

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS Y CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DE BGNNFG AISLADOS DE LECHE CRUDA (II)

Resistance to the Antimicrobes and Minimal Inhibitory Concentration of BGNNFG Isolated from non Pasteurized Milk (Raw Milk) II

José Faría¹; Zulbey Rivero²; Belisario Gallego³ y María Allara¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. ²Facultad Experimental de Ciencias. ³Facultad de Medicina. Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

A 416 muestras de leche cruda recolectadas aleatoriamente a nivel de cántaras en 5 receptorias ubicadas en la Cuenca del Lago de Maracaibo, estado Zulia-Venezuela, se les determinó la presencia de antibióticos mediante el Delvotest-P y el método de Disco Ensayo de la Asociación de Químicos Análíticos Oficiales (AOAC). Las leches positivas fueron sembradas para detectar crecimiento de Bacilos Gram Negativos No Fermentadores de la Glucosa (BGNNFG), posteriormente se realizaron pruebas de susceptibilidad a 13 antimicrobianos y se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las cepas frente a 27 antimicrobianos. Se encontró que 48 muestras contenían antibióticos y de éstas se aislaron 10 BGNNFG, de los cuales 7 fueron *Pseudomonas* sp. y 3 *Acinetobacter* sp.. *Pseudomonas* sp. mostró resistencia a 10 de los 13 antibióticos estudiados, mientras *Acinetobacter* sp. lo hizo sólo frente a 5. Las cepas mostraron un patrón de resistencia común a penicilina, novobiocina, cloxacilín y nitrofurantoina. Las *Pseudomonas* sp. mostraron cifras de CIMs bajas frente a mezlocilín, piperacilina, cefoperazone, ceftazidime e imipenem. Los CIM90 más elevados para *Pseudomonas* sp. se observaron con cefotaxime, ceftriaxone, ampicilina, ceftaxidim, cefazolín, cefuroxime, cefalotín, vancomicina, ampicilina/sulbactam y amoxicilina/ácido clavulánico mientras que *Acinetobacter* sp. presentó CIM90 elevados frente a sólo 6 antimicrobianos: cefazolín, cefalotín, vancomicina, penicilina G, oxacilina y clindamicina.

Palabras clave: Antibióticos, resistencia, bacilos Gram negativos, concentración inhibitoria mínima, leche cruda.

ABSTRACT

Four hundred sixteen on pasteurized milk samples (row milk) were taken at random from milk pot at 5 different gathering plants. Gathering plants were located around Lake of Maracaibo basin, Zulia state, Venezuela. Samples were analyzed to determine presence of antibiotics by using the Delvotest-P and the assay disc method of Association of Official analytical chemists (AOAC). Positive samples were cultured to determine gram negative bacterial growth of glucose non-fermentative bacillus (GNGNFB). Susceptibility test to 13 anti-microbes was performed and the minimal inhibitory concentration (MIC) of the stock of microbes in front of 25 anti-microbes was determined. It was found that 48 milk samples had important amount of antibiotics. However, from these samples, there were isolated 10 GNGNFB, from them 7 were *Pseudomonas* sp and 3 were *Acinetobacter* sp. *Pseudomonas* sp showed to be resistant to 10 of the 13 antibiotics tested whereas *Acinetobacter* sp only was resistant to 5. Microbes stock showed a common pattern of resistance to penicillin, novocaine, cloxacillin and nitrofurantoin. *Pseudomonas* sp had lower MICs values when exposed to mezlocylin, piperacylin, cefoperazone, ceftazidimine and imipenem. The highest MIC90 for *Pseudomonas* sp were observed with cefotaxime, ceftriaxone, ampicylim, ceftaxidim, cefazolin, cefuroxime cephalotin, vancomycin, ampicylim/sulbactam and amoxicillin/ clavulanic acid. On the other hand, *Acinetobacter* sp only showed high MIC90 against 6 anti-microbes: cefazolin, cefalotin, vancomycin, penicillin G, oxacillin and clidamycin.

Key words: Antibiotics, resistance, bacillus Gram negative, animal inhibitory concentration row milk.

INTRODUCCIÓN

La aparición de resistencia múltiple a los antibióticos fue observada por primera vez en Japón en 1960, donde después de varios años de amplia difusión terapéutica para tratar la disentería bacilar, algunas cepas del género *Shigella* y otras enterobacterias mostraron resistencia a varias drogas: sulfonamidas, estreptomina, cloranfenicol y tetraciclina [1].

El incremento de la resistencia de los microorganismos a los agentes quimioterápicos dificulta el tratamiento de infecciones en el hombre, por las limitaciones que se presentan en la elección de antibióticos.

El consumo de pequeñas cantidades de antibióticos a través de algunos alimentos puede resultar en el incremento de microorganismos resistentes. Se ha reportado que la adición de clortetraciclina y penicilina en alimentos para animales, con el objetivo de mejorar la tasa de crecimiento y prevenir enfermedades del ganado, genera plásmidos de resistencia en la flora entérica del animal y, que este material genético transmite, a patógenos humanos resistencia a los antibióticos; produciendo una pérdida significativa de la eficacia de los mismos [2,8,12].

La cadena alimentaria se ha señalado como una vía importante para la transmisión de bacterias antibiótico-resistentes al hombre; enfocándose recientemente la atención hacia la importancia que tiene, desde el punto de vista de salud pública, la presencia de estas bacterias en leche cruda y productos lácteos sin pasteurizar. De hecho, se han reportado brotes diarréicos causados por cepas resistentes de *Salmonella typhimurium* adquiridas a través del consumo de leche cruda [16]. Igualmente, se reportó en leche pasteurizada, durante el brote de salmonellosis de Illinois en 1985, una cepa con un perfil inusual de plásmidos y una resistencia múltiple a tetraciclina, eritromicina, clindamicina, sulfasoxazol, sulfadiazina, triple sulfamida, cefoperazona, estreptomina, mezlocilina, piperacilina, carbenicilina, penicilina y kanamicina [22].

Uno de los mecanismos que propicia el desarrollo de resistencia es la presencia de antibióticos en leche, administrados al animal para el tratamiento de la mastitis, debido a la excreción de residuos, inclusive durante un tiempo mayor al recomendado para el retiro del animal en ordeño [17,23]. Igualmente, se ha reportado que los niveles subterapéuticos de antibióticos, tienen un fuerte potencial de selección de poblaciones bacterianas resistentes. Brady y col. [6] estudiaron el efecto, de las concentraciones de antibióticos considerados por la Administración de Alimentos y Drogas (AAD) como niveles seguros, sobre el desarrollo de resistencia en cepas de *Staphylococcus aureus*, señalando que inclusive estos niveles de antimicrobianos tienen un fuerte potencial para la selectividad de poblaciones resistentes.

En Venezuela, Faría y col. [9] reportaron una alta incidencia (20,37%) de residuos de antimicrobianos en muestras

de leche cruda producida en diversas zonas del estado Zulia. Por ello, en esta investigación se determinó el patrón de resistencia y la concentración inhibitoria mínima de bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa (BGNNFG) aislados de leche cruda con antibióticos producida en el estado Zulia, frente a antimicrobianos de uso común.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y detección de antibióticos

Fueron recolectadas en forma aleatoria 416 muestras de leche cruda en 5 receptorias ubicadas en la Cuenca del Lago de Maracaibo del estado Zulia-Venezuela. Aproximadamente, 30 ml de leche fueron tomados en forma aséptica de las cántaras, y transportados bajo refrigeración. A su llegada al laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia (LUZ), las muestras se analizaron para detectar la presencia de residuos de antibióticos mediante las técnicas del Delvotest-P (Gist-Brocades) y el método del Disco Ensayo, usando *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* propuesto por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) [3].

Aislamiento bacteriano

Las muestras que resultaron positivas a la determinación de antibióticos fueron diluidas en buffer fosfato salino de pH 7,2 (25°C) a concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; posteriormente fueron sembradas por profundidad en agar bilis rojo violeta (ABRV) e incubadas a 37°C por 24 horas para obtener crecimiento de bacterias Gram negativas.

Identificación

Las colonias fueron caracterizadas morfológicamente según su tamaño, olor y presencia o no de pigmentos. Posteriormente fueron sembradas en agar triple azúcar hierro (ATAH) y agar nutritivo (AN) en placa y, fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Los BGNNFG se identificaron con el ATAH, la prueba de la oxidasa en AN y la motilidad en gota pendiente según Lennette y col. [18].

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos

Los microorganismos identificados fueron sembrados en caldo soya triptica (CST) e incubados a 37°C por 24 horas. El crecimiento obtenido fue diluido con solución fisiológica salina (SFS) estéril, hasta obtener una densidad equivalente al estándar N° 0,5 de la escala de McFarland. Posteriormente, fue realizado el método de difusión en agar de Bauer-Kirby [5] con discos comerciales (BBL, Difco, Oxoid) de los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de la mastitis, TABLA I. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y fue determinado el criterio de sensibilidad según las especificaciones.

TABLA I
CONCENTRACION DE LOS ANTIMICROBIANOS USADOS
EN LA PRUEBA DE DIFUSION EN AGAR

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

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

A partir de cultivos puros de las cepas de BGNNFG identificadas, fueron tomadas varias colonias y se resuspendieron en 5 ml de SFS estéril hasta obtener una turbidez equivalente al estándar Nº 0,5 de McFarland. De esta suspensión fueron tomados 250 µl y se agregaron a 24,75 ml de SFS estéril para obtener una dilución 1:100, con una concentración final de inóculo de aproximadamente 1×10^6 ufc/ml. Esta dilución fue sembrada en las placas de microtitulación del método de microdilución en caldo UNISCEPT MIC Type3 (Analytab Products Plainview, NY), TABLA II, según las instrucciones del fabricante, luego, fue calculado el CIM90 y comparado con los criterios de interpretación del Comité Nacional para estándares de Laboratorios Clínicos (CNELC) [20].

Análisis estadístico

El análisis de los antibiogramas se efectuó comparando los porcentajes de resistencia de las cepas mediante la prueba Z, utilizando el MICROSTAT (Ecosoft Inc.1978-85) y para el análisis de la varianza se utilizó el STATISTIX (NH Analytical Software. 1987) del paquete estadístico SAS [24], versión 2.02. Con la Prueba de Tukey se establecieron diferencias entre medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 416 muestras de leche cruda analizadas, 48 resultaron positivas a las pruebas de detección de antimicrobianos, y de éstas se aislaron 10 BGNNFG, siendo 7 *Pseudomonas sp.* y 3 *Acinetobacter sp.*

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

Antimicrobiano	Rango de Concentraciones (µg/ml)
Betalactámicos	
•Penicilinas naturales:	
Penicilina G.	0,03-8
•Penicilinas resistentes a la penicilinas: Oxacilin	0,50-4
•Aminopenicilinas: Ampicilina	0,12-16
•Ureidopenicilinas:	
Mezlocilín	16-128
Piperacilina	8-128
•Carbapenemos: Imipenem	1-8
•Monobactámicos: Aztreonam	2-16
•Betalactámicos e inhibidores de Betalactamasa:	
Amoxicilina/Ac. Clavulánico	2/1-16/8
Ampicilina/Sulbactam	2/1-16/8
Ticarcilina/Ac. Clavulánico	16/2-128/2
•Cefalosporinas 1ª generación:	
Cefalotin	2-16
Cefazolín	2-16
•Cefalosporinas 2ª generación:	
Cefoxitín	2-16
Cefuroxime	2-16
•Cefalosporinas 3ª generación:	
Cefotaxime	4-32
Ceftriaxone	4-32
•Cefalosporinas 3ª generación con aumentada actividad antipseudomonas:	
Cefoperazona	4-32
Ceftazidime	2-16
Aminoglicósidos:	
Gentamicina	1-8
Amikacina	4-32
Tobramicina	1-8
Fluoroquinolonas:	
Norfloxacín	4-16
Ciprofloxacina	0,5-4
Macrólidos: Eritromicina	0,5-4
Lincomicinas: Clindamicina	0,5-4
Glucopéptidos: Vancomicina	2-16
Combinación Sulfonamidas:	
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0,5/9,5-8/152

TABLA III
PORCENTAJE DE RESISTENCIA A LOS
ANTIMICROBIANOS DEL GÉNERO *Pseudomonas sp*

Antimicrobiano	% Resistencia
Penicilina	100,00 ^a
Novobiocina	100,00 ^a
Cloxacilina	100,00 ^a
Ampicilina	80,00 ^{ab}
Triple Sulfa	0,00 ^c
Gentamicina	16,60 ^c
Neomicina	60,00 ^{ab}
Estreptomina	33,30 ^{bc}
Cefotaxime	0,00 ^c
Polimixina B	0,00 ^c
Tetraciclina	60,00 ^{ab}
Ac Nalidíxico	60,00 ^{ab}
Nitrofurantoina	100,00 ^a

a,b,c Medias que posean diferentes super índice difieren significativamente (P < 0,05).

TABLA IV
PORCENTAJE DE RESISTENCIA A LOS
ANTIMICROBIANOS DEL GÉNERO *Acinetobacter sp*

Antimicrobiano	% Resistencia
Penicilina	100 ^a
Novobiocina	100 ^a
Cloxacilina	100 ^a
Ampicilina	0 ^b
Triple Sulfa	0 ^b
Gentamicina	0 ^b
Neomicina	0 ^b
Estreptomina	45 ^{ab}
Cefotaxime	0 ^b
Polimixina B	0 ^b
Tetraciclina	0 ^b
Ac. Nalidíxico	0 ^b
Nitrofurantoina	100 ^a

a,b Medias que posean diferentes super índice difieren significativamente (P < 0,05).

Resistencia a los antimicrobianos

El análisis de la varianza permitió establecer diferencias significativas (P < 0,05) en la resistencia de *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.* según el tipo de antibiótico empleado.

En la TABLA III se muestran los porcentajes de resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *Pseudomonas sp.* aisladas de la leche cruda, donde se observa la elevada y múltiple

resistencia que las caracteriza. Mostrando una elevada resistencia frente a penicilina, novobiocina, cloxacilín, nitrofurantoina, ampicilina, neomicina, tetraciclina y ácido nalidíxico; lo que confirma los resultados encontrados por Kapur y col. [15], quienes reportaron altos grados de resistencia en los aislamientos de *Pseudomonas* obtenidos en leche.

La resistencia presentada por *Pseudomonas sp.* a nitrofurantoina era esperada, puesto que el espectro de acción de los nitrofuranos no incluye a dichas cepas.

La resistencia a los aminoglicósidos, entre ellos estreptomina, gentamicina y neomicina puede producirse por alteración de las proteínas ribosómicas, disminución del transporte del antibiótico o inactivación enzimática de la droga. De cualquier manera, la resistencia presentada por *Pseudomonas sp.* a neomicina fue probablemente inducida por el constante contacto con el antibiótico, el cual es regularmente utilizado para el tratamiento de la mastitis bovina en nuestro medio. Cabe destacar la presencia de cepas resistentes a gentamicina (16,6%) y estreptomina (33,3%), lo cual confirma los reportes de otros autores [7,11].

Las cepas de *Pseudomonas sp.* fueron totalmente sensibles al resto de los antimicrobianos usados en la experimentación.

Los aislamientos de *Acinetobacter sp.*, TABLA IV, mostraron elevada resistencia a penicilina, novobiocina, cloxacilín, nitrofurantoina y estreptomina, mientras que no se obtuvo cepas resistentes a los demás antimicrobianos probados. La sensibilidad de estas cepas a polimixina B y algunos aminoglicósidos ha sido reportada anteriormente [18]. Cabe destacar la gran sensibilidad mostrada por estos microorganismos a la ampicilina, la cual no ha sido observada en cepas de origen hospitalario, donde existe hasta un 100% de resistencia [19].

Concentración Inhibitoria Mínima

Los aislamientos de *Pseudomonas sp.* fueron resistentes a la mayoría de los antimicrobianos probados, como puede verse en la TABLA V. Para los betalactámicos hubo altas CIMs frente a nueve de ellos, entre estos cabe destacar, que la resistencia a ceftaxim, cefotaxime y ceftriazone ha sido reportada anteriormente [21]. Afortunadamente, presentó sensibilidad a mezlocilín, piperacilina, cefoperazona, ceftazidime e imipenem, los cuales son considerados tratamiento de primera elección contra estos microorganismos [10].

Dentro de los aminoglicósidos fue observada resistencia a gentamicina (CIM90 = 8 µg/ml), medicamento frente al cual estas cepas han venido desarrollando resistencia en los últimos años [13]. Así mismo, presentó total resistencia a eritromicina, clindamicina y vancomicina y altas cifras de CIMs con amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam y trimetoprim/sulfametoxazol. Las cepas mostraron sensibilidad a amikacina (CIM90=8 µg/ml). Otros autores han reportado *Pseudomonas aeruginosa* resistente a amikacina, señalándose que el

TABLA V
VALORES DE CIM90 ($\mu\text{g/ml}$) DE *Pseudomonas sp* Y
Acinetobacter sp AISLADAS DE LECHE CRUDA

Antimicrobiano	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Acinetobacter sp</i>
Oxacilin	>4	>4
Penicilina G	>8	>8
Ampicilina	>16	4
Mezlocilin	≤ 16	≤ 16
Pipperacilin	8	≤ 8
Cefazolin	>16	>16
Cefoperazona	8	8
Cefotaxime	>32	≤ 4
Cefoxitin	>16	4
Ceftazidime	4	≤ 2
Ceftriaxone	>32	≤ 4
Cefuroxime	>16	4
Cefalotin	>16	>16
Aztreonam	4	8
Imipenem	2	≤ 1
Gentamicina	8	≤ 1
Amikacina	8	≤ 4
Tobramicina	≤ 1	≤ 1
Eritromicina	>4	>4
Clindamicina	>4	>4
Vancomicina	>16	≤ 16
Ciprofloxacina	≤ 0.5	≤ 0.5
Norfloxacina	≤ 4	≤ 4
Trimet./Sulfa	8/152	$\leq 0.5/9.5$
Amoxi/Ac clav.	>16/8	4/2
Ampic/Sulbact.	>16/8	$\leq 2/1$
Tic./Ac clav.	32/2	$\leq 16/2$

Resistencia absoluta, porque la CIM del microorganismo supera la alcanzable en tejidos o suero.

mecanismo de resistencia no se debe a la presencia de enzimas que modifican el aminoglicósido, ni a plásmidos, sino a la impermeabilidad de la pared celular al medicamento [14].

La resistencia a la sulfonamida y a trimetoprim se debe a modificaciones en las enzimas sintetasa y reductasa, esenciales para la síntesis del folato [21] y ha sido reportada en cepas hospitalarias. Igualmente, la resistencia a ampicilina/sulbactam se deriva de que, la mayoría de los Gram negativos, incluyendo la *P. aeruginosa*, generalmente poseen betalactamasas que pertenecen a la clase I de Richmond-Sykes, sobre las que no actúan los nuevos inhibidores de las betalactamasas, entre ellos, el sulbactam [21].

Las cepas de *Acinetobacter sp.* aisladas fueron bastante sensibles a los antimicrobianos, como puede verse en la TA-

BLA V. No presentó resistencia a imipenem, fluoroquinolonas, amikacina y ceftazidime que son los medicamentos recomendados para su tratamiento. Los mayores valores de CIM90 se observaron con oxacilín, penicilina, cefazolín, cefoxitín, vancomicina y clindamicina. Es conveniente destacar que las cepas de *Acinetobacter sp.* se clasificaron como intermedias frente a eritromicina (CIM90 = 4 $\mu\text{g/ml}$). Las cepas hospitalarias de *Acinetobacter sp.* se han reportado [4] como totalmente resistentes a ampicilina y cefoxitín, mientras que las cepas obtenidas en este estudio mostraron sensibilidad a estos medicamentos.

Dentro de los BGNF aislados en el presente estudio, el género predominante fue *Pseudomonas* y, aunque no fué posible una identificación concreta de todas las especies presentes, las características coloniales, olor y producción de brillo metálico indican que 5 de las 7 cepas se correspondieron con *P. aeruginosa*, la cual es ampliamente reconocida como un patógeno oportunista, situación ésta que alerta de la probable transmisión a través de productos lácteos no pasteurizados de estas cepas multirresistentes al hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AKIBA, T.; KOYAMA, K; ISHIKI, Y; KIMURA, S.; FUKUSHIMA, T. On the mechanism of the development of multiple drug-resistant clones of Shigella. *Jap. J. Microbiol.* 4:219-227. 1960.
- [2] ALBRIGHT, J.; TICKEY, S.; WOODS, G. Antibiotics in milk, a review. *J. Dairy Science.* 44:779-807. 1961.
- [3] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS(AOAC). Official methods of analysis. Milk N°982:16.1990.
- [4] BABALOVA, M; KRALIKOVAK, V.; KUBONOVAK, K. Variation in Transfer resistance of cefotaxime, ceftazidime and aztreonam in strains of *Acinetobacter sp.*, *Enterobacter sp.* and *Citrobacter sp.* isolated from the same university hospitals. *Cas Lek Cesk.* 135(6):181-184. 1996.
- [5] BAUER, A.; KIRBY, W.; SHERRIS, J.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496. 1966.
- [6] BRADY, M.; WHITE, N.; KATZ, S. Resistance development potential of Antibiotic/Antimicrobial residue levels designated as "safe levels". *Journal of Food Prot.*56(3): 222-233. 1993.
- [7] CHAR, N.; RAO, M. In vitro antibiotic sensitivity of *P. aeruginosa* isolated from different pathological conditions of animals and its efficacy in vivo therapy. *Indian Vet. J.* 68:1-5. 1991.
- [8] DURBIN, L. Antibiotics in food preservation. *Am. J. Public Health.* 46:1306-1310. 1956.

- [9] FARÍA, J.; RIVERO, Z.; SANTORO, R. Aislamiento de Gram Negativos en leches crudas con antibióticos. **Revista Científica, FCV-LUZ**. Vol IV. Nº 1: 11-16. 1994.
- [10] FASS, R.; BARNISHAM, J.; AYERS, L. Emergence of bacterial resistance to imipenem and ciproxacin in a University hospital. **J. Antimicrob. Chemother.** 36(2):343-353. 1995.
- [11] GONZÁLEZ, L. Estudio comparativo del efecto de antibióticos sobre cepas bacterianas aisladas de alimentos, material hospitalario y de aguas costeras de Cumaná. (Trabajo de Ascenso). Escuela de Ciencias. Universidad de Oriente. 320 pp. 1981.
- [12] GUFTAFSON, R. Symposium: Antibiotic residues in meat and milk. Use of antibiotic in livestock and human health concerns. **J. Dairy Science.** 74:1428-1432. 1991.
- [13] HASEGAWA, M.; KOBAYASHI, Y.; SAIKA, T.; NISHIDA, M. Drug resistance patterns of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in regard to their lipopolysaccharide-chain sizes. **Kansenshogak-Zasshi.** 70(6):605-612. 1996.
- [14] HURLEY, J.; MILLER, G.; SMITH, A. Mechanism of Amikacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with septic fibrosis. **Diagn. Microbiol Infect. Dis.** 22(4): 331-336. 1995.
- [15] KAPUR, M.; SHARMA, A.; KHANNA, B.; BHARDWAI, R. *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in a heifer: a case report. **Indian Journal of Vet. Medicine.** 9(2):115-119. 1989.
- [16] LANGLOIS, B.; FZENSTAT, J.; BULL, L.; HEMKEM, R. Antibiotic resistance of enteric bacteri isolated from milk and faeces. **J. Dairy Science.** 63 (Suppl.1): 124. 1980.
- [17] LAROCQUE, L.; NEVILLE, G. Quantitative evaluation of an infusion by studing on depletion residues in milk. **Journal of Food Prot.** Vol 48 (7):611-615. 1986.
- [18] LENNETTE, E.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.; TRUANT, J. **Microbiología Clínica.** Editorial Panamericana. 3ra Edición. 1260 pp. 1982.
- [19] MARUASHVILI, Y.; SHUBITIDZE, A.; GABISONIIA, T.; PKHAKADZE, T. Biological characteristics and antibiotic sensitivity to *Acinetobacter* strains. **Antibiot-Khimioter.** 40(8):28-31. 1995.
- [20] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Zone diameter interpretative standards and equivalent Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Break point for organism other than *Haemophilus*. **NCCLS.** Vol 20, Nº 7. 30 pp. 1988.
- [21] PFIZER SA. Inhibición de la resistencia en bacterias productoras de betalactamasa. *Estudio in vitro.* Boletín. 13pp. 1992.
- [22] SCHUMAN, J.; ZOTTOLA, E.; HARLANDER, S. Preliminary characterization of a food-borne multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strain. **Applied and Environmental Microbiology.** 55(9):2344-2348. 1989.
- [23] SEYMOUR, G.; JONES, G.; MC. GILLIARD, M. Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle. **Journal of Dairy Science.** 71: 2292-2296. 1988.
- [24] Statistical Analysis System Institute. SAS User's Guide: Statistics. Cary. North Caroline. Version 2.02. USA. 1986.