

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS AISLADAS DE TILAPIAS, AGUA Y SEDIMENTO EN VENEZUELA

Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated From Tilapia, Water and Sediment Samples In Venezuela

Julia D. Álvarez R., Claudia P. Agurto, Ana M. Álvarez y José Obregón

Laboratorio de Microbiología de Peces y Crustáceos, INIA-CENIAP. Maracay, estado Aragua, Venezuela.

E-mail: maregatti@cantv.net

RESUMEN

El uso indiscriminado de los antimicrobianos ejerce fuerte presión selectiva en las bacterias, lo que causa el surgimiento y diseminación de genes de resistencia a ellos. Considerando que en el Lago de Valencia drenan grandes volúmenes de agua producto de una intensa actividad antropogénica, se planteó la evaluación de la resistencia bacteriana en tilapias silvestres y cultivadas y determinar la concentración inhibitoria mínima para los antimicrobianos seleccionados. La sensibilidad fue evaluada utilizando dos métodos: uno semi cuantitativo de difusión a partir del disco en agar Mueller-Hinton y uno cuantitativo determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM). Aunque la resistencia a los antimicrobianos en las muestras tomadas en el Lago de Valencia fue elevada (6-12 compuestos), se registraron variaciones en las diferentes especies, detectándose multiresistencia en todas las bacterias, con una mayor resistencia en ambiente de cultivo (8-12 compuestos) que en ambiente natural. El ácido oxolínico, compuesto ampliamente usado en la acuicultura y que carece de importancia en salud pública, parece ser el más útil en inhibir el desarrollo de estas bacterias, con una CIM en el rango de 0,5-10 µg/mL. La elevada resistencia y los valores amplios de CIM detectados destacan el hecho de que el uso de los antimicrobianos debe realizarse en forma responsable, con un estudio previo de la resistencia *in vitro*, para evitar la selección de cepas bacterianas resistentes.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, tilapia, salud pública.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antimicrobials exerts high selective pressure on bacteria, provoking the emergence and

dissemination of genes resistance to them. Considering that in Lake Valencia great volumes of water drain as a consequence of intense anthropogenic activities, the bacterial resistance in feral and cultured tilapia was evaluated, and the inhibitory concentration of selected antimicrobials was determined. The sensitivity was evaluated by two methods: a semi quantitative one (Mueller-Hinton agar disk diffusion method) and a quantitative one, determining the minimal inhibitory concentration (MIC). Variations were registered for the different species, observing multiple resistance in all the bacteria, with a higher resistance in cultured conditions (8-12 compounds) than in feral ones, although the antimicrobial resistance in Lake Valencia was high too (6-12 compounds). Oxolinic acid, a compound widely used in aquaculture, that does not have any importance in human health, seems to be the most effective in inhibiting the development of these bacteria, with a MIC in the range of 0.5-10 µg/mL. The high resistance and the wide range of MIC values found, emphasises the fact that the use of antimicrobials should be carried out in a controlled manner and with a previous study of resistance *in vitro*, in order to prevent the selection of resistant bacterial strains.

Key words: Bacterial resistance, tilapia, public health.

INTRODUCCIÓN

El inicio de la era de los antibióticos, a finales de la década de los años 40, trajo esperanzas de erradicar o controlar enfermedades infecciosas; sin embargo, el uso universal indiscriminado y arbitrario de los mismos en medicina humana y animal, incluida aquí la acuicultura, ha traído serias consecuencias, tales como la aparición de cepas bacterianas resistentes a múltiples antimicrobianos, y la presencia de residuos antibióticos en el ambiente acuático y en la carne del animal [2, 3, 8, 23, 25, 26]. Además debe considerarse uno de los

problemas más graves la presencia en el ambiente de elementos genéticos que transmiten resistencia.

El uso indiscriminado de los antimicrobianos ejerce una fuerte presión selectiva entre las bacterias, lo que trae consigo la selección y diseminación de genes resistentes a los antimicrobianos, con mayor intensidad en los hospitales, en los botaderos urbanos de basura, en los efluentes que reciben aguas servidas, ya sea por el sistema de desagüe urbano o por el agua arrastrada por la escorrentía producto de las lluvias [10, 29].

Es por ello que la aparición de cada nuevo antimicrobiano va seguida de un progresivo desarrollo de resistencia al mismo en lapsos variables, ya que se promueve la desaparición de cepas susceptibles y la aparición de cepas resistentes [8]. El incremento de la resistencia de los microorganismos a los agentes quimioterapéuticos, dificulta el tratamiento de infecciones en el hombre, por las limitaciones que se presentan en la elección de los antibióticos [15].

Esto ha traído como consecuencia la necesidad de medir la sensibilidad a los antimicrobianos, siendo importante enfatizar que esta prueba es solo una guía para el clínico, no una garantía de que el agente antimicrobiano será efectivo en la terapia [19]. La sensibilidad a los antimicrobianos puede ser evaluada utilizando dos métodos: uno semi cuantitativo, que consiste en la difusión a partir del disco en agar Mueller-Hinton (AM-H) [5], y uno cuantitativo, mediante el cual se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) [19, 20], siendo el primer método el más aplicado por ser el más sencillo y menos costoso [7].

Considerando que en el Lago de Valencia drenan grandes volúmenes de aguas servidas, provenientes de hospitales, actividades domésticas, industriales y agrícolas, y que especies como la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) y la petenia (*Caquetaia kraussi*) son capturadas en grandes cantidades para el consumo humano, que luego son comercializadas en forma de filete, en diferentes ciudades del país [6]. Álvarez y col. [1] realizaron un estudio desde marzo de 1999 a abril de 2000, en el que identificaron miembros de la bacterioflora aerobia Gram negativa del intestino de tilapias sanas, provenientes del Lago de Valencia y también de una granja comercial de la región central del país, así como, del agua y sedimento del entorno, la mayoría de estas especies: *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae*, han sido reportadas como causantes de problemas sanitarios en el hombre y en la acuicultura [4, 13, 14, 22, 27]. En una segunda etapa, utilizando las cepas bacterianas aisladas por Álvarez y col. [1], se planteó evaluar la resistencia bacteriana de miembros de la bacterioflora intestinal aerobia de tilapias silvestres y cultivadas, con el método estandarizado de difusión a partir del disco y determinar la concentración inhibitoria mínima de los siguientes antimicrobianos: ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cloranfenicol, eritromicina, estreptomycin, kanamicina, furazolidona, nitrofurazona, novobiocina, polimixina B y tetraciclina frente a cepas bacterianas seleccionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sensibilidad a los antimicrobianos

Fue evaluada usando bacterias jóvenes (18 h) y recientemente aisladas (incubadas a 30°C por 24-48 h), cultivadas en caldo tripticasa soya e incubadas durante 18 horas a 30°C. Las cepas fueron previamente aisladas por Álvarez y col. [1] durante el período 1999-2000, producto del procesamiento de tilapias (*Oreochromis mossambicus*) silvestres provenientes del Lago de Valencia, y de tilapias cultivadas [tilapia azul (*O. aureus*) y el tetrahíbrido de la tilapia roja (*O. mossambicus* x *O. urolepis hornorum* x *O. niloticus* x *O. aureus*)] en una granja comercial de la región central del país, así como, del agua y sedimento del entorno. En la TABLA I se indican en detalle las especies bacterianas utilizadas en la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos.

Antibiogramas

El método seguido para este estudio fue el de difusión a partir del disco en agar Mueller-Hinton (AM-H; DIFCO), indicado por Bauer y col. [5], e involucró los siguientes compuestos (BBL): ácido nalidíxico (30 mcg), ácido oxolínico (2 µg), cloranfenicol (30 mcg), eritromicina (15 mcg), estreptomycin (10 mcg), gentamicina (10 mcg), kanamicina (30 mcg), nitrofurantoina (300 mcg), novobiocina (30 mcg), penicilina G (10 UI), polimixina B (300 mcg), tetraciclina (30 mcg), trimetoprim/sulfametoxazol (25 mcg) y triple sulfa (300 mcg). Los resultados fueron interpretados de acuerdo al Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (NCCLS: por su siglas en inglés: "National Comité for Clinical Laboratory Standards") [24]. Se utilizó como control de la calidad de los discos la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Sensibilidad al agente vibriostático 0/129

(2,4-diamino-6,7-diisopropil teridina sal fosfato; SIGMA)

La sensibilidad al agente vibriostático fue determinada utilizando una solución con una concentración de 10 mcg y de 150 mcg/disco. Para esta prueba se utilizaron discos estériles (121°C/15 min.) de 0,7 mm de diámetro (S&S Filter paper No. 740-E), impregnados con 0,1 mL de la solución antes indicada, esterilizada por filtración (utilizando filtros de 0,22 µm de porosidad), de 0/129 y secados a 37°C. Los discos fueron colocados sobre la superficie de placas sembradas de AM-H [17]. Se utilizó como criterio de sensibilidad la presencia de halo, independientemente del diámetro de este último.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima en agar (CIM)

La metodología [9, 19, 20] consistió en la utilización del AM-H como medio base. Las cepas bacterianas seleccionadas y empleadas en esta prueba se indican en la TABLA II. Los antimicrobianos usados fueron: ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cloranfenicol, eritromicina, estreptomycin, kanamicina, ni-

TABLA I
IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE DE LOS BACILOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES CLASIFICADOS
DURANTE EL PERÍODO MARZO 1999 - ABRIL 2000 [1]

Especie Bacteriana	Ambiente Silvestre				Ambiente de cultivo			
	Agua	Sedimento	Juveniles	Total	Agua	Sedimento	Juveniles	Total
<i>Aeromonas</i> spp.	8	7	51	66	3	4	70	77
<i>A. caviae</i>	1			1			1	1
<i>A. hydrophila anaerogenes</i>							1	1
<i>A. hydrophila hydrophila</i>	1		3	4			9	9
<i>A. schubertii</i>			4	4			3	3
<i>A. sobria</i>			2	2			1	1
<i>A. veronii</i>			4	4			1	1
<i>Plesiomonas</i> spp.			10	10		2	2	4
<i>P. shigelloides</i>		1	21	23			14	14
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		1			1		6	8
Enterobacteriaceae	1	3	5	9	1	2	6	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>							1	1
<i>Vibrio cholerae</i>			2	2				
No identificadas	4	2	13	19	7	7	9	23
Nº total de cepas	15	13	115	143	1	0	124	152
Nº total de especies	2	2	6	7	0	0	9	9

trofurantoína, nitrofurazona, polimixina B, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol.

Utilizando los diluyentes indicados por Lightner [19], se prepararon 8 diluciones para obtener concentraciones decrecientes finales de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL y 0,5 µg/mL.

En la preparación del agar se diluyeron 3,8 g de AM-H en 90 mL de agua destilada, se procedió a su esterilización (121°C por 15 minutos), luego de lo cual se mantuvo el medio a 50°C en un baño maría hasta su uso. Se le agregó a cada 90 mL de agar, el volumen apropiado de la concentración intermedia del antimicrobiano (en forma decreciente), se mezcló bien e inmediatamente se vertió la mezcla en las placas estériles desechables, se dejó enfriar y se sometió el medio a control hasta el día siguiente a 37°C. Se usó un mínimo de 4 placas por dilución. Adicionalmente se sembraron 2 placas control también en cuadruplicado, una de las cuales estuvo libre del antimicrobiano y contuvo un volumen equivalente del máximo del solvente empleado, mientras que la otra fue de AM-H sin ningún aditivo, para descartar la existencia de un efecto tóxico del solvente sobre la cepa bacteriana y asegurar la viabilidad de la bacteria, respectivamente. La CIM se estipuló como la concentración del antimicrobiano en la primera placa de una serie sin crecimiento visible.

La preparación del inóculo consistió en los siguientes pasos: a, cada cepa bacteriana se sembró en caldo tripticasa soya (CTS; DIFCO), y fue incubada a 30-35°C durante 18 ho-

ras; b, luego fue resuspendida en solución salina estéril (SSE) igualando la concentración a la del tubo No. 0,5 del nefelómetro de MacFarland [10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL]; c, la concentración de 10^8 fue diluida 1:10 (10^7 UFC/mL), y se tomó 1 µL para inocular las placas con las diferentes diluciones del antimicrobiano y las placas control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resistencia a los antimicrobianos

Se registraron diferentes niveles de resistencia a los antimicrobianos ensayados para las especies bacterianas, detectándose multiresistencia de todas las cepas aisladas a por lo menos tres de los mismos.

En el Lago de Valencia (ambiente natural) el rango de resistencia ($R \geq 50\%$) estuvo entre 6-12 de los compuestos (TABLA IV), detectándose para los géneros: *Aeromonas* frente a seis compuestos, *Plesiomonas* ante seis de estos, *Vibrio* frente a nueve y *Pseudomonas* ante 12.

En el ambiente de cultivo, el rango de resistencia ($R \geq 50\%$) estuvo entre 6 y 13 de los compuestos probados (TABLA IV), específicamente para el género *Aeromonas* frente a nueve compuestos, para *Plesiomonas* frente a 13, para *Pseudomonas* ante 10 y para *Klebsiella* frente a 11.

Al analizar la resistencia por especie en ambiente silvestre (TABLA V) se observa que de todas las especies aisladas

TABLA II
PROCEDENCIA DE LAS CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CIM
DE LOS ANTIMICROBIANOS SELECCIONADOS

Especies bacterianas	Fuente	Procedencia	Código interno
<i>Aeromonas hydrophila anaerogenes</i>	Juvenil tilapia	Juvenil tilapia	Granja comercial
<i>A. hydrophila hydrophila</i>	Juvenil tilapia	Granja comercial	102 1° AQUA 98
<i>A. hydrophila hydrophila</i>	Juvenil tilapia	Granja comercial	70 1° AQUA 99
<i>A. hydrophila hydrophila</i>	Agua	Lago de Valencia	82 1° LV 00
<i>A. schubertii</i>	Juvenil tilapia	Granja comercial	31 1° AQUA 99
<i>A. schubertii</i>	Juvenil tilapia	Lago de Valencia	144 1° LV 00
<i>A. sobria</i>	Juvenil tilapia	Lago de Valencia	38 1° LV 99
<i>A. veronii</i>	Agua	Lago de Valencia	19 1° LV 99
<i>A. veronii</i>	Juvenil tilapia	Lago de Valencia	30 1° LV 99
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Juvenil tilapia	Granja comercial	4SAL 1° AQUA 99
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Juvenil tilapia	Lago de Valencia	35 1° LV 99
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Juvenil tilapia	Lago de Valencia	70 1° LV 99
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Juvenil tilapia	Granja comercial	5 1° AQUA 99
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Juvenil tilapia	Granja comercial	57 1° AQUA 99
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Juvenil tilapia	Granja comercial	87 1° AQUA 99
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Reproductor de tilapia	Granja comercial	86M
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Juvenil tilapia	Granja comercial	131 1° AQUA 98
<i>Vibrio cholerae</i>	Juvenil tilapia	Lago de Valencia	31 1° LV 00
<i>Vibrio cholerae</i>	Juvenil tilapia	Lago de Valencia	149 1° LV 00

la mayor resistencia observada fue en la especie *Aeromonas hydrophila hydrophila* proveniente del agua, presentando 100% resistencia frente a 10 compuestos: eritromicina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, novobiocina, penicilina G, polimixina B, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol y triple sulfá. Las cepas de *Vibrio cholerae* resultaron 100% resistentes al ácido nalidíxico, estreptomycin, novobiocina, penicilina G y a la triple sulfá; 50% resistentes al ácido oxolínico, eritromicina, kanamicina y a la tetraciclina, con un 100% de sensibilidad al cloranfenicol, gentamicina, nitrofurantoína, polimixina B y al trimetoprim/sulfametoxazol. Estas cepas resultaron sensibles a la concentración de 100 µg y de 150 µg del vibriostato O/129. Shukla y col. [28] realizaron un estudio de sensibilidad a ciertos antimicrobianos encontrando un número de *Vibrio cholerae* y *Aeromonas* spp. resistentes a la estreptomycin, co-trimoxazol y a la nitrofurantoína, pero sensibles al cloranfenicol, kanamicina, gentamicina y al ácido nalidíxico.

Es interesante destacar que las cepas de *Pseudomonas fluorescens* presentaron diferencias en cuanto a la resistencia frente a los antimicrobianos estudiados en el presente trabajo. La cepa proveniente del agua del medio ambiente sólo presentó resistencia y del 100% a la nitrofurantoína, novobiocina y a la penicilina G; sin embargo, las cepas aisladas de juveniles resultaron resistentes a 10 y 11 de los compuestos probados, y en las siguientes proporciones: 100% al ácido nalidíxico, cloranfe-

nicol, eritromicina, nitrofurantoína, novobiocina, penicilina G y a la tetraciclina, 80% a la estreptomycin, trimetoprim/sulfametoxazol y a la triple sulfá. Una cepa de *Pseudomonas fluorescens* aislada del sedimento, resultó resistente a 12 antimicrobianos, y sensible sólo a la gentamicina y a la polimixina B.

Cuando se hace el análisis de las resistencias determinadas por especie en ambiente de cultivo (TABLA VI) cabe destacar lo siguiente:

- a. La especie *Plesiomonas shigelloides* resultó 100% resistente a la estreptomycin, kanamicina, penicilina G, y triple sulfá; 93% resistente a la novobiocina, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol; 71% resistente a la gentamicina; 64% resistente al ácido nalidíxico, ácido oxolínico y eritromicina; 57% resistente a la polimixina B; 43% al cloranfenicol y 100% sensible a las dos concentraciones utilizadas del vibriostato O/129. En esta última especie fueron encontradas cepas resistentes a 13 de los 14 antimicrobianos probados.
- b. La cepa de *Klebsiella pneumoniae* resultó resistente a 10 de los 14 compuestos probados: kanamicina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomycin, kanamicina, nitrofurantoína, novobiocina, penicilina, tetraciclina y a la triple sulfá, y sensible al ácido oxolínico, gentamicina, trimetoprim/sulfametoxazol y a la polimixina B. Koneman y

TABLA III
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE CEPAS BACTERIANAS SELECCIONADAS FRENTE
A ALGUNOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos	Especie Bacteriana								
	<i>Aeromonas hydrophila anaerogenes</i> (n= 1)	<i>A. hydrophila hydrophila</i> (n= 3)	<i>A. schubertii</i> (n= 2)	<i>A. sobria</i> (n= 1)	<i>A. veronii</i> (n= 2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n= 1)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (n= 4)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (n= 3)	<i>Vibrio cholerae</i> (n= 2)
	Rango (mcg/mL)	Rango (mcg/mL)	Rango (mcg/mL)	Rango (mcg/mL)	Rango (mcg/mL)	Rango (mcg/mL)	Rango (mcg/mL)	Rango (mcg/mL)	Rango (mcg/mL)
Ácido nalidíxico	2	2 - 5	0,5	0,5	0,5	50	0,5 - 50	2 - >100	0,5
Ácido oxolínico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5 - 10	0,5
Cloranfenicol	1	5 - 10	0,5	2	1 - 2	50	0,5 - 1	1 - >100	2
Eritromicina	20	20 - 100	5 - 10	20	10	>100	20 - 50	10 - >100	10 - 20
Estreptomicina	20	10 - 50	20	100	20	10	50 - > 100	20 - >100	20
Kanamicina	50	5 - 10	5 - 50	5	20	5	50	5 - 10	10
Furazolidona	0,5	0,5 - 2	0,5 - 5	0,5	0,5	50	0,5 - 20	1 - >100	0,5 - 1
Nitrofurazona	2	5 - 50	5 - 10	5	2 - 10	>100	5 - 10	10 - >100	5 - 20
Novobiocina	50	50 - >100	20 - 100	>100	1 - 5	>100	50 - 100	2 - >100	1 - 5
Polimixina B	5	2 - >100	1 - 5	5	100 - >100	5	0,5 - 1	2 - 100	10 - 100
Tetraciclina	0,5	0,5 - 5	0,5 - 50	0,5	0,5	100	0,5 - 50	0,5 - 10	0,5

n= número de cepas.

col. [20] señalan que los miembros del género *Klebsiella* tienen la tendencia de portar plásmidos de resistencia a diversos antimicrobianos, por lo que puede pronosticarse la existencia de infecciones con cepas resistentes a múltiples de estos compuestos. La cepa aislada en el presente trabajo presentó una elevada resistencia a los antimicrobianos estudiados.

En la FIG. 1 se observa una mayor resistencia de las bacterias aisladas bajo condiciones de cultivo frente al ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, polimixina B y a la tetraciclina. Dentro del grupo anterior están el ácido oxolínico, cloranfenicol, eritromicina y la tetraciclina, ampliamente usados en la acuicultura para el control de patógenos Gram negativos [4]. También se observa que en el Lago de Valencia la resistencia a: la eritromicina, kanamicina, novobiocina, penicilina, trimetoprim/sulfametoxazol y la triple sulfá, compuestos usados en medicina humana, sobrepasó el 50% [11, 20].

La granja de cultivo muestreada en este trabajo, es abastecida con agua de pozo; sin embargo, el nivel de resistencia en los peces (9 compuestos), como en el agua (10 compuestos) y sedimento (11 compuestos), es más elevada que en el Lago de Valencia. Esto podría deberse: a) al uso en forma inapropiada de los compuestos, es decir, sin determinación de la resistencia previa y/o a la aplicación indiscriminada de ellos como preventivos; b) a la transferencia de bacterias con elevada resistencia: b.1) mediante la introducción en la granja de reproductores o alevines, o b.2) en el agua de escorrentía generada en la época

de lluvia en la región. Esto último es particularmente importante, pues la granja está rodeada de grandes extensiones de terreno dedicadas a la cría de otros animales para consumo humano. Chandrasekaran y col. [10] consideran que el agua de lluvia y la escorrentía de ésta, desplaza bacterias terrestres antibiótico-resistentes hacia cuerpos de agua marinos, lo que también puede ocurrir en cuerpos de agua dulce.

El ambiente acuático del Lago de Valencia está fuerte y constantemente intervenido por actividades antropogénicas y por desechos industriales y agrícolas, por ello, las aguas servidas que son vertidas a este Lago provienen, fundamentalmente, de ambientes tales como hospitales, conjuntos habitacionales, vertederos de basura [21], que constantemente están eliminando bacterias con altos niveles de resistencia a numerosos antimicrobianos [16, 18].

Concentración inhibitoria mínima (CIM)

La prueba de la CIM se emplea para determinar la concentración mínima de una sustancia, y se expresa en µg/mL necesaria para inhibir el desarrollo de un microorganismo [19]. El método de determinación de la CIM efectuado en placas de agar, ha sido exitosamente adaptado para el uso rutinario en grandes laboratorios probando sólo concentraciones seleccionadas de antibiótico. Una suspensión estandarizada de bacterias es inoculada en una serie de placas de agar, cada una conteniendo una concentración diferente del antimicrobiano, cubriendo un margen alrededor del rango terapéutico de la droga [20].

TABLA IV
RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS POR GÉNERO BACTERIANO Y POR TIPO DE AMBIENTE

Antimicrobiano	Identificación Bacteriana																			
	Ambiente Silvestres						Ambiente Cultivo													
	Aeromonas (n= 81)		Plesiomonas (n=32)		Vibrio (n= 2)		Pseudomonas (n= 1)		Gram-negativos (totales) (n= 3)		Aeromonas (n= 93)		Plesiomonas (n= 18)		Pseudomonas (n= 7)		Klebsiella (n=1)		Gram-negativos totales (n= 119)	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Acido nalidíxico	10	12	4	13	2	100	1	100	17	15	48	52	10	56	6	86	1	100	65	55
Acido oxolínico	8	10	2	6	1	50	1	100	12	10	20	22	11	61	0	0	1	100	32	27
Cloranfenicol	3	4	2	6	0	0	1	100	6	5	26	28	9	50	6	86	1	100	42	35
Eritromicina	16	20	11	34	1	50	1	100	29	25	60	65	11	61	6	86	1	100	78	66
Estreptomicina	75	93	30	94	2	100	1	100	108	93	86	92	16	89	5	71	1	100	108	91
Gentamicina	16	20	11	34	0	0	0	0	27	23	35	38	10	56	3	43	0	0	48	40
Kanamicina	65	80	31	97	1	50	1	100	98	84	70	75	17	94	0	0	1	100	88	74
Nitrofurantoina	4	5	0	0	0	0	1	100	5	4	30	32	0	0	6	100	1	100	37	32
Novobiocina	73	90	32	100	2	100	1	100	108	93	84	90	17	94	6	100	1	100	108	92
Penicilina G	81	100	32	100	2	100	1	100	116	100	90	97	18	100	6	100	1	100	116	97
Polimixina B	16	20	8	25	0	0	0	0	24	21	41	44	11	61	0	0	0	0	52	44
Tetraciclina	19	23	1	3	1	50	1	100	22	20	59	63	17	94	6	86	1	100	83	70
Trimetro./Sulfame.	58	72	22	69	0	0	1	100	81	70	69	74	15	83	5	71	0	0	89	75
Triple sulfa	79	98	32	100	2	100	1	100	114	98	89	96	18	100	5	71	1	100	113	95

N= número de cepas. %= porcentaje resistente.

TABLA V
RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS POR ESPECIE BACTERIANA, AISLADAS DE AMBIENTE SILVESTRE

Antimicrobiano	Identificación Bacteriana																											
	Agua				Sedimento				Tilapias																			
	Aeromonas spp. (n= 8)		A. caviae (n= 1)		A. hydrophila (n= 1)		Aeromonas spp (n= 7)		Plesiomonas shigelloides (n=1)		Pseudomonas fluorescens (n=1)		Aeromonas spp. (n=51)		A. hydrophila (n=3)		A. sobria (n=2)		A. schubertii (n=4)		A. veronii (n= 4)		Plesiomonas shigelloides (n=21)		Vibrio cholerae (n=2)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Acido nalidixico	2	25	0	0	0	0	2	29	0	0	1	100	4	8	0	0	0	0	2	50	0	0	1	10	3	14	2	100
Acido oxolinico	2	25	0	0	0	0	3	43	0	0	1	100	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	1	50	
Cloranfenicol	2	25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	1	5	0	0
Eritromicina	1	13	0	0	1	100	3	43	1	100	1	100	6	12	0	0	1	50	4	100	0	0	3	30	7	33	1	50
Estreptomicina	7	88	1	100	1	100	6	86	0	0	1	100	48	94	3	100	1	50	4	100	4	100	10	100	20	95	2	100
Gentamicina	2	25	0	0	1	100	2	29	0	0	0	0	10	20	0	0	0	0	0	0	0	1	25	1	10	48	0	0
Kanamicina	7	88	0	0	1	100	5	71	1	100	1	100	41	80	3	100	2	100	2	50	4	100	10	100	20	95	1	50
Nitrofurantoina	1	13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Novobiocina	7	88	1	100	1	100	7	100	1	100	1	100	46	90	3	100	2	100	4	100	2	50	10	100	21	100	2	100
Penicilina G	8	100	1	100	1	100	7	100	1	100	1	100	51	100	3	100	2	100	4	100	4	100	10	100	21	100	2	100
Polimixina B	4	50	1	100	1	100	3	43	0	0	0	0	5	10	0	0	0	0	0	0	2	50	0	0	8	38	0	0
Tetraciclina	4	50	0	0	1	100	5	71	0	0	1	100	8	16	0	0	1	50	0	0	0	0	0	0	1	5	1	50
Trimeto./Sulfame.	5	63	0	0	1	100	7	100	0	0	1	100	34	67	3	100	1	50	4	100	3	75	6	60	16	76	0	0
Triple sulfa	8	100	1	100	1	100	7	100	1	100	1	100	49	96	3	100	2	100	4	100	4	100	10	100	21	100	2	100

N= número de cepas. %= Porcentaje resistente.

N= número de cepas. %= Porcentaje resistente.

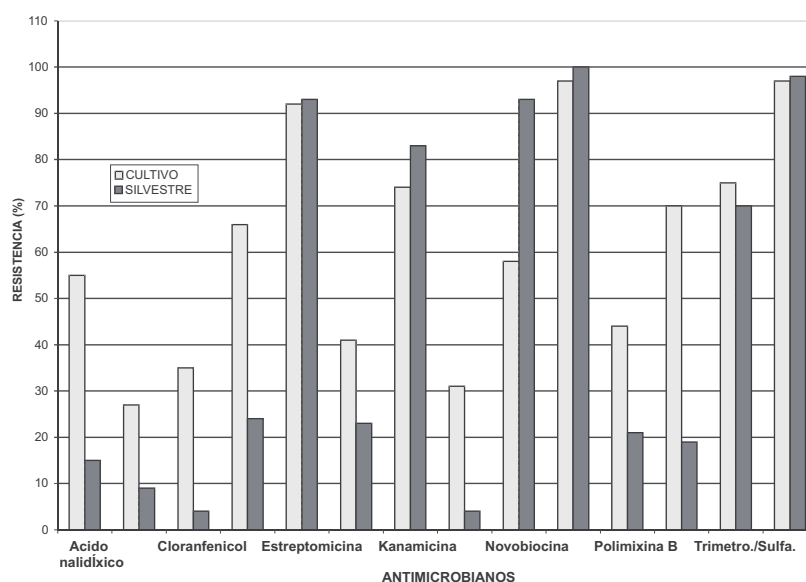


FIGURA 1. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE AMBIENTES DE CULTIVO Y SILVESTRE.

Generalizar en relación a los valores de las CIM aquí obtenidos es difícil, aunque en líneas generales se puede decir que el ácido oxolínico, compuesto ampliamente usado en la acuicultura para controlar las enfermedades ocasionadas por bacilos Gram negativos, y que carece de importancia en terapéutica humana, parece ser el más útil en cuanto a inhibir el desarrollo de las especies bacterianas aquí estudiadas. Con este compuesto se midió una CIM en el rango de 0,5 – 10 µg/mL, (0,5 – 10 ppm); sin embargo, se presentaron cepas de *Pseudomonas fluorescens* que requirieron valores de hasta 10 ppm para lograr la inhibición de su desarrollo. El siguiente compuesto en efectividad general fue la kanamicina, presentando una CIM en el rango de 5 – 50 µg/mL. En los demás compuestos antimicrobianos se determinaron rangos de CIM que presentaron valores mucho más distanciados o erráticos para cada especie bacteriana estudiada: el ácido nalidíxico, cloranfenicol, furazolidona, polimixina B y tetraciclina (0,5 - > 100 µg/mL); novobiocina (1,0 - > 100 µg/mL); nitrofurantoína (2,0 - > 100 µg/mL); eritromicina (5,0 - > 100 µg/mL) y estreptomina (10,0 µg/mL - > 100 µg/mL).

Las CIM variaron mucho intraespecíficamente en cada compuesto, con la excepción, desde luego, del ácido oxolínico. Los compuestos más efectivos en inhibir el desarrollo bacteriano fueron: para las *Aeromonas* el ácido oxolínico (0,5 µg/mL) en primer lugar, luego el ácido nalidíxico y la furazolidona (0,5-5 µg/mL) y finalmente el cloranfenicol (0,5-10 µg/mL). En el caso de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* se observaron valores muy erráticos en todos los antimicrobianos estudiados, aunque pueden indicarse el ácido oxolínico y la tetraciclina (0,5-10 µg/mL). En las *Plesiomonas* se señalan en primer término el ácido oxolínico (0,5 µg/mL), seguido del cloranfenicol y la polimixina B (0,5-1 µg/mL), mientras que las cepas de *Vibrio cholerae* fueron inhibidas en primer lugar por el ácido nalidíxico, el ácido oxolínico y la tetraciclina (0,5 µg/mL); en

segundo lugar por la furazolidona (0,5-1 µg/mL), y en tercer lugar por el cloranfenicol (2 µg/mL). La enterobacteria *Klebsiella pneumoniae* fue inhibida por el ácido oxolínico (1 µg/mL).

CONCLUSIONES

1. Las tilapias silvestres y las cultivadas en agua dulce constituyen un reservorio de bacterias potencialmente patógenas para este recurso y para la salud pública, presentando elevada resistencia a diversos antimicrobianos de uso común en acuicultura y en salud pública.
2. Se encontró una mayor resistencia en ambiente de cultivo (granja) que en ambiente silvestre (Lago de Valencia), aunque es importante destacar que en este último ambiente, la resistencia también fue elevada.
3. Los valores amplios registrados de la CIM en las cepas estudiadas confirman la necesidad de realizar un cultivo inicial para identificar el agente y determinar la sensibilidad ante los antimicrobianos, para finalmente poder seleccionar el terapéutico apropiado.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue financiado con fondos del Proyecto 02-613-04001 Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA)-PRODETEC-Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCT).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ÁLVAREZ, J.D.; ÁLVAREZ, A.M.; AGURTO, C.P. Bacterioflora Gram negativa aerobia del intestino de tilapias silvestres y cultivadas en Venezuela. **Vet. Trop.** 25. (2): 209-228. 2000.

- [2] AOKI, T.; KITAO, T.; KAWANO, K. Changes in drug resistance of *Vibrio anguillarum* in cultured ayu *Plecoglossus altivelis* Temmirick and schelgel, in Japan. **J. Fish Dis.** 4: 223-230. 1981.
- [3] AUSTIN, B. Chemotherapy of Bacterial Fish Diseases. **Fish and shellfish Path.** 19-26. 1985.
- [4] AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial Fish Pathogens – Disease in Farm and Wild Fish.** 2nd. Ed. Ellis Horwood Ltd. Chichester, England, U.K. 384 pp. 1993.
- [5] BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Path.** 45: 493-496. 1966.
- [6] BISBAL, F. Consumo de la Fauna en el Lago de Valencia, Estados Aragua y Carabobo, Venezuela. **Bol. Centro Invest. Biol.** 34 (3): 362-375. 2000.
- [7] BRANSON, E. Clinical relevance of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs). **Aquacult.** 196: 289-296. 2001.
- [8] CARMONA, O.; GUZMÁN, M.; Grupo Venezolano de la Resistencia a los Antimicrobianos en Venezuela. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Venezuela. **Bol. Soc. Ven. Microb.** 14 (1): 15-25. 1994.
- [9] CHRISTOFILOGIANNIS, P. Current inoculation methods in MIC determination. **Aquacul.** 196: 297-302. 2001.
- [10] CHANDRASEKAN, S.; BALAKRISHNAN, V.; LALITHAKUMARI, D. Transfer and Expression of a Multiple Antibiotic Resistance Plasmid in Marine Bacteria. **Curr. Microb.** 37: 347-351. 1998.
- [11] COMEGNA, M.; GUZMÁN, M.; CARMONA, O.; MOLINA, M.; Grupo Venezolano de la Resistencia a los Antimicrobianos en Venezuela. Resistencia bacteriana en Venezuela. **Bol. Soc. Ven. Microb.** 20 (1):58-63. 2000.
- [12] CRUZ, J.M.; SARAVIA, A.; EIRAS, J.C.; BRANCO, R.; SOUSA, J. An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Portugal. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.** 6: 20-22. 1986.
- [13] DASKALOV, H.; STOBIE, M.; AUSTIN, A. *Klebsiella pneumoniae*: A pathogen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)? **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.** 18: 26-28. 1998.
- [14] FARÍA, J.; RIVERO, Z.; GALLEGÓ, B.; ALLARA, M. Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de BGNNFG aislados de leche cruda (II). **Rev. Científ. FCV-LUZ.** IX (1): 11-16. 1999.
- [15] FONTAINE, T.D.; HOADLEY, A.W. Transferable drug resistance associated with coliformes from hospital and domestic sewage. **Health Lab. Sci.** 13: 238-245. 1976.
- [16] FURNISS, A.L.; LEE, J.V.; DONOVANT, J. **The Vibrios.** Public Health Laboratory Service. Monograph Series 11. London, England. U.K. 58 pp. 1978.
- [17] GRABOW, W.O.K.; PROZESKY, O.W. Drug resistance of coliform bacteria in hospital and city sewage. **Antimicrob. Agents Chemother.** 3: 175-180. 1973.
- [18] LIGHTNER, D.V. **Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp.** The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, U.S.A. 1996.
- [19] KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** 5th. Ed. J.B. Lippincott Company. Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A. 1.395 pp. 1997.
- [20] MINISTERIO DEL AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES (MARNR). II Seminario Técnico del Programa de Saneamiento Ambiental Integral de la Cuenca del Lago de Valencia. Estudio del Lago de Valencia. Parámetros Físico-Químicos y Biológicos (1971-1995). Convenio MARNR – Fundación Polar. Caracas, 19 de mayo. 58 pp. 1995.
- [21] MENDOZA, C.; HERNÁNDEZ, P. Incidencia de *Plesiomonas shigelloides* en tetrahíbridos de tilapia (*Oreochromis* sp.). **Arch. Latinoam. de Nutri.** 49: 67-71. 1999.
- [22] MYHR, E.; LARSEN, J.L.; LILLEHANG, A.; GUDDING, R.; HEUM M.; HASTEIN, T. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species, isolated from farmed fish in Norway. **Appl. Environ. Microb.** 57: 2750-2757. 1991.
- [23] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS document M100-S12 (ISBN 1-56238-454-6) Pennsylvania, U.S.A. 117 pp. 2002.
- [24] NUSBAUM, K.E.; SHOTTS, E.B. Action of selected antibiotics on four common bacteria associated with diseases of fish. **J. Fish Dis.** 4: 397-404. 1981.
- [25] PEARSON, M.; INGLIS, V. A sensitive microbioassay for the detection of antibacterial agents in the aquatic environment. **J. Fish Dis.** 16: 255-260. 1993.
- [26] ROBERTS, R.J. Motile Aeromonad septicaemia. In: **Bacterial Diseases of Fish** (Editors: V. Inglis, R.J. Roberts and N.R. Bromage). Blackwell Science. Oxford, England, U.K. 143-156 pp. 1993.
- [27] SHUKLA, B.N.; SINGH, D.V.; SANYAL, S.C. Attachment of noncultural toxigenic *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. to the aquatic arthropod *Gerris spinolae* and plants in the River Ganga, Varanasi. **FEMS Immunol. and Med. Microb.** 12: 113-120. 1995.
- [28] YOUNG, H.K. Antimicrobial resistance spread in aquatic environment. **J. Antimicrob. Agents Chemoth.** 31: 627-635. 1993.