

PROYECTO

CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli* AISLADOS DE HISOPADOS RECTALES DE CORDEROS DEL ESTADO DE MÉXICO.

CLAVE: 3560/2013CHT

RESPONSABLES

Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat, Dr. Martín Talavera Rojas

PARTICIPANTES

Dr. Edgardo Soriano Vargas, Roberto Montes de Oca Jiménez

Área del Conocimiento

MICROBIOLOGÍA

RESUMEN

RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* AISLADA DE HECES DE OVINOS EN EL ESTADO DE MEXICO.

E. coli es uno de los microorganismos más difundidos en la naturaleza y uno de los integrantes principales de la flora intestinal normal, pero algunos serotipos son agentes causales de diarreas neonatales en los mamíferos. Las diferentes investigaciones realizadas señalan que *E. coli* está presente en el 30% al 40% de los focos de diarrea neonatal de los corderos. La resistencia a los antimicrobianos es un problema importante que va en aumento en humanos como en animales. El amplio uso y a veces indiscriminado de estos compuestos da lugar a una selección de bacterias que son hereditariamente resistentes. El objetivo de este trabajo es evaluar la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de corderos con y sin diarrea y madres. Se tomaron 182 muestras de hisopados rectales en ocho unidades de producción del estado de México, se realizó la siembra en agar EMB para el aislamiento de *E. coli*, a las colonias sospechosas se les realizaron pruebas bioquímicas para su identificación. La resistencia a los antibióticos se realizó por la técnica de difusión en medio sólido con agar Mueller Hinton y discos de ceftriaxona (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), tetraciclina (30 μ g), ácido nalidíxico (30 μ g), ciprofloxacino (5 μ g), Amikacina (10 μ g) y Gentamicina (10 μ g), la evaluación de la resistencia se realizó en base al CLSI, 2012. De las 119 cepas de *E. coli* aisladas el 45.3 % fue resistente a tetraciclina el 18.4% a ácido nalidíxico el 6.7% a gentamicina el 3.3% a ciprofloxacina y el 1.6% a amikacina. Se encontraron tres cepas multirresistentes. No se encontraron cepas resistentes a los antibióticos β lactámicos estudiados cefotaxima y ceftazidima. Los resultados indican la resistencia en primer lugar a las tetraciclinas las cuales son ampliamente utilizadas en la producción ovina, además se presentaron algunas cepas multiresistentes; por lo tanto, existe el riesgo latente del fracaso terapéutico en caso de presentares brotes diarreicos por *E. coli* sin realizarse aislamiento y pruebas de sensibilidad *in vitro*.

1 INTRODUCCIÓN

E. coli es uno de los microorganismos más difundidos en la naturaleza y además el integrante principal de la flora intestinal normal, pero consistentemente la bacteria es uno de los agentes etiológicos más importantes de las diarreas neonatales de los mamíferos, concretamente cuando intervienen determinadas cepas de *E. coli* que poseen una peculiar capacidad de adhesión selectiva de las células epiteliales del intestino (Gallego y Pérez, 1993).

Las diferentes investigaciones realizadas señalan que *E. coli* está presente en el 30% al 40% de los focos de diarrea neonatal de los corderos, pero en concordancia con el principio etiológico del síndrome diarreico neonatal, la presentación de la diarrea colibacilar, al igual que la producida por otros microorganismos, no va a depender en exclusiva de las complejas características antigénicas, serológicas y de los factores de virulencia de las cepas de *E. coli*. La edad del cordero, con una mayor susceptibilidad cuanto más temprana, y el nivel de inmunidad pasiva aportado por el calostro, son igualmente determinantes, asimismo, varios de los elementos del factor entorno van a condicionar la presentación de la enfermedad; en concreto los aspectos que se engloban en lo que habitualmente se denomina manejo, como deficiencias en higiene, humedad, temperatura ambiente, hacinamiento y coexistencia de edades muy diferentes (Gallego y Pérez 1993).

Las infecciones sistémicas causadas por *E. coli* son bastantes frecuentes en terneros, corderos y pollos. Las cepas septicémicas de *E. coli* presentan mecanismos especiales para superar las defensas del hospedador. Son capaces de alcanzar la corriente sanguínea tras penetrar por el intestino, los pulmones o el tejido umbilical (Quinn *et al.*, 2005).

La resistencia a los antimicrobianos es un importante problema, en crecimiento, tanto en el caso del hombre como de los animales. El amplio uso, a veces indiscriminado, de estos compuestos da lugar a una selección de bacterias que

son hereditariamente resistentes. No solamente pueden estas bacterias resistentes convertirse en la especie predominante en una población, sino que también pueden transferir genéticamente el material a bacterias susceptibles que adquieren la resistencia (Quinn *et al.*, 2005).

La importancia de las bacterias indicadoras como *E. coli* se debe a que la microflora normal de los animales es considerada un reservorio de bacterias y determinantes genéticos de resistencia que podrían ser transmitidas a bacterias patógenas y zoonóticas. El monitoreo de este tipo de microorganismos permite dar a conocer a los médicos veterinarios cuáles antimicrobianos están generando resistencia, evitando un riesgo en salud pública, además de disminuir el riesgo de un fracaso terapéutico que genera grandes pérdidas económicas al productor (Moreno *et al.*, 2000). La elección de *E. coli* como bacteria indicadora se justifica fundamentalmente por su elevada frecuencia de aislamiento e identificación en los laboratorios de sanidad; además, en las pautas que siguen diversos programas de monitoreo se considera a esta bacteria como el mejor indicador entre los microorganismos Gram negativos (Moreno *et al.*, 2000; Emborg y Heuer, 2003).

Debido a la importancia de *E. coli* en la presentación de cuadros diarreicos causantes de mortalidad en corderos el conocimiento de la resistencia a los antibióticos que presentan las cepas aisladas de corderos con y sin diarrea contribuirá al mejor control de las mismas.

2 MARCO DE REFERENCIA TEÓRICO METODOLÓGICO

En las últimas décadas el mundo fue testigo de una gran proliferación de bacterias patógenas que no solo originan múltiples enfermedades, sino que también presentan resistencia a muchos o todos los antibióticos, se les ha llegado a llamar superbacterias, se le ha dado este término a aquellas bacterias que han

acumulado varios genes determinantes de resistencia a los antibióticos (Antunes *et al.*, 2013).

Una de las razones más importantes de la proliferación de estas superbacterias es la amplia utilización de antibióticos en el ambiente hospitalario, lo mismo que en el ámbito doméstico. A ello también se le suma su uso a gran escala en unidades de producción (Antunes *et al.*, 2013).

En estudios hechos anteriormente en España sobre resistencia antimicrobiana Cid *et al.*, en 1994 reporta un 90% de sensibilidad en cepas de *E.coli*, para ciprofloxacino en un estudio realizado con corderos y cabritos, Orden *et al.*, en 2000 realizó un estudio con cepas de *E. coli* verotoxigenicas (VTEC) aisladas de corderos con diarrea y reportó una sensibilidad del 50 al 90% para quinolonas, y un 14 a 26.3% de resistencia para ácido nalidíxico, enrofloxacina y enoxacina; que hasta ese entonces no habían sido reportadas para corderos. En 2005 en España, Mora *et al.*, reporta resistencia a penicilinas de 1ª generación y penicilinas de 3ª generación tanto en población humana como en ovinos y sobretodo en productos de origen animal (carne de bovino) Además de reportar un 20% de prevalencia de cepas de *E. coli* STEC de origen ovino, y un 53% de prevalencia en bovinos.

Trabajos publicados y realizados en Argentina reportan resistencia antibiótica a penicilinas, quinolonas y tetraciclinas obtenidas a partir de bovinos y ovinos en explotaciones intensivas, en este estudio para el caso de ovinos se reporta una resistencia del 21% a Tetraciclina y 5% a Cefalotina (Pantozi *et al.*, 2010).

En la provincia de Ontario, Canadá Scott *et al.*, 2012, reporta en rebaños de ovinos una resistencia de 12% para tetraciclinas y un 100% de sensibilidad para ciprofloxacino y amikacina y 0.2% de resistencia para ácido nalidíxico. Scott, relaciona el nivel de resistencia en tetraciclina al uso inadecuada de este en dietas y agua de bebida suplementadas con tetraciclina.

Wani *et al*, (2013) con cepas de *E. coli* enterotoxigenicas (ETEC), reporta un porcentaje mayor a 50% de sensibilidad en varios tipos de antibióticos como aminoglucosidos (gentamicina), quinolonas (ciprofloxacino) y β -lactámicos (ceftazidima y ceftriaxona).

Las causas de mortalidad en corderos son variadas y de diferente origen, las que pueden comprender problemas asociados a la baja de peso al nacer, deficiencias nutricionales de la madre y las condiciones ambientales como ocurre en el complejo exposición-inanición. También debido a traumatismos cráneo-encefálicos ocurridos durante el parto distócico, que imposibilitan consumir calostro inmediatamente después del parto lo cual predispone a la aparición de enfermedades infectocontagiosas. En el caso de rumiantes no hay paso de anticuerpos maternos a través de la placenta. La única forma que adquiera inmunidad el cordero recién nacido es por medio de la ingesta de calostro, la que es esencial que se produzca en las primeras horas posteriores al parto. Además de proporcionarle anticuerpos, el calostro también es una fuente importante de energía para las primeras horas de vida. Las fallas en la transferencia de inmunidad pasiva de la madre a la cría tiene un efecto significativo en la mortalidad de los corderos, y se asocia a enfermedades infecciosas que están correlacionadas en forma positiva con bajas cantidades de inmunoglobulinas séricas (Sharif *et al.*, 2005; Méndez *et al.*, 2010; Pugh y Baird, 2012).

Las enfermedades de origen digestivo se pueden agrupar dentro de un complejo denominado Síndrome Diarreico Neonatal (SND) cuya repercusión económica es preocupante no sólo por las altas tasas de enfermedad que ocasionan (morbilidad y mortalidad), sino también por el retraso en el desarrollo corporal de los corderos y los gastos implícitos en los tratamientos veterinarios (Méndez *et al.*, 2010).

Desde un punto de vista etiológico las gastroenteritis neonatales de los corderos son complejas asociándose a éstas, numerosos microorganismos patógenos

(bacterias, virus y protozoos) que en la mayoría de las ocasiones actúan de forma simultánea o concomitante dando lugar a cuadros patogénicos muy diversos que complican los capítulos de prevención médica y/o sanitaria. Algunos de estos agentes presentan cierta asociación con la edad de los animales, lo que ayudará a la hora de establecer el diagnóstico presuntivo de cada proceso (Méndez *et al.*, 2010).

2.1 Colibacilosis en corderos

El agente causal de la colibacilosis en los corderos es *Escherichia coli* un colonizador habitual del intestino delgado y grueso de todos los mamíferos. Se excreta por las heces y puede sobrevivir en los excrementos y medio ambiente durante meses. La presencia de coliformes en el agua es un indicativo de la contaminación fecal de la misma. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, sin embargo *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) puede causar graves enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) (OMS, 2002). Cabe señalar *E. coli* O157:H7 ha sido detectada en ovejas, caballos, perros, aves silvestres, ciervos, bisontes, cerdos y bovinos, sin embargo, el modo de difusión de este agente patógeno en particular en el ambiente no está bien entendido (Ahmad *et al.*, 2007; Dontorou *et al.*, 2004).

Una de las presentaciones clínicas de la enfermedad producida por *E. coli* que afectan a los corderos es la llamada “Boca acuosa” esta enfermedad mortal que afecta a los corderos dentro de las primeras 72 horas de vida y que se caracteriza por una salivación profusa, estasis intestinal, colapso y muerte. Es frecuente en crianzas intensivas donde existe una alta densidad de animales por unidad de superficie el agente causal que es adquirido por la ingestión de materiales contaminados como camas, lana, ubres y pezones, inmediatamente posterior al parto, que se combina en algunos casos con la ingestión de cantidades inadecuadas de calostro (Méndez *et al.*, 2010; Pugh y Baird, 2012).

La presentación clínica más común es la "Colibacilosis" o "diarrea colibacilar", suele afectar a corderos desde la primera semana de vida, los animales presentan un cuadro de debilidad, diarrea acuosa y profusa, caquexia y deshidratación, describiéndose tasas de mortalidad próximas al 50%. Si los animales no son sometidos a un tratamiento adecuado y precoz, pueden morir a las 12 horas de iniciado el proceso. No obstante, a veces, el cuadro se presenta de forma menos letal siendo difícil distinguirlo de otras etiologías. Desde un punto de vista lesional se observan infartos ganglionares a nivel intestinal. Las lesiones se concentran fundamentalmente en duodeno, yeyuno e íleon, los cuales se encuentran distendidos con acumulo de gas y repletos de líquido amarillento; el abomaso habitualmente contiene leche sin digerir. En otras ocasiones el contenido es claramente mucoso (enteritis catarral mucosa) (Pugh y Baird, 2012).

2.2 Características morfológicas y fisicoquímicas de *E. coli*

E. coli es una de las especies bacterianas más estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales de diversa índole. Forma parte de la familia Enterobacteriaceae. Está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos, es aerobia o anaerobia facultativa, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos y reductores de nitratos a nitritos (Sears y Kapper, 1996).

Incluye gérmenes generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva a rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Son inhibidos por KCN (cianuro de potasio) e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. No producen H₂S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y decarboxilan

la lisina. Se clasifican en más de 170 serogrupos O según las características antigénicas de su LPS, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares (Sears y Kapper, 1996).

2.3 Clasificación taxonómica

La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, pero también se pueden estudiar sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares o modelos animales y, más recientemente, empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos (Schmidt *et al.*, 1995).

Para determinar el serogrupo al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Schmidt *et al.*, 1995).

Hay descritos seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) (Sears y Kapper, 1996) y con adherencia difusa (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998)

2.4 Antibióticos

Los antibióticos son productos del metabolismo secundario de diversos microorganismos del suelo que participan en procesos ecológicos de competencia por nichos nutricionales y representan un ejemplo de diferenciación y especialización microbiana. Es obvio que los microorganismos productores de antibióticos también posean mecanismos de resistencia a los mismos antibióticos

que producen. Paralelamente, en esta competencia dinámica, otros microorganismos han desarrollado sus propios mecanismos de resistencia o los han adquirido directamente de los microorganismos productores de antibióticos. La capacidad de producir antibióticos y los mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos son, entonces, el resultado de un intenso proceso evolutivo ocurrido durante miles de millones de años en la naturaleza (García, 2001).

2.5 Resistencia a los antimicrobianos.

La resistencia a antibióticos representa un problema a nivel mundial no solo en cuanto a su diagnóstico y descubrimiento temprano sino también en cuanto a su manejo y control, Por esta razón instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Centro de Control de Enfermedades (CDC) y otras a nivel Europeo han diseñado nuevos programas de vigilancia de la resistencia bacteriana. Asimismo se ha solicitado que cada país tenga un programa de vigilancia nacional y local para poder realizar un mejor control de este fenómeno. El problema de la resistencia constituye un factor que conduce a cambios permanentes en la prescripción antibiótica y está en función del tiempo y el uso de un antimicrobiano (Crespo, 2002).

La resistencia a los antimicrobianos es un importante problema, en crecimiento, tanto en el caso del hombre como de los animales. El amplio uso, a veces indiscriminado, de estos compuestos da lugar a una selección de bacterias que son hereditariamente resistentes. No solamente pueden estas bacterias resistentes convertirse en la especie predominante en una población, sino que también pueden transferir genéticamente el material a bacterias susceptibles que adquieren la resistencia (Quinn *et al.*, 2005).

Muchas bacterias Gram negativas son naturalmente resistentes a la penicilina G y a otras penicilinas, como las resistentes a las β -lactamasas, enzimas que atacan

el núcleo β -lactámico. Estas lactamasas pueden ser específicas contra cefalosporinas, penicilinas o contra ambas. Las lactamasas se pueden transmitir vía plásmidos y durante los últimos 40 años han mermado la capacidad antibacteriana de los compuestos β -lactámicos (Sumano 2006).

2.5.1 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos que producen resistencia a los fármacos antibacterianos que se muestran en el cuadro 1 incluyen; la producción de enzimas por bacterias, que destruyen o inactivan el compuesto y la reducción de la permeabilidad de las bacterias. Las bacterias también pueden desarrollar rutas metabólicas alternativas a aquellas que resultan inhibidas por la sustancia antibacteriana. Los antibióticos pueden eliminarse de la bacteria o pueden alterarse estructuralmente la diana del mismo. La alteración del sitio diana y la destrucción enzimática del agente son probablemente los mecanismos más habituales por los que puede ocurrir la resistencia (Quinn *et al.*, 2005).

Otro factor incluye tres formas posibles de transferencia de genes entre bacterias: a) contacto entre ellas, b) liberación de material genético en el medio extracelular y su captación por otra bacteria, c) transferencia por medio de virus, esto demuestra que la transmisión no solo se lleva a cabo de forma vertical entre la descendencia, también se lleva a cabo de manera lateral a individuos no necesariamente emparentados, con los que termina compartiendo trozos de su genoma (Antunes, *et al.*, 2013).

Los mecanismos que producen resistencia a los fármacos antibacterianos incluyen la producción de enzimas por bacterias, que destruyen o inactivan el compuesto y la reducción de la permeabilidad de las bacterias. Las bacterias también pueden desarrollar rutas metabólicas alternativas a aquellas que resultan inhibidas por la sustancia antibacteriana. Los antibióticos pueden eliminarse de la bacteria o puede alterarse estructuralmente la diana del mismo. La alteración del sitio diana y

la destrucción enzimática del agente son probablemente los mecanismos más habituales por los que puede ocurrir la resistencia (Quinn *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Mecanismos de resistencia de las bacterias hacia los antibióticos.

Mecanismo de resistencia	Ejemplos
Enzimas que destruyen al antibiótico	Betalactamasas, cefalosporinasas
Alteración del receptor del antibiótico	Proteínas de unión a la penicilina
Inactivación del antibiótico	Acetilación del cloranfenicol
Inactivación del antibiótico	Acetilación de aminoglucósidos
Cambios en la permeabilidad de membrana	Tetraciclina, cloranfenicol
Metilación enzimática del RNA 23S	Eritromicina y lincomicina
Eritromicina y lincomicina	Expulsan al antibiótico al exterior
Bypass	Síntesis de una enzima resistente a la inactivación

2.5.2 Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos.

Dentro de los mecanismos moleculares de resistencia destacan: inactivación enzimática, alteraciones del sitio blanco y alteraciones en la permeabilidad. Las enterobacterias a nivel mundial presentan alta resistencia hacia ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico por lo que hay que determinar la prevalencia de los diferentes genes relacionados a nivel molecular (Mosquito, *et al.*, 2011).

Disminución de la permeabilidad hacia el antibiótico: por modificación de una barrera preexistente como el cambio en determinadas porinas de membrana que imposibilitan el paso del fármaco, por extrusión activa del antibiótico como ciertos plásmidos “R” que contienen transposones que codifican un sistema para bombear tetraciclina desde el interior bacteriano hacia el exterior en contra del gradiente de concentración, también puede ser por alteración del mecanismo de transporte específico del antibiótico, en *Escherichia coli* la cicloserina entra a provechando el sistema de transporte de la valina o de la glicina, por la que determinados

mutantes incapaces de transportar estos aminoácidos son resistentes a la glicoserina (Gimeno y Ortega, 2005).

Inactivación enzimática del antibiótico: consiste en la síntesis de las por parte de las bacterias a ciertas enzimas que modifican la estructura de la molécula antibiótica provocando la anulación de su función, el ejemplo más típico es la producción de beta-lactamasas, este mecanismo depende muchas veces de plásmidos resistentes (Gimeno y Ortega, 2005). La presencia de beta-lactamasas de espectro extendido mediadas por plásmidos es cada vez más preocupante, la mayoría son mutantes e hidrolizan a las cefalosporinas y las penicilinas (Zavod, *et al.*, 2004).

Modificación química de la diana del antibiótico: ciertas modificaciones que afectan a las estructuras bacterianas donde actúan los antibióticos imposibilitan la acción de estos (Gimeno y Ortega, 2005).

Síntesis de una nueva enzima resistente: Estas nuevas enzimas presentan más resistencia a la acción de los antibióticos por su menor afinidad a estos. (Gimeno y Ortega, 2005).

2.6 Pruebas de susceptibilidad.

Las pruebas para determinar el antibiótico más adecuado para el tratamiento eficaz de una enfermedad dada pueden llevarse a cabo a través del aislamiento obtenido de casos clínicos. Sin embargo, estas pruebas que se llevan a cabo *in vitro* no pueden contemplar varios factores que pueden afectar la actividad antibacteriana *in vivo*. Se dispone de varias pruebas de laboratorio para la determinación de la susceptibilidad antibacteriana, incluyendo la dilución en caldo, la difusión de discos, el gradiente de agar y algunos métodos automatizados (Quinn et al, 2005).

2.6.1 Tipos de Antibiogramas

2.6.1.1 Disco Difusión en Agar

Se basa en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco cargado con un antimicrobiano que difunde en un medio sólido.

Esta técnica consiste en la siembra de una bacteria en la superficie de una placa con un medio de cultivo, sobre el que se depositan unos discos de papel cargados con una cantidad precisa de antibiótico, que difunde casi instantáneamente a través del Agar, formándose un gradiente de concentración del mismo alrededor del disco. Posteriormente se lleva a incubar a 37° C durante 18 horas (Prants, 2005).

El microorganismo crece en la superficie de la placa pero alrededor de los discos se forman unos halos de inhibición más o menos grandes, dependiendo de la mayor o menor sensibilidad a la bacteria a cada antibiótico, se mide el diámetro del halo (expresado en milímetros) y se lleva a las tablas que correlacionan los diámetros con la sensibilidad, en la técnica de difusión se trabaja con puntos de corte basados en dos medidas, un diámetro menor del halo de inhibición, por debajo del cual el microorganismo es resistente (R), y un diámetro mayor, por encima del cual es sensible (S), entre ambos diámetros la sensibilidad se considera intermedia o indeterminada (I) (Prants, 2005).

2.6.1.2 Microdilución

La técnica de microdilución en caldo es de gran utilidad práctica para el estudio de las CIM. No es más que una técnica de dilución en medio líquido, realizada en placas de poliestireno, con micropocillos en lugar de tubos. Los pocillos de cada columna contienen concentraciones crecientes de un antibiótico en forma de suspensión liofilizada o desecada, por lo que solo debe añadirse el medio de cultivo líquido en el que se ha efectuado una suspensión de la bacteria a estudiar. Tras la incubación se determina la CIM. (Prants, 2005).

2.6.1.3 Épsilon-test

Combina la simplicidad y flexibilidad de las pruebas de disco-difusión, con la capacidad de para cuantificar la concentración inhibitoria mínima de las técnicas de dilución.

El E test consiste en una tira de plástico no poroso de 5cm de largo por 5mm de ancho a lo largo de la cual se dispone un gradiente predefinido y señalado en la tira de un antimicrobiano equivalente a 15 concentraciones dobles progresivas. Una vez que se ha sembrado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E test sobre la superficie, produciéndose en forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte de plástico hasta el agar, creándose de este modo alrededor y a lo largo de la tira una gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. (Prants, 2005)

3. JUSTIFICACIÓN

La Colibacilosis ocasionada por *Escherichia coli* es una enfermedad de importancia en la producción ovina que ocasiona graves pérdidas, principalmente en borregos antes del destete; la cual está relacionada con las condiciones higiénicas de las instalaciones, así tanto como del manejo nutricional de las madres y calostrado de los corderos.

La resistencia antimicrobiana a las diferentes familias de antimicrobianos como β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos etc. es un factor que en la actualidad está tomando gran importancia debido al uso sin control y supervisión de los antibióticos, lo que propicia que ya no sean tan efectivos frente a gran cantidad de microorganismos.

Dada la capacidad intrínseca que posee *E. coli* de adquirir o transmitir genes de resistencia a antimicrobianos, resulta necesario estudiar el perfil de susceptibilidad a estos agentes en los aislamientos realizados por lo cual el estudio de la

resistencia a los antibióticos en *E. coli* aislados de hisopados rectales tanto de madres como corderos nos permitirá realizar un mejor control y conocer si la resistencia a los antibióticos es común en las cepas aisladas de los animales en diferentes unidades de producción del Estado de México.

Es de gran importancia contar con un reporte integral, para conocer la situación en el Estado de México y poder llevar a cabo un monitoreo para ver cuál es el índice de resistencia existente no solo para ovinos sino también para otras especies animales.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la resistencia a antibióticos β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos en cepas de *Escherichia coli* aislados de corderos con y sin diarrea y madres en unidades de producción ovina del Estado de México.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar la sensibilidad in vitro obtenida en los diferentes unidades de producción estudiados

Determinar la presencia de cepas con resistencia a los antibióticos β -Lactámicos que puedan tener presentes la enzima β -Lactamasa de espectro extendido.

Conocer la distribución de la resistencia en las diferentes unidades de producción ovina así como entre madres y corderos con y sin diarrea

6. METODOLOGÍA

6.1 Muestreo

Se muestrearon 183 animales con un total de 156 corderos y 27 madres, se muestrearon 172 animales clínicamente sanos y 11 casos de animales enfermos entre los cuales se encontraban 6 corderos con signos de diarrea, 2 corderos con

caquexia y 3 hembras adultas con emaciación. Los muestreos se llevaron a cabo en diferentes unidades de producción procedentes de diferentes áreas en el Estado de México, Xalatlaco, Ocoyoacac (2 explotaciones), Calimaya, San Jerónimo Chicahualco, Temoaya, Texcaliacac y Jiquipilco.

6.1.1. Tamaño de muestra en poblaciones finitas

Para el análisis estadístico se aplicó la fórmula para tamaño de muestras en poblaciones finitas, la prevalencia tomada en este trabajo corresponde al artículo realizado por Mora en 2005.

Fórmula

$$n = \frac{Nzpq}{d^2(N-1) + z^2pq}$$

Donde

n= Tamaño de muestra

N= población

z= intervalo de confianza (1.96)

p= prevalencia (20%)

q= 1-p

d= significancia (0.05)

Sustitución

$$n = 188(1.96)^2$$

$$n = \frac{188(1.96)^2(.20)(.80)}{(0.05)^2(188-1) + (1.96)^2(.20)(.80)}$$

$$n = \frac{115.55}{0.4675 + 0.614656}$$

$$n = \frac{115.55}{1.082150}$$

N= 106.77

Cuadro 2. Tamaño de muestra por unidad de producción y total de muestras

Unidades de producción	Población	%	Tamaño de muestra por unidad de producción
1	26	13.82	14.75
2	22	11.70	12.49
3	18	9.57	10.21
4	16	8.51	9.08
5	26	13.82	14.75
6	20	10.63	11.34
7	36	19.14	20.43
8	24	12.76	13.62
Total	188	94.95	106.67

6.2 Colección y Envío de Muestras

Se llevó a cabo un muestreo de oportunidad. Las muestras se colectaron bajo estrictas condiciones de antisepsia. Tanto el material de colección como el recipiente en el que se transportaron.

Se utilizaron hisopos con medio Stuart para evitar la desecación de la muestra. Las muestras fueron identificadas con los siguientes datos: especie, raza, edad, sexo, así también dirección, teléfono y nombre del propietario. Se anexo una historia clínica permanente que incluye, número de animales afectados, si el animal del que proviene la muestra fue tratado con antimicrobianos, cuáles y durante cuánto tiempo; así como un diagnóstico presuntivo con base en signos clínicos y epidemiológicos.

Una vez colectadas las muestras y en condiciones de refrigeración con una temperatura de 4 a 7°C se enviaron dentro de las siguientes 24 horas al Centro de

Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal CIESA al área de Bacteriología.

6.3 Identificación de especie

Se procedió a una siembra de las muestras en agar EMB o en agar McConkey y se observó la morfología y color característico de estas colonias en estos medios. Aquellas colonias que resultaron sospechosos por sus características morfológicas en ambos medios se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas confirmatorias, TSI, LIA, Citrato de Simmons, MIO, SIM, OF, Rojo de Metilo, Agua Peptonada, Vogues Proskauer y Urea. También se realizaron pruebas rápidas de catalasa y oxidasa. La preparación de los medios y su interpretación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BIOXON México).

Las colonias que fueron confirmadas bioquímicamente de ser *E coli* se congelaron a -80°C en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol.

6.4 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad antimicrobiana se evaluó mediante una prueba de difusión con discos. Se preparó el inóculo bacteriano de cada aislamiento en tubos de ensayo con caldo Mueller Hinton (MH) con patrón de turbidez de 0.5 en la escala de McFarland lo que equivale aproximadamente de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). Se introdujo en el tubo de ensayo inoculado un hisopo estéril de algodón el cual se sumergido completamente y se frotó un poco en las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo quedando pronto para sembrar (CLSI, 2012^a). Para sembrar las cajas petri con agar MH, se estrió el hisopo con la suspensión de bacteria sobre toda su superficie en forma paralela y compacta, este paso se repitió dos veces más rotando la placa aproximadamente 60 grados cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo, finalmente se barrió el hisopo sobre el borde de la placa; cada caja sembrada se dejó secar durante 2-3 min. (CLSI, 2012^a).

Dentro de 15 min posteriores que las cajas de petri fueron sembradas, se procedió a colocar los sensibilizadores de ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), tetraciclina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), Amikacina (10 µg) y Gentamicina (10 µg) con una pinza estéril o con un dispensador asegurándose de que hicieran contacto con la superficie del agar. Posteriormente las placas se invirtieron e incubaron por 18 hrs a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (CLSI, 2012^a). La lectura se realizó midiendo el diámetro del halo de inhibición en mm con un vernier. Los aislamientos se clasificaron como susceptibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) de acuerdo a los estándares de CLSI (CLSI, 2012^b).

6.5 Análisis de los Datos

Los datos obtenidos se registraron en una base de datos, previa máscara de captura en Excel. Se realizó la estadística descriptiva presentando los resultados en cuadros y gráficas con el número y porcentajes de resistencia a los diferentes antibióticos de las cepas aisladas.

6.5 Prueba para ESBIs

A los aislamientos que resultaran resistentes (R) a los antibióticos β -lactámicos empleados en las prueba de difusión se les realizaría una prueba de discos en combinación para confirmar la detección fenotípica de ESBIs, para la prueba se usarían unidiscos de CAZ y CTX en combinación con ácido clavulánico (CLA, 10 µg). Esta prueba se realizaría del medio MH, el inóculo y las condiciones de incubación serían iguales a la prueba de difusión con discos. Realizando en su caso la interpretación según el CLSI 2012^a.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se analizaron 182 muestras de hisopados rectales de los cuales se aislaron 119 cepas identificadas morfológicamente y bioquímicamente como *E. coli*, provenientes de ocho establecimientos productores de ovinos en el Estado de México, su distribución por establecimiento se presenta en el Cuadro N° 4.

Cuadro N° 4. Número de aislamientos de *E. coli* en madres y corderos según el establecimiento

Unidad de producción	Corderos	Madres de Corderos	Total de Aislamientos
Unidad de producción 1	12	5	17
Unidad de producción 2	9	7	16
Unidad de producción 3	6	4	10
Unidad de producción 4	11		11
Unidad de producción 5	13		13
Unidad de producción 6	8		8
Unidad de producción 7	31		31
Unidad de producción 8	13		13

Resistencia por establecimiento

La resistencia que presentan los aislamientos de *E. coli* por cada establecimiento muestreado se presenta en el Cuadro N° 5.

En la unidad de producción 1 perteneciente a Xalatlaco se aislaron 17 cepas de *E. coli*, el mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 52.9%, seguido del ácido nalidíxico con un 23.5% y gentamicina con un 5.9%, para los demás antibióticos empleados no se presentó resistencia.

Unidad de producción 2 perteneciente a Ocoyoacac se aislaron 16 cepas de *E. coli*, el mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 37.5%, seguido de gentamicina con un 18.8% y el ácido nalidíxico con un 12.5%.

Unidad de producción 3 perteneciente a Calimaya se aislaron 10 cepas de *E. coli*, El mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 20% seguido de amikacina con un 10% al igual que gentamicina.

Unidad de producción 4 se aislaron 11 cepas de *E. coli*, perteneciente a Metepec. El mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 54.5%, para todos

los demás antibióticos empleados no se presentó ningún porcentaje de resistencia.

Unidad de producción 5 perteneciente a Temoaya se aislaron 13 cepas de *E. coli*, el mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 45.2% seguido de ácido nalidíxico con un 23.1% y ciprofloxacino con un 7.7%.

Unidad de producción 6 perteneciente a Texcaliacac se aislaron 8 cepas de *E. coli*, el mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 37.5%, para todos los demás antibióticos empleados no se presentó ningún porcentaje de resistencia.

Unidad de producción 7 perteneciente a Jiquipilco se aislaron 31 cepas de *E. coli*, el mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 51.61% seguido de ácido nalidíxico con un 35.48%, ciprofloxacino con un 6.45% al igual que gentamicina.

Unidad de producción 8 perteneciente a Ocoyoacac se aislaron 13, el mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 46.2% seguido de ácido nalidíxico con un 15.4%, ciprofloxacino con un 7.7% al igual que gentamicina

Cuadro 5. Número y porcentaje de cepas resistentes intermedias y sensibles a los antibióticos de los diferentes establecimientos.

N de Establecimiento	1		2		3		4		5		6		7		8	
	nR	%R														
CTX (Cefotaxime)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAZ (Ceftazidima)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TE (Tetraciclina)	9	52.9	6	37.5	2	20.0	6	54.5	6	45.2	3	37.5	16	53.1	6	46.2
NA (Ácido Nalidíxico)	4	23.5	2	12.5	-	-	-	-	3	23.1	-	-	11	34.4	2	15.4
CIP (Ciprofloxacino)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	7.7	-	-	2	6.2	1	7.7
AM (Amikacina)	-	-	-	-	1	10.0	-	-	-	-	-	-	1	3.1	-	-
GE (Gentamicina)	1	5.9	3	18.8	1	10.0	-	-	-	-	-	-	2	6.2	1	7.7

En el cuadro 6 se muestran el número de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos utilizados, encontrando que 91 (76.49%) cepas de 119 presentaban resistencia al menos a un antibiótico.

Cuadro 6. Número de cepas resistentes por lo menos a un antibiótico.

Antibiótico	Número de cepas resistentes
Tetraciclina	54
Ácido Nalidíxico	22
Gentamicina	9
Ciprofloxacino	4
Amikacina	2
Total	91

Resistencia General

La resistencia general que presentan los aislamientos de *E. coli* de todas las unidades de producción en donde se muestra si son resistentes (R), intermedias (I) o sensibles (S), se presenta en la figura 5 y en la figura 6 se muestra solo la tabla con los porcentajes de resistencia.

El mayor porcentaje de resistencia fue para tetraciclina con un 45.37 % seguido de ácido nalidíxico con un 18.48%, gentamicina con un 6.72%, ciprofloxacina con un 3.36% y amikacina con un 1.68%.

Para los antibióticos como la cefotaxima y la ceftazidima no se presentó ningún porcentaje de resistencia.

Se presentó resistencia intermedia a tetraciclina en un .84%, ácido nalidíxico con 10.08%, amikacina con 3.36% y gentamicina con un .84%.

Figura 5. Porcentaje general de resistencia a los antibióticos empleados.

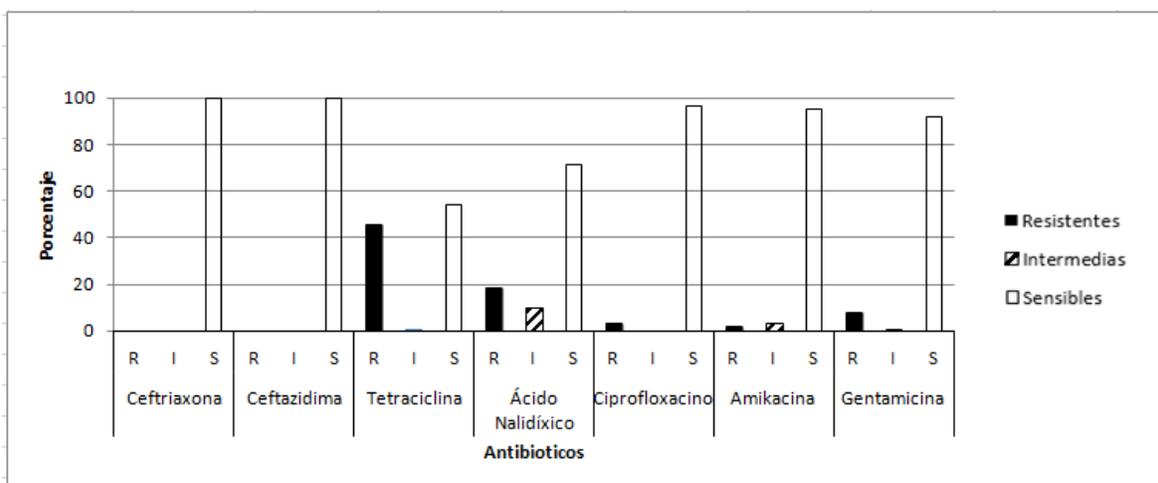
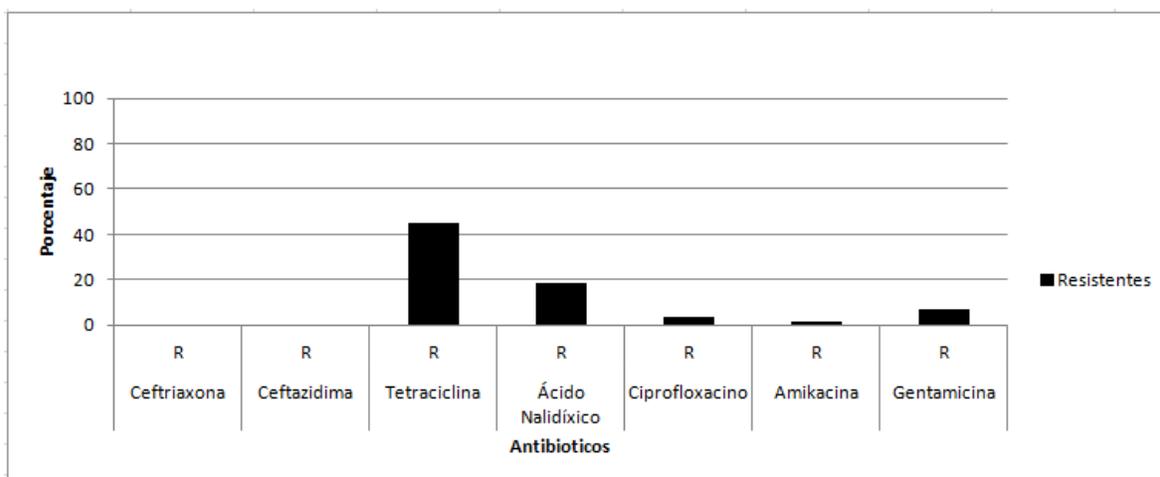


Figura 6. Porcentaje general de cepas de *E. coli* resistentes.



Las cepas multiresistentes se muestran en el cuadro 7.

Se detectaron 3 aislamientos multiresistentes, 2 de la unidad de producción 7 resistentes a TE, CIP, GE y NA y 1 de la unidad de producción 8 resistente a TE, CIP, GM y NA.

Cuadro 7. Unidades de producción con cepas multiresistentes.

N° de establecimiento	Cepas	Antimicrobianos
Establecimiento 7	Cepa 18	TE, GM, NA
	Cepa 31	TE, GM, CIP, NA
Establecimiento 8	Cepa 22	TE, GM, CIP, NA

Abreviatura: **TE** (Tetraciclina), **CIP** (Ciprofloxacina), **NA** (ácido nalidíxico), **GM** (gentamicina).

No se hubo presencia de β -lactamasas de espectro extendido ya que no se encontraron cepas resistentes a ceftriaxona y ceftazidima, por lo tanto no se realizó la prueba confirmatoria para demostrar la presencia fenotípica de colonias con la enzima β -lactamasa.

8. DISCUSIÓN

La resistencia a los fármacos constituye un problema en la Salud Pública extremadamente grave, el uso indiscriminado de estos productos ha hecho que las bacterias dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y

celulares) desarrollen estrategias que les permitan evadir con efectividad la acción de estos antimicrobianos (Cabrera, 2007).

Las investigaciones publicadas sobre la prevalencia de la resistencia bacteriana en bacterias entéricas aislados de ovejas y cabras es escasa (Scott y Menzies, (2011). En México se tienen registradas alrededor de 53,000 unidades de producción ovina, que están distribuidas aproximadamente de la siguiente forma: 53% en el centro, 24% en el sur-sureste y 23% en el norte (PROGAN, 2010) y se cuenta con estudios muy escasos acerca de la resistencia a antimicrobianos en esta especie en nuestro país.

Respecto a información existente sobre resistencia a antimicrobianos en ovinos y caprinos, en un primer estudio realizado en España cuando aún no eran utilizadas comúnmente las fluoroquinolonas se trabajaron con cepas de *E. coli* aisladas de corderos y cabritos con diarrea, no se encontraron cepas resistentes a fluoroquinolonas, posteriormente cuando se empezaron a utilizar con más frecuencia llevaron a cabo otro estudio con las mismas especies y esta vez se encontraron porcentajes relativamente elevados de resistencia (Order y de la Fuente, 2001).

En la actualidad, varios países vigilan las tendencias en el uso de antimicrobianos, se monitorea más la resistencia a antimicrobianos en ganado, cerdos y aves de corral, esto no incluye pequeños rumiantes como borregos y cabras (Scott, 2009).

En un estudio hecho en Argentina (Moredo *et al.*, 2007) con cepas de *E. coli* aislada de cerdos sin diarrea y cerdos con diarrea no necesariamente a *E. coli*, los porcentajes de resistencia más elevados se obtuvieron frente a los antimicrobianos empleados habitualmente en las explotaciones porcinas (ampicilina, estreptomina y tetraciclinas) lo que puede demostrar que el uso continuo y a veces discriminado de un antibiótico puede traer consigo el origen de cepas resistentes o multirresistentes.

Respecto al ambiente y considerando que se trata también de un problema ecológico (Marquéz, 2008), en un estudio llevado a cabo en Culiacán Sinaloa (López *et al.*, 2006) se aisló *Salmonella* y *E. coli* de un análisis de 51 muestras de agua y 23 muestras de suelo agrícola y se evaluó el perfil de resistencia de estas bacterias con los siguientes antimicrobianos: ampicilina, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, estreptomina y gentamicina, para *E. coli* solo se emplearon los últimos tres antimicrobianos. Las 20 cepas aisladas de *Salmonella*, fueron susceptibles a ampicilina, ciprofloxacino y trimetoprim-sulfametoxazol y el 60% presentaron resistencia a tetraciclina. De las 46 cepas de *E. coli* aisladas el 19.5% presentó resistencia a tetraciclina y una presentó resistencia intermedia, 82.6% fueron resistentes a estreptomina y 17.4% presentaron resistencia intermedia y para Gentamicina solo el 2.1% y 50% presentaron resistencia intermedia. Se ha demostrado que cepas de *E. coli* provenientes de muestras de cascara de huevo exhibe perfiles de resistencia a tetraciclina, estreptomina y gentamicina en 29.9, 6.2 y 3.1% respectivamente Musgrove *et al.*, 2006 citado por López, *et al.*, 2009. Las cepas aisladas presentaron mayor resistencia a la tetraciclina, ya que este antimicrobiano exhibe actividad contra diversos grupos de bacterias, motivo por el cual es ampliamente utilizado en la terapia en infecciones humanas y para la prevención y control de infecciones en plantas y animales (Miko *et al.*, 2005 citado por López, *et al.* 2009). En el presente trabajo coincidiendo con estos autores los mayores porcentajes de resistencia fueron a tetraciclina además de encontrarse resistencia a este antimicrobiano en los ocho establecimientos estudiados.

En el continente Americano en el caso de humanos la organización Panamericana de la Salud, que actúa como Oficina regional de la OMS para las Américas coordina la recopilación de datos sobre la resistencia a los antibióticos en los hospitales y laboratorios, los datos muestran que hay una elevada resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas dos clases muy utilizadas de fármacos antimicrobianos para humanos (OMS, 2014) en

nuestro caso no encontramos resistencia a las cefalosporinas estudiadas (ceftazidima y ceftriaxona) y bajos porcentajes a las quinolonas (ácido nalidíxico).

Es más preocupante la presencia de resistencia a fluoroquinolonas en bacterias de mayor difusión como *E. coli*. La resistencia a una fluoroquinolona generalmente produce resistencia en todas las fluoroquinolonas, se han aislado cepas en humanos que son resistentes a estas aunque nunca hayan sido tratados (Order y De la Fuente, 2001). En este trabajo se encontró bajo porcentaje de resistencia al ácido nalidíxico sin antecedentes de utilización en el hato coincidiendo con lo descrito por los autores que anteceden en humanos.

El problema de la resistencia a antibióticos es ecológico y nunca antes se había visto que los organismos infecciosos fueran resistentes a un alto número de antibióticos, la aplicación indiscriminada de antibióticos y la migración de las bacterias en diferentes ambientes amplifica las consecuencias ecológicas del uso de antibióticos. Se ha documentado que cepas resistentes a antibióticos no solo ocurren en individuos tratados sino también en individuos sanos que comparten el mismo ambiente (Márquez, 2008).

Es difícil imaginar que la aplicación de antibióticos en un ecosistema no va a tener efectos en otro ecosistema, ya que fácilmente afecta individuos que comparten el mismo ambiente. Sería ideal escoger antibióticos de corto espectro para limitar el número de bacterias que pueden ser afectadas, determinar si es necesario tratar a toda una agrupación de animales o solo a animales enfermos (Márquez, 2008).

La importancia de las bacterias indicadoras como *E. coli* se debe a que la microflora normal de los animales es considerada un reservorio de bacterias y determinantes genéticos de resistencia que podrían ser transmitidas a bacterias patógenas y zoonóticas (Moreno *et al.*, 2000).

En el caso de animales de compañía la presencia de diferentes especies bacterianas en la flora normal de pequeños animales, determina que perros y

gatos sean considerados como reservorios de bacterias con genes de resistencia que tienen importancia clínica en humanos (Guardabassi *et al.*, 2004), En un estudio realizado por Morris *et al.*, (2010) demostró que los humanos y sus mascotas pueden ser portadores de cepas idénticas de estafilococos resistentes a meticilina cuando comparten el mismo ambiente. En el caso de nuestro estudio cabe la posibilidad que dichos genes de resistencia a los antibióticos fueran transmitidos a las cepas presentes en los humanos a través del consumo de carne ovina contaminada.

En nuestro país no existe un monitoreo constante del uso de antibióticos, existen pocos estudios que se han hecho para comparar la resistencia entre especies animales y regiones del país.

Los patrones de sensibilidad a los diferentes antimicrobianos en este estudio realizado resultaron variables en los diferentes establecimientos a excepción de tetraciclina ya que existen ciertas bacterias que desarrollan resistencia a este antimicrobiano esto se puede deber a que los genes de resistencia están mediados por plásmidos (Sumano, 2006) que pueden ser transferidos por conjugación a otros microorganismos (Hamada *et al.*, 2002), los resultados muestran que todos los establecimientos presentaron porcentajes de resistencia de entre 20% a 56.6% a tetraciclina.

La administración continua de tetraciclinas por vía oral inhibe bacterias de la flora intestinal y favorece el desarrollo de microorganismos resistentes (Sumano, 2006). El factor R de resistencia a las tetraciclinas se presenta debido al transporte activo deficiente del fármaco al interior de la bacteria.

También se presentaron porcentajes de resistencia representativos al ácido nalidíxico ya que la mayoría de los establecimientos presentaron resistencia desde 12.5 % hasta un 40%.

Respecto a establecimientos del mismo lugar como es el caso de Ocoyoacac, las cepas aisladas de *E. coli* presentan resistencia casi a los mismos antimicrobianos como es el caso de Tetraciclina, Ácido Nalidíxico y Gentamicina solo que el establecimiento 8 presentó resistencia a Ciprofloxacino esta distribución regional de la resistencia a los antibióticos también fue observado en el caso de la región central de España (Cid *et al.*, 1994) y en Kashmir, India (Wani *et al.*, 2013).

La resistencia se presentó sin que antes se hubiera instaurado un tratamiento con algún antimicrobiano, lo que puede indicar que la resistencia que presentan estas cepas de *E. coli* pudo haber sido adquirida de otras bacterias que ya presentaban la resistencia a los diferentes antimicrobianos.

En el caso del establecimiento 5, había 2 casos de corderos con diarrea y se les dio un tratamiento con gentamicina, pero en este caso *E. coli* no presentó resistencia, lo que puede indicar que el tratamiento estuvo bien aplicado.

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Son en su mayoría producidas por enterobacterias especialmente frecuentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Alvarez, 2010), en nuestro estudio no hubo presencia de estas β -lactamasas, y no fue necesario realizar la prueba confirmatoria.

Se debe tomar en cuenta el monitoreo de los patrones de resistencia que están presentando las bacterias para poder así fomentar la prescripción adecuada de los antibióticos.

En el presente trabajo se encontró una resistencia a Tetraciclina de 45.3 %, mientras que estudios sobre resistencia a la tetraciclina en *E. coli* de ovejas sanas de otros países varió de muy bajo en Grecia e Irán (1%), a moderados en Canadá (12%) y España (20%), a la alta en estados unidos (33%) del Reino Unido (35% al

49 %) por otra parte, resistencia fue mucho mayor (76%) en *E. coli* aislado a partir de casos clínicos en España (Scoot y Menzies, 2011).

9- CONCLUSIONES

El antibiótico al cual se encontró mayor número de aislamientos resistentes fue la tetraciclina con un 45.37 % seguido de ácido nalidíxico con un 18.48%, gentamicina con un 6.72%, ciprofloxacina con un 3.36% y amikacina con un 1.68%.

No se encontraron cepas con β -lactamasas de espectro extendido ya que para los antibióticos como la cefotaxima y la ceftazidima no se presentó ningún porcentaje de resistencia.

La susceptibilidad de los aislamientos fue menor que la resistencia, 47% de las cepas no presentaron resistencia a ningún antimicrobiano

El 76.49% de los aislamientos presentó resistencia al menos a alguno de los antibióticos utilizados.

Se encontraron 3 aislamientos multirresistentes pertenecientes a dos establecimientos.

10- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar S., (2011), Sensibilidad *In vitro* de cepas de *Escherichia coli* Hemolítica aislada de Canales de Bovinos en el Estado de México. Tesis de Licenciatura, FMVZ, Universidad Autónoma de Estado de México, Toluca México.
- Ahmad, A., Nagaraja, T.G., Zurek, L. (2007), Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to cattle by house flies. *Preventive Veterinary Medicine*; 80(1):74-81.
- Antunes F., Souza R., Figueiredo A., (2013), Superbacterias, El problema mundial de la resistencia a los antibióticos, *Microbiología Médica*, 23(133): 39-41.
- Alvarez A. D., (2010), Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias *Revista Habanera de Ciencias Médicas*; 9(4): 516-524.
- Cabrera, C.E., Gómez, R.F., Zúñiga, A.E. (2007), La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*; 38(2):149-158.

- Chávez L., Torres E, Díaz F., Escalante G., Estrada E., (2008), Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*, Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana; 13(2): 45-48.
- Cid D, Piriz S, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Valle J, Garcia S, Vadillo S, and De la Fuentel R. (1994), In vitro activities of enoxacin, enrofloxacin, sparfloxacin and ciprofloxacin against *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic lambs and kids. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 38(10): 2469-2470
- Crespo M., (2002), La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina, Colombia Médica; 33(4): 179-193.
- Carloni G., Pereyra A., Denamiel G., Gentilini E., (2011), Resistencia a antimicrobianos en aislamientos de *Escherichia coli* de origen animal, Investigación Veterinaria; 13(2): 47-51,
- CLSI (Clinical and Laboratory Estándar Institute), (2012), Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility, 22nd informational supplement. M100-S22. Wayne, PA, USA.
- Dontorou A. Papadopoulou C. Filioussis G. Apostolou I. Economou V. Kansouzidou A. Levidiotou S., (2004), Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm animals in Greece. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 27:201–207.
- Fuentes O., (1995), Diarrea de los corderos, su etiología, sintomatología, diagnóstico y tratamientos, Mundo Ganadero, 95:60-64.
- García F., (2001), Resistencia Bacteriana a Antibióticos, Acta Medica Costarricense; 43(3) 101-102.
- Gallego L., Pérez J., (1993), Producción ovina y caprina, colección Estudios, España, Editorial, Universidad de Castilla. La Mancha, Murcia, España.
- Gimeno O., Ortega C., (2005), Antibioterapia y Salud Pública Veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de Resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos, www.sapuvetnet.org/artigo/Pdf%20Files/antib_portugal.pdf, (5 de febrero de 2015).
- Guardabassi, L., (2008), Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria: recente discoveries potentially impacting human health. 59^o Congresso Internazionale Multisala SCIVAC 30 Mayo- 1Junio Rimini, Italia. 247-248.
- INAFED, (2010) Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México, <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/index.html>, (Febrero 2015).
- Lagunas S., Vega L. F., (2013), Manual de prácticas de laboratorio de Bacteriología y micología de la FMVZ UAEM., http://veterinaria.uaemex.mx/docs/607_970_MP%20Bacteriolog%C3%ADa%20%20Micolog%C3%ADa.pdf, (20 de septiembre de 2014).
- López O., León J., Jiménez M. y Chaidez C., (2009), Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola, Revista Fitotecnia Mexicana; 32(2): 119-126.
- Malbrán C., (2001), Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos,

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-Levell/Manual_procedimientos.pdf (19 de marzo de 2014).

- Márquez D., (2008), Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia, *Revista Corpoica- Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9(1): 124-135.
- Méndez, A., Maldonado, A., Riuz-Villamor, E., Luque, I., Bautista M.J., Huerta, B. Sierra, E., Borge, C., Enfermedades neonatales, <http://www.asmexcriadoresdeovinos.org/empezar/neonatales.html>, (Consultado abril 2013).
- Mora A., Blanco J., Blanco M., Alonso M., Dhahi G., Echeita A., González E., Bernàrdez M., Blanco J., (2005), Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain, *Research in Microbiology*; 156(7): 793-806.
- Moredo F. A., Vigo G. B., Cappuccio J. A., Piñeyro P., Perfumo C. J., Giacoboni G. I., (2007), Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina, *Revista Argentina de Microbiología*, 39(4):227-229.
- Moreno M.A., Domínguez L., Teshager T., Herrero I.A., Porrero M.C., (2000), Antibiotic resistance monitoring: The Spanish programme. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 14(4), 285-290.
- Morris D., Rook K., Shofer F., Rankin S. (2006). Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04) *Veterinary Dermatology*; 17:332-337
- Mosquito S., Ruiz J., Bauer J. L., Ochoa T. J., (2011), Mecanismos Moleculares de Resistencia Antibiótica en *Escherichia coli* Asociadas a Diarrea, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*; 28(4):648-656.
- Pantozzi F. L., Moredo F. A., Vigo G. B., Giacoboni G. I., (2010), Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina, *Revista Argentina de Microbiología*; 42(1): 49-52.
- Prants G., (2005), *Microbiología Clínica*, Editorial Médica Panamericana, Primera Edición, Buenos Aires: Madrid, Pág. 48.
- PROGAN, (2010). Programa Nacional Ganadero. SAGARPA. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Programas/Paginas/PROGRAM.aspx>, (Enero de 2015).
- Quinn P., Markey B., Carter M., (2005), *Microbiología y enfermedades Infecciosas Veterinarias*, Editorial Acribia, Zaragoza.
- OMS, (2014), El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>, (30 de enero de 2015).
- Orden J., De la Fuente R., (2001), Repercusiones en la salud pública de la resistencia a Quinolonas en Bacterias de origen animal, *Revista Española de Salud Pública*; 75(4): 313-320.

- Orden JA, Ruiz-Santa-Quintera JA, García S, Cid D and De la Fuente R. (2000), Quinolone resistance in *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs in Spain, *Veterinary Record*, 147(20): 576-578.
- Pugh D.G., Baird A.N. (2012), *Sheep and Goat Medicine*. Ed. Elsevier Saunders, Missouri, USA.
- Sánchez J., Feris J., (1998), Antibiogramas: utilidad y limitaciones, *Archivos Dominicanos de Pediatría*; 34(3): 83-87.
- Sears CL, Kaper JB (1996), Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Reviews*, 60: 167-215.
- Scott L, Menzies P, Reid-Smith, RJ, Avery BP, McEwen SA, Moon CS. and Berke O. (2012): Antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* obtained from Ontario sheep flocks and associations between antimicrobial use and resistance. *The Canadian Journal of Veterinary Research*; 76:(1),109–119.
- Scott L., Menzies P., (2011), Antimicrobial resistance and small ruminant veterinary practice. *Veterinary Clinics of North America: Food animal practice*; 27 :(1)23-32.
- Sharif L., Obeidat J., Al-Ani F., (2005). Risk factors for lamb and kid mortality in sheep and goat farms in Jordan, *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.*; 8(2), 99108.
- Sumano H., Ocampo L., (2006), *Farmacología Veterinaria*, Editorial Mc Graw Hill, México, pág. 235-248, 306-328.
- Susic E. (2004), Mechanisms of resistance in Enterobacteriaceae towards beta-lactamase antibiotics. *Acta Médica Croática*; 58(4):307-312.
- Wani S.A., Hussain I., Beg S.A., Rather M.A., Kabli Z. A., Mir M.A., Nishikawa Y., (2013), Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Salmonella* in calves and lambs in Kashmir: absence, prevalence and antibiogram. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*; 32:(3),1-17.