

1 Prevalencia de *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido
2 (BLEE) en muestras de tanques de leche de hatos lecheros del municipio de Entreríos,
3 Antioquia, Colombia
4

5
6
7 Laura Vásquez Jaramillo
8 Médica Veterinaria
9

10
11 Director
12 Jorge Arturo Fernández Silva MV, MSP, Dr med vet
13

14
15
16
17 Comité tutorial
18 Nicolás Fernando Ramírez Vásquez
19 Ömer Akineden
20

21
22
23
24 Maestría en Ciencias Veterinarias
25 Línea de Salud Pública y Epidemiología
26

27 Universidad de Antioquia
28 Facultad de Ciencias Agrarias
29 Escuela de Medicina Veterinaria
30 Medellín

31 2016
32

33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61

62
63

Agradecimientos

A mi madre, la mujer de visión única de la vida, su amor inagotable, su confianza, su apoyo y su palabra impecable fueron hilos que tejieron éste su más grande legado.

A mi hermana y su excepcional presencia desde el primer latido tan cerca del mío.

A padre y a mi hermano, energía creadora.

A mi tutor que me enseñó de academia y de la vida, del valor del tiempo y el orden, de la franqueza y la disciplina.

A los miembros del comité tutorial Nicolás y Ömer, mi admiración y respeto.

A mí amada alma máter, mi sueño y mi hogar.

A los participantes en la línea de investigación en Salud Pública y Epidemiología, compañía en este proceso formativo.

Dedicatoria

Al recuerdo entrañable de mis abuelos, siempre presentes.

A la búsqueda de la salud humana, principio y fin de este y tantos esfuerzos.

Al amor... al infaltable amor, como motor de toda obra.

Tabla de contenido

64	Resumen.....	6
65	Abstract.....	8
66	Introducción.....	10
67	Objetivo General.....	15
68	Objetivos Específicos.....	15
69	Marco teórico	16
70	Generalidades de la resistencia a antibióticos.....	16
71	Mecanismos de resistencia.....	18
72	Antibióticos betalactámicos.....	19
73	Betalactamasas	20
74	Betalactamasas de espectro extendido (BLEEs).....	21
75	Familia Enterobacteriaceae	22
76	Importancia social y económica.....	24
77	El fenómeno de la resistencia en animales.....	25
78	Antecedentes de <i>Enterobacteriaceae</i> productora de BLEE en Ganadería de leche en el	
79	mundo.....	28
80	Antecedentes en Colombia de <i>Enterobacteriaceae</i> productora de BLEE.....	30
81	Consumo de antibióticos en Colombia	32
82	Cuerpo del trabajo.....	34
83	Artículo para publicación.....	34
84	Conclusiones.....	70
85	Referencias	73
86	Anexos	87

87

88

89

90

91

92

93

94

Lista de abreviaturas

95 ADN: ácido desoxirribonucleico

96 AMK: amicacina
97 ARNr: ácido ribonucleico ribosomal
98 ATCC: American Type Culture Collection (Cepas microbiológicas de referencia)
99 ATM: aztreonam
100 BLEE: Betalactamasas de espectro extendido
101 BPO: Buenas prácticas de ordeño
102 CAZ: ceftazidima
103 CDC: Centre for Disease Prevention and Control (Centro para el Control y Prevención de
104 Enfermedades)
105 CIM: Concentración Inhibitoria Mínima
106 CIP: ciprofloxacina
107 CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares clínicos y de
108 laboratorio)
109 COL: colistina
110 CODI: Comité para el Desarrollo de la Investigación
111 CRO: ceftriaxona
112 CS: Células somáticas
113 CTX: cefotaxima
114 DOR: doripenem
115 ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeo para la
116 Prevención y Control de Enfermedades)
117 EE: Error Estándar
118 EFSA: European Food Safety Authority
119 ETP: ertapenem
120 FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de alimentos y Agricultura)
121 FDA: Food and Drug Administration (Organización de alimentos y medicamentos)
122 FEDEGAN: Federación Nacional de Ganaderos
123 FEP: cefepime
124 FOX: cefoxitina
125 GEN: gentamicina
126 GREBO: Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá
127 I: Intermedio

128 IC: intervalo de confianza
129 INS: Instituto Nacional de Salud
130 Int: Interpretación
131 MEM: meropenem
132 MIP: imipenem
133 ml: mililitro
134 NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Instituto Nacional de Alergias y
135 Enfermedades Infecciosas)
136 OMS: Organización Mundial de la Salud
137 OR: Odds Ratio
138 PBPs: Penicillin binding proteins (Proteínas de unión a penicilinas)
139 R: Resistente
140 SAM: Ampicilina / sulbactam
141 SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina
142 Sentry: Red internacional de laboratorios para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana
143 SERM: *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina
144 S: Sensible
145 SMART: Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (Estudio para el monitoreo de
146 las tendencias de resistencia a los antimicrobianos)
147 sp: Especie
148 TEST: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (Evaluación de Tigeciclina y prueba de
149 vigilancia)
150 TGC: Tigeciclina
151 UFC: Unidades Formadoras de Colonia
152 UMATA: Unidades Municipales de Atención Técnica Agropecuaria
153
154 μ l: Microlitro
155 WHO: World Health Organization
156 WHONET: Software para la vigilancia de la resistencia bacteriana

157 **Resumen**

158 **Introducción:** Los antibióticos han sido creados para salvar vidas, sin embargo, algunas
159 bacterias han evolucionado de tal manera que pueden resistir el efecto de éstos
160 medicamentos y además transmitir esa resistencia a otras bacterias de su misma o de
161 diferente especie. Una de las mayores preocupaciones es el rápido crecimiento de la
162 resistencia a los betalactámicos por la producción de betalactamasas de espectro extendido
163 (BLEE) en la familia de las enterobacterias, que reduce la eficacia de los miembros más
164 nuevos de este grupo. La aparición de resistencia a los antibióticos en las bacterias de los
165 animales y productos de origen animal ha aumentado la preocupación debido al potencial
166 para la transferencia de determinantes de resistencia a la población humana. En Colombia,
167 hay una evidente falta de información acerca del estado actual de la producción de BLEE en
168 enterobacterias que se encuentran en la producción pecuaria. **Objetivo:** Caracterizar
169 epidemiológicamente *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE aisladas a partir de muestras
170 de leche de tanque de hatos lecheros del municipio de Entrerriós, Antioquia, Colombia.
171 **Metodología:** se llevó a cabo un estudio de corte transversal analítico en el que la unidad de
172 análisis fue el tanque de leche. Ciento veinte hatos fueron seleccionados aleatoriamente de
173 cada vereda para lo cual se usó afijación proporcional. Se tomó una muestra de leche del
174 tanque por hato. Para el tamizaje de *Enterobacteriaceae* productora de BLEE, se utilizó un
175 agar cromogénico. La identificación de los aislamientos se realizó utilizando un kit comercial
176 y la confirmación de la producción de BLEE se realizó mediante la prueba de sinergia de
177 doble disco. A cada aislado confirmado como productor de BLEE se le realizó prueba de
178 susceptibilidad antimicrobiana para otros grupos de antibióticos mediante el método de Kirby-
179 Bauer y el método de microdilución en caldo. Posteriormente fueron analizados por PCR y
180 secuenciación para la presencia de genes *bla* de los subtipos BLEE (TEM, SHV, y CTX-M).
181 Para la exploración de los factores de riesgo, la información sobre las prácticas de manejo
182 del hato se registró usando un cuestionario y la asociación de los predictores y los resultados
183 fueron probados mediante un análisis de regresión logística. **Resultados:** La prevalencia de
184 *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en muestras de leche de tanque en el Municipio de
185 Entrerriós, Antioquia fué 3.3%. Todos los aislamientos albergaban genes tipo *bla* CTX-M
186 mostrando una alta homología con CTX-M-96. La producción de resistencia a otras familias
187 de antibióticos fue común en todos los aislamientos. El tamaño de hato presentó asociación
188 significativa con la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en leche de tanque

189 (OR=11.5, $p<0.038$). **Conclusión:** El análisis de la resistencia a antimicrobianos en muestras
190 de leche de tanque podría servir para monitorear las tendencias en la resistencia a
191 antibióticos en la producción pecuaria y aportar al conocimiento de las dinámicas de difusión
192 de los determinantes genéticos de la resistencia. Dado que los genes encontrados en
193 nuestros aislamientos coinciden con genes previamente encontrados en aislamientos de
194 seres humanos en Colombia, el fenómeno de la resistencia a los antibióticos en animales
195 productores de alimentos debe seguir siendo investigado para aclarar el papel que juegan
196 estos animales y como pueden afectar la salud humana.
197

198 **Abstract**

199 **Introduction:** Antibiotics have been created to save lives, but some type of bacteria have
200 evolved in such a way that they can resist the effect of these drugs and also, they can spread
201 that resistance to other bacteria of the same or different species. One of the biggest concerns
202 is the rapid growth of resistance to beta-lactam antibiotics by producing extended-spectrum
203 beta-lactamases (ESBL) by *Enterobacteriaceae* family, which reduces the effectiveness of the
204 latest members of this group. The emergence of antibiotic resistance in bacteria from animals
205 and animal by-products has increased considerably the concern for the potential for the
206 transferring of resistance determinants to human population. In Colombia, there is an obvious
207 lack of information about the current state of resistance production in bacteria found in
208 livestock production. **Objective:** To epidemiologically characterize ESBL-producing
209 Enterobacteriaceae from bulk tank milk samples from dairy herds in the municipality of
210 Entrerríos, Antioquia, Colombia. **Methods:** a cross-sectional analytical study was conducted
211 considering bulk tank milk as the unit of analysis. Herds were selected randomly from each
212 district using proportional allocation according to the specific weight of each district in the
213 municipality. A milk sample was taken from 120 herds (a tank per herd). For the screening of
214 ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, an ESBL chromogenic agar was used. The
215 identification of the isolates was performed using a commercial kit, and confirmation of ESBL
216 production was performed by double disc synergy test Each isolate confirmed as ESBL
217 producer Was subjected to antimicrobial susceptibility testing for other groups of antibiotics by
218 means of Kirby-Bauer test and by a broth microdilution method. ESBL-positive isolates were
219 further analyzed for the presence of *bla* genes of the ESBL subtypes (TEM, SHV, and CTX-
220 M) by PCR and sequencing. For the risk factors assessment, information on herd
221 management practices were recorded using a questionnaire and the association of predictors
222 and outcomes were tested using logistic regression analysis. **Results:** The prevalence of
223 ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in bulk tank milk samples in the municipality of
224 Entrerríos, Antioquia was 3.3%. Production of resistance to other antibiotic families was
225 common in all isolates. The molecular analysis revealed that all of the isolates harbored *bla*
226 CTX-M genes showing strong homology with CTX-M-96. Herd size was significantly
227 associated with the presence of ESBL- producing enterobacteria (OR=11.5, $p<0.038$).
228 **Conclusion:** The analysis of antimicrobial resistance in bulk tank milk samples can be useful
229 to monitor trends in antibiotics resistance in dairy farms, and thus contribute to the knowledge

230 of the dynamics of distribution and dissemination of genetic determinants of resistance. Since
231 the genes found in our isolates agree with genes previously found in isolates from humans in
232 Colombia, the phenomenon of antibiotics resistance in food-producing animals should
233 continue to be investigated to clarify the role that these animals plays and how they can affect
234 health human.

235

236 **Introducción**

237 La resistencia a los antibióticos se está extendiendo rápidamente en todo el mundo y se ha
238 convertido en un problema tanto en la medicina humana como en la veterinaria (Geser *et al.*,
239 2012). El uso excesivo de antibióticos y el mal uso de los mismos han llevado a un aumento
240 en la incidencia de enfermedades infecciosas que no responden a la antibioticoterapia debido
241 a la rápida respuesta adaptativa de las bacterias para evadir estos medicamentos;
242 asegurando su supervivencia y desarrollo. La resistencia a los antibióticos es debida a una
243 capacidad de las bacterias para producir mutaciones genéticas que hace que los
244 medicamentos utilizados para tratar infecciones causadas por éstas dejen de ser eficaces
245 (Mendoza Medellín, 2011). A pesar de que la resistencia es un fenómeno biológico natural
246 que ha existido desde antes del descubrimiento y el uso de antibióticos por los humanos
247 (Acar *et al.*, 2012) en las últimas décadas se ha acelerado la aparición y propagación de
248 microorganismos multirresistentes debido a la concurrencia de varios factores, como la
249 globalización, que han contribuido a aumentar tanto el número de infecciones como su
250 transmisión y, por consiguiente, la necesidad de uso de antimicrobianos (OMS, 2014).

251

252 Una de las mayores preocupaciones es el rápido crecimiento de la presentación de
253 betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en las bacterias, principalmente en los
254 organismos Gram-negativos, que limitan las propiedades antimicrobianas de las penicilinas,
255 cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación (pero no las cefamicinas ni los
256 carbapenémicos) y el aztreonam (Paterson and Bonomo 2005). Esta resistencia se basa en
257 la producción de enzimas de origen cromosómico o mediada por elementos genéticos
258 móviles (plásmidos, integrones y trasposones) que inactivan estos compuestos por hidrólisis
259 de su anillo beta-lactámico; éstas enzimas a su vez son inhibidas por el ácido clavulánico
260 (Abreu Rodríguez, 2012). En los organismos Gram-negativos, la expresión inducible de
261 betalactamasas se encuentra comúnmente nivel cromosómico mientras que las enzimas
262 mediadas por plásmidos generalmente se expresan de manera constitutiva (Cantón *et al.*,
263 2012).

264

265 El hecho de que la mayoría de las BLEE se encuentren codificadas por plásmidos
266 conjugativos, permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre
267 distintas cepas de la misma especie, sino también entre distintas especies bacterianas a

268 través de la transferencia horizontal (Ausina Ruiz y Moreno Guillén, 2005; Kamel *et al.*,
269 2013). Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de
270 transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes
271 genéticos transferibles de resistencia a otros grupos de antimicrobianos (Rybak *et al.*, 2004;
272 Geser *et al.*, 2012; Xian-Zhi *et al.*, 2007).

273

274 Las primeras BLEE se describieron en 1983 en Alemania en diferentes aislamientos de
275 enterobacterias que presentaban resistencia a cefotaxima y ceftazidima y que podían
276 transferirse por conjugación (Knothe *et al.*, 1983). Desde entonces, estos microorganismos
277 se han descrito cada vez con más frecuencia en brotes nosocomiales en diferentes países
278 del mundo. Así mismo, ha habido un aumento en la detección de cepas productoras de BLEE
279 en la comunidad (Mesa *et al.*, 2006). Especies Gram-negativas importantes con
280 características de producción de BLEE son *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Sin
281 embargo, las especies productoras de BLEE se podrían también encontrar dentro de los
282 géneros *Enterobacter*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia* y *Salmonella* (Galí- Navarro,
283 2010). Las BLEE clásicas derivan de las β -lactamasas con actividad fundamentalmente
284 penicilinasas y que son inhibidas por el ácido clavulánico, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, y
285 que debido a mutaciones en su centro activo, su efecto hidrolítico se ha extendido hasta las
286 cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos (Oliver y Cantón, 2003). Bush
287 *et al.*, (2010) establecieron una clasificación de las betalactamasas que permite diferenciar
288 las BLEE de otras betalactamasas en función del sustrato que hidrolizan, sus inhibidores y
289 características físico-químicas. Las enzimas tipo BLEE están incluidas en el grupo funcional
290 2be que pertenece a la clase molecular A. Las betalactamasas tipo BLEE incluyen
291 principalmente las enzimas tipo TEM, SHV, CTX – M. Entre ellos, el más alto número de
292 variantes descritas en los últimos años corresponde a la familia CTX - M. Esta difusión de
293 CTX - M en todo el mundo se ha denominado como la "pandemia de CTX - M", debido al
294 aumento en los reportes de la misma a nivel mundial (Cantón *et al.*, 2012).

295

296 Las bacterias productoras de BLEE son causantes de diferentes infecciones en humanos
297 como infecciones del tracto urinario e infecciones de tejidos blandos y resisten a una amplia
298 gama de antibióticos, lo que supone un problema de salud que incrementa la morbilidad y

299 mortalidad de los pacientes hospitalizados; igualmente obliga a manejar agentes terapéuticos
300 más tóxicos, costosos y de amplio espectro antibacteriano (Abreu Rodríguez, 2012).

301

302 Hay evidencia de que enterobacterias multirresistentes pueden encontrarse en animales de
303 granja y podrían actuar como reservorios de genes de resistencia que al estar localizados en
304 estructuras genéticas con alta capacidad de movilización, pueden ser fácilmente diseminados
305 entre bacterias de diferentes ecosistemas, incluso en el entorno humano (Abreu Rodríguez,
306 2012; Valentin *et al.*, 2015). Es así como enterobacterias productoras de BLEE con CTX-M y
307 otras enzimas se han aislado a partir de animales y diferentes productos alimenticios (Tham
308 *et al.*, 2012; Schmithausen *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2015; Batista Botelho *et al.*, 2015). Los
309 factores que intervienen en la aparición de resistencia a los antimicrobianos en bacterias de
310 animales destinados al consumo humano parecen ser los mismos que en los seres humanos,
311 pero hay algunas características importantes. En primer lugar está el uso de antimicrobianos
312 en animales para la promoción del crecimiento, profilaxis y tratamiento de infecciones y en
313 segundo lugar, está la ausencia de servicios de diagnóstico microbiológico, que hace que la
314 terapéutica suela ser empírica y la identificación de cualquier animal enfermo a menudo
315 conduzca al tratamiento de toda la población, al contrario de lo que ocurre en los seres
316 humanos, en los que los tratamientos están individualizados. Otro factor muy importante
317 consiste en el hecho de que, en algunos países, hasta el 40% de los ingresos de los
318 veterinarios provienen de la venta de fármacos veterinarios (OMS, 2001).

319

320 Los antibióticos se utilizan a menudo en medicina veterinaria para combatir enfermedades
321 animales tales como mastitis, neumonía o infecciones podales causadas por diversos
322 microorganismos. Los residuos de antibióticos son moléculas por lo general
323 farmacológicamente activas que pueden permanecer en los alimentos obtenidos de animales
324 tratados, y de este modo interactuar con bacterias que pertenecen a la flora normal del
325 intestino animal y del humano generando un riesgo inherente para la selección de
326 microorganismos resistentes en los animales y en el hombre (Cancho Grande *et al.*, 2000).
327 La resistencia tiene implicaciones para la salud animal y la salud humana cuando los
328 patógenos multirresistentes entran en la cadena alimentaria. Se estima que en América del
329 Norte y Europa, el 50% del tonelaje total de la producción de los antimicrobianos se utiliza en
330 animales destinados al consumo humano, incluidas las aves (OMS, 2001). La entrada de

331 enterobacterias productoras de BLEE a partir de los animales a la cadena alimentaria y el
332 medio ambiente (agua, suelo) podría considerarse una posible interfaz para el intercambio de
333 genes de resistencia entre los seres humanos y los animales. La transmisión puede tener
334 lugar, entre otras, a través del contacto directo y/o de la ingestión de alimentos contaminados
335 con cepas productoras de BLEE. Por lo tanto, es importante evaluar si los alimentos pueden
336 ser parte del rápido aumento y la difusión de cepas productoras de BLEE (Carattoli, 2008;
337 Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Mesa *et al.*, 2006). En consecuencia, la cadena alimentaria
338 puede servir como una vía de transmisión de estas infecciones y podría representar un
339 riesgo para el consumidor debido a su potencial zoonótico, lo que ha provocado que las
340 enterobacterias productoras de BLEE ahora se consideren un tema emergente en
341 microbiología de los alimentos de origen animal y una gran preocupación en la salud pública
342 (OMS, 2011)

343

344 En consecuencia, dada la considerable presencia detectable de enterobacterias en el
345 contenido total de gérmenes en la leche de cruda y el uso masivo de antibióticos en la
346 producción lechera, la posible entrada de microorganismos productores de BLEE en el
347 entorno de los lácteos es de gran interés debido que la leche hace parte de la canasta
348 familiar colombiana y su consumo por habitante para el 2014 fue de 143 litros al año
349 (FEDEGAN, 2015), cantidad que según la FAO representa un consumo mediano de leche
350 (FAO, 2015). El Norte es la región lechera más importante en Antioquia aportando el 70% de
351 la leche producida en todo el departamento. La producción de leche en esta región, está
352 calculada en 2.500.000 litros/día superando incluso, departamentos como Cundinamarca, por
353 lo que es considerado también la cuenca lechera más importante del país (Cámara de
354 Comercio de Medellín, 2015). El municipio de Entreríos fue escogido para este trabajo por
355 ser es uno de los 17 municipios que conforman el Norte de Antioquia donde la producción
356 lechera es la actividad económica más importante en el municipio y se en todas las veredas
357 que lo conforman (Alcaldía de Entreríos-Antioquia, 2013).

358

359 Hasta el momento y para nuestro conocimiento, ninguna información referente a la dimensión
360 del riesgo de aparición de bacterias resistentes a los antibióticos en la leche está disponible
361 para Colombia. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar epidemiológicamente
362 la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en muestras de leche de tanque de

363 hatos lecheros ubicados en el Municipio de Entrerríos en la región del Norte de Antioquia,
364 evaluando los posibles factores de riesgo que puedan estar asociados.
365

366 **Objetivo General**

367

368 Evaluar la presencia y caracterizar *Enterobacteriaceae* productoras de
369 Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) a partir de muestras de leche de
370 tanques de fincas lecheras del Municipio de Entrerríos, Antioquia, Colombia.

371 **Objetivos Específicos**

372

- 373 • Identificar y caracterizar *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE aisladas a partir de
374 muestras de leche de tanque de diferentes fincas lechereas.
- 375 • Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos productores de BLEE
376 contra varios agentes antibióticos.
- 377 • Identificar molecularmente la presencia de genes tipo *bla* en los aislamientos de
378 *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE.
- 379 • Explorar posibles factores de riesgo asociados con la presencia de *Enterobacteriaceae*
380 productoras de BLEE aisladas de muestras de leche de tanque de diferentes fincas
381 lecheras.

383 Marco teórico

384

385 Generalidades de la resistencia a antibióticos

386 Los antibióticos son uno de los descubrimientos terapéuticos más importantes en la historia
387 médica (ECDC, 2015). Luego de la aparición de los antibióticos en mitad del siglo XX se
388 revolucionó el manejo médico para el control de las infecciones bacterianas reduciendo la
389 mortalidad y morbilidad. El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1028
390 abrió el campo para el desarrollo de nuevos medicamentos para el control de las
391 enfermedades infecciosas (Alanis, 2005) y desde entonces la industria de los antibióticos ha
392 crecido de manera sorprendente, registrándose más de 100 tipos de antibióticos para el
393 control de enfermedades infecciosas (FDA, 2015).

394

395 A pesar de los grandes desarrollos en terapéutica farmacológica, las bacterias han
396 desarrollado diferentes mecanismos, los cuales de una u otra forma le ayudan a evadir la
397 acción farmacológica bien sea bactericida o bacteriostática (Cunha, 1998). Una vez que los
398 antibióticos se empezaron a usar ampliamente, cepas resistentes capaces de inactivarlos
399 llegaron a ser prevalentes, y por tanto fue necesario llevar a cabo estudios para modificarlos
400 químicamente y prevenir la hidrólisis por enzimas que los inactivaran (Davies y Davies,
401 2010). Los determinantes de la resistencia a antibióticos existen mucho antes del uso de los
402 mismos en la terapéutica y han sido asociados con los microorganismos productores de
403 antibióticos (que se encuentran en la microbiota ambiental) y su necesidad de protegerse
404 cuando los producen; estos determinantes de resistencia en bacterias ambientales son
405 mucho más numerosos que los encontrados en los patógenos y han existido por cientos de
406 años, lo que convierte a estos microorganismos en un gran reservorio de genes de
407 resistencia que pueden ser transferidos a otras bacterias (Acar and Moulin 2012).

408

409 La resistencia antibiótica se define como un fenómeno caracterizado por la falta de eficacia
410 de los antibióticos contra las bacterias, generada principalmente por su uso indiscriminado e
411 irracional y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso de antimicrobianos
412 (Sussmann *et al.*,2001). Es así como un microorganismo que originalmente era vulnerable a

413 un medicamento antimicrobiano, puede volverse resistente a uno o varios antibióticos
414 utilizados comúnmente en la terapéutica o profilaxis (WHO, 2015; ECDC, 2015). La
415 resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida; la resistencia natural es
416 propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, esto implica que no todas las especies
417 bacterianas son susceptibles naturalmente a los antimicrobianos (Pérez, 2007). Por el
418 contrario la resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie
419 bacteriana (Vignoli, 2008), y se da por la modificación de la carga genética de la bacteria por
420 mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética (Daza Pérez, 1998). Por
421 lo tanto, es la resistencia adquirida la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se
422 utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección (Vignoli,
423 2008) convirtiéndose en la resistencia de mayor importancia clínica.

424

425 Diferentes factores se han descritos para el desarrollo de la resistencia antibiótica por parte
426 de las bacterias (Alanis, 2005). Volumen de uso, duración de la terapia antibiótica y tipo de
427 antibiótico son de los factores más descritos por diversos autores (Wiedemann y Heisig,
428 1994; Cunha, 1998; Appelbaum y Klepser, 1999; Guillemot y Carbon, 1999; Stapleton *et al.*,
429 1999; Cunha, 2000). Otros factores incluyen la utilización de antibióticos como promotores de
430 crecimiento en la producción animal, diagnóstico inadecuado de las enfermedades y los
431 agentes etiológicos y el uso excesivo sin una necesidad justificada (Cunha, 1998; NIAID,
432 2011).

433

434 Una bacteria susceptible puede volverse resistente al adquirir por transferencia horizontal, a
435 partir de una bacteria resistente, elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones y
436 trasposones e incorporarlos a su material genético, adquiriendo genes de resistencia que
437 facilitan la expansión epidémica de la misma dado que es un fenómeno que puede ocurrir
438 entre bacterias de la misma especie o especies distintas (Pérez, 2007). Luego de la
439 adquisición de uno o varios genes de resistencia, el desarrollo de ésta a los antibióticos se
440 produce cuando el gen es capaz de expresarse y producir un efecto biológico tangible que
441 resulta en la pérdida de actividad del antimicrobiano (Daza Pérez, 1998; Heinemann *et al.*,
442 2000; Sefton, 2002)

443 Las cepas resistentes se hacen predominantes por la presión selectiva de los antibióticos
444 que hacen desaparecer las bacterias sensibles, no estando implicados solamente los

445 antibióticos utilizados en medicina humana, sino también y de forma muy importante los
446 empleados en veterinaria (Daza Pérez, 1998). Los antibióticos por si solos no pueden
447 generar mutaciones. El desarrollo de resistencia inducida por el uso de antibióticos, depende
448 de la selección de cepas que previamente habían mutado y que son resistentes,
449 obedeciendo la teoría de Darwin, de selección del más fuerte (Pérez, 2007).

450 **Mecanismos de resistencia**

451 Hasta el momento se conocen alrededor de 7 familias de antibióticos, dentro de los cuales se
452 encuentran diferentes tipos desde lo más antiguos, hasta fármacos de última generación
453 (Sumano y Ocampo, 2011). Los mecanismos de acción de muchos antimicrobianos son
454 complejos y diversos, pero básicamente se pueden resumir en: inhibición de la síntesis de
455 ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o bien alterando la membrana celular de
456 la bacteria sobre la cual actúan (Daza Pérez, 1998; Levy y Marshall, 2004; Sumano y
457 Ocampo, 2011).

458

459 Los mecanismos de resistencia antimicrobiana son variados, destacando entre ellos cuatro
460 mecanismos principales:

461 1. Inactivación enzimática: Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano,
462 destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el
463 microorganismo. (Daza Pérez, 1998).

464 2. Modificación del sitio blanco: La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente
465 y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano (Moreno *et al.*, 2009), impidiendo o
466 dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del
467 ADN girasa, del ARNr 23S y de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina)
468 necesarias para la formación de la pared celular (Daza Pérez, 1998).

469 3. Disminución de la permeabilidad de la pared celular: cambios en el diámetro y/o número
470 de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria (Moreno *et al.*, 2009).

471 4. Bombas de eflujo: Que transportan al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin
472 modificaciones, pero sin acción antimicrobiana (Daza Pérez, 1998). Es un mecanismo de
473 expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe
474 eficazmente (Moreno *et al.*, 2009).

475

476 Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o
477 muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos
478 mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio
479 de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos (Daza Pérez, 1998).

480

481 **Antibióticos betalactámicos**

482 Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica
483 clínica. Se han utilizado con seguridad y eficacia por más de 70 años, en un principio para el
484 tratamiento de infecciones causadas por cocos Gram-positivos. Con la introducción de
485 betalactámicos de amplio espectro, las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas
486 anaeróbicas y aeróbicas también son tratadas con esta familia de antibióticos. Entre estos
487 agentes se encuentran las penicilinas de espectro reducido y cefalosporinas, cefalosporinas
488 de espectro extendido, los carbapenémicos y los monobactámicos (Bush, 2012).

489

490 Los betalactámicos son agentes bactericidas que actúan inhibiendo la última etapa de la
491 síntesis de la pared celular bacteriana, específicamente del peptidoglucano. El
492 peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la
493 repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico
494 fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla, bien
495 directamente (Gram-negativos) o mediante un pentapéptido de glicina (Gram-positivos). Los
496 betalactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la
497 síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por
498 la presión osmótica intracelular. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la
499 bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular. Los
500 componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través
501 de la membrana citoplasmática al espacio que existe entre ésta y la pared celular. A este
502 nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas),
503 que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las
504 penicilinas y otros betalactámicos, por lo que se llaman Proteínas de unión a penicilinas
505 (PBP) La función de las PBP es alargar, dar forma y dividir la bacteria. Los anillos de los
506 betalactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido
507 (D-alanina-D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la

508 transpeptidasa. También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas
509 (Marín y Gudiol, 2003).

510

511 **Betalactamasas**

512 Son enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo beta-lactámico. Son el
513 principal exponente del mecanismo de resistencia por inactivación enzimática, lo constituyen
514 un grupo de enzimas que tienen la capacidad de inactivar o modificar antibióticos
515 Betalactámicos.

516

517 Las betalactamasas son producidas por una gran variedad de bacterias que incluyen
518 especies de Gram-positivos, Gram-negativos y anaerobios (Xian-Zhi *et al.*, 2007; Moreno *et*
519 *al.*, 2009). Estas pueden ser codificadas por genes en cromosomas o plásmidos (García
520 Castellanos *et al.*, 2014). Las betalactamasas en las bacterias Gram-negativas, se
521 encuentran en el espacio periplásmico, y en las Gram-positivas como carecen de membrana
522 externa, son excretadas al medio exterior. Los diferentes tipos de betalactamasas varían en
523 su capacidad de inactivar un betalactámico determinado y en su susceptibilidad a inhibidores
524 como el clavulanato, sulbactam y tazobactam; estos inhibidores tienen mayor afinidad a la
525 enzima e impide la destrucción del antimicrobiano y de esta manera permiten la acción del
526 antibiótico ayudando a combatir esta resistencia (Moreno *et al.*, 2009).

527

528 Las betalactamasas generalmente son clasificadas de acuerdo a dos esquemas: el de
529 Ambler y el de Bush-Jacoby-Madeiros. La clasificación de Ambler (Ambler *et al.*, 1991) posee
530 cuatro clases A, B, C, D, y está basada en la similitud u homología de los aminoácidos y no
531 tiene en cuenta las características fenotípicas. En esta clasificación la clase B son metalo-
532 betalactamasas y el resto serino betalactamasas. La clasificación de Bush-Jacoby-Madeiros
533 se basa en la similitud funcional y la característica de inhibición o no por el ácido clavulánico
534 (Bush *et al.*, 1995).

535

536 La resistencia que desarrollan las bacterias frente a los betalactámicos representa un grave
537 problema, pues son los antimicrobianos más prescritos, tanto en atención primaria como en
538 los hospitales (Marín y Gudiol, 2003), y el número de nuevas alternativas terapéuticas
539 actualmente es bajo (Maldonado *et al.*, 2014).

540

541 **Betalactamasas de espectro extendido (BLEEs)**

542 Se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas
543 (menos las cefamicinas) y las monobactámicos, pero no las carbapenémicos. Las BLEE se
544 caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. En 1983 se
545 descubrió en Alemania la primera enzima capaz de hidrolizar las cefalosporinas de más
546 amplio espectro, inaugurando el capítulo de las BLEE (Seral García *et al.*, 2010), y desde
547 entonces, el número de BLEE descritas ha aumentado de forma exponencial (Muñoz Bellido,
548 2004) y han sido motivo de atención para la comunidad médica y científica.

549

550 Las BLEE se derivan generalmente de las betalactamasas de espectro reducido codificadas
551 por plásmidos, estas son TEM-1, TEM-2 y SHV-1), que especifican resistencia a la penicilina
552 y cefalosporinas tempranas (Jacoby y Muñoz, 2005; Bush y Jacoby, 2010). La capacidad de
553 las BLEEs para inactivar una gama más amplia de antibióticos beta-lactámicos está
554 relacionada con una o más mutaciones en el gen común que codifica para enzimas TEM y
555 SHV (Cantón *et al.*, 2012). Las BLEEs son comúnmente encontradas en *E.coli*, *Klebsiella*
556 *spp*, y *Proteus mirabilis*, no obstante, existen otras BLEE que difieren filogenéticamente de
557 TEM y SHV, como las CTX-M (por su actividad hidrolítica preferente por la cefotaxima),
558 encontradas en especies de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Serratia spp*
559 y *Enterobacter spp*. A diferencia de otras BLEE, la familia CTX-M constituye un grupo
560 complejo y no homogéneo de enzimas. La alineación de la secuencia de aminoácidos de las
561 diferentes variantes CTX-M permitió clasificar estas enzimas en cinco grupos CTX-M-1, CTX-
562 M-2, CTX-M-9, CTX-M-8 y CTX-M-25 (Cantón *et al.*, 2012).

563 Los análisis filogenéticos sugieren que CTX-M no se originó por mutaciones de enzimas
564 anteriores mediadas por plásmidos, sino a través de la movilización de los genes
565 cromosómicos tipo *bla* de *Kluyvera spp*. Cuando fueron incorporados en elementos genéticos
566 móviles (Cantón, 2008). Esta movilización de genes *bla* CTX-M afecta a la cefotaxima en un
567 grado mayor que la ceftazidima. Sin embargo, y desde un punto de vista evolutivo, las
568 enzimas CTX-M como otras BLEE más tarde divergieron por mutaciones puntuales,
569 probablemente como consecuencia de la presión selectiva por el uso de antibióticos, lo que
570 mejoró la actividad hidrolítica de éstas contra ceftazidima (Cantón *et al.*, 2012).

571

572 Para la detección molecular de genes codificantes de betalactamasas, el método estándar y
573 convencionalmente utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés
574 Polimerase Chain Reaction), sin embargo, la técnica PCR por sí misma no nos permite
575 establecer a que variante pertenece la betalactamasa detectada, por lo cual si se desea
576 genotipificar la enzima es necesario realizar la secuenciación del producto de amplificación
577 (GREBO, 2010).

578

579 Por lo general, cuando se habla de BLEE se refiere únicamente a las enzimas de codificación
580 plasmídica, ya que son éstas las que suponen un mayor problema epidemiológico debido a
581 su elevada capacidad de diseminación (Oliver y Cantón, 2003). Por consiguiente, la aparición
582 de novedosas betalactamasas pueden inactivar nuevos betalactámicos y constituyen un
583 desafío particular tanto para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos como para la
584 quimioterapia (Xian-Zhi *et al.*, 2007).

585 **Familia Enterobacteriaceae**

586 Las enterobacterias son un grupo grande y heterogéneo de bacilos Gram-negativos, no
587 formadores de esporas, inmóviles o móviles (por medio de flagelos), crecen en condiciones
588 aerobias o anaerobias (son anaerobios facultativos), crecen sobre peptona o medios con
589 extracto de carne sin suplementos, son fermentadores de azúcares, con frecuencia producen
590 gas, reducen nitratos a nitritos y reciben su nombre por la localización habitual como
591 saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de
592 forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora
593 intestinal normal de muchos animales además del hombre (Puerta-García y Mateos-
594 Rodríguez, 2010), pueden intervenir en ocasiones en procesos patógenos intra o
595 extraintestinales. Se caracterizan por ser poco exigentes en sus necesidades nutritivas y
596 relativamente resistentes a la acción de los agentes externos (Castro Peláez, 2009).

597

598 Se han definido más de 25 géneros y 110 especies de enterobacterias, sin embargo, las de
599 importancia clínica comprenden de 20 a 25 especies. Entre los géneros de las
600 enterobacterias se encuentran: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*,
601 *Shigella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Yersinia*, entre otros. Algunas de estas bacterias, como
602 *Escherichia coli*, forman parte de la microbiota normal del intestino e incidentalmente causan

603 enfermedad, en tanto que otros, *Salmonella* y *Shigella*, con gran frecuencia son patógenas
604 para el humano (Castro Peláez, 2009).

605

606 Con frecuencia, *Escherichia* y *Klebsiella* son causantes de un número considerable de
607 infecciones nosocomiales, ya que en el paciente hospitalizado las enterobacterias colonizan
608 el tubo digestivo, la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel, mientras que en el ambiente
609 hospitalario pueden aislarse del agua, catéteres, sondas, sueros, antisépticos, equipos de
610 respiración mecánica, etc., nichos ambientales con los que pueden entrar en contacto los
611 pacientes hospitalizados y debido a su ubicuidad dentro y fuera del cuerpo a menudo causan
612 infecciones oportunistas (Galí- Navarro, 2010).

613

614 Las cepas de enterobacterias multirresistentes tienen distribución mundial. Durante un
615 tiempo el problema estuvo centrado, sobre todo, en hospitales; ésta situación ha cambiado
616 de forma drástica en la última década, en la que se han comenzado a aislar de forma cada
617 vez más frecuente cepas productoras de BLEE en el medio extrahospitalario. Diferentes
618 factores han contribuido al incremento de las infecciones por enterobacterias en los
619 hospitales: el uso cada vez mayor de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas
620 (catéteres intravenosos, endoscopias, intervenciones quirúrgicas), el empleo de potentes
621 inmunosupresores y las estancias hospitalarias prolongadas, entre otros (Puerta-García y
622 Mateos-Rodríguez, 2010). En los individuos hospitalizados o inmunodeprimidos (incluyendo
623 los pacientes alcohólicos y diabéticos), en especial en los pacientes que reciben tratamiento
624 antibiótico, puede haber colonización por *Enterobacteriaceae*. La proporción de aislados
625 resistentes a múltiples antimicrobianos, incluidos aquellos que producen BLEE, ha
626 aumentado de forma ininterrumpida, de modo que casi todos los aislados nosocomiales, y
627 muchos de los aislados adquiridos en la comunidad, son ahora resistentes a varias clases
628 importantes de antimicrobianos (OMS, 2011; EFSA 2011). El concepto de infección adquirida
629 en la comunidad comprende aspectos como la naturaleza del microorganismo causante de
630 la infección y la relación o no con la atención sanitaria (Friedman *et al.*, 2002). Cuando se
631 considera la adquisición comunitaria de una infección por enterobacterias productoras de
632 BLEE uno de los criterios más utilizados es la estancia hospitalaria inferior a 48 h y la
633 ausencia de hospitalización previa en períodos variables, desde 1 mes, 90 días, 3 meses y
634 hasta 4 meses (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004; Pitout *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2002;

635 Colodner *et al.*, 2001). En este sentido, las infecciones nosocomiales (del latín nosocomium,
636 «hospital») son infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital y que no estaban
637 presentes ni en el período de incubación ni en el momento del ingreso del paciente. Las
638 infecciones que ocurren en más de 48h después del ingreso suelen considerarse
639 nosocomiales (Pujol y Limón, 2013).

640

641 **Importancia social y económica**

642 La resistencia cuesta dinero y vidas humanas, pone en peligro la eficacia de los programas
643 de atención de la salud y podría llegar a constituir una amenaza para la estabilidad mundial y
644 la seguridad de los países (OMS, 2001). El desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido
645 drásticamente en los últimos 25 años. La causa de este descenso es multifactorial, pero se
646 debe principalmente a su bajo retorno de la inversión. El desarrollo de fármacos, en general,
647 se enfrenta a desafíos cada vez mayores debido a los altos costos requeridos, que se estima
648 actualmente en \$ 400-800 millones de dólares por agente aprobado. Lamentablemente, los
649 antibióticos por ser de uso a corto plazo tienen una menor tasa de retorno sobre la inversión
650 que otros fármacos (Spellberg *et al.*, 2008).

651

652 El impacto clínico de la infección causada por microorganismos resistentes en la mortalidad y
653 la morbilidad de pacientes gravemente enfermos, va de la mano con el incremento en los
654 costos de la atención y, probablemente, está asociado a los factores que permiten una mayor
655 supervivencia; en este contexto, los costos más altos se generan por la atención en la unidad
656 de cuidados intensivos y por el consumo de medicamentos e insumos, entre ellos los
657 antibióticos (Barrero *et al.*, 2014).

658

659 El impacto de la resistencia a los antimicrobianos puede evaluarse desde la perspectiva del
660 hospital, el paciente y la sociedad, y se podría subestimar el efecto completo de la resistencia
661 a los antimicrobianos examinando solo una de esas perspectivas (McGowan, 2001). La
662 mayoría de los estudios publicados han demostrado una asociación entre resistencia a los
663 antibióticos y los resultados adversos en cuanto a salud y economía, y se ha hablado de un
664 aumento de 1.3-2 veces en la mortalidad, la morbilidad y el coste para los pacientes con
665 infecciones resistentes frente a infecciones susceptibles (Cosgrove y Carmeli, 2003).

666

667 El análisis de la mortalidad y la duración de la hospitalización miden el efecto directo a corto
668 plazo de la resistencia en el paciente infectado. Sin embargo, las consecuencias indirectas y
669 largo plazo de las infecciones resistentes pueden tener implicaciones importantes como por
670 ejemplo, la pérdida del trabajo y de tiempo con la familia asociado con un mayor tiempo de
671 hospitalización y la recuperación posterior; el futuro de la salud, dado que las infecciones
672 causadas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos pueden requerir una terapia
673 más tóxica que puede conducir a resultados adversos en la salud, y puede además afectar
674 la parte emocional de los pacientes (Cosgrove y Carmeli, 2003).

675

676 Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados
677 Unidos, se produjo un registro anual estimado de 23.000 casos y 1.700 muertes por
678 infecciones causadas por BLEE en 2013. Sin embargo, el coste total de la resistencia a los
679 antibióticos para la economía de los Estados Unidos ha sido difícil de calcular. Las
680 estimaciones varían, pero se han extendido tan alto como \$ 20 mil millones de dólares en
681 costos directos de salud, con un coste adicional para la sociedad por pérdida de
682 productividad (CDC, 2013).

683

684 **El fenómeno de la resistencia en animales**

685 Cada vez son más los estudios que relacionan la administración de antimicrobianos a los
686 animales destinados al consumo humano con la resistencia de los agentes patógenos
687 comunes (Valentin *et al.*, 2014; Friese *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012; Wooldridge, 2012;
688 Wittum *et al.*, 2010; Doi *et al.*, 2010). La resistencia tiene consecuencias para la salud de los
689 animales, y también para la salud de los seres humanos cuando los patógenos se introducen
690 en la cadena alimentaria. El uso de antimicrobianos en los animales destinados al consumo
691 humano puede afectar a la salud humana debido a la presencia de residuos de los fármacos
692 en los alimentos y, sobre todo, a la selección de microorganismos resistentes en los
693 animales. Las consecuencias de dicha selección incluyen el aumento del riesgo de que los
694 patógenos resistentes sean transferidos al ser humano por el contacto directo con los
695 animales o por el consumo de alimentos o aguas contaminadas y la transferencia de genes
696 de resistencia de la flora bacteriana animal a la humana (OMS,2001).

697

698 Los factores implicados en la aparición de resistencia a los antimicrobianos en los animales
699 destinados al consumo humano parecen ser los mismos que en los humanos, pero hay
700 algunas peculiaridades importantes. En primer lugar, de los tres usos de los antimicrobianos
701 en los animales (estimulación del crecimiento, profilaxis y tratamiento), los de mayor peso
702 son los dos primeros. Además, debido a la inexistencia de servicios de diagnóstico
703 microbiológico, el uso terapéutico es generalmente empírico, y la identificación de algún
704 animal enfermo suele llevar al tratamiento de toda la población, al contrario de lo que ocurre
705 en los humanos, en los que el tratamiento es individualizado. Otro factor muy importante
706 consiste en el hecho de que, en algunos países, hasta un 40% de los ingresos de los
707 veterinarios proceden de la venta de fármacos (OMS, 2001).

708

709 Especialmente en América Latina, hay varios aspectos que están promoviendo el desarrollo
710 de microorganismos resistentes a los antibióticos a nivel de producción pecuaria:

711 - El uso de los antibióticos en entidades patológicas no apropiadas (enfermedades
712 virales).

713 - La baja percepción del problema por parte de los consumidores y el público en
714 general.

715 - Las aplicaciones terapéuticas de antibióticos, vermífugos, acaricidas con criterios
716 médicos, pero sin las previsiones adecuadas de cumplimiento de tiempos de supresión.

717 - La comercialización directa de la industria con estrategias de mercadeo, promociones
718 y publicidad, lo que supone la venta libre de estos productos.

719 - El uso de los mismos antibióticos para la medicina humana y la medicina veterinaria.

720 - En algunos países, es muy habitual que el veterinario prescriba antibióticos y envíe al
721 propietario a comprarlos al centro de salud o farmacia de medicina humana, de manera que
722 al final los antibióticos utilizados sean los mismos para los animales y las personas.

723 - La aplicación de los antibióticos a voluntad del ganadero o propietario, tanto en el
724 caso de animales de compañía como en el de animales de abasto. Esta actuación reduce los
725 costos por el servicio del profesional veterinario, pero implica una administración sin control
726 en la mayoría de los casos.

727 - La debilidad de los servicios públicos y privados en la vigilancia y el control de
728 productos veterinarios.

729 - Darles mayor importancia, por parte de los sanitarios, a los aspectos clínicos y de
730 control de la enfermedad frente a la salud pública y la protección del medioambiente. Esto
731 supone la proliferación de microorganismos ubicuos (infecciones nosocomiales) en
732 hospitales veterinarios.

733 - El predominio, en muchos casos de criterios, comerciales frente a la protección del
734 consumidor y la sostenibilidad del medioambiente por parte de los productores.

735 - El uso de los antibióticos en producción animal con carácter de aditivo promotor de
736 crecimiento (prohibido en Europa desde el año 2006) o con carácter preventivo con el riesgo
737 que ello supone para el paso de microorganismos resistentes a la cadena alimentaria. En
738 algunos países de América Latina, aunque existe una norma que indica que no deben quedar
739 residuos de antibióticos en los productos de origen animal destinados a la cadena
740 alimentaria, se indica que no existe un programa de seguimiento y vigilancia de esos
741 residuos en las canales, ya que las inspecciones veterinarias se basan en la observación,
742 algo que no permite detectar aquellos residuos (Falcón, 2010).

743

744 Con base en esto, la cadena alimentaria puede servir como una vía de transmisión de
745 infecciones multiresistentes y podría representar un riesgo para el consumidor debido a su
746 potencial zoonótico, lo que ha provocado que las enterobacterias productores de BLEE ahora
747 se consideren un tema emergente en microbiología de los alimentos y una gran
748 preocupación en la salud pública (OMS, 2011). Dado que, enterobacterias como *E. coli* son
749 habitantes normales de la flora intestinal de los animales y los productos alimenticios se
750 pueden contaminar directamente en las plantas de beneficio o con el estiércol que se utiliza
751 para promover el crecimiento de las verduras (Tham *et al.*, 2012), la posible entrada de
752 microorganismos productores de BLEE en el entorno de los productos lácteos es de gran
753 interés.

754

755 Por todo lo anteriormente expuesto, las intervenciones necesarias a nivel agropecuario
756 deben realizarse de forma coordinada, en un marco de recomendaciones con el fin de limitar
757 la aparición y propagación de bacterias resistentes en el entorno de los animales. Dentro de
758 esas recomendaciones pueden incluirse: la prohibición del uso de antibióticos como
759 promotores del crecimiento y limitar su uso para otras aplicaciones no terapéuticas, la
760 reducción de la difusión de bacterias resistentes a múltiples fármacos a través de la cadena

761 alimentaria mediante la mejora de la bioseguridad agrícola y el desarrollo de estrategias de
762 tratamiento alternativas, el aumento de las condiciones y prácticas de higiene a lo largo de la
763 cadena alimentaria, el desarrollo de programas de educación dirigido principalmente a los
764 veterinarios, los ganaderos y los manipuladores de alimentos y sistemas de vigilancia unidos
765 para la resistencia a los antibióticos establecidos para los seres humanos y los animales
766 (Roca *et al.*, 2015)

767

768 **Antecedentes de *Enterobacteriaceae* productora de BLEE en ganadería de leche en el** 769 **mundo**

770 En India, un total de 150 muestras que comprendían ensalada de verduras, huevo crudo,
771 pollo crudo, leche no pasteurizada y carne cruda se procesaron microbiológicamente para
772 aislar *E. coli* y se estudió su patrón de sensibilidad a los antibióticos por el método de Kirby -
773 Bauer. Los mayores porcentajes de resistencia a los medicamentos en los aislamientos de *E.*
774 *coli* se detectaron en el pollo crudo (23,3%), seguido de ensalada de verduras (20%), la
775 carne cruda (13,3%), el huevo crudo (10%) y la leche no pasteurizada (6,7%). La incidencia
776 general de *E. coli* resistente fue de 14,7%. Un total de seis (4%) productores de BLEE, dos
777 de cada uno de ensaladas de verduras y pollo crudo, uno de huevo crudo y uno de la carne
778 cruda. Ningún aislamiento productor de BLEE se obtuvo a partir de la leche cruda (Rasheed
779 *et al.*, 2014).

780

781 En Suiza, Gesser *et al.*, 2012 estudiaron 334 muestras fecales de cerdos, ganado vacuno,
782 pollo y ovejas y 100 muestras de leche cruda, representativas de leche de tanque de 100
783 granjas lecheras diferentes, 104 muestras de carne picada (cerdo y ternera) y 67
784 aislamientos de *E. coli* de ganado con mastitis. Hasta un 15,3% de 13,7%, 8,6% y 63,4% de
785 las muestras fecales de porcinos, bovinos, ovinos y pollo, respectivamente, arrojaron
786 productores de BLEE después de una etapa de enriquecimiento. En contraste, ninguna de
787 las muestras de carne picada, ninguna de las muestras de leche de tanque y sólo una de las
788 muestras de leche de mastitis contenía cepas productoras de BLEE.

789

790 En Alemania, se aislaron *E. coli* productoras de BLEE de muestras de leche de tanque de
791 30% de las granjas estudiadas. La detección de *E. coli* productora de BLEE se asoció con la
792 aparición de metritis y distocia en las granjas. El uso de antibióticos en el tratamiento de las

793 vacas después de distocia y en el tratamiento de las infecciones umbilicales y la artritis en los
794 terneros también se asoció con la presencia de *E. coli* productora de BLEE en leche de
795 tanque (Kreausukon, 2011). En otro estudio en el mismo país, el 8,7% de los aislados de
796 muestras de leche cruda fueron resistentes a cefotaxima (Akineden *et al.*, 2012). En cuanto a
797 los factores de riesgo para la presencia de enterobacterias en las granjas lecheras, un
798 estudio reciente informó que las granjas que habían utilizado una cefalosporina de tercera o
799 cuarta generación (ceftiofur, cefoperazona y cefquinoma) en el ganado en los últimos 12
800 meses tuvieron casi 4 veces más probabilidades de tener *E. coli* productora de BLEE
801 presentes ($p = 0,037$; $OR = 3,93$); además, se identificaron otros factores de riesgo para la
802 presencia de *E. coli* CTX-M, tales como el almacenamiento del estiércol en un pozo y operar
803 con una política de hato abierto (Snow *et al.*, 2012).

804

805 Bandyopadhyaya *et al.*, 2015 en India, describieron una infección intramamaria de
806 *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina (SERM), *Staphylococcus aureus*
807 resistente a la meticilina (SARM) y *E. coli* productora de betalactamasa de espectro
808 extendido (BLEE) en dos vacas con mastitis subclínica y una vaca con mastitis clínica. En
809 total tres SERM, uno SARM y tres *E. coli* productora de BLEE fueron aisladas de estos
810 casos. Así mismo, Saishu *et al.*, 2014 obtuvieron 2 aislamientos de *K. pneumoniae*
811 productoras de BLEE de vacas con mastitis clínica en Japón y Ohnishi *et al.*, 2013 aislaron
812 65 enterobacterias productoras de BLEE a partir de 258.888 muestras de leche con mastitis
813 de las granjas lecheras japonesas entre 2007 y 2011; en este estudio *K. pneumoniae* y *E.*
814 *coli* fueron las cepas predominantemente aisladas. En otro estudio, Dahmen *et al.*, 2013, a
815 partir de una colección de 1.427 *E. coli* y *K. pneumoniae* causantes de mastitis clínica en
816 Francia, reportaron 0.4% (6/1427) de los aislamientos llevaban un gen BLEE.

817

818 En indonesia, Sudarwanto *et al.*, 2015 confirmaron fenotípicamente la producción de BLEE
819 en 7 aislamientos de *K. pneumoniae* a partir de 7 muestras de leche de tanques diferentes de
820 un total de 80 tanques de leche seleccionados al azar y en la República Checa la producción
821 de BLEE fue confirmada en 2 (0,7%) aislamientos a partir de 263 muestras de leche cruda
822 de 40 fincas diferentes.

823

824 Los resultados de estos estudios indican que la leche puede ser un reservorio de bacterias
825 portadoras de genes de resistencia con un potencial de propagación a través de la cadena
826 alimentaria. La contaminación de la leche con este tipo de bacterias podría ocurrir durante el
827 ordeño de los animales, almacenamiento y / o el procesamiento de la misma. En
828 consecuencia, sin buenas prácticas de higiene, la leche puede actuar como vehículo de
829 transferencia de bacterias multirresistentes al tracto gastrointestinal de los consumidores.

830

831 Aunque la presencia de las bacterias resistentes a los antibióticos en los alimentos todavía
832 no ha sido planteada como un indicador de riesgo para la salud humana (Overdevest *et al.*,
833 2011), la contribución potencial de los alimentos, a la afección de la salud humana, por la
834 difusión de las BLEE mediadas por plásmidos, se debe evaluar epidemiológicamente debido
835 a la incompleta información relacionada con este fenómeno emergente a nivel local,
836 regional, nacional e internacional (Tekiner y Özpınar, 2016).

837

838 **Antecedentes en Colombia de *Enterobacteriaceae* productora de BLEE**

839 El reporte de la resistencia se inició en Colombia a finales de los años 90 (González y Cortés,
840 2013) y ya entonces se dio la primera gran alarma sobre el aumento de la resistencia
841 bacteriana en las enterobacterias. A partir del 2001 empezó a reportarse de forma
842 sistemática y consecutiva la resistencia bacteriana en hospitales colombianos gracias a la
843 aparición de sistemas de vigilancia implementados por diversos grupos de investigación y a
844 la adopción de dichos sistemas de vigilancia por parte de los entes gubernamentales
845 (González y Cortés, 2013). El Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en
846 Bogotá (GREBO) comenzó la vigilancia en el 2001, en un principio, lo conformaban ocho
847 hospitales de tercer nivel; para el año 2006 hacían parte de la red más de 25 instituciones
848 hospitalarias de segundo y tercer nivel, e incluso hospitales de fuera de Bogotá. Actualmente
849 cuenta con más de 30 instituciones de varias regiones del país. El sistema de vigilancia se
850 hace a través de la base de datos WHONET, de la Organización Mundial de la Salud (OMS),
851 con recolección de los resultados obtenidos de los laboratorios participantes a través de
852 métodos automatizados y manuales. La mayoría de las redes establecidas en el país se han
853 enfocado a la identificación de marcadores de resistencia hospitalaria, en algunas ocasiones
854 con esfuerzos de control de infecciones, y con menor frecuencia a la medición del uso o
855 consumo de antibióticos a nivel hospitalario (INS, 2009).

856

857 Los estudios que se han identificado no permiten establecer la frecuencia de las BLEE en
858 Colombia, puesto que no hay uniformidad de criterios en este sentido y los reportes
859 encontrados no corresponden a los mismos períodos y no son secuenciales. Con base en los
860 estudios identificados, en los últimos años (2009 a 2011) la frecuencia de BLEE podría
861 situarse entre 10,1 y 11,8% en *E. coli* y entre 14,6 y 32,6% en *K. pneumoniae*. A nivel
862 mundial, los datos del estudio TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial), los del
863 proyecto Sentry (red internacional de laboratorios para la vigilancia de la resistencia
864 antimicrobiana) y los del estudio SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance
865 Trends) muestran cómo en la última década las tasas más altas se observan en Asia,
866 seguidas por las de América Latina y, por último, las de los países desarrollados (Huang *et*
867 *al.*, 2012; Villegas *et al.*, 2011). Al comparar la situación de Colombia con los datos
868 reportados, en el caso de *K. pneumoniae* productora de BLEE, el país estaría al nivel de
869 América Latina, con las tasas de resistencia más altas. En el caso de *E. coli* productora de
870 BLEE, Colombia se situaría a nivel de Europa con una prevalencia intermedia. En
871 comparación con los países vecinos, los datos reportados por Bantar *et al.*, 2009 y García *et*
872 *al.*, 2012 sugieren que en Colombia la frecuencia del fenotipo BLEE en *E. coli* estaría por
873 debajo de la detectada en Venezuela, Argentina y Chile, y en *K. pneumoniae*, se ubicaría
874 después de Perú, Venezuela y Argentina, pero con mayor frecuencia de resistencia que Chile
875 (González y Cortés, 2013).

876

877 Las regiones del país que reportan estudios corresponden a Bogotá, Valle del Cauca,
878 Medellín, Montería y Barranquilla. La resistencia por betalactamasas de espectro extendido
879 (BLEE), así como a los carbapenémicos se reporta en el país desde el año 1997. La tasa
880 máxima de perfil BLEE reportada en el país está en 22% para *E. coli*, y 26% para *K.*
881 *pneumoniae* (INS, 2009). Aunque las enzimas TEM y SHV han estado presentes, la clase
882 predominante en la mayoría de aislamientos en Colombia, tanto hospitalarios como en la
883 comunidad, ha sido CTX- M (Villegas *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2012).

884

885 Hay una evidente falta de información con respecto a las cepas bacterianas productoras de
886 BLEE y su transmisión a los humanos a través de la cadena alimentaria. La presencia de
887 enterobacterias productoras de BLEE en el ganado lechero y la producción agrícola primaria

888 en Colombia se desconoce. Dada la situación colombiana de altos residuos de antibióticos
889 en la leche (25% de restos de antibióticos en la leche cruda) (Mattar *et al.*, 2009), esto podría
890 estar asociado con la aparición de bacterias resistentes y convertirse en un riesgo para la
891 salud pública (Mattar *et al.*, 2009) ya que se evidencia la falta de control sobre el uso
892 racional de estas moléculas.

893

894 **Consumo de antibióticos en Colombia**

895 En un estudio realizado por Wirtz *et al.*, 2010 se presentaron las tasas nacionales de
896 utilización de antibióticos en ocho países latinoamericanos, se analizaron los datos de las
897 ventas al por menor de antibióticos orales e inyectables entre 1997 y 2007. En 1997, México
898 tuvo el mayor consumo de antibióticos seguido de Argentina y Chile. Los tres países con la
899 utilización más baja en 1997 fueron Perú, Brasil y Uruguay. Para el año 2007, Argentina y
900 Venezuela encabezaron la lista de países en el uso de antibióticos, seguido de Perú, México,
901 y Chile. Significativamente menor era el uso de antibióticos en Uruguay, Colombia, y Brasil,
902 con las tasas de utilización más bajas de los ocho países estudiados.

903

904 Un observacional descriptivo realizado por Machado-Alba y González-Santos, 2009
905 determinó que los antibióticos más vendidos para administración oral fueron las penicilinas
906 (amoxicilina dicloxacilina), seguidos de cefalosporinas de primera generación y sulfonamidas.
907 El grupo de antibióticos que más se utilizó por vía parenteral fue el de las penicilinas
908 (penicilina G benzatínica) y le siguieron en importancia los aminoglicósidos (gentamicina).
909 Los otros grupos utilizados por vía parenteral fueron cefalosporinas, los carbapenémicos, la
910 vancomicina, y quinolonas. La ciudad con la tasa de prescripción de antibióticos más alta fue
911 Ibagué y las tasas más bajas, se reportaron en Bogotá y Medellín.

912

913 En cuanto al consumo de antibióticos en animales en Colombia, la información es escasa. En
914 un estudio descriptivo transversal realizado en la clínica de pequeños animales en la
915 Universidad Nacional de Colombia sobre los hábitos de prescripción de medicamentos, se
916 encontraron ocho grupos farmacológicos de antibióticos asociados a los tratamientos, de los
917 cuales los más frecuentemente usados fueron los beta-lactámicos (penicilinas y
918 cefalosporinas); esto concordó con lo encontrado en Medellín y Pasto donde este grupo

919 farmacológico también fue el más utilizado, con una mayor cantidad de kilogramos vendidos
920 (Cabrera García 2011).

921

922 En cuanto a ganadería de leche y carne, la distribución del uso de antibióticos es
923 desconocida. Teniendo en cuenta que Colombia es el tercer productor de leche en Sur
924 América, el sexto en América y el 23º en el mundo y que se tiene un consumo per cápita
925 nacional de 143 litros de leche/año (Decreto 1880 de 2011, Ministerio de la Protección
926 Social), se deben adelantar estudios que cuantifiquen la cantidad de antibióticos usados en la
927 producción de leche y poder dimensionar como estos pueden afectar la salud humana.

928

929

930

931 **Cuerpo del trabajo**

932

933 Los resultados de la investigación fueron presentados además en los siguientes eventos:

934 1st International Caparica Conference in Antibiotic Resistance. Enero 26, 27 y 28 de 2015.

935 Costa de Caparica, Setubal, Portugal. Modalidad póster

936 56th Food Hygiene Congress. Septiembre 29 a octubre 2 de 2015. Garmisch-Partenkirchen,

937 Alemania. Modalidad póster

938 XIII Encuentro Nacional y VI Internacional de los investigadores de las ciencias pecuarias –

939 ENICIP. Octubre 19 y 20 de 2015. Medellín, Antioquia, Colombia. Modalidad ponencia.

940

941 **Artículo para publicación**

942 Este artículo fue sometido a evaluación en la Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

943 para su publicación.

944

945

946 **Ocurrence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing**

947 ***Enterobacteriaceae* in bulk tank milk samples of bovine dairy farms in Antioquia, Colombia**

948

949 **Ocurrencia y factores de riesgo de *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro**

950 **extendido (BLEE) en muestras de tanques de leche de fincas lecheras del municipio de**

951 **Entrerríos, Antioquia, Colombia**

952

953 **Ocorrência e fatores de risco de espectro estendido beta-lactamase (ESBL) -producing**

954 ***Enterobacteriaceae* em amostras de leite de tanque de rebanhos de bovinos leiteiros em**

955 **Entrerríos, Antioquia, Colombia**

956

957

959 **Summary**

960 **Background:** Antibiotic resistance is Spreading worldwide, is important to evaluate whether foods of
961 animal origin constitute a reservoir of resistance genes. **Objective:** The aim of the present study was to
962 assess the occurrence and characterize Extended Spectrum Beta Lactamase-producing
963 Enterobacteriaceae (ESBL-E) from bulk tank milk samples of dairy farms located in Entrerríos,
964 Antioquia, Colombia. **Methods:** A total of 120 randomly selected raw milk samples (one bulk tank
965 milk sample per dairy farm) were collected in September and October of 2013. For the screening of
966 presumptive ESBL-E a commercial chromogenic agar was used. The identification of genus and
967 species of isolates was performed using a commercial biochemical identification kit. ESBL production
968 was confirmed using the double disc synergy test. An antimicrobial susceptibility test was performed
969 by the agar disc diffusion method and the automatized broth microdilution method. ESBL-positive
970 isolates were analyzed for the presence of *bla* genes by PCR and sequencing. For the exploration of
971 risk factors, information on dairy farm management practices was recorded using a questionnaire and
972 the associations of predictors and results were tested by a logistic regression analysis. **Results:** ESBL-E
973 were isolated from 3.3% (4/120; IC 95% 3.0 – 3.5%) of the bulk tank milk samples and dairy farm size
974 was the only factor found associated with an increase of their presence (OR 11.5; 95% CI 1.14 –
975 115.54; p=0.038). All isolates were resistant to several antibiotics and harbored *bla*CTX-M-96
976 (alternate name CTX-M-12a) enzymes. **Conclusion:** although a low apparent frequency of ESBL-E
977 was observed, the presence of these resistant bacteria in foods of animal origin may constitute a risk to
978 public health and must remain under investigation.

979 **Keywords:** *Antibiotic resistance, CTX-M-12a, livestock, public health, raw milk.*

980

981

982 **Resumen**

983 **Antecedentes:** La resistencia a antibióticos se está diseminando en el mundo, es importante evaluar si
984 los alimentos de origen animal constituyen un reservorio de genes de resistencia. **Objetivo:** Evaluar la
985 presentación y caracterizar Enterobacteriaceae productoras de BLEE (E-BLEE) a partir de muestras de
986 leche de tanque de hatos lecheros localizados en Entrerríos, Antioquia, Colombia. **Métodos:** 120
987 muestras de leche cruda (una muestra por tanque de leche) de hatos lecheros seleccionados al azar
988 fueron colectadas en septiembre y octubre de 2013. Para el tamizaje de presuntiva E-BLEE, se utilizó

989 un agar cromogénico comercial. La identificación de los aislamientos se realizó utilizando un kit de
990 identificación bioquímica comercial. La confirmación de la producción de BLEE fue confirmada
991 usando la prueba de sinergia de doble disco. La susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada por el
992 método de difusión de disco en agar y por el método de microdilución en caldo automatizado.
993 Aislamientos positivos para BLEE fueron analizados para la presencia de genes *bla* por PCR y
994 secuenciación. Para la exploración de los factores de riesgo, la información sobre las prácticas de
995 manejo del hato se registró usando un cuestionario y la asociación de los predictores y los resultados
996 fueron probados mediante un análisis de regresión logística. **Resultados:** E-BLEE fueron aisladas de
997 3,3% (4/120; IC 95% 3.0 – 3.5%) de las muestras de leche de tanque y el tamaño del hato fue el único
998 factor que se encontró asociado con un incremento en su presencia (OR 11.5; 95% CI 1.14 – 115.54;
999 $p=0.038$). Todos los aislamientos fueron resistentes a varios antibióticos y albergaban enzimas *bla*
1000 CTX-M-96 (nombre alternativo CTX-M-12a) **Conclusión:** Aunque se observó una baja frecuencia
1001 aparente de E- BLEE, la presencia de estas bacterias resistentes en los alimentos de origen animal
1002 puede constituir un riesgo para la salud pública y debe seguir siendo investigada.

1003 **Palabras clave:** *CTX-M-12a, ganadería, leche cruda, resistencia a los antibióticos, salud pública.*

1004

1005 **Resumo**

1006 **Antecedentes:** A resistência aos antibióticos está se espalhando rapidamente em todo o mundo É
1007 importante avaliar se os alimentos de origem animal constituem um reservatório de genes de
1008 resistência. **Objetivo:** Avaliar a ocorrência e caracterizar Enterobacteriaceae produtoras de Espectro
1009 Estendido Betalactamases (ESBL-E) de amostras de leite do tanque de rebanhos leiteiros. **Método:** Um
1010 total de 120 amostras leite cru (uma amostra por leite do tanque) de explorações leiteiras selecionados
1011 aleatoriamente localizadas no município de Entrerriós, Antioquia, Colômbia, foram coletados em
1012 setembro e outubro de 2013. Para o rastreio da presumíveis ESBL- E foi utilizado um meio de ágar
1013 cromogénico comercial. A identificação das espécies de género e isolados foi realizada utilizando um
1014 kit comercial da identificação bioquímica. Produção de ESBL foi confirmada pelo teste de disco dupla
1015 sinergia. Um teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão em disco de
1016 ágar e método de microdiluição em caldo automatizado. Isolados ESBL-positivos foram analisados
1017 para a presença dos genes *bla* por PCR e sequenciação. Para a exploração de fatores de risco, as
1018 informações sobre as práticas de gestão do rebanho foi gravado utilizando um questionário e as
1019 associações de preditores e os resultados foram testados por uma análise de regressão logística.
1020 **Resultados:** ESBL Enterobacteriaceae foram isoladas de 3,3% (4/120; IC 95% 3,0-3,5%) das amostras

1021 de leite do tanque e tamanho do rebanho foi o único fator encontrado associado com um aumento na a
1022 sua presença (OR 11,5; 95% CI 1,14-115,54; p =0,038). Todos os isolados foram resistentes aos vários
1023 antibióticos e albergava bla enzimas CTX-M-96 (nome alternativo CTX-H-12a). **Conclusão:** Embora
1024 tenha sido observado uma baixa frequência aparente de ESBL-E, presenças destas bactérias resistentes
1025 nos alimentos de origem animal podem constituir um risco para a saúde pública e deve permanecer sob
1026 investigação.

1027 **Palavras-chave:** CTX-M-12A, de saúde pública, leite cru, gado, resistência aos antibióticos.

1028

1029 **Introduction**

1030

1031 Antibiotic resistance is expanding rapidly throughout the world and has become a problem in both
1032 human and veterinary medicine (FDA, 2012; Reist *et al.*, 2013). The emergence of this resistance in
1033 bacteria found in animals and their products has stimulated considerable interest because of the
1034 potential for the transfer of resistance determinants to the human population (McDermott *et al.*, 2002).

1035

1036 One of the greatest concerns is the rapid increase of bacterial resistance by the production of extended-
1037 spectrum beta-lactamases (ESBLs), which reduce the efficacy of a wide range of beta-lactam
1038 antibiotics, such as third-generation cephalosporins and monobactams (Philippon *et al.*, 1989; Bush,
1039 2010). This resistance is based on genes of chromosomal or plasmidic origin that encode enzymes that
1040 inactivating these compounds by hydrolysis of their beta-lactam ring (Paterson and Bonomo, 2005;
1041 Reist *et al.*, 2013). These genes can be easily transferred between bacteria through mobile genetic
1042 elements, which often carry additional genes for resistance to other groups of antibiotics,
1043 compromising the efficacy of treatments for infections caused by resistant bacteria (Smet *et al.*, 2010).

1044 Until the nineties the most prevalent ESBL in the world were Temoniera (TEM) and sulfhydrylvariable
1045 (SHV) type associated mainly to hospital outbreaks caused by *Klebsiella (K.) pneumoniae*. However,
1046 since 2000, the enzyme Cefotaxime-Munich (CTX-M) became one of the most frequent and

1047 *Escherichia (E.) coli* producing ESBL emerged as an important pathogen in the community (Blanco *et*
1048 *al.*, 2015).

1049

1050 CTX-M isolates have been found in various species of Enterobacteriaceae from different geographic
1051 areas: mainly during nosocomial outbreaks that occurred in Japan, Europe, South America, Africa,
1052 China, Korea and United States (Villegas *et al.*, 2004). In 2003, a study conducted in three different
1053 Colombian hospitals from the cities of Bogotá, Medellín, and Cali detected isolates from *K. oxytoca*, *K.*
1054 *pneumoniae*, and *E. coli* that harbored CTX-M enzymes, this study confirmed that CTX-M enzymes
1055 also occur in Colombia (Villegas *et al.*, 2004). Further studies in Colombia indicated that this antibiotic
1056 resistance patterns from several hospital isolates have spread, especially in Gram-negative bacteria
1057 (Sánchez *et al.*, 2008; Villegas *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2013 Amado *et al.*, 2014; González and Cortés,
1058 2014; Blanco *et al.*, 2015).

1059

1060 The entry of ESBL-producing Enterobacteriaceae in the food chain and environment could be
1061 considered a possible interface for the exchange of resistance genes between humans and animals
1062 (WHO, 2001; Walsh and Fanning, 2008; EFSA, 2011). Raw milk, for example, can be contaminated
1063 intramammary with Enterobacteriaceae during mastitis processes, directly through animal feces or
1064 indirectly during milking through milkers or milking equipment (Dahmen *et al.*, 2013), also, raw milk
1065 can be contaminated by the contact of the cows with feces in the farm environment such as pens
1066 (Ferens and Hovde, 2011). However, after pasteurization, all pathogenic microorganisms, including
1067 multi-resistant bacteria, are destroyed, making milk and other dairy products generally safe for human
1068 consumption (Leedom, 2009; Lejeune and Rajala-Schultz, 2009). However, raw milk is still used by a
1069 large number of farmer families and by a growing segment of the population who believe that raw milk
1070 is generally safe and imparts beneficial health effects that are destroyed by pasteurization (Zeinhoma *et*

1071 *al.*, 2014). According to data from the Ministry of Agriculture and Rural Development of Colombia,
1072 59% of the total volume of milk produced in Colombia is intended for commercialization through
1073 intermediaries, processing in estates, and self-consumption, among others, and only the remaining 41%
1074 is processed by the dairy industry (Decree 1880 of 2011, Ministry of Social Protection). Thus, the
1075 transmission of ESBL-producing Enterobacteriaceae to humans can occur through direct contact and/or
1076 the ingestion of foods contaminated with ESBL-producing strains, among other routes (Wooldridge,
1077 2008; Verraes *et al.*, 2013).

1078

1079 In other hand, resistance to wide-spectrum antibiotics such as cephalosporins is increasingly being
1080 reported among food-producing animals, and foods of animal origins can be considered a possible
1081 reservoir of ESBLs (Mesa *et al.*, 2006; Xian-Zhi *et al.*, 2007; Carattoli, 2008; Leverstein-van Hall *et*
1082 *al.*, 2011). The excessive or inappropriate use of antibiotics for the well-being of food-producing
1083 animals can generate adaptation of bacteria to antimicrobials (FAO, 2011); thus, it has become a matter
1084 of great importance for health authorities (WHO, 2001; EFSA, 2011).

1085

1086 The presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in dairy animals in Colombia is unknown.
1087 Although there are policies restricting the sale of antimicrobials to ensure human and animal health,
1088 compliance is minimal, which facilitates the appearance of resistance (Machado-Alba and González-
1089 Santos, 2009; Vacca *et al.*, 2011). Thus, it is necessary to investigate the frequency of multi-resistant
1090 bacteria in foods of animal origin and to establish the possible role of dairy farms in their dissemination
1091 (Smet *et al.*, 2010; Timofte *et al.*, 2014).

1092

1093 This study aims to assess the presence and characterize ESBL-producing Enterobacteriaceae from bulk
1094 tank milk samples of dairy farms from the municipality of Entrerriós, Antioquia, Colombia,

1095 determining the frequency and exploring potential risk factors associated with the presence of these
1096 bacteria in the bulk tank milk.

1097

1098 **Materials and Methods**

1099 *Location*

1100 This study was performed in the municipality of Entrerríos, which belongs to the Northern region of
1101 the department of Antioquia, Colombia. Of all the regions, the Northern region has the greatest milk
1102 production in Antioquia. The municipality of Entrerríos has an average temperature of 16°C and is
1103 located at an altitude of 2,300 m and approximately 60 km north of Medellín, the capital of the
1104 department of Antioquia. Dairy farming is the most important economic activity in the municipality,
1105 given the advantages associated with the road network and the close location of the municipality to the
1106 metropolitan area of Valle de Aburrá (Gobernación de Antioquia, 2013). Dairy farms are oriented
1107 100% towards milk production, and milk production is performed in all districts of the municipality.
1108 The average daily milk production is 238,854 liters (Gobernación de Antioquia, 2007).
1109 Commercialization of milk is performed by 2 large companies representing the dairy industry, which
1110 participate as intermediaries between the producers and consumers. A percentage of the milk is sold to
1111 2 cheese makers of the municipality who are the processors of pasteurized milk, cheese, “quesito”
1112 (little cheese) and butter; the remaining percentage is destined for domestic consumption and the
1113 feeding of other animals (Gobernación de Antioquia , 2013).

1114

1115 *Selection of farms*

1116 From a total of 952 bovine dairy farms in the municipality of Entrerríos, calculated based on the foot-
1117 and-mouth disease vaccination records in 2013 (Secretary of Agricultural Technical Assistance and
1118 Development of the Municipality of Entrerríos), 120 dairy farms were initially randomly selected. This
1119 number of farms was calculated based on an expected proportion of frequency of 0.10 at farm level
1120 (Odenthal *et al.*, 2013), a 90% confidence level and a maximum acceptable error rate of 0.10. The
1121 number of dairy farms to be sampled from each district was determined by proportional allocation.
1122 Only farms with independent bulk tank milk could be selected, that is, farms that deposited their milk
1123 in a collective or community tank were not considered. The owners of the farms were contacted by
1124 phone to tell them about the study and ask their willingness to participate. In cases where there was no
1125 response or the response was negative, the farms were excluded and randomly substituted by others
1126 that met the same conditions. An additional list of possible participating dairy farms was randomly

1127 selected to replace farms where the milk had already been collected by the milk tank truck on the
1128 sampling day.

1129

1130 *Sample collection*

1131 The bulk tank milk samples were collected in the months of September and October of 2013. Each milk
1132 sample (30 ml) was obtained directly from the tank in a sterile container. The samples were
1133 immediately cooled after being taken and were transported under refrigeration to the laboratory (Toro,
1134 2012), where they were kept refrigerated and were processed within 24 hours of sampling.

1135

1136 *Isolation and identification of ESBL-producing Enterobacteriaceae*

1137 For the selective isolation (screening) of ESBL-producing bacteria, 100 µl of the milk sample was
1138 spread onto chromogenic agar chromID™ ESBL (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), which was
1139 incubated at 37°C for 20 to 24 h. The samples that displayed growth of colonies with pink-burgundy,
1140 green, blue or brown colorations were considered presumptive ESBL-producing Enterobacteriaceae. In
1141 each sample, one colony of each coloration was taken and spread onto McConkey agar (bioMérieux,
1142 Rio de Janeiro, Brazil) for subsequent identification. Each isolate was replicated weekly in McConkey
1143 agar for preservation. In samples where there was growth of various colonies of the same coloration,
1144 the form of the colonies was compared, and 2 colonies of different morphology were taken. To identify
1145 the genus and species of Enterobacteriaceae, the commercial BD BBL™ Crystal™
1146 Enteric/Nonfermenter ID Kit (E/NF, Sparks, MD, USA) was used according to the manufacturer's
1147 instructions. Only glucose fermenting colonies were selected, whereas the non-fermenting colonies
1148 were discarded.

1149

1150 *Confirmation of ESBL production*

1151 ESBL production was confirmed based on the double disk synergy test. For this, Mueller-Hinton agar
1152 (bioMérieux, Rio de Janeiro, Brazil) was inoculated with a bacterial suspension of 0.5 turbidity pattern
1153 in the McFarland standard, and discs of cefotaxime (CTX, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg),
1154 ceftriaxone (CRO, 30 µg), cefepime (FEP, 30 µg) and aztreonam (ATM, 30 µg) were placed 20 mm
1155 center to center from a central disk of amoxicillin/clavulanic acid (AMC). The agar inoculated with a
1156 bacterial suspension (Mc Farland turbidity pattern of 0.5) and discs were incubated at 37°C for 18-24
1157 hours. An increase in the zone towards the AMC was considered positive for ESBL production

1158 according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2014 Document
1159 M24). Reference strains of *E. coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 and *K.*
1160 *pneumoniae* ATCC 700603 were used as negative and positive controls, respectively, in the double
1161 disk synergy test.

1162

1163 *Antimicrobial susceptibility test*

1164 The antimicrobial susceptibility test was performed by the disc diffusion method in agar, according to
1165 the recommendations of the CLSI (2015). For this purpose, the bacterial colonies were suspended in
1166 brain heart broth (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and adjusted to a McFarland turbidity pattern of
1167 0.5 to be inoculated in a plate of Mueller-Hinton agar. Discs of the following antibiotics were
1168 evaluated: ampicillin (10 µg), norfloxacin (10 µg), imipenem (IPM, 10 µg), amoxicillin (10 µg),
1169 cefoxitin (FOX, 30 µg), cefuroxime (30 µg), ciprofloxacin (CIP, 30 µg), chloramphenicol (30 µg),
1170 doxycycline (30 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), *trimethoprim/sulfamethoxazole* (1.25/23.75 µg),
1171 erythromycin (15 µg) and cephalexin (30 µg) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). After being
1172 incubated for 18-24 h, inhibition halos (margin of the zones where no visible growth was observed)
1173 were measured in millimeters and interpreted as sensitive, intermediate or resistant according to the
1174 standards of the CLSI, 2015.

1175

1176 *Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)*

1177 The antimicrobial MIC for isolates of ESBL-producing Enterobacteriaceae was determined by the
1178 broth microdilution method using the Vitek 2 07.01 system (bioMérieux). A total of 14 antibiotics were
1179 evaluated and interpreted according to the standards of the CLSI 2008: ampicillin/sulbactam (SAM),
1180 FOX, CAZ, CRO, FEP, doripenem (DOR), ertapenem (ETP), IPM, meropenem (MEM), amikacin
1181 (AMK), GEN, CIP, tigecycline (TGC) and colistin (COL).

1182

1183 *Characterization of ESBL by polymerase chain reaction (PCR)*

1184 Positive ESBL isolates were additionally analyzed for the presence of *bla* genes of the ESBL subtypes
1185 TEM, SHV and CTX-M (groups 1, 2, 8, 9 or 25) by PCR using primers and conditions as described
1186 previously (Pitout *et al.*, 1998; Batchelor *et al.*, 2005; Woodford *et al.*, 2006). Bacterial DNA was
1187 isolated with the innuPREP bacteria DNA kit (Analytikjena, Berlin, Germany) according to the

1188 manufacturer's instructions. Two strains, *K. pneumoniae* ATCC 700603 (which harbors a *bla*SHV
1189 gene) and an isolate of *K. pneumoniae* (which harbors both *bla*CTX-M and *bla*TEM genes) from the
1190 collection of strains of the Department of Milk Sciences of the University of Giessen, were used as
1191 positive ESBL standard strains. An ESBL non-producing strain *E. coli* ATCC 25922 was used as a
1192 negative control. PCR products were determined by electrophoresis in a 2% agarose gel (Biozym,
1193 Hessisch Oldendorf-, Germany). The DNA molecular scale marker, GeneRuler 100 bp (MBI
1194 Fermentas, St. Leon-Roth, Germany), was used.

1195

1196 *Sequencing of bla genes*

1197 Genes that code for ESBL *bla*TEM, *bla*SHV, and *bla*CTX-M of ESBL-positive isolates were amplified with
1198 primers and PCR conditions as described previously (Pitout *et al.*, 1998; Batchelor *et al.*, 2005). The
1199 resulting amplicons were purified using the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Hilden).
1200 Sequencing was performed in SeqLab (Goettingen, Germany). The results were evaluated using the
1201 BLAST algorithm available at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

1202

1203 *Collection of information on the dairy farms characteristics and management practices*

1204 At the time of bulk tank milk sample collection in each dairy farms, information on the characteristics
1205 and management practices that could be associated with the presence of ESBL-producing
1206 Enterobacteriaceae in bulk tank milk was obtained using a questionnaire (Supplemental material).
1207 Information on variables related to general conditions of the dairy farm, production, sanitation and
1208 hygiene and the use of antibiotics was collected (Tables 1 and 2). The information about CFU values
1209 were obtained from the purchase invoice generated by the milk processing company. The dairy farms
1210 were classified as small farms (≤ 50 cows in milking) and large farms (> 50 cows in milking).

1211

1212 *Case definition*

1213 The bulk tank milk was considered the unit of analysis. A tank was considered positive for the presence
1214 of ESBL-producing Enterobacteriaceae when at least one (1) isolate of Enterobacteriaceae was
1215 confirmed as an ESBL producer.

1216

1217 *Statistical analysis*

1218 The data were stored in Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA) spreadsheets and later were exported
1219 to Stata 12.0 (StataCorp, Texas) for statistical analysis. The data were initially analyzed by descriptive
1220 statistics through measures of central tendency and observation of the frequency distribution. Bivariate
1221 logistic regression analysis was performed to evaluate the associations between the variable, the
1222 presence of ESBL in the tank, and some predictors of interest. Associations with p values <0.25 were
1223 considered significant and were selected for the multivariate model. In the final model, only those
1224 variables with p values <0.05 remained.

1225

1226 Results

1227

1228 *General characteristics of the dairy farms*

1229 The main characteristics of the 120 evaluated dairy farms are summarized in Tables 1 and 2. In total,
1230 60% (72/120) of the sampled farms operated as closed farms; 77.5% (93/120) of the farms had at least
1231 50 cows in milking. In addition, 91% (108/120) of the farms possessed animals of non-bovine species,
1232 with the presence of domestic birds and pigs in 47% (56/119) and 24.4% (29/119) of the farms,
1233 respectively. Moreover, 51.3% (61/119) of the farms had no dunghill tank, and 66.4% (79/119)
1234 reported performing the milking routine following technical recommendations that were focused on
1235 Good livestock practices. Feeding calves waste milk was practiced in 40% (48/120) of the farms, 55%
1236 (66/120) of the farms had one milker and 45% (54/120) of the farms had more than one milker. A total
1237 of 70% (84/120) of producers reported that they used antibiotics formulated by a veterinarian only 50%
1238 of the times or less. The average milk production in the studied dairy farms was $659,000 \pm 449$
1239 liters/day. Additionally, in 75% (90/120) of the farms, the counts of colony forming units (CFUs) and
1240 somatic cells were below 28.000 CFU/mL and 406.000 cells/mL, respectively (Table 2).

1241

Table 1. Selected predictors for exploring risk factors associated with the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in bulk tanks milk of the municipality of Entrerríos (n=120), Antioquia, Colombia

Variable	Category	Frequency	%	Description
Operation of the farm	Open	48	40	Purchase (open) or not (closed) of animals from other farms
	Closed	72	60	

Size of dairy farm	≤50 cows in milking	93	77.5	Number of cows in milking
	>50 cows in milking	27	22.5	
Other production	Birds	56	47	Presence of birds, pigs or other domestic animals in the dairy farms
	Pigs	29	24.4	
	Other	23	19.3	
Milk production	No	11	9.24	Total average daily milk production (liters)
	<370	28	23.33	
	>369 and <850	61	50.83	
Dunghill tank	>849	31	25.83	Presence of a tank to collect fecal matter of the cattle
	Yes	58	48.7	
Milking routine under technical recommendation	No	61	51.3	Realization of milking routine under hygiene standards that good milking practices (GMP) established for which producers have been trained
	Yes	79	66.4	
Destination of waste milk	Feeding calves	48	40	Milk from cows with antibiotic treatment

	Refuse	62	51.67	
	Feeding of other animal species	10	8.33	
Number of milkers	1	66	55	Workers in contact with milking cows
	>1	54	45	
Use of antimicrobials	Cephalosporins	22	19.5	Most frequently used antibiotics to dairy farms animals in the last 12 months
	Tetracyclines	32	28.3	
	sulphonamides	7	6.2	
	Other	59	46	

1242

1243

Table 2. Description of the quantitative variables selected to explore risk factors associated with the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in bulk tanks milk of dairy farms in the Municipality of Entrerriós (n=120), Antioquia, Colombia

Variable	Mean	Standard deviation	Maximum Value	Minimum Value	Percentile	
					25%	75%
Milk production/ dairy farm/day(Liters)	659	449.3	3.480	90	370	850
CFU	29.6	65.7	560	2	6	28
Somatic cells count*	316.8	164.2	800	100	201	406

1244

CFU: colony forming units

1245

* per mL × 1000

1246

* *Arithmetic mean*

1247 *Characteristics of dairy farms with isolates confirmed as ESBL producers*

1248 In total, 75% (3/4) of the farms with isolates positive for ESBL production operated as closed farms, 4
1249 farms had >50 (average 93) cows in milking, 100% of the farms also had horses and pets (dogs and
1250 cats), 50% (2/4) of the farms reported the presence of birds, and pigs were reported in only one farm.
1251 Additionally, 75% (3/4) of the farms had a dunghill tank, and the number of milkers in the positive
1252 farms was different in each farm (1, 3 or 5 milkers). The feeding of calves with waste milk was
1253 reported in 100% of positive farms, and milking was performed under technical recommendations in
1254 75% of positive farms. The use of antimicrobials to treat animals following recommendations of the
1255 veterinarian was reported as *usually* in one farm, *sometimes* in two farms, and *rarely* in more than two
1256 farms. The most frequently used antimicrobials in the past year in these four farms included penicillins
1257 (75%, 3/4), macrolides (50%, 2/4) and tetracyclines and quinolones (25%, 1/4). The 4 farms had an
1258 average production of 1,865 liters/day. The CFU and somatic cell counts were 39.000 CFU/mL and
1259 401,000 cell/mL on average, respectively.

1260

1261 *Presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae*

1262 Bacteria suspicious of producing ESBL were isolated in 6.6% (8/120) of the samples of equal numbers
1263 of screened bulk tank milk. One isolate was obtained in each of the 8 tanks. Of these 8 isolates, 2 non-
1264 fermenting glucose isolates were discarded. Of the 6 remaining isolates, ESBL production was
1265 confirmed in 4; thus, the confirmed apparent frequency of ESBL-producing Enterobacteriaceae in the
1266 bulk tank milk, in this study, was 3.3% (4/120; IC 95%: 3.0 – 3.5%). All of the isolates showed
1267 synergy with at least two of the cephalosporins used and clavulanic acid. The 4 isolates of ESBL-
1268 producing Enterobacteriaceae were identified as *Enterobacter (E) cloacae*, *Serratia (S) fonticola*,
1269 *Escherichia coli* and *Enterobacter (E) cancerogenus* using the Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID kit
1270 (E/NF).

1271

1272 *Antimicrobial susceptibility*

1273 The four ESBL-producing isolates were resistant to ampicillin, amoxicillin, cephalexin, cefuroxime,
1274 erythromycin and trimethoprim/sulfamethoxazole. Conversely, the four isolates were sensitive to FOX,
1275 IPM, CIP and norfloxacin (Table 3). *E. coli* was resistant to eight of the evaluated antibiotics
1276 (ampicillin, amoxicillin, cephalexin, cefuroxime, erythromycin, chloramphenicol, doxycycline and
1277 trimethoprim/sulfamethoxazole) and had the greatest resistance compared to the rest of the isolates. *S.*

1278 *fonticola* had the least resistance to the evaluated antibiotics (6/13) compared to the rest of the isolates
 1279 and was the only isolate in addition to *E. cancerogenus* that displayed sensitivity to gentamicin. *S.*
 1280 *fonticola* and *E. cloacae* were the only isolates sensitive to chloramphenicol and doxycycline.
 1281

Table 3. Antimicrobial susceptibility patterns obtained by the disk diffusion method for 4 isolates of ESBL-producing Enterobacteriaceae in bulk tanks milk in the municipality of Entrerríos, Antioquia, Colombia.

Antibiotics	µg disc	Cutoff mm	<i>Enterobacter cancerogenus</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Serratia fonticola</i>	
			S	R	S	R	S	R	S	R
Ampicillin	10	≥ 17	-	0	-	0	-	0	-	0
Amoxicillin	10	≥ 17	-	0	-	0	-	0	-	0
Cephalexin	30	≥ 18	-	0	-	0	-	0	-	0
Cefuroxime	30	≥ 18	-	0	-	0	-	8	-	0
Cefoxitin	30	≥ 18	20	-	23	-	21	-	23	-
Imipenem	10	≥ 23	30	-	27	-	27	-	29	-
Erythromycin	15	≥ 15	-	0	-	0	-	0	-	0
Chloramphenicol	30	≥ 18	-	0	32	-	-	0	30	-
Gentamicin	10	≥ 15	16	-	-	0	14	-	22	-
Doxycycline	30	≥ 14	-	0	20	-	-	12	20	-
Ciprofloxacin	5	≥ 21	44	-	36	-	28	-	40	-
Norfloxacin	10	≥ 17	30	-	44	-	26	-	28	-
trimethoprim/ sulfamethoxazole	1.25/23.75	≥ 16	-	0	-	0	-	0	-	0

S: sensitive, R: resistant

1282

1283 *Minimum inhibitory concentration (MIC)*

1284 The MIC to 13 antibiotics obtained through the broth microdilution method in the 07.01 Vitek 2
1285 (bioMérieux) for the 4 isolates is shown in Table 4. The only isolate that displayed sensitivity to SAM
1286 was *E. coli*, which had an MIC of 8 mg/ml. For the other 3 isolates, resistance or an intermediate level
1287 was reported. All of the isolates showed sensitivity to DOR, ETP, IPM, MEM, AMK, CIP and TGC
1288 (Table 4). For CRO, all of the isolates yielded a MIC value that was interpreted as resistance. By
1289 contrast, for FEP and CAZ, only *E. coli* was resistant, with a MIC \leq 1 mg/ml (by automatic modification
1290 of the values obtained by the automated expert system Vitek ®) and a MIC \geq 64 mg/ml, respectively.
1291 *S. fonticola* and *E. cloacae* isolates showed resistance to FOX, with a MIC of 16 mg/ml and a MIC \leq 4
1292 mg/ml, respectively. The latter MIC was reported as resistant by automatic modification of values
1293 performed by the Vitek ® system. The only isolate that showed resistance to GEN was *E. cloacae* with
1294 a MIC \geq 16 mg/ml. For the rest of the groups of antibiotics, the MIC varied according to the isolated
1295 bacteria.

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) values obtained by the microdilution method in 07.01 Vitek 2 broth (bioMérieux) for 4 isolates of ESBL-producing Enterobacteriaceae in bulk tanks milk of dairy herds in the municipality of Entrerríos, Antioquia, Colombia

Isolates	Crystal Enteric/ Nonfermenter ID Kit (%)	<i>bla</i> gene s	Antibiotics																											
			SAM		FOX		CAZ		CRO		FEP		DOR		ETP		IPM		MEM		AMK		GEN		CIP		TGC			
			CI	Int	CI	Int	CI	In	CI	In	CI	In	CIM	In	CI	In	CIM	In	CIM	In	CI	In	CI	In	CIM	In	CI	In		
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	0.93	CTX-M96	16	I	≤4	S	4	S	16	R	2	S	≤0.1	S	≤0.5	S	0.5	S	≤0.2	S	≤2	S	≤1	S	≤0.2	S	≤0.5	S		
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.94	CTX-M96	4*	R	≤4	R	≤1	S	16	R	≤1	S	≤0.1	S	≤0.5	S	0.5	S	≤0.2	S	≤2	S	≥16	R	≤0.2	S	≤0.5	S		
<i>Escherichia coli</i>	0.98	CTX-M96	8	S	≤4	S	≥64	R	8	R	≤1	R	≤0.1	S	≤0.5	S	≤0.2	S	≤0.2	S	≤2	S	≤1	S	≤0.2	S	≤0.5	S		
<i>Serratia fonticola</i>	0.76	CTX-M96	≥32	R	16	R	4	S	≥64	R	4	S	≤0.1	S	≤0.5	S	≤0.2	S	≤0.2	S	≤2	S	≤1	S	≤0.2	S	1	S		

Ampicillin/sulbactam (SAM), cefoxitin (FOX), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), cefepime (FEP), doripenem (DOR), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacin (AMK), gentamicin (GEN), ciprofloxacin (CIP), tigecycline (TGC), colistin (COL).

MIC: Minimum inhibitory concentration, Int: Interpretation, S: Sensitive, I: Intermediate, R: Resistant

* values modified by the advanced expert system

Characterization of ESBL by PCR and sequencing of bla genes

Based on the PCR analysis, the four isolates hosted CTX-M genes. All of the isolates were positive for the CTX-M -1 group, and when these were sequenced, all sequences showed strong homology with the CTX-M 96 variant, which is alternatively called CTX-M-12a.

Risk factors

A univariate logistic regression analysis yielded an association between the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae and the size of the farm and between the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae and milk production (Table 5). At the end only the variable *dairy farm size* remained significant in the multivariable model constructed by backward elimination, $p < 0.05$. The odds of having ESBL-producing Enterobacteriaceae in the bulk tank milk were 11.5-fold higher in the farms with more than 50 cows in milking compared to the farms with less than 50 cows in milking ($p < 0.038$).

Table 5. Unconditional logistic regression analysis of risk factors associated with the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in bulk tanks milk of dairy farms in the municipality of Entrerríos, Antioquia, Colombia

Variable	OR	SE	P	95% CI
Operation of the farm	0.49	0.57	0.54	0.04 - 4.84
Milk production	7.39	8.10	0.068	0.86 - 63.27
Dunghill tank	3.27	3.82	0.311	0.33 - 32.40
Feeding of calves with waste milk	2.26	1.81	0.306	0.47 - 10.88
Presence of pigs	1.04	1.23	0.968	0.10 - 10.47
Presence of birds	1.14	1.16	0.892	0.15 - 8.42

Milking routine under technical recommendation	0.49	0.50	0.488	0.06 - 3.63
Number of milkers	1.23	1.25	0.838	0.16 - 9.03
Use of tetracyclines	0.83	0.98	0.881	0.08 - 8.37
dairy farm size	11.49	13.53	0.038	1.14 - 115.54
CFU	2.22	2.26	0.434	0.30 - 16.40
Somatic cells count	1.52	1.54	0.680	0.20 - 11.18

CFU: colony forming units, OR: odds ratio, SE: standard error, p value: significance level, 95% CI: 95% confidence interval

Discussion

The main limitations of this study were the absence of previous investigations on ESBL-producing Enterobacteriaceae in bulk tanks milk in comparable dairy regions of Colombia, which would have estimated frequency according to national productive conditions, and a larger budget, which would allow a larger sample size and include different periods of time. Taking into account the low number of positive isolates, these results should be analyzed in detail and carefully.

In this study, 120 dairy farms with equal numbers of milk cooling tanks located in the Northern municipality of Antioquia, Colombia, were sampled to determine the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in bulk tank milk samples and to explore the risk factors associated with their presence in milk.

Recently, studies of the characteristics and prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in animals have increased in different countries worldwide (Smet *et al.*, 2010; Ohnishi *et al.*, 2013; Timofte *et al.*, 2014; Skočková *et al.*, 2015; Sudarwanto *et al.*, 2015; Odenthal *et al.*, 2016). However, relatively few studies have been conducted in Colombia on antibiotic resistance in food-producing

animals and their products (Donado-Godoy *et al.*, 2015; Jiménez Velásquez *et al.*, 2013; Vanegas López *et al.*, 2012) compared to other countries and to our knowledge, this is the first study conducted to determine the occurrence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in bulk tank milk of dairy farms, specifically raw cow's milk in Colombia.

The frequency of ESBL-producing Enterobacteriaceae reported in this study (3.3%) agrees with other studies conducted from bulk tank milk samples in Switzerland, Brazil, India, the Czech Republic, Indonesia and Germany, which reported prevalences ranging between 0 and 9% (Geser *et al.*, 2012, Nóbrega *et al.*, 2013, Rasheed *et al.*, 2014; Skočková *et al.*, 2015; Sudarwanto *et al.*, 2015; Odenthal *et al.*, 2016). Although the reported occurrences are low, they represent a significant finding that can contribute to clarifying the role that animals and their products have in the dissemination of multi-resistant bacteria in foods of animal origin.

The low frequency of ESBL-producing Enterobacteriaceae in the bulk tank milk of the studied dairy farms could be a result of the high hygiene standards required by milk processing companies in the department of Antioquia for the purchase of raw milk from producers of specialized dairies. Milk payment in Colombia is dependent on quality parameters such as CFU. Milk processing companies pay milk to producers as follows: CFU counts between 0 and 175.000 CFU / ml are considered as milk of very good quality and receive a bonus payment, CFU counts between 175.001 and 200.000 CFU / ml receive neither a bonus payment nor a discount on the price of milk, and counts > 200.001 CFU / ml receive discount on the price of milk (Ministry of Agriculture, 2012). Improving the general hygiene in all stages of production and thereby reducing the microbial load on food products will also reduce the antimicrobial resistance load (Wegener, 2012). It is also possible that the low occurrence of ESBLs in the bulk tank milk of the studied dairy farms it is due to the little use of cephamycins and carbapenems in this dairy farms since the selection pressure that drives ESBL evolution has usually been attributed to the intense use of oxyimino-cephalosporins, mainly 'third-generation' cephalosporins (Gniadkowski, 2001).

Our isolates contrast with the predominant isolates in dairy farms in other geographic areas where *E. coli* and *K. pneumoniae* have been most frequently reported (Odenthal *et al.*, 2016; Sudarwanto *et al.*, 2015; Locatelli *et al.*, 2010; Dahmen *et al.*, 2013; Ohnishi *et al.*, 2013;). However, the relevance of

other bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family could be underestimated because studies have mainly focused on *E. coli* and *K. pneumoniae* (Smet *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2013; Sudarwanto *et al.*, 2015; Odenthal *et al.*, 2016). Anyway, the discovery of these bacteria (*Enterobacter sp* and *Serratia sp*) in milk is striking because usually *Serratia fonticola* is found in a wide array of environments, including drinking water, soil and sewage (Aljorayid *et al.*, 2016) while *Enterobacter* strains tend to colonize hospitalized patients, particularly those treated with antibiotics, and have been associated with infections of burns, wounds, respiratory tract and urinary tract (Puerta-García and Mateos-Rodríguez, 2010).

Although resistance to different antibiotics was detected, both by the disc diffusion method in agar (Kirby-Bauer) and by the microdilution broth method, the sensitivity to different antibiotics belonging to the carbapenems group were still preserved. Carbapenems are the most potent beta-lactam antibiotics because of their wide spectrum (Bush, 2013), and these bacteria are still sensitive to this family of antibiotics, which makes a battery of effective antibiotics available for treating infections caused in humans and animals. However, carbapenems require responsible use to prevent the emergence of resistance.

The susceptibility patterns shown by both tests were similar. Discrepancies between any of the results can be based on the pattern comparison strategy of the Vitek® automated expert system, which compares the observed phenotype with descriptions based on knowledge constructed from data obtained in scientific publications complemented by internal data of each health system (Gerst, 2000); if the system detects a discrepancy between that observed for an antibiotic and the distribution of MICs for the rest of the antibiotics, it has the ability to modify the result, thus providing rapid, automatic and systematic validation of each of the sensitivity results while at the same time minimizing human error (Sanders *et al.*, 2001; Schwaber *et al.*, 2006; bioMérieux, 2015).

Given that the production of the majority of ESBLs is encoded by plasmids, co-resistance to other groups of antibiotics is common (Rybak *et al.*, 2004; Xian-Zhi *et al.*, 2007; Geser *et al.*, 2012). The resistance shown to gentamicin and erythromycin by 100% of the isolates possibly indicates the presence of a gene encoding resistance to antibiotics belonging to the family of aminoglycosides and macrolides simultaneously. Notably, the range of antibiotics for which resistance was acquired is large

and sufficiently worrisome because it shows the severity of the emergence of antibiotic resistance in different pathogens; for example, an infection caused by a strain of *E. coli* such as that found in our study could represent a larger problem because therapeutic options are clearly limited.

Recently, rapid growth in the number of positive isolates with CTX-M enzymes has been observed (Woodford, 2010). CTX-M enzymes constitute a rapidly growing family of ESBLs enzymes with significant clinical impact (Zhao and Hu, 2013). Enterobacteriaceae isolates that are positive for CTX-M have been found in food-producing animals and their products (Carattoli, 2008; Smet *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2013; Randall *et al.*, 2014). The enzymes found in our isolates agree with those frequently reported worldwide. CTX-M-96 (CTX-M-12a alternative name) is one of the 109 variants of CTX-M enzymes that have been identified and assigned in the Lahey database (Zhao and Hu, 2013). CTX-M-96 was reported in *Klebsiella pneumoniae* as host organism and contained in the GenBank® with the code AJ704396 (NCBI 2005). CTX-M-96 had previously reported in *K. pneumoniae* in Chile and Argentina (NCBI, 2015; NCBI 2005). One study published this enzyme as a simulation model for evaluating activity towards oxyimino cephalosporins (Ghiglione *et al.*, 2015). However, with its alternate name, the *bla* gene CTX-M-12a was detected first in Colombia in four isolates: two *E. cloacae* and in two *K. pneumoniae* isolates; one of the *E. cloacae* isolates and one of the *K. pneumoniae* isolates were associated with nosocomial infections while the other one was isolated from the community (Mantilla *et al.*, 2009). Further study revealed that of 33 ESBL positive strains isolated from three Colombian hospitals, 18 harbored group 1 *bla* CTX-M and analysis of DNA sequences revealed the presence of *bla* CTX-M-12a in three of these (Ruiz *et al.*, 2011). These results alert on the policies concerning antibiotic use, distribution, selling and management and other factors that may be associated with the spread of multiresistant organisms causing outbreaks in hospitals and in the community, including the agricultural sector. The presence of the same gene at the hospital level and at the animal production level gives rise to establish future studies to elucidate the relationship between both environments and behavior of antibiotic resistance in Colombia. It is important to conduct more molecular epidemiological studies of bacterial resistance that permit identifying genetic determinants and variants of the ESBL enzyme families that may be associated with changes in the spectrum and that decrease antimicrobial activity in a determined environment.

Relative to risk factors associated with the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae, the risk factors found in our study differ from those reported in previous studies in England and north of Wales, Switzerland and Israel (Snow *et al.*, 2012; Reist *et al.*, 2013; Adler *et al.*, 2015) considering that the independent variables are different in the different studies. In these studies the factors use of third and fourth generation cephalosporins in the last 12 months, operating as an open farm, infrequent cleaning of equipment for feeding of calves and storage of fecal matter in dunghill, animals originating from farms with primary production type “dairy”, animals originating from farms with more than one animal movement per day per 100, lack of a cooling system, increased crowdedness and lack of manure cleaning, antimicrobial prophylaxis and increased frequency of veterinarian visits were associated with the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in cattle (Snow *et al.*, 2012; Reist *et al.*, 2013; Adler *et al.*, 2015).

The risk factor *dairy farm size* associated with the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in our study could be explained on the fact that a larger number of milking cows could represent an increase in the circulation and presentation of diseases in a dairy farm, which would finally lead to the frequent use of antibiotics (Kreusikon, 2011) and/or increased contact between milkers and cows that are sick or being treated. Similarly, the larger number of cows in milking could lead to non-compliance of the stringent routine milking standards between cows (Ruiz Romero, date accessed 23.11.2015)

The fact that most of the dairy farms had reported performing the milking routine following technical recommendations favors the sanitary situation in the municipality because if there is no monitoring of good milking practices, there would be more cases of mastitis and therefore a greater usage of antibiotics with the possibility of developing or acquiring resistance (Oliver y Murinda, 2012). In the same way, situations in which the choice and provision of antibiotics is in the hands of a person other than the veterinarian may cause variations in bacterial sensitivity along with recurrence of the presentation of microorganisms associated with different pathologies as a consequence of not normally performing isolation or evaluation by antibiogram of the causal agent of infection (Betancourt *et al.*, 2003).

In this study, it was possible to determine that feeding calves with waste milk, defined as the milk product of cows with antibiotic treatment -although not found as a risk factor- continues to be a

frequent activity in dairy farms of the municipality, despite currently knowing the association between this practice and increased resistance to antimicrobials in calves (Langford *et al.*, 2003; Aust *et al.*, 2013; Brunton *et al.*, 2014).

The use of bulk tank milk samples could serve to monitor trends in resistance to antibiotics in dairy farms (Berge *et al.*, 2007). Although the presence of ESBL-producing Enterobacteriaceae was not high in this study, the use of antibiotics should be controlled, sanitary measures should be reinforced, and the phenomenon of antibiotic resistance in food-producing animals should continue to be investigated (FDA, 2012). Timely identification of ESBL-producing Enterobacteriaceae strains is essential in the monitoring of the development of antimicrobial resistance and in the implementation of infection control measures for the protection of public health (WHO, 2001).

Conflicts of interest

The authors declare they have no conflicts of interest with regard to the work presented in this report.

References

Adler A, Sturlesi N, Fallach N, Zilberman-Barzilai D, Hussein O, Blum SE, Klement E, Schwaber MJ and Carmeli Y. Prevalence, risk factors and transmission dynamics of ESBL- producing Enterobacteriaceae: a national survey of cattle farms in Israel, 2013. *J. Clin. Microbiol.* 2015 Nov; 53(11):3515-21.

Aljorayid A, Viau R, Castellino, L and Jump R. *Serratia fonticola*, pathogen or bystander? A case series and review of the literatura. Published online 2016 May 24. doi: 10.1016/j.idcr.2016.05.003

Amado NY, Fajardo HD, Ramírez-Rueda RY, González GI. Prevalencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos gramnegativos de una institución de salud de Tunja (Colombia) en el año 2013. *Salud Soc Uptc.* 2014; 1(2):54-60

Archivo Secretaría de Asistencia Técnica Agropecuaria y Desarrollo Comunitario Municipio de Entrerriós, Antioquia, Colombia. Ciclo de vacunación contra fiebre aftosa, Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN) 2013-2.

Aust V, Knappstein K, Kunz HJ, Kaspar H, Wallmann J, Kaske M. Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* Dec; 97(6):1091-103. 2013

Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, Liebana E. blaCTX-M genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1319–1322.

Blanco VM, Maya Juan J, Correa Adriana, Perenguez Marcela, Muñoz Juan S, Motoa Gabriel, Pallares Christian, Rosso Fernando, Matta Lorena, Celis Yamile, Garzón Martha y Villegas María V. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas

por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015.

Berge A C, Champagne S C, Finger R M, Sisco W M. The use of bulk tank milk samples to monitor trends in antimicrobial resistance on dairy farms. *Foodborne Pathog Dis*. Winter; 4(4):397-407. 2007

Betancourt O, Scarpa C y Villagrán K. Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX región de Chile. *Revista Científica FCV-LUZ*. 2003, 13 (5): 413-417.

Biomerieux, 2015. Una Combinación Ganadora para Detectar Resistencias. Disponible en: http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_37.

Brunton L A, Reeves H E, Snow L C, Jones J R. A longitudinal field trial the impact of feeding waste milk containing antibiotic residues on the prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* in calves. *Prev Vet Med*. Nov 15; 117(2):403-12. 2014

Bush, K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1277 84-90. 2013

Bush, K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care*. 14(3): 224. 2010

Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Micro biol Infect*. 14(1):117–123. 2008

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

Dahmen S, Métayer V, Gay E, Madec JY, Haenni M. Characterization of ESBL-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. *Veterinary microbiology* 162 793-799. 2013

Donado-Godoy P, Castellanos R, León M, Arevalo A, Clavijo V, Bernal J, León D, Tafur M. A, Byrne B. A, Smith W. A and Perez-Gutierrez E. The Establishment of the Colombian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (COIPARS): A Pilot Project on Poultry Farms, Slaughterhouses and Retail Market. *Zoonoses and Public Health* 62 (suppl. 1) 58–6. 2015

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* 9, 2322. 2011

Ferens Witold A. and Hovde Carolyn J. *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. *Foodborne Pathog Dis.* 2011 Apr; 8(4): 465–487.

Food and Drug Administration (FDA). Center for Veterinary Medicine. The judicious use of medically important antimicrobial drug in food-producing animals. Guidance for industry. April 13, 2012

González, L and Cortés, JA. (2014). Revisión sistemática de la farmacorresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. *Biomédica*, 34(2), 180-197

Gerst, J. Detección de la Resistencia a los antibióticos con los sistemas vitek y vitek 2 de biomérieux. Capítulo del libro: Resistencia antimicrobiana en las Americas: magnitud del problema y su contención. Organización Panamericana de la Salud. 2000

Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res. 2012 Mar 7; 8:2.

Ghiglione B, Rodríguez MM, Herman R, Curto L, Dropa M, Bouillenne F, Kerff F, Galleni M, Charlier P, Gutkind G, Sauvage E, Power P. Structural and Kinetic Insights into the "Ceftazidimase" Behavior of the Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-96. Biochemistry 2015 Aug 18; 54(32):5072-82.

Gniadkowski, M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. Clin Microbiol Infect. 2001 Nov; 7(11):597-608.

Gobernación de Antioquia , 2013. Economía. Municipio de Entrerriós. Disponible en: <http://enterrerios-antioquia.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mfVereda-1-&m=f#economia>

Gobernación de Antioquia , 2007. Perfil subregional norte antioqueño. Disponible en: http://www.antioquia.gov.co/antioquiav1/organismos/planeacion/descargas/perfiles/Perfil%20Subregional_Norte.pdf

Jiménez Velásquez S; Torres Higuera L D; Rodríguez Bautista J L; García Castro F E; Patiño Burbano R E. Identificación de aislamientos meticilino resistentes de *Staphylococcus sp* provenientes de hatos lecheros del Departamento de Cundinamarca. RevColombCiencPecu; 26: Suplemento. 2013

Kreusikon, K. 2011. Usage of antimicrobials on 60 dairy farms in Northern Germany and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and extended spectrum betalactamases producing Escherichia coli (ESBLs-producing E. coli) isolated from bulk tank milk samples. PhD Diss. Freie Universität Berlin, Berlin, Germany.

Langford F, Burstyn U, Fisher L, Shelford J and Weary D. Feeding waste milk to calves and antibiotic resistance. 21st Annual Western Canadian Dairy Seminar, Red Deer, AB March 11-14, 2003.

Leal AL, Cortés JA, Arias G, Ovalle MV, Saavedra SY, Buitrago G, Escobar JA. Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Enterobacteriaceae causantes de infección del tracto urinario de inicio comunitario en hospitales de Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(5):298–303

Leedom, John (2009). Comparing the Food Safety Record of Pasteurized and Raw Milk Products. Disponible en: <http://www.foodpoisonjournal.com/food-poisoning-information/comparing-the-food-safety-record-of-pasteurized-and-raw-milk-products/#.V7Yrfyh97IW>. Consultado el: 17.08.2016

Lejeune JT, Rajala-Schultz PJ. Food safety: unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan 1;48(1):93-100. doi: 10.1086/595007.

Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect*, 17(6):873-80. 2011

Locatelli C, Scaccabarozzi L and Pisoni G. CTX-M1 ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* Isolated from Cases of Bovine Mastitis. *Clin. Microbiol* vol. 48 no. 10 3822-3823. 2010

Machado-Alba J E and González-Santos D M. Dispensing antibiotics to outpatients in a Colombian population. *Rev salud pública*. 11 (5): 734-744, 2009.

Mantilla Anaya JR, Barreto Hernández E, Reguero Reza MT, Velandia Rodríguez DA. Identifying cefotaximase genes in Enterobacteriaceae hospital isolates by PCR-SSCP. *Rev. colomb. biotecnol* [Internet]. 2009 June; 11(2): 57-65

Mesa R J, Blanc V, Blanch A R, Cortés P, González J J, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola M T, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, Prats G, Navarro F J. Extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *AntimicrobChemothe*, 58:211-215. 2006

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Resolución 000017: Sistema de pago de leche cruda al productor. Bogotá, Colombia. 2012

Ministerio de la Protección Social. Decreto 1880 del 27 de mayo de 2011. Bogotá, Colombia.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 616 del 28 de febrero de 2006. Bogotá, Colombia.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2005). CTX-M-12a enzyme *Klebsiella pneumoniae*. GenBank: CAG28417.1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/47109376>. Consultado el: 20.04.2016

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2015). *Klebsiella pneumoniae* strain K-837 beta-lactamase CTX-M-96 (blaCTX-M) gene, blaCTX-M-96 allele, complete cds. GenBank: KR811026.1. Disponible en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/940376853?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=C1WP1YKG01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/940376853?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=C1WP1YKG01R). Consultado el 20.04.2016

Nóbrega D B, Guiduce M V.S, Guimarães F F, Ribol D F. Molecular epidemiology and extended-spectrum β -lactamases production of *Klebsiella pneumoniae* isolated from three dairy herds. *Pesq. Vet. Bras.* 33(7):855-859, July 2013.

Odenthal S, Akineden Ö, Usleber E. Extended-spectrum betalactamase (ESBL)-produzierende Enterobacteriaceae in Anlieferungsmilch aus hessischen Milchviehbetrieben. En: 54. Arbeitstagung der Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen (Alemania), Septiembre 24 – 27 de 2013.

Ohnishi A T, Okatani H, Esaki K, Harada T, Sawada M, Murakami K, Marumo Y, Kato R, Sato K, Shimura N, Hatanaka and Takahashi T. Herd prevalence of Enterobacteriaceae producing CTX-M type and CMY-2 β -lactamases among Japanese dairy farms. *Journal of Applied Microbiology* 115, 282–289, July 2013.

Ohnishi M, Okatani A T, Harada K, Sawada T, Marumo K, Murakami M, Sato R, Esaki H, Shimura K, Kato H, Uchida N, and Takahashid T. Genetic Characteristics of CTX-M-Type Extended-Spectrum- β -Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae Involved in Mastitis Cases on Japanese Dairy Farms, 2007 to 2011. *J Clin Microbiol. Sep*; 51(9): 3117–3122. 2013

Oliver SP and Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012 Jul;28(2):165-85.

Paterson D L, and Bonomo R A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18:657-686. 2005

Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. β -lactamases responsible for resistance to expanded spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1350–1354

Puerta-García, A and Mateos-Rodríguez, F. Enterobacterias. *Medicine.* 2010; 10(51):3426-31

Randall L, Heinrich K, Horton R, Brunton L, Sharman M, Bailey-Horne V, Sharma M, McLaren I, Coldham N, Teale C, Jones J. Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. *Res Vet Sci* 2014; 96:15–24.

Rasheed M U, thajuddin N, ahamed P, teklemariam Z and Jamil K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56(4):341-346, July-August, 2014.

Reist M, Geser N, Hachler H, Scharrer S, Stephan R. ESBL-Producing Enterobacteriaceae: Occurrence, Risk Factors for Fecal Carriage and Strain Traits in the Swiss Slaughter Cattle Population Younger than 2 Years Sampled at Abattoir Level. PLOS ONE Volume 8 Issue 8 e 71725. 2013

Ruiz Romero R A. Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. Disponible en: http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf. Consultado 22.11.2015

Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martinez E, Rosso F, Muñoz M, Quinn JP., Canton R and Villegas MV. First Characterization of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 Clones Causing Community-Onset Infections in South America. Journal of clinical microbiology, May 2011, p. 1993–1996 Vol. 49, No. 5

Randall L, Heinrich K, Horton R, Brunton L, Sharman M, Bailey-Horne V, Sharma M, McLaren I, Coldham N, Teale C, Jones J. Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of extended- spectrum b-lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. Res Vet Sci 2014;96:15–24.

Rybak M J, Pharm D. Resistance to Antimicrobial Agents: An Update. Supplement to pharmacotherapy Volume 24, Number 12, 2004.

Sánchez L, Ríos R, Máttar S. Detection of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in a clinic in Villavicencio, Colombia. Infect. vol.12 no.3 Bogotá July/Sept. 2008

Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Cavalieri SJ, Shubert C, Thomson KS, Boeufgras JM, and Sanders WE. Potential impact of the VITEK 2 system and the Advanced Expert System on the clinical laboratory of a university-based hospital. J. Clin. Microbiol. 2001;39:2379-2385.

Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Bavarian Dairy and Beef Cattle Farms. *Applied and Environmental Microbiology* p. 3027–3032 Volume 79 Number 9. 2013

Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwartz D, and Carmeli Y. Utility of the VITEK 2 Advanced Expert System for Identification of Extended-Spectrum β -Lactamase Production in *Enterobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2006 Jan; 44(1): 241–243.

Skočková A, Bogdanovičová K, Koláčková I, Karpíšková R. Antimicrobial-Resistant and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Raw Cow's Milk. *Journal of Food Protection*, Number 1, pp. 2-234, pp. 72-77(6). January 2015

Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: Molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiol Rev* 34:295–316. 2010.

Snow L C, Warner R G, Cheney T, Wearing H, Stokes M, Harris K, Teale C J, Coldham N G. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *E. coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. *Prev Vet Med.* 106 (3-4):225-34. 2012

StataCorp. 2011. Stata: Release 12. Statistical Software Release 12. ed. StataCorp LP., College Station, Texas.

Sudarwanto M, Akineden Ö, Odenthal S, Gross M, and Usleber E. Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulk Tank Milk from Dairy Farms in Indonesia. *Foodborne pathogens and disease* Volume 0, Number 0, 2015

Timofte D, Maciucă I E, Evans N J, Williams H, Wattret A, Fick J C, Williams N J. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(2):789-94. 2014

Toro, C. Protocolo de toma de muestras de leche: laboratorio de calidad e inocuidad de leche cruda. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Colombia. Versión 1 julio 10 de 2012

Vacca C P, Niño C Y, Reveiz L. Restricción de la venta de antibióticos en farmacias de Bogotá, Colombia: estudio descriptivo. Rev Panam Salud Publica. 30(6):586–91. 2011

Vanegas López M C, Moreno J E, Ramos Rueda V, Chirivi J S, Garzón A, Arévalo S A, Martínez M F, Gardeazábal P A and Baquero C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Colombian Foods. BIO 2, 61-67. 2012

Verraes C, Van Boxstael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, de Schaetzen M A, Van Huffel X, Imberechts H, Dierick K, Daube G, Saegerman C, De Block J, Dewulf J and Herman L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. Int. J. Environ. Res. Public Health 10(7), 2643-2669. 2013

Villegas MV, Correa A, Perez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, Casellas JM, Ayala J, Lolans K, Quinn John P. CTX-M-12 β -Lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate in Colombia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004; 48(2):629-631. doi:10.1128/AAC.48.2.629-631.2004.

Villegas MV; Guzmán Blanco M; Sifuentes-Osornio J y Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America – 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Braz J Infect Dis 2011; 15(1):34-39

Walsh C and Fanning S. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens--a cause for concern Curr Drug Targets. 9(9):808-15.2008

Wegener HC. Antibiotic resistance—linking human and animal health. En: Institute of Medicine (US). Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2012. A15. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114485/>

Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended spectrum B- lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:154–155.

Woodford N. Rapid characterization of beta lactamases by multiplex PCR. *Methods Mol Biol* 2010; 642:181–192.

Wooldridge M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev Sci Tech*, 31(1):231-47.2008

World Health Organization –WHO (2001): Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. *RevPanam Salud Pública* vol.10 n.4 Washington Oct. 2001 Xian-Zhi L, Manisha M, Shiva G, Lateef A. B- lactam resistance and β - lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology* 121 197-214. 2007

Zhao WH and Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013; 39(1): 79–101

Zeinhoma, Mohamed M A, Abdel-Latefb, Gihan K. Public health risk of some milk borne pathogens. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. Volume 3, Issue 3, Pages 209–215 September 2014.

Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo fue abordar la problemática de la resistencia a antibióticos desde la medicina veterinaria y describir la situación actual a nivel de producción primaria, más específicamente, en producción bovina de leche con el fin de establecer la posible dinámica de los genes de resistencia a los antibióticos en la cadena alimenticia.

Con la presente investigación se realizó un tamizaje inicial de la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en muestras de leche de tanque describiendo las características generales de los hatos lecheros evaluados y las posibles asociaciones con la prevalencia de estas bacterias.

Cabe señalar que el alcance de este estudio no fue más allá de precisar la frecuencia de presentación de bacterias multirresistentes en leche desde el punto de vista de la salud pública y no de la terapéutica de las infecciones comunes en el ganado de leche; no obstante, es claro que si estas bacterias son aisladas de cualquier individuo animal son un factor de riesgo para la salud de los mismos, ya que limita las opciones terapéuticas que tiene el médico veterinario para enfrentar las infecciones bacterianas en los hatos ganaderos.

La importancia de profundizar en el tema de la resistencia bacteriana desde el entorno animal radica en que muchas de las bacterias que causan infecciones multirresistentes en los seres humanos podrían estarse adquiriendo a partir del contacto directo con los animales o a través del consumo de sus productos. A pesar de que el proceso de pasteurización asegura la destrucción de los microorganismos patógenos en la leche, la leche cruda sigue siendo consumida por un segmento grande de la población Colombiana, aumentando el riesgo de transmisión de enterobacterias productoras de BLEE por contaminación de la

misma, convirtiendo a los hatos lecheros en foco de observación por su posible responsabilidad en la diseminación de bacterias multirresistentes.

El municipio de Entreríos -Antioquia, fue escogido como epicentro de la investigación por estar ubicado en la región de mayor producción de leche de todo el departamento; lo que lo convierte en un municipio representativo que cumple con las características generales de producción del resto de municipios del Norte de Antioquia y por tanto, permite establecer la base para futuras investigaciones que busquen determinar la situación de Enterobacteriaceae productora de BLEE abarcando la zona lechera del norte en su totalidad. Se escogió la leche de tanque como matriz de estudio ya que se pretendía realizar un acercamiento preliminar de gran envergadura con los recursos y el presupuesto disponible.

La frecuencia relativamente baja (3,3%) de enterobacterias productoras de BLEE en leche de tanque en el municipio de Entreríos- Antioquia resalta la importancia del uso prudente de antibióticos en medicina veterinaria y unas medidas estrictas de higiene durante el ordeño para obtener leche con altos estándares de calidad. Los resultados presentados en esta trabajo además demuestran la presencia de co- resistencia a varios grupos de antibióticos que genera mayor preocupación por la posible expresión simultánea de varios genes y mecanismos que puedan aumentar la morbilidad y la mortalidad de las personas y los animales. Por lo anterior es esencial crear conciencia y educar la sociedad especialmente los productores de leche y propietarios de animales en general sobre la importancia de usar los antimicrobianos solo cuando es necesario y siempre bajo supervisión de un médico veterinario.

Los hallazgos obtenidos a nivel molecular en este estudio son alarmantes y generan grandes interrogantes dada la similitud genética existente entre las bacterias aisladas de humanos y de animales. Constituyen además, el punto de partida para incentivar la realización de nuevas investigaciones que permitan

establecer la dinámica de la resistencia a antibióticos y en qué grado se relaciona la presencia de estos genes en animales productores de alimentos y sus productos con la presencia de los mismos a nivel hospitalario y de la comunidad. Se demuestra también la necesidad de combatir el problema de resistencia a los antibióticos desde acciones interdisciplinarias en las que el médico veterinario cumpla un papel fundamental y permitan intercambiar información disponible sobre resistencias tanto en humanos como en animales para adoptar las medidas adecuadas que ayuden a retardar la posible aparición de nuevos patrones de resistencia.

Referencias

Abreu rod guez R. Prevalencia de Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en exudados rectales de pollos de engorde en granjas avícolas en la isla de Tenerife, España. Tesis doctoral disponible en: <http://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/105/Rossana%20Abreu%20Rodr%C3%ADguez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Fecha de acceso: 10.08.2015

Acar JF, Moulin G, Page SW, Pastoret PP. Antimicrobial resistance in animal and public health: introduction and classification of antimicrobial agents. Rev Sci Tech 2012, 31(1):15-21.

Acar JF, Moulin G. Antimicrobial resistance: a complex issue. Rev Sci Tech 2012; 31(1):23-31.

Akineden  , Odenthal S., Hassan, A. Usleber E. (2012) Vorkommen von extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) bildende Enterobacteriaceae in Anlieferungsmilch aus hessischer Milchviehbetriebe. In: 53. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG. p. 206

Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?. Arch Med Res 2005, 36(6):697-705.

Alcald a de Entrerrios – Antioquia (2013). Información general del Municipio. Disponible en: http://www.entrerrios-antioquia.gov.co/informacion_general.shtml. Consultado 25-05-2016

Ambler R, Coulson A, Frere J, Ghuysen J, Joris B, Forsman M, Levesque R, Tiraby G, Waley S. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. Biochem J 1991; 276:269-270.

Appelbaum PC, Klepser ME: Role of the newer fluoroquinolones against penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Dis Clin Pract* 1999, 8:374.

Ausina Ruiz y Moreno Guillén, 2005. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editorial Panamericana. Buenos Aires; Madrid. 2005. Disponible en: <https://goo.gl/CQfaUM>. Consultado: 25. 05. 2016

Bantar C, Curcio D, Canigia FL, García P, Blanco GM, Leal AL. Comparative in vitro activity of tigecycline against bacteria recovered from clinical specimens in Latin America. *J Chem* 2009; 21:144-52.

Barrero LI, Castillo JS, Leal AL, Sánchez R, Cortés JA, Álvarez CA, González AL, GREBO. Impacto económico de la resistencia a la meticilina en pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en hospitales de Bogotá. *Biomédica* 2014; 34:345-53

Batista Botelho LA, Bergiante Kraychete G, J Lapa Costa e Silva, Vieira Regis DV, Picão RC, Meurer Moreira B, and Bonelli RR. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015 Apr; 110(2): 249–254.

Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1–1410.1128/AAC.48.1.1-14.2004

Bush K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 2012, 31 (1), 43-56.

Bush K, Jacoby G, Medeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-1233.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Mar;54(3):969-76.

Cabrera García PA (2011). Utilización de antibióticos de uso humano en caninos y Felinos atendidos en la clínica de pequeños animales de la Universidad nacional de Colombia, 2011. Trabajo de grado de Maestría en Ciencias - Farmacología. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2708/1/192246.2010.pdf>. Fecha de acceso: 07.08.2014

Cámara de comercio de Medellín. Ruta competitiva de lácteos 2015. Disponible en:

<http://www.camamedellin.com.co/site/Portals/0/Documentos/2015/Foros%20regiones/negocio%20lacteo%20en%20el%20norte%20Antioque%C3%B1o.pdf>.

Consultado 25-05-2016

Cancho Grande B, García Falcón MS, Simal Gándara J. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc. Tecnol. Aliment* 2000 Vol. 3, No. 1, pp. 39-47.

Cantón R. Epidemiology and evolution of β -lactamases. In: Baquero F, Nombela C, Cassel GH, Gutierrez-Fuentes JA, editors. *Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens*. Washington: ASM Press; 2008. pp. 249–270.

Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3:110.

Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta- lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:117–123.

Castro Peláez LM. Actividad antibacteriana de plantas medicinales en cepas clínicas de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido. Trabajo de grado Maestría en Uso y Producción de Plantas Medicinales MUPLAM Guatemala, noviembre de 2009. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2884.pdf. Fecha de acceso: 13.09.2015

CDC- Centers for Disease Control and Prevention 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/features/antibioticresistancethreats/>. Fecha de acceso: 2.11.14

Colodner R, Keness Y, Chazan B, Raz R. Antimicrobial susceptibility of community-acquired uropathogens in northern Israel. *Int J Antimicrob Agents*. 2001; 18:189-92

Cosgrove SE, Carmeli Y. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin Infect Dis*. 2003; 36:1433-7.

Cunha BA. Antibiotic resistance: Control Strategies. *Crit Care Clin*. 1998 Apr; 14(2):309-27.

Davies J and Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and molecular biology reviews* 2010, p. 417–433.

Daza Pérez RM. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud* 1998; 22: 57-67.

Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZH, Sidjabat HE, Rodriguez-Bano J. Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *E. coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *ClinMicrobiol Infect* 2010, 16:33-38.

ECDC-European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Antimicrobial resistance. Disponible en:

http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance. Fecha de acceso: 21.11.2015

ECDC-European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Antimicrobial resistance. Disponible en: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/basic_facts/Pages/factsheet_experts.aspx. Fecha de acceso: 22.11.2015

Falcón N, Ortega C, Gorniak S, Villamil LC, Ríos C, Simón MC. El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública. Revista Sapuvet de Salud Pública, N.º 1. Enero-junio de 2010.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Milk and milk products. Disponible en: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/es/#.VIXfDXYvfiU>. Fecha de acceso: 20.10.2015

FEDEGAN- Federación Colombiana de Ganaderos (2015). Consumo de leche aumentó en Colombia durante 2014. Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/noticias/consumo-de-leche-aumento-en-colombia-durante-2014>. Fecha de acceso: 20.10.2015

Friedman ND¹, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med.* 2002; 137:791-7. 5.

Friese A , Schulz J, Laube H, von Salviati C, Hartung J, Roesler T. Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (laMRSA) and ESbl/AmpC-producing *E. coli* from animal

farms in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2013 Mar-Apr; 126 (3-4): 175-80.

FDA- Food and Drug Administration. Antimicrobial Resistance. 2015. Disponible en: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/>. Fecha de acceso: 09.05.2015

Galí Navarro ZC (2010). Enterobacterias- Antibioticoterapia. APUA alianza para el uso prudente de los antibióticos. Disponible en: <http://goo.gl/smlfUQ>. Consultado 25.05.2016

García Castellanos T, Castillo Marshal A, Salazar Rodríguez D. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. Rev Cubana Salud Pública. 2014; 40(1)

García C, Horna G, Linares E, Ramírez R, Tapia E, Velásquez J, Medina V, Guevara J, Urbina M, Zevallos S, Espinoza N, Samalvides F, and Jacobs J. Antimicrobial drug resistance in Peru. Emerg Infect Dis. 2012; 18:520-1.

Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res 2012. 7; 8:21.

González L y Cortés JA. Revisión sistemática de la farmacorresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. Biomédica 2014 vol.34 no.2.

GREBO grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá. Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas clsi m100 – s20 2010. Secretaría distrital de salud, 2010.

Guillemot D, Carbon C Antibiotic use and pneumococcal resistance to penicillin: The French experience. Clin Microbiol 1999, 5:4S38.

Huang CC, Chen YS, Toh HS, Lee YL, Liu YM, Ho CM, Lu PL, Liu CE, Chen YH, Wang JH, Tang HJ, Yu KW, Liu YC, Chuang YC, Xu Y, Ni Y, Ko WC, Hsueh. Impact of revised CLSI breakpoints for susceptibility to third-generation cephalosporins and carbapenems among Enterobacteriaceae isolates in the Asia-Pacific region: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2002-2010. Int J Antimicrob Agents. 2012 ; 40(Suppl.):S4-10.

Heinemann JA, Ankenbauer RG, Amábile-Cuevas CF. Do antibiotics maintain antibiotic resistance?. Drug Discov Today. 2000 May; 5(5):195-204.

INS-Instituto Nacional de Salud (2009). Estado del arte de la resistencia bacteriana y la vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas al cuidado de la salud en Colombia. Disponible en:<http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/IAAS/Forms/AllItems.aspx>. Fecha de acceso: 06.03.2014

Jacoby G and Muñoz S. The new β -lactamases. N Engl J Med 2005; 352:380-391
Kamel N, Aboshanab K, Abouelwafa M, El-tayeb, WN. Plasmid mediated extended spectrum beta-lactamase producing strains of enterobacteriaceae isolated from diabetic foot infections in Egypt. ARCHIVES OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2013 Vol. 4 No. 4:1

Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection. 1983; 11:315-7

Kreausukon (2011) Usage of Antimicrobials on 60 Dairy Farms in Northern Germany and Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus

(MRSA) and Extended Spectrum Beta-Lactamases Producing E. coli (ESBL-producing E. coli) Isolated from Bulk Tank Milk Samples. Doctoral thesis. Klinik für Klautiere und Internationale Tiergesundheit, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin und Bundesinstitut für Risikobewertung

Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin Microbiol Infect 2011, 17(6):873-80.

Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med. 2004 Dec; 10(12 Suppl):S122-9.

López-Cerero L y Pascual A. Epidemiología de las BLEE en la comunidad: un problema emergente. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25 Supl. 2:23-8.

Machado-Alba JE y M. González-Santos D. Dispensación de antibióticos de uso ambulatorio en una población colombiana. Rev. salud pública 2009, vol.11 n.5.

Maldonado NA, Múnera MI, López JA, Sierra P, Robledo C, Robledo J. Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: resultados de seis años de vigilancia. Vol. 34, Núm. 3 (2014) <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i3.1658>

Marín M y Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21(1):42-55.

Martinez P, Garzón D, Mattar S. CTX-M-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. Braz J Infect Dis. 2012 Sep-Oct; 16(5):420-5.

Máttar S, Calderón A, Sotelo D, Sierra M y Tordecilla G. Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. Rev. salud pública 2009, 11 (4): 579-590.

Máttar S y Martínez P. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología Infectio2007; 11(1): 23-35.

McGowan JE. Economic Impact of Antimicrobial Resistance. Emerging Infectious Diseases 2001, 286 Vol. 7, No. 2.

Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola MT, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, Prats G, Navarro FJ. Extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). Antimicrob Chemothe 2006, 58:211-215.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 1880 del 27 de mayo de 2011. Bogotá, Colombia.

Moreno C, González R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello 2009, v.69 n.2 Santiago ago.

Müller A, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing Escherichia coli isolated from the environment, livestock, food and humans. Sci Total Environ 2015 Oct 1; 541:667-672.

Muñoz Bellido J L. Betalactamasas de espectro extendido: ¿son hoy un serio problema en España?. Rev Esp Quimioterap, Diciembre 2004; Vol 17 (Núm. 4): 314-316

NIAID - National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2011). Antimicrobial (Drug) Resistance Causes. Disponible en: <http://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialResistance/understanding/Pages/causes.aspx>. Fecha de acceso: 09.05.2015.

Oliver, A y Cantón, R. Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido. 2003. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>

OMS- Organización Mundial de la Salud (2001): Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf>. Fecha de acceso: 27.11.2013

OMS- Organización Mundial de la Salud (2014): Preguntas frecuentes sobre la resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/faq/es/index1.html>. Fecha de acceso: 14.12.2013

Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J. Extended-spectrum β -lactamase genes of Escherichia coli in chicken meat and humans, the Netherlands. Em. Infect. Dis. 17:1216-1222. 2011

Paterson DL and Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005, 18:657-686.

Pérez C, 2007. Resistencia Bacteriana. Disponible en: http://www.susmedicos.com/art_Resistencia_Bacteriana.htm. Fecha de acceso: 10.11.2015

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. Clin. Microbiol. Infect. 14, 75–8110.1111. (2008)

Pujol M, Limón E. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2013, Vol. 31. Núm. 02.

Puerta-García A y Mateos-Rodríguez F. Enterobacterias. Medicine 2010; 10(51):3426-31

Rasheed M U, thajuddin N, ahamed P, teklemariam Z and Jamil K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2014, 56(4):341-346.

Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, CavaleriM, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heure OE, Kahlmeter G, Kruse H, Laxminarayan R, Liébana E, López-Cerero L, MacGowan A, Martins M, Rodríguez-Baño J, Rolain JM, Segovia C, Sigauque B, Taconelli E, Wellington E, and Vila J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. New Microbes New Infect. 2015 Jul; 6: 22–29.

Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R and Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol 2004; 42:1089-94. 6.

Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F, El-Jade M, Reif M, Hack S, Meilaender A, Montabauer G, Fimmers R, Parcina M, Hoerauf A, Exner M, Petersen B, Bierbaum G, Bekeredjian-Ding I. Analysis of Transmission of MRSA and ESBL-E among Pigs and Farm Personnel. PLoS One 2015 Sep 30; 10(9):e0138173

Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. Drugs. 2002; 62(4):557-66.

Seral García C, de la Gándara MP y Castillo García FJ. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(Supl 1):12-18

Snow L C, Warner R G, Cheney T, Wearing H, Stokes M, Harris K, Teale C J, Coldham N G. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase E. coli (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. Prev Vet Med. 2012, 106 (3-4):225-34.

Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld MW, Bartlett JG, Edwards J. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. Clinical infection disease 2008 Jan 15; 46(2):155-64

Stapleton PD, Shannon KP, French L: Carbapenem resistance in Escherichia coli associated with plasmid-determined CMY-4 p-lactamase production and loss of an outer membrane protein. Antimicrob Infect Dis 1999, 43:1206.

Sudarwanto M, Akineden Ö, Odenthal S, Gross M, and Usleber E. Extended-Spectrum b-Lactamase (ESBL)–Producing Klebsiella pneumoniae in Bulk Tank

Milk from Dairy Farms in Indonesia. Foodborne pathogens and disease 2015, Volume 0, Number 0.

Sussmann OA, Mattos L, Restrepo A. Apuntes de resistencia bacteriana (2001). Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>. Fecha de acceso: 10.11.2015

Sumano HS, Ocampo L. Farmacología veterinaria. 2011. México D.F: México, McGraw-Hill. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/55938774/Farmacologia-Veterinaria-Tercera-Edicion-Sumano-Ocampo#scribd>. Fecha de acceso: 12.08.2015

Tham J, Walder M, Melander E and Odenholt I. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in food. Infect Drug Resist 2012; 5: 143–147.
Tekiner IH and Özpınar H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. Brazilian journal of microbiology 47 (2016) 444–451

Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>. Fecha de acceso: 10.11.2015

Villegas MV, Blanco MG, Sifuentes-Osornio J, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America - 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Braz J Infect Dis. 2011; 15:34-9.

Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004 Jul; 49(3):217-22.

Valentin L, Sharp H, Hille K, Seibt U, Fischer J, Pfeifer Y, Michael GB, Nickel S, Schmiedel J, Falgenhauer L, Friese A, Bauerfeind R, Roesler U, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Helmuth R, Valenza G, Werner G, Schwarz S, Guerra B, Appel B, Kreienbrock L, Käsbohrer A. Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int J Med Microbiol* 2014; 304(7):805-16.

Wang H, McEntire JC, Zhang L, Li X, Doyle M. The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Rev Sci Tech*. 2012, 31(1):249-60.

Wiedemann B, Heisig P. Mechanisms of quinolone resistance. *Infection*. 1994; 22 (Suppl 2):S73–S79.

Wittum TE, Mollenkopf DF, Daniels JB, Parkinson AE, Mathews JL, Fry PR, Abley MJ, Gebreyes WA. CTX-M-type extended-spectrum β –lactamases present in *E. coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. *Foodborne Path Dis* 2010, 7:1575-1579.

WHO- World Health Organization (2015). Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N°194. Abril de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. Fecha de acceso: 17.09.2015

Wooldridge M. Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. Rev Sci Tech. 2012 Apr; 31(1):231-47.

Xian-Zhi L, Manisha M, Shiva G, Lateef A. B- lactam resistance and β - lactamases in bacteria of animal origin. Veterinary Microbiology 2007, 121 197-214.

Anexos

Reglamento de la Revista Colombiana de ciencias pecuarias:

<http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/about/submissions#authorGuidelines>