monitorear el uso controlado de antimicrobianos en la producción.

CONCLUSIONES

- El 3% (1/36) de los aislados de *Escherichia coli* evidenció la presencia de betalactamasa de tipo AmpC.
- El 42% (15/36) evidenció una posible mutación en *gyrA*, el 33% (12/36) presentó alta probabilidad de genes *qnr* y el 14% (5/36) al menos dos posibles mutaciones en *gyrA* o *gyrA* + *parC*.
- Las enzimas del mecanismo de resistencia a aminoglucósidos expresadas fueron de 39% (14/36) para AAC (6"), 28% (10/36) para ANT (2") y 11% (4/36) para AAC (3) IV.

LITERATURA CITADA

1. [CLSI] *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2016. CLSIM100-S26 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-sixth informational supplement. CLSI 36(1) M100-S26. 251 p.
2. *Cona E*. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Rev Chil Infectol 19(Supl 2): 77-81. doi: 10.4067/S0716-10182002019200001
3. *di Conza JA, Badaracco A, Ayala J, Rodríguez C, Famiglietti A, Gutkind GO*. 2014. β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant enterobacteria isolated in Buenos Aires, Argentina: a new blaTEM gene. Rev Argent Microbiol 46: 210-217. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70075-6
4. *Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, Pasterán F, et al*. 2005. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. Rev Argent Microbiol 37: 57-66.
5. *Heisig P*. 1996. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Ch 40: 879-885.
6. *Jacoby GA*. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis 41(Suppl 2): 120-126. doi: 10.1086/428052
7. *Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A*. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 10: 867-878.
8. *Kikvi SK, Lee HS, Nam HM, Cho YS, Kim JM, Song SW, Park YH, et al*. 2007. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. Int J

- Food Microbiol 116: 283-286. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2006.12.014
9. **Lezameta L, Gonzales-Escalante E, Tamariz JH. 2010.** Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasa de espectro extendido. Rev Peru Med Exp Salud Pública 27: 345-351
 10. **Lim JY, Hong JB, Sheng H, Shringi S, Kaul R, Hovde CJ. 2010.** Phenotypic diversity of *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with the plasmid O157. J Microbiol 48: 347-357. doi: 10.1007/s12275-010-9228-4
 11. **Livermore DM. 2008.** Defining an extended-spectrum beta-lactamase. Clin Microbiol Infect 14: 3-10. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01857.x
 12. **Martínez--Martínez L, Calvo J. 2010.** El problema creciente de la resistencia antibiótica en bacilos gramnegativos: situación actual. Enferm Infecc Microbiol Clin 28: 25--31. doi: 10.1016/S0213-005X(10)70027-6
 13. **Martínez-Martínez L, Ruiz de Alegría C. 2009.** *Escherichia coli* resistente a gentamicina y sensible a amikacina. En: Alós JI, Cantón R, Martínez-Martínez L, Vila J (eds). Atlas del antibiograma. España: Biomérieux. p 141-143.
 14. **Michael G, Butaye P, Cloekaert A, Shwarz S. 2006.** Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. Microbes Infect 8: 1898-1914. doi: 10.1016/j.micinf.2005.12.019
 15. **Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa R, Navarro F, Coll P. 2006.** A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*. Enferm Infecc Microbiol Clin 24: 370-372. doi: 10.1157/13089690
 16. **Miró E, Vergés C, García I, Mirelis B, Navarro F, Coll P, Prats G, et al. 2004.** Resistencia a quinolonas y betalactámicos en *Salmonella enterica*, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa. Enferm Infecc Microbiol Clin 22: 204-211. doi: 10.1016/S0213-005X(04)73067-0
 17. **Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. 2011.** Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gram-negativos. Enferm Infecc Microbiol Clin 29: 524-534. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.011
 18. **[OIE] Organización Mundial de la Salud Animal. 2016.** Boletín: Manejo adecuado de los antibióticos. [Internet]. Disponible en: http://www.oie.int/esp/session2017/pdf/E_IF_2016.pdf
 19. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2001.** Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: OMS. [Internet]. Disponible en: http://www.antibioticos.mscbs.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf
 20. **Oteo J, Campos J, Lázaro E, Cuevas O, García-Cobos, Pérez-Vázquez, de Abajo FJ, et al. 2008.** Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. Emerg Infect Dis 14: 1259-1262. doi: 10.3201/eid1408.071059
 21. **Prescott JF. 2000.** Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD (eds). Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Iowa, USA: Iowa State University Press. p 21-31.
 22. **Ramirez M, Tolmasky M. 2010.** Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Update 13: 151-171. doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003
 23. **Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2011.** Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother 17: 149-182. doi: 10.1007/s10156-010-0120-2
 24. **del Valle D. 2009.** Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. Rev Soc Venezolana Microbiol 29: 78-83.

25. **Rubinstein E. 2001.** History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy* 47(Suppl 3): 44-4848. doi: 10.1159/000057838
26. **Ruiz J. 2003.** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemoth* 51: 1109-1117. doi: 10.1093/jac/dkg222
27. **Ruiz J, Navia M, Marco F, Vila J. 2004.** Mecanismos de resistencia a betalactámicos y ácido nalidíxico en aislados clínicos de *Salmonella enterica* serotipo hadar y bsilla. *Enferm Infec Micr Cl* 22:252-253. doi: 10.1016/S0213-005X(04)73078-5
28. **Sánchez LC, Corrales LC. 2005.** Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova* 3: 21-29.
29. **Sanders CC, Sanders WE. 1979.** Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin inducible β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 15: 792-797.
30. **Seral C, Pardos M, Castillo FJ. 2010.** Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infec Micr Cl* 28(Supl 1): 12-18. doi: 10.1016/S0213-005X(10)70003-3
31. **Stine OC, Johnson JA, Keefer NA, Perry KL, Tigno J, Qaiyumi S, Stine MS, et al. 2007.** Widespread distribution of tetracycline resistance genes in a confined animal feeding facility. *Int J Antimicrob Ag* 29: 348-352. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.11.015
32. **Talens-Visconti, Garrigues TM, Cantón E. 2002.** Quinolonas y *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismo de acción y resistencia. *Rev Esp Quim* 15: 313-324.
33. **van Den Bogaard AE, London N, Stobberingh EE. 2000.** Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *J Antimicrob Chem* 45: 663--671. doi: 10.1093/jac/47.6.763
34. **van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. 2011.** Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2: 203. doi: 10.3389/fmicb.2011.00203
35. **[WHO] World Health Organization. 2004.** Joint FAO/OIE/WHO Expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific assessment. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-bq-500e.pdf>
36. **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. 1991.** Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents CH* 35: 1647-1650. doi: 10.1128/AAC.34.6.1271