



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“EFECTO DE LA TERAPIA CON OXITETRACICLINA
SOBRE BACTERIAS QUE COMPONEN LA MICROBIOTA
INTESTINAL DE AVES DE POSTURA”

Antonio Francisco Pérez Carrasco

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: BETTY SAN MARTIN N.

SANTIAGO, CHILE

2012

ÍNDICE

Resumen	2
Summary	3
Introducción	4
Revisión bibliográfica	5
Hipótesis	16
Objetivos	16
Material y método	17
Resultados	25
Discusión	34
Conclusiones	40
Bibliografía	41

RESUMEN

La composición de la microbiota de las aves depende de varios factores, entre los que se encuentra el uso de antimicrobianos. Los antimicrobianos pueden influir en el equilibrio de la microbiota intestinal de las aves, así como también favorecen la aparición de cepas resistentes a este tipo de fármacos.

En este estudio, el objetivo fue evaluar el efecto de la terapia con oxitetraciclina sobre algunas bacterias que componen la microbiota intestinal y la selección de cepas resistentes a los antimicrobianos en aves de postura.

Se distribuyeron al azar treinta aves de postura de 25 semanas en dos grupos experimentales: grupo I (control) no recibió tratamiento y grupo II recibió oxitetraciclina por 10 días. Se realizó un análisis cuantitativo de los cambios producidos en las poblaciones de *Lactobacillus spp.*, y de las bacterias indicadoras *E. coli* y *Enterococcus spp.* Para estas dos últimas bacterias, se establecieron patrones de resistencia a los antimicrobianos.

Los resultados muestran que el tratamiento con oxitetraciclina afectó negativamente a las poblaciones de *E. coli* y *Enterococcus spp.*, y no tuvo efectos significativos sobre los *Lactobacillus spp.* Ambos grupos experimentales presentaron elevados niveles de resistencia a tetraciclinas. El fenómeno de multiresistencia fue más frecuente en cepas de *E. coli* que en las de *Enterococcus spp.*

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que el uso de tetraciclina disminuyó el número de *E. coli* y *Enterococcus spp.*, y además que existe un importante porcentaje de resistencia previa en las cepas estudiadas, por lo que es aconsejable que estos estudios se realicen en aves que no hayan tenido exposición previa a antimicrobianos.

Palabras claves: microbiota, antimicrobiano, oxitetraciclina, resistencia bacteriana, multiresistencia.

SUMMARY

Effect of the therapy with oxytetracyclin on the bacteria composing the intestinal microbiota in laying hens.

Microbiota composition in birds depends on several factors, among which is the antimicrobial use. Antimicrobials can affect the balance of the intestinal microbiota of birds, and also favor the emergence of resistant strains to these drugs.

In this study, the objective was to evaluate the effect of oxytetracycline therapy on the intestinal microbiota and the selection of resistant strains to antimicrobial agents in laying hens.

Thirty 25-weeks laying hens of were randomized in two experimental groups: group I (control) received no treatment and group II received oxytetracycline for 10 days. Quantitative changes were analyzed in *Lactobacillus spp* population's and indicator bacteria such as *E. coli* and *Enterococcus spp*. For the latter bacteria, putters of antimicrobials resistances were established.

The results show that the oxytetracycline treatment negatively affected *E. coli* and *Enterococcus spp* populations, and had no significant effects on *Lactobacillus spp*. Both experimental groups had high levels of tetracycline resistance. The multiresistance phenomenon was more common in *E. coli* strains than in *Enterococcus spp* strains.

According to these results, we conclude that tetracycline administration decreased the number of *E. coli* and *Enterococcus spp*. Also there is a significant levels of previous resistance in the studied strains, so it is recommended that these studies must be performed in birds with no previous antimicrobial exposure.

Keywords: microbiota, antimicrobial, oxytetracycline, bacterial resistance, multiresistance

INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal de las aves corresponde a una compleja comunidad de microorganismos que está compuesto principalmente por bacterias comensales y nocivas. Las poblaciones comensales participan en la producción de vitaminas, estimulación del sistema inmunológico y en la inhibición de las poblaciones de bacterias nocivas. Estas bacterias poseen un importante rol en la salud y funcionalidad del tracto gastro-intestinal, lo cual repercute en la productividad y en el bienestar de los animales de producción. Por otro lado, las poblaciones nocivas pueden estar involucradas en la putrefacción intestinal, producción de toxinas y en la inducción de infecciones, las cuales constituyen una amenaza para la salud contribuyendo a una calidad de vida deficiente, produciendo bajas eficiencias de conversión y mortalidad, con lo que se elevan los costos totales de producción.

Para el tratamiento de las enfermedades de origen bacteriano en aves de corral, son utilizados diversos antimicrobianos entre ellos la oxitetraciclina. La administración de este antimicrobiano podría producir cambios en la composición de la microbiota intestinal, así como también seleccionar microorganismos resistentes. Derivado de esto último, se debe considerar el riesgo potencial para la salud pública que implica la emergencia y diseminación de microorganismos zoonóticos resistentes a los antibióticos, como por ejemplo *Salmonella spp.* Considerando lo señalado, en muchos países se han impuesto restricciones en cuanto al uso de algunos antimicrobianos en producción animal y se han implementado programas para monitorear la resistencia a los antimicrobianos.

Por lo anterior, es importante conocer el efecto de antimicrobianos ampliamente usados como la oxitetraciclina, usada en dosis terapéuticas sobre la composición de la microbiota intestinal y la selección de cepas resistentes en gallinas de postura.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Microbiota normal de las aves

La microbiota intestinal en las aves se compone de distintos grupos bacterianos, las cuales pueden ser clasificadas como poblaciones nocivas y comensales (Koutsos y Arias, 2006). Esta microbiota tiene un rol importante en la nutrición, detoxificación de compuestos, ganancia de peso y además, proporciona protección contra las bacterias patógenas debido a que constituye la primera barrera contra patógenos provenientes del alimento (Amit-Romach *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2006). Distintos autores han descrito que la microbiota intestinal tiene una importante participación en la salud y el bienestar de los animales (Ricke y Pillai, 1999; Gong *et al.*, 2002; Dumonceaux *et al.*, 2006).

La microbiota intestinal de las aves se puede analizar mediante diferentes métodos, siendo el cultivo microbiológico el más utilizado. No obstante, estas técnicas son laboriosas y sólo se puede cultivar entre el 10 a 60% del total de bacterias presentes en la microbiota (Savage, 2001). Actualmente, la implementación de técnicas moleculares, como la amplificación mediante PCR del 16s rRNA, ha permitido complementar la información otorgada por los cultivos microbiológicos y descubrir nuevos grupos bacterianos intestinales, su diversidad y organización (Amit-Romach *et al.*, 2004; Backhed *et al.*, 2005).

La composición de la microbiota intestinal presenta una variación considerable entre individuos debido a que es afectada por diversos factores, entre ellos el tipo de dieta que reciben, la utilización de antimicrobianos, factores estresantes, infecciones con microorganismos patógenos y la edad de los animales (Binek *et al.*, 2000; Gavini *et al.*, 2001; Knarreborg *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007).

Es sabido que a medida que transcurre la vida de las aves se producen modificaciones en la dinámica de las poblaciones bacterianas en el intestino. De esta manera, luego de la eclosión, el tracto gastrointestinal de los pollitos es

rápidamente colonizado por microorganismos provenientes de la madre o del medio ambiente circundante. La colonización se inicia entre las tres a seis horas post eclosión del huevo con el establecimiento de grandes cantidades de bacterias anaeróbicas. Durante los primeros 2 a 4 días de edad el intestino delgado es colonizado por estreptococos y enterobacterias y luego aumenta el predominio del género *Lactobacillus spp*; mientras que en el ciego las principales poblaciones corresponden a *E. coli* y a *Bacteroides spp.*, con bajo número de aerobios facultativos. Dentro de las dos semanas de vida se establece una microbiota intestinal típica de aves adultas, estabilizando su composición a los 30 días de edad (Amit-Romach *et al.*, 2004). En general, en individuos adultos sanos la microbiota intestinal se mantiene estable, modificándose su composición en la etapa senil (Woodmansey, 2007).

Según los estudios de Lu *et al.* (2003) sobre la diversidad de la microbiota ileal y cecal en pollos broiler alimentados con raciones libres de aditivos, mediante la utilización de secuencias 16s rRNA, determinaron que cerca del 67% de las secuencias obtenidas desde el íleon estaban relacionadas con *Lactobacillus spp*, seguidas por *Clostridium spp* (11%), *Streptococcus spp* (6,5%) y *Enterococcus spp* (6,5%). En íleon predomina además de los *Lactobacillus spp*, el grupo de las enterobacterias. En cambio, en el ciego las secuencias relacionadas con *Clostridium spp* señalan que éste es el más abundante (68%). Otras secuencias encontradas correspondían a *Fusobacterium spp* (14%), *Lactobacillus spp* (8%), y *Bacteroides spp* (5%).

En un estudio similar realizado por Amit-Romach *et al.* (2004), se demostró la colonización de bacterias benéficas en intestino delgado y ciegos como *Lactobacillus spp* y *Bifidobacteria spp*, y de bacterias patogénicas para el hombre como *Salmonella spp* y *Campylobacter spp*. También los autores señalaron que se observaron algunas especies posiblemente dañinas para el pollo como *E. coli* y *Clostridium spp*.

Función de la microbiota intestinal

La microbiota del tracto intestinal funciona como una barrera contra los patógenos, contribuye a la degradación de algunos componentes de los alimentos, participa en la estimulación antigénica y produce enzimas y ácidos grasos de cadena corta (Backhed *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006; O`Hara y Shanahan, 2006; Li *et al.*, 2009). Otra de las funciones de microbiota intestinal de las aves de corral es la síntesis de vitamina K y del complejo B, manteniendo de esta manera el equilibrio de la misma. Sin embargo, el rol y la función de especies bacterianas particulares o de grupos presentes en el tracto gastrointestinal es aún poco conocida (Da Silva *et al.*, 2004).

Una microbiota intestinal saludable es fundamental para la nutrición del hospedero, eficiencia de la producción, estimulación antigénica y para el desarrollo del tejido linfoide asociado a intestino (Amit-Romach *et al.*, 2004). Esto se explica porque la microbiota comensal produce metabolitos como los ácidos grasos volátiles y bacteriocinas que establecen un mecanismo de competición con especies potencialmente patógenas, actuando como una barrera natural contra el crecimiento de microorganismos patógenos como *Salmonella spp* o para otro tipo de bacterias potencialmente patógenas como *Clostridium perfringens* (Corrier *et al.*, 1995).

Enfermedades bacterianas y uso de antimicrobianos en aves de corral

Se reconoce una variedad de enfermedades bacterianas en las aves de corral. Algunas de estas enfermedades afectan principalmente el intestino, éstas son la enteritis necrótica, enteritis ulcerosa y espiroquetosis, mientras que otras enfermedades bacterianas, como la salmonelosis, colibacilosis, micobacteriosis y el cólera, además del intestino, afectan a una variedad de sistemas (Porter, 1998). Para el tratamiento de estas enfermedades son utilizados diversos antimicrobianos como las quinolonas (enrofloxacino y norfloxacino), sulfas (sulfadimetoxina y sulfadimina+trimetropim), eritromicina, tetraciclinas, bacitracina metileno disalicilato

(bmd), entre otros. A continuación se describen algunas de las principales enfermedades de origen bacteriano.

El Coriza Infeccioso de las gallinas es una patología respiratoria infecto-contagiosa causada por el agente *Haemophilus paragallinarum*. Es una patología de curso agudo o crónico y de localización preferencial en las vías respiratorias superiores. Los signos clínicos incluyen secreción serosa óculo – nasal y estornudos. Rápidamente se aprecia una baja en el consumo de alimento y caída en la producción de huevos. Para el tratamiento se puede utilizar estreptomicina, sulfadimetoxina y las tetraciclinas con efectividad moderada, ya que no elimina la infección de las aves portadoras (Saif, 2003).

La salmonelosis genera distintos cuadros en aves como pulorosis, tifosis y paratifosis, dependiendo del serotipo de *Salmonella*. Los cuadros de pulorosis y tifosis los producen cepas de salmonelas especie específica que generan un cuadro septicémico, luego la bacteria se localiza y multiplica en varios órganos o tejidos. Los cuadros de paratifosis son producidos por cualquiera de las cepas de salmonelas no especie específica, de localización intestinal, donde se multiplican y en forma esporádica pasan a la sangre para localizarse en diferentes órganos o tejidos. En la actualidad para evitar la aparición de casos de salmonelosis lo más utilizado es la vacunación, mientras que los tratamientos con antibióticos son reservados para la aparición de brotes. Antimicrobianos como las sulfonamidas y florfenicol han demostrado ser útiles disminuyendo los porcentajes de mortalidad (Saif, 2003).

El término colibacilosis se refiere a una enfermedad causada por *Escherichia coli*. Algunas de las presentaciones más comunes son la colisepticemia, coligranuloma, enfermedad de los sacos aéreos, peritonitis y salpingitis entre otros. *E. coli* puede ser sensible a diferentes antimicrobianos como ampicilina, florfenicol, clortetraciclina, neomicina y nitrofuranos; sin embargo, algunas cepas suelen presentar resistencia a más de un antimicrobiano, especialmente aquellos ampliamente utilizados en la industria, como las tetraciclinas, por lo tanto es

imprescindible determinar el grado de sensibilidad a los antimicrobianos de una cepa de *E. coli* involucrada en un brote antes de establecer un tratamiento (Saif, 2003).

La pasteurelosis o cólera aviar es causada por *Pasteurella multocida*, la cual produce un cuadro respiratorio en las aves. En su forma aguda tiene un carácter septicémico con una elevada morbilidad y mortalidad. En su expresión crónica forma abscesos caseificados en diferentes órganos o tejidos. En la fase aguda se observan signos como fiebre, disnea, hemorragias, descarga mucosa desde el pico e incremento de la frecuencia respiratoria. Sin embargo, la muerte suele ser el primer indicador de enfermedad. El estado crónico de la enfermedad puede ocurrir luego de una infección aguda o ser resultado de una infección con cepas de baja virulencia. Para el tratamiento se pueden utilizar distintos agentes antibacterianos tales como sulfas, penicilina, estreptomina, combinaciones de penicilina con estreptomina y oxitetraciclina. El éxito depende de la rapidez con que se establezca el tratamiento y el tipo de fármaco usado. Las pruebas de sensibilidad son de gran utilidad, especialmente cuando se tienen antecedentes del uso previo y prolongado de los antimicrobianos (Saif, 2003).

La micoplasmosis aviar es causada por el agente *Mycoplasma gallisepticum*, y es comúnmente denominada como enfermedad respiratoria crónica de los pollos. Los signos clínicos de esta patología son crépitos traqueales, descarga nasal, tos, disnea y reducción del peso como consecuencia de un menor consumo de alimento. En las aves de postura la producción de huevos disminuye. Se sabe que *M. gallisepticum* es susceptible a una gran variedad de antibióticos, entre los que se incluyen estreptomina, oxitetraciclina, eritromicina, espiramicina, tilosina y lincomicina. Sin embargo, algunos aislados de *M. gallisepticum* han mostrado ser altamente resistentes a estreptomina, eritromicina, espiramicina y tilosina (Saif, 2003).

Efecto de los antimicrobianos sobre la microbiota intestinal

Los antimicrobianos pueden influir en el número, pero principalmente en la composición de las bacterias que forman parte de la microbiota de las aves (Zhou *et al.*, 2007). El efecto de los antimicrobianos en la microbiota intestinal depende de varios factores, como su espectro de acción, sus propiedades farmacocinéticas, vía de administración y eliminación (Sullivan *et al.*, 2001).

Estudios realizados por Fairchild *et al.*, (2005) demostraron que la administración oral de oxitetraciclina en pollos broilers no reducía la diversidad de la comunidad bacteriana. Esto sugería que la administración de oxitetraciclina oral ejercía un mínimo efecto sobre la cantidad de bacterias del compartimiento cecal de los pollos estudiados, pero sí existe la posibilidad de que la mayor parte de esta microflora cecal genere resistencia a las tetraciclinas, traspasando los genes de resistencia a microorganismos de mayor importancia epidemiológica, como lo son *E. coli*, *Enterococcus* o *Campylobacter*.

Por otro lado, un estudio realizado por Dumonceaux *et al.*, (2006), donde se administró virginiamicina en forma terapéutica a pollos broiler, demostró un aumento en las poblaciones de *Lactobacillus* en duodeno, íleon y yeyuno, siendo en este último el que tuvo el alza más marcada. Los autores observaron una reducción en las cantidades de *Salmonella spp* sólo en el duodeno, no observándose en otras ubicaciones del tracto gastrointestinal. Esto implicaría un efecto benéfico con respecto al rendimiento y salud de las aves, debido al aumento de las bacterias benéficas y en la reducción de microorganismos nocivos, pero las recientes preocupaciones sobre la posible selección de genes que confieren resistencia a los antimicrobianos de uso humano (quinupristina y dalfopristina) y la detección de cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a estos antimicrobianos en aves de corral han llevado a cuestionar la práctica de utilizar la virginiamicina en especies productivas (Sader, 2002; Dumonceaux *et al.*, 2006).

Resistencia a los antimicrobianos

Se describe que un microorganismo es resistente a un antimicrobiano cuando es capaz de sobrevivir y multiplicarse en presencia de concentraciones de antimicrobiano en dosis terapéutica propia de esa especie para ese fármaco en particular (WHO, 2000; García, 2003).

El fenómeno de resistencia a antimicrobianos puede deberse a una característica propia de una especie bacteriana, lo cual se denomina resistencia natural o intrínseca, o puede presentarse entre cepas de especies sensibles que desarrollan esta resistencia, lo que se conoce como resistencia adquirida (WHO, 1999). Los mecanismos generales más comunes utilizados por las bacterias para evadir la actividad inhibitoria de los antimicrobianos son los siguientes (Brunton *et al.*, 2007):

1. El fármaco no llega a su objetivo: se impide el ingreso a la bacteria, mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana externa y/o interna mediante la modificación de los canales de difusión llamados porinas o por la síntesis de bombas de eflujo. También, pueden producirse mutaciones en genes que codifican proteínas transportadoras específicas de membrana.
2. El fármaco no es activo: las bacterias producen enzimas que inactivan a los antimicrobianos. Un ejemplo de este mecanismo es la producción de β lactamasas, que inactivan a la familia de los β lactámicos.
3. El objetivo se encuentra alterado: mediante la alteración de los sitios blanco de unión de los antimicrobianos por mutaciones o por reemplazo del sitio blanco de acción del antimicrobiano por otro.

La aparición de resistencia a los antimicrobianos en las bacterias zoonóticas ha tenido un gran impacto a nivel mundial. Se cree que la selección inadecuada y el abuso de los antimicrobianos pueden producir resistencia en varias bacterias y además, complica el tratamiento de infecciones bacterianas en la población humana. Hay evidencia que demuestra que los antimicrobianos usados en la industria avícola producen selección de cepas bacterianas potencialmente

patógenas como *E. coli* resistentes a los antimicrobianos; incluso en algunos casos se ha observado que se mantiene una alta cantidad de cepas resistentes en el tracto intestinal de las aves, posterior al período de resguardo, es decir, cuando ya es permitido el uso de estos animales para el consumo humano (Miranda *et al.*, 2008).

Considerando lo anterior, en muchos países se han implementado programas para monitorear la resistencia a los antimicrobianos en cepas aisladas desde animales productores de alimentos con el fin de proteger la salud animal y la salud del consumidor. Estos programas monitorean microorganismos zoonóticos tales como *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.*, y bacterias indicadoras tales como *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.* (Lapierre *et al.*, 2008).

Es importante señalar que el término resistencia múltiple o multi-resistencia se utiliza para referirse a bacterias que presentan en forma conjunta resistencia a dos o más antimicrobianos no relacionados entre sí. La importancia de la multiresistencia radica en la disminución de las alternativas de tratamiento. Se ha observado en diversas cepas aisladas desde animales y pacientes humanos, que los perfiles de multiresistencia se repiten; esto último tendría relación con diversos factores como el género bacteriano y la utilización de los antimicrobianos. Hay muchas bacterias que han desarrollado esta característica y varios de estos mecanismos son complementarios (Fluit *et al.*, 2001).

La situación de la resistencia y multi-resistencia no es ajena a nuestro país. En un estudio realizado por Lapierre *at al.*, (2008) sobre la caracterización genética de la resistencia en cepas indicadoras de *Escherichia coli* en aves de corral y cerdos, encontró que más del 78% de las cepas presentaron resistencia al menos a un agente antimicrobiano estudiado (tetraciclinas, estreptomicina, sulfonamidas + trimetoprim, y fluoroquinolonas). Con respecto a las tetraciclinas, se encontró un elevado porcentaje (77%) de cepas resistentes aisladas de aves de corral y se determinaron cinco perfiles de multiresistencia.

En el caso de *Salmonella spp*, estudios realizados en Chile han determinado que un 41% de las cepas de *Salmonella spp* aisladas desde cerdos presentan resistencia a la oxitetraciclina. Además, se detectó multiresistencia a lo menos en dos grupos de los antimicrobianos probados, siendo la oxitetraciclina-estreptomina el perfil más común (San Martín *et al.*, 2008).

Tetraciclinas

Las tetraciclinas son una de las familias de antibióticos más antiguas, siendo conocidas desde el año 1948 con la aparición de la clortetraciclina. Posteriormente, se aisló de *Streptomyces rimosus* la oxitetraciclina.

La estructura química de estos antibióticos es tetracíclica, siendo su núcleo central el octahidronaftaceno. En su forma libre son sustancias anfotéricas cristalinas de baja solubilidad, por lo cual están disponibles como clorhidratos, las cuales son más solubles (Chopra y Roberts, 2001).

Los distintos antimicrobianos de la familia de las tetraciclinas difieren principalmente en su absorción después de la administración oral, siendo en general de carácter moderado (30-70 %), con la excepción de las tetraciclinas de acción prolongada que se absorben en gran cantidad (90 %). Cuando las tetraciclinas se administran por vía oral, la absorción se realiza en las primeras porciones del intestino delgado, pero una parte de la dosis permanece en la luz intestinal del tracto digestivo modificando la flora intestinal. La unión a proteínas plasmáticas es de 40 a 80 %. Las principales diferencias entre las distintas tetraciclinas radican en su comportamiento farmacocinético y por ello, suelen clasificarse dependiendo de su vida media plasmática la cual varía entre seis a dieciocho horas. El volumen de distribución está entre los 50 y 128 L/Kg. Se distribuyen en todos los líquidos y tejidos corporales, llegando en bajas concentraciones al líquido cerebro espinal, donde las concentraciones son de 10 a 25% de las del suero. Se excretan principalmente por orina y bilis en forma activa. La vía de eliminación es la renal a

través de la filtración glomerular y en el caso de las tetraciclinas de larga duración la vía más importante es la excreción biliofecal, tras sufrir circulación enterohepática (Chopra y Roberts, 2001).

El mecanismo de acción de las tetraciclinas se basa en la unión reversible a las subunidades 30S de los ribosomas bacterianos, bloqueando la unión de la aminoacil-tRNA al sitio aceptor sobre el complejo de unión ribosomal del mRNA, impidiendo la adición de aminoácidos al péptido en crecimiento. Son bacteriostáticos para muchas bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo anaerobios, rickettsias, clamidias, micoplasmas y formas L, y también presentan actividad contra algunos protozoarios (Chopra y Roberts, 2001).

La resistencia bacteriana a las tetraciclinas ocurre principalmente por la disminución en la acumulación intracelular del fármaco, debida tanto al ingreso impedido como al egreso aumentado producto de la alteración de la bomba de transporte activo. La alteración del sistema de transporte activo es el principal sistema de resistencia, y al parecer está mediada por plásmidos y es de carácter inducible, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Schwarz y Chaslus- Dancla, 2001). Otros mecanismos de resistencia, se deben a la protección ribosomal debida a la producción de proteínas que interfieren con la unión de las tetraciclinas a los ribosomas, y a la inactivación enzimática de las tetraciclinas. Posterior a la unión del ribosoma bacteriano con la molécula de tetraciclina, estas proteínas se unen al ribosoma provocando un cambio conformacional en él, lo que determina la separación de la tetraciclina del ribosoma, permitiendo así la síntesis proteica nuevamente (Chopra y Roberts, 2001; Fluit *et al.*, 2001).

Se han evidenciado altos porcentajes de resistencia a la oxitetraciclina, los cuales dependen del país evaluado. En Estados Unidos de América para *E. coli* se han reportado valores de resistencia entre 51 a 87%, mientras que en Suecia se han detectado valores cercanos al 7% (Gyles, 2008).

Lo anteriormente expuesto señala que la resistencia a los antimicrobianos es un tema que necesita mayor investigación con el fin de utilizar los antimicrobianos

de una forma más apropiada, manteniendo de esta forma la salud y el crecimiento óptimo de los animales, y además protegiendo la salud del consumidor entregando productos inocuos.

HIPÓTESIS

El tratamiento con oxitetraciclina genera alteraciones en la microbiota intestinal de gallinas ponedoras, como también favorecen la presencia de cepas bacterianas resistentes a estos fármacos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la utilización de oxitetraciclina sobre bacterias que componen la microbiota intestinal y la selección de cepas bacterianas resistentes en aves de postura.

Objetivos Específicos

1. Cuantificar el cambio en poblaciones de *E. coli*, *Enterococcus spp* y *Lactobacillus spp*, aisladas de la microbiota intestinal en gallinas ponedoras tratadas con oxitetraciclina en dosis terapéuticas.
2. Determinar la susceptibilidad bacteriana a 8 diferentes antimicrobianos en cepas de *Enterococcus spp.* y *E. coli* aisladas desde íleo y ciego en gallinas de postura sometidas a tratamiento con oxitetraciclina.
3. Establecer los perfiles de resistencia en cepas de *E. coli* y de *Enterococcus spp.*, a los antimicrobianos estudiados.

MATERIALES Y MÉTODO

MATERIALES

Los reactivos y equipos usados en este estudio, están detallados en las siguientes tablas:

TABLA 1: Reactivos y laboratorio de los materiales usados en este estudio.

REACTIVO	LABORATORIO
Agar Enterococoselel	Difco
Agar MacConkey	Merck
Agar MRS	Oxoid
Agar Mueller-Hinton	Difco
Agarosa	Gentec ®
Buffer fosfato	Merck
Caldo TSB (Trypticase Soya Base)	Difco
NaCl (Cloruro de sodio)	Fisher Scientific
NaOH (Hidróxido de sodio)	Fisher Scientific
Sistema RapID	Remel Apogent
Tinción Gram	Liofilmchem
Agua peptonada	Difco

TABLA 2: Nombre y marca de los equipos utilizados.

EQUIPO	MARCA
Autoclave	Huxley HL
Balanza de precisión	Sartorius
Gabinete de seguridad	Heal Force (Clase A II)

Centrifuga	Heidolph
Desionizador de agua	Millipore
Estufa de cultivo	Memmert
Nefelómetro de McFarland	Oxoid
Vórtex	Heidolph
Contador de colonias	Suntex

MÉTODO

1.- Animales en estudio:

El presente estudio se realizó de acuerdo a los preceptos del Bienestar Animal, sancionadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (ver anexo). Además, todo el trabajo se hizo bajo las normas del Comité de Bioseguridad de la misma facultad.

1.1.- Animales: Se utilizaron 30 gallinas Leghorn, adquiridas a las 16 semanas de edad desde el plantel avícola Chorombo ubicado en la zona de Pirque. Se alojaron en jaulas convencionales, con comederos lineales de canoa y bebederos automáticos de niple para el consumo de agua *ad libitum*. Estas aves fueron alimentadas con dietas libres de antibióticos, certificadas por el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Su dieta fue elaborada de acuerdo a los requerimientos nutricionales según lo señalado por el National Research Council (1994). Las aves fueron criadas en la Unidad Experimental de Nutrición y Producción Avícola de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que cuenta con dispositivos para el manejo de la temperatura ambiental, ventilación e iluminación natural y artificial.

1.2.- Grupos experimentales: A las 25 semanas, las gallinas se asignaron aleatoriamente a dos grupos experimentales (grupo I, sin tratamiento y grupo II, con tratamiento), considerando las recomendaciones realizadas por Zhou *et al.*, (2007) para definir el número de animales por tiempo de muestreo (n=5) (tabla 3).

El tratamiento se administró vía sonda gástrica. El protocolo de tratamiento se indica en la siguiente tabla:

TABLA 3: Protocolo de tratamiento y tiempo de recolección de muestras para cada grupo experimental.

Grupo	N° animales	Antibiótico (por 10 días)	Tiempo de muestreo** (días)***
I	15	Oxitetraciclina (40 mg/k)	2, 7 y 15
II	15	-----	2, 7 y 15

-----: sin tratamiento; ** Se utilizaron 5 animales en cada tiempo de muestreo; *** Días después del tratamiento.

1.3.- Recolección de muestras: Para realizar la recolección de muestras, las aves se sacrificaron por dislocación cervical, previa anestesia con cloroformo de acuerdo con la normativa vigente (Directiva (CE) N° 1099/1993) en relación con el Bienestar Animal. Se identificó un sector del íleo y ambos ciegos, los cuales fueron ligados en sus extremos con forcep o “clamp” para extraerlos asépticamente. Una vez extraído el intestino éste se depositó en frascos estériles. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en una sala acondicionada para este estudio en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

1.4.- Bioseguridad: Dado a que las gallinas se reconocen como portadoras de *Salmonella spp*, se realizaron las siguientes medidas:

- Los procedimientos se realizaron con guantes, mangas, delantal y mascarilla.
- Los desechos biológicos fueron descontaminados.
- Las jaulas y galpón se limpiaron y desinfectaron con productos yodados.
- Manejo de aves por personal autorizado y capacitado.

2.- Aislamiento, identificación y recuento de las cepas bacterianas:

2.1.- Aislamiento e identificación bacteriana: De los microorganismos representativos de la microbiota intestinal se aislaron *E. coli*, *Enterococcus spp.* y *Lactobacillus spp.*

Para poder cuantificar los cambios en las poblaciones intestinales, se recolectó desde las muestras intestinales 1g de contenido de ileo y ciegos y se homogeneizó con 9 ml de agua peptonada estéril constituyendo así la dilución 10^{-1} . Desde esta dilución se efectuaron diluciones 1/10, hasta completar siete diluciones, obteniéndose diluciones desde la 10^{-1} hasta la 10^{-8} . De cada dilución se sembró por duplicado una alícuota de 50 μ l con el método de placa extendida, en una placa con agar selectivo para cada tipo bacteriano.

Para el aislamiento y recuento de estas bacterias se utilizaron los medios de cultivo que se detallan en la tabla 4. Además, para la identificación de bacterias se utilizó el sistema RapID, el cual es un micrométodo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos.

TABLA 4: Protocolo para el aislamiento e identificación bacteriana.

	Agar	Condiciones	Incubación 37°C	Identificación
<i>E. coli</i>	MacConkey	Aerobio	24 h	Gram y RapID® one
<i>Enterococcus spp</i>	BBL Enterococos el	Aerobio	24 h	Gram y RapID® Str
<i>Lactobacillus spp</i>	MRS	microaerobio en jarra ANAEROJAR	48 h	Gram y RapID® ANA II

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas en el caso de *E. coli* y *Enterococcus spp*, y por 48 horas para *Lactobacillus spp*. Los *Lactobacillus spp* se incubaron en condiciones de anaerobiosis, para lo cual se utilizó un generador comercial de anaerobiosis y una cámara de anaerobiosis (ANAEROJAR™).

Una vez identificadas las cepas, de cada género bacteriano se seleccionaron al azar como máximo diez cepas para el grupo experimental I y cinco para el grupo II, para cada ave en estudio; posteriormente fueron guardadas en ceparios a -20°C en solución TSB (Tryptic Soy Broth) y glicerol al 15% para su posterior análisis de sensibilidad.

2.2.- Recuento bacteriano: Terminando el tiempo de incubación se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), seleccionando las placas inoculadas que contenían entre 20 y 200 colonias típicas. Las UFC se expresaron por gramo de muestra, utilizando la siguiente fórmula:

$$N=C \times D \times 10$$

Donde: N= Unidad formadora de colonia por gramo de muestra

C= Media del número de colonias en las dos placas.

D= Factor o inverso de la dilución

3.- Prueba de susceptibilidad antimicrobiana / resistencia *in vitro*:

Las cepas de *E. coli* y *Enterococcus* spp. aisladas fueron sometidas a una prueba de sensibilidad “in vitro”, por su rol como bacterias indicadoras o comensales consideradas en los programas de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos (Aerestrup *et al.*, 2000). Esta técnica determina la concentración mínima de antimicrobianos que inhiben el crecimiento bacteriano (CIM). Se realizaron siguiendo las normas recomendadas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006).

3.1.- Preparación de las placas: Los estándares de antimicrobianos (droga pura) se obtuvieron directamente de los laboratorios proveedores, con potencia determinada. Con cada uno de ellos, se prepararon soluciones “stock” de 1280 µg/ml, los cuales se mantuvieron refrigerados a 4°C hasta por una semana. A partir de ellas se prepararon diluciones seriadas en base 2 (1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 µg/ml) en el momento del análisis. Preparadas las diluciones, éstas se mezclaron con agar Mueller-Hinton en una proporción de 1:10 (2 mL de dilución de antimicrobiano en 18 mL de agar). Con estas diluciones de agar se prepararon diez placas con las diferentes concentraciones para cada antimicrobiano en estudio. Además, se incluyó una placa control sin la droga.

3.2.- Preparación e inoculación de las suspensiones bacterianas: Las cepas bacterianas previamente aisladas se sembraron en caldo común; la suspensión se

ajustó con suero fisiológico estéril a un equivalente al 0,5 del nefelómetro de Mc Farland. A partir de esta suspensión, se prepararon los inóculos en una relación de 1:10 (9 mL de suero fisiológico con 1 mL del cultivo bacteriano al 0.5 del nefelómetro de Mc Farland). Para inocular las placas se utilizó el inóculo-replicador de Steers. La inoculación del medio comenzó por la placa control sin antimicrobiano y luego por la de menor a mayor concentración de antimicrobiano. Las placas se incubaron a 37°C por 18 a 24 horas.

Como cepas controles se utilizaron *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *E. coli* ATCC 25922. Como cada cepa de una misma especie bacteriana se comporta individualmente frente a las diferentes concentraciones de un antimicrobiano determinado, las MIC se expresaron en valores absolutos ($\mu\text{g/ml}$).

Los antimicrobianos que se analizaron frente a cada especie bacteriana se detallan a continuación:

TABLA 5: Antimicrobianos utilizados en las pruebas de susceptibilidad frente a cepas de *E. coli* y *Enterococcus* spp.

Antimicrobianos	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp
β -lactámicos	Amoxicilina	Amoxicilina
	Cefotaxima	-----
Quinolonas	Enrofloxacino	Enrofloxacino
	Ác. Nalidíxico	-----
Aminoglucósidos	Estreptomina	-----
Macrólidos	-----	Eritromicina
Tetraciclina	Oxitetraciclina	Oxitetraciclina
Sulfa+Trimetropim	Sulfa+Trimetropim	-----

3.3.- Lectura e interpretación de resultados: Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las placas inoculadas registrando la concentración más baja de antimicrobiano que inhiba el crecimiento de cada una de las cepas en estudio. Con esta información se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) expresada en $\mu\text{g/mL}$. Con los valores de CIM se calculó el porcentaje de cepas sensibles, resistentes o con sensibilidad intermedia, utilizando como pauta los puntos de corte establecidos para cada antimicrobiano por el CSLI (Emborg y Heuer, 2003). Adicionalmente, se detectó la presencia de multiresistencia en cepas aisladas.

4.- Análisis de resultados.

Se realizó un análisis estadístico descriptivo en los grupos del estudio, considerando promedios, medias, frecuencias y desviación estándar. Para establecer las comparaciones en la composición de la microbiota intestinal de los grupos tratados con antibióticos se realizó una prueba de ANDEVA, considerando los efectos de tratamiento, día y su interacción. El análisis de sensibilidad a antimicrobianos se expresó en porcentajes.

RESULTADOS

A.- Análisis descriptivo del aislamiento bacteriano de *E. coli*, *Enterococcus spp* y *Lactobacillus spp.*, en gallinas tratadas con oxitetracilina.

Para el aislamiento, identificación y recuento bacteriano se sembraron ocho diluciones en duplicado en los medios de cultivo señalados en la tabla 4. Los resultados de los conteos fueron promediados para cada gallina, para cada día del estudio y posteriormente fueron analizados mediante la prueba estadística de ANDEVA.

1.- Análisis de recuentos de *E. coli* (UFC/g)

Los resultados obtenidos fueron sometidos a una prueba de análisis de varianza, la que determinó que, con un $p \leq 0,05$ existieron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones bacterianas encontradas en el intestino de los animales sometidos al tratamiento con oxitetracilina y los grupos control (Tabla 6).

TABLA 6: Recuentos de *E. coli* aisladas desde gallinas tratadas con oxitetracilina.

T	N	DÍA 2		DÍA 7		DÍA 15	
		Media**	C.V.	Media**	C.V.	Media**	C.V.
O	5	5,02 (a)	9,74	6,00 (a)	22,44	5,24 (a)	13,56
C	5	6,64 (b)	21,71	6,74 (b)	18,75	6,77 (b)	18,17

UFC: unidades formadoras de colonia (expresadas en log 10); C.V.: coeficiente de variación;
 ** letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). T: tratamiento; O: oxitetracilina;
 C: control.

Por otra parte, los resultados señalaron que no existió un efecto estadísticamente significativo entre los días post tratamiento con oxitetracilina. Pese

a esto, se observó una tendencia que se manifiesta con un aumento en el día 7 para luego disminuir hacia el día 15 (figura 1).

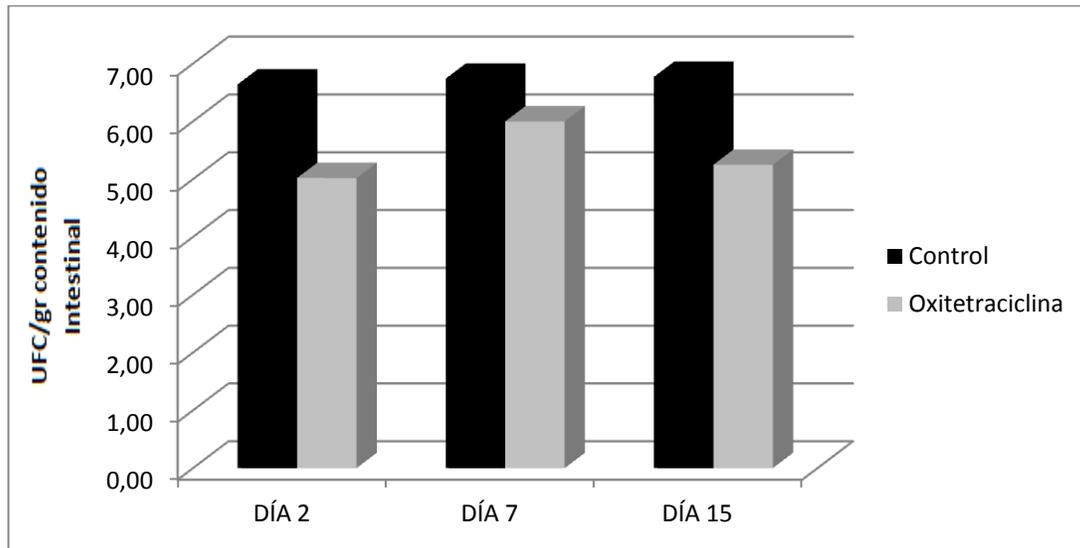


FIGURA 1: Recuentos promedios de *E. coli* por día según tratamiento antimicrobiano.

2.- Análisis de recuentos de *Enterococcus spp*:

Con respecto a *Enterococcus spp* se observó que el grupo tratado con oxitetraciclina presentó menor cantidad de UFC que el grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) (tabla 7).

TABLA 7: Recuentos promedio de *Enterococcus spp* aislados desde gallinas tratadas con oxitetraciclina.

T	N	DÍA 2		DÍA 7		DÍA 15	
		Media**	C.V.	Media**	C.V.	Media**	C.V.
O	5	3,44 (a)	8,02	3,79 (a)	22,12	3,77 (a)	16,68
C	5	5,62 (b)	34,07	5,65 (b)	34,07	5,65 (b)	33,77

UFC: unidades formadoras de colonia (expresadas en log 10); C.V.: coeficiente de variación;
 ** letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). T: tratamiento; O: oxitetraciclina;
 C: control.

No se observó efecto significativo entre los días en el grupo experimental. Sin embargo, se incrementaron levemente las UFC al día 7, disminuyendo hacia el día 15 (figura 2).

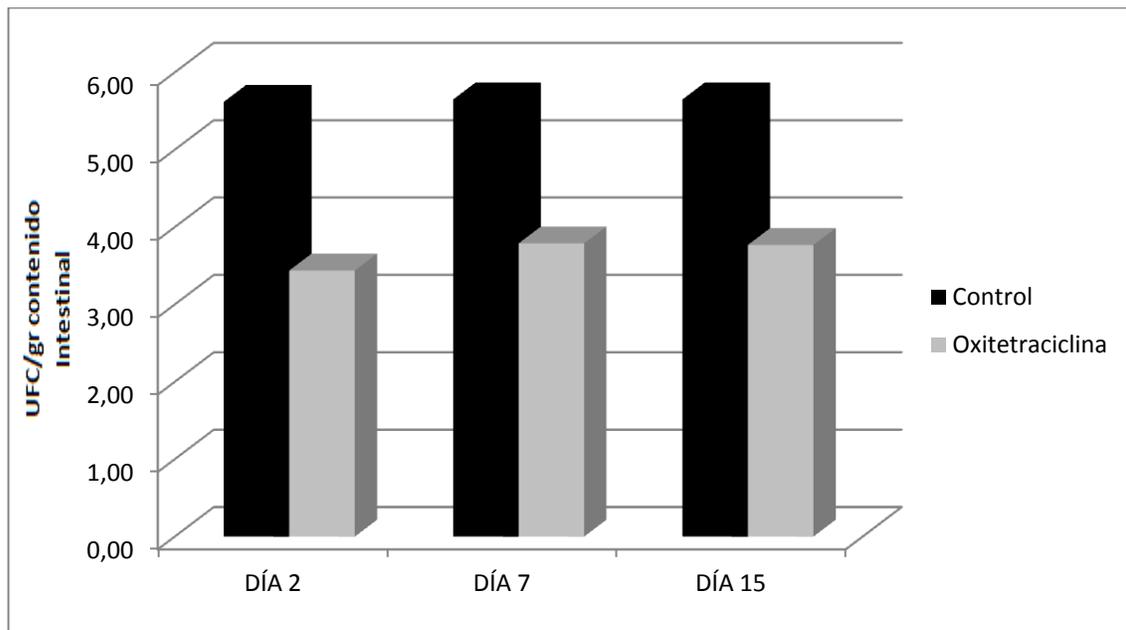


FIGURA 2: Recuentos promedio de *Enterococcus spp* por día según tratamiento antimicrobiano.

3. Análisis recuentos en *Lactobacillus spp.*:

Al analizar las cepas de *Lactobacillus spp.* (Tabla 8) se observó que las UFC en el grupo experimental no tuvieron diferencias significativas entre los días evaluados. Con respecto al control, el grupo experimental tuvo valores superiores en todos los días que duró el experimento (figura 3).

TABLA 8: Recuentos promedios de *Lactobacillus spp.* aislados desde gallinas sometidas a diferentes tratamientos según día de muestreo.

T	N	DÍA 2		DÍA 7		DÍA 15	
		Media**	C.V.	Media**	C.V.	Media**	C.V.
O	5	8,51 (a)	2,20	8,41(a)	1,50	8,06 (a)	6,81
C	5	7,99 (a)	3,91	8,01 (a)	3,86	8,00 (a)	3,79

UFC: unidades formadoras de colonia (expresadas en log 10); C.V.: coeficiente de variación;

** letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). T: tratamiento; O: oxitetraciclina;

C: control.

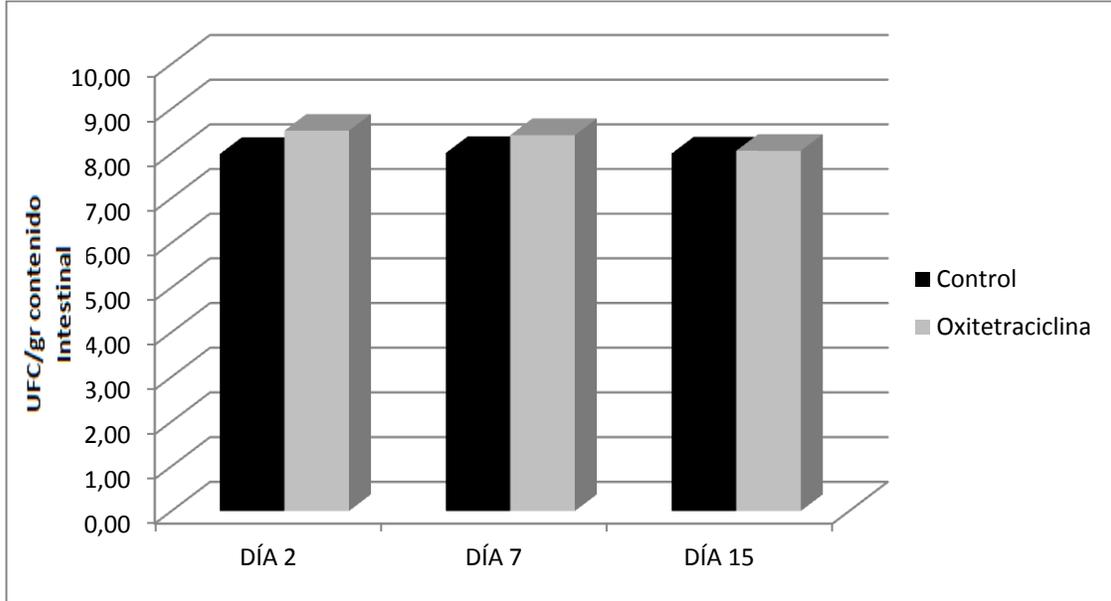


FIGURA 3: Recuentos promedio de *Lactobacillus spp* por día según tratamiento antimicrobiano.

B.- Patrones de susceptibilidad fenotípica de cepas de *E. coli* y *Enterococcus spp.*

Se aislaron y tipificaron en total 188 cepas de *E. coli* y 156 cepas de *Enterococcus spp.* Para cada cepa bacteriana se determinó su sensibilidad, definiéndola como sensible o resistente mediante el método de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Los resultados fueron interpretados según las normas establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y DANMAP para definir las cepas sensibles, resistentes o con sensibilidad intermedia a cada antimicrobiano en estudio.

1.- Determinación de la susceptibilidad fenotípica de cepas de *E. coli* frente a un panel de antimicrobianos:

En la tabla 9 se detalla el número de cepas aisladas en cada día de muestreo; en ella se indican los porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia frente a 6 antimicrobianos.

TABLA 9: Porcentajes de resistencia y sensibilidad en cepas de *E. coli* aisladas de gallinas tratadas con Oxitetraciclina.

G	Día **	n	Amoxicilina		Cefotaxima		Enrofloxacino		Ac. Nalidíxico		Estreptomina		Oxitetraciclina	
			%		%		%		%		%		%	
			R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
I	2	32	0,0	100	0,0	100	65,6	34,4	96,9	3,1	53,1	46,9	100	0,0
	7	36	0,0	100	2,8	97,2	66,7	33,3	97,2	2,8	69,4	30,6	100	0,0
	15	45	11,1	88,9	0,0	100	53,3	46,7	68,9	31,1	22,2	77,8	11,1	88,9
II	2	25	0,0	100	0,0	100	72,0	28,0	88,0	12,0	24,0	76,0	100	0,0
	7	25	0,0	100	0,0	100	76,0	24,0	84,0	16,0	24,0	76,0	100	0,0
	15	25	0,0	100	0,0	100	72,0	28,8	84,0	16,0	28,0	72,0	100	0,0

G: Grupo experimental; R: resistencia; S: sensibilidad. **: Días posteriores al tratamiento antimicrobiano; n: número de cepas aisladas.

Al analizar las cepas de *E. coli*, se determinó que la totalidad fueron sensibles a sulfametoxazol + trimetoprim.

Para el caso de la amoxicilina, la mayoría de las cepas fueron sensibles, excepto en el grupo tratado con oxitetraciclina que en el día 15 presentó un 11,1% de resistencia. Con respecto a la cefotaxima, también se observó que la gran mayoría de las cepas fue sensible, salvo un 2,8 % de las cepas que se aislaron el día 7 desde el grupo tratado con oxitetraciclina.

Frente al enrofloxacino se evidenció una resistencia promedio de 62% en el grupo tratado con oxitetraciclina. Sin embargo, el grupo control presentó porcentajes de resistencia más elevados (entre 72 y 76%).

Para el caso del ácido nalidíxico, los patrones de resistencia también fueron elevados para ambos grupos. En el grupo tratado con oxitetraciclina, el porcentaje de resistencia disminuyó hacia el final del estudio (día 15).

En general, los niveles de resistencia a estreptomina aumentaron en la primera determinación (día 2), para después disminuir con el tiempo llegando a ser similares a los del grupo control.

Se observaron altos valores de resistencia a oxitetraciclina en ambos grupos experimentales. Sólo se aprecia una leve disminución de la resistencia, con un 88,9% hacia el día 15 en el grupo que recibió tratamiento.

2.- Determinación de la susceptibilidad fenotípica de cepas de *Enterococcus spp* frente a un panel de antimicrobianos:

En la tabla 10 se detalla el número de cepas de *Enterococcus spp* aisladas en cada día de muestreo; en ella se indican los porcentajes de resistencia y sensibilidad frente a 4 antimicrobianos.

TABLA 10: Porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia en cepas de *Enterococcus spp* aisladas de gallinas tratadas con Oxitetraciclina según día de muestreo.

GRUPO	Día **	n	Amoxicilina		Enrofloxacino		Eritromicina		Oxitetraciclina	
			%		%		%		%	
			R	S	R	S	R	S	R	S
I	2	31	0,0	100	29,0	71,1	71,0	29,0	87,1	12,9
	7	16	0,0	100	50,0	50,0	69,1	30,9	100	0,0
	15	34	0,0	100	29,4	70,6	70,6	29,4	100	0,0
II	2	25	0,0	100	44,0	56,0	88,0	12,0	96,0	4,0
	7	25	0,0	100	36,0	64,0	88,0	12,0	100	0,0
	15	25	0,0	100	40,0	60,0	96,0	4,0	100	0,0

R: resistencia; S: sensibilidad. **: Días posteriores al tratamiento antimicrobiano.

Para el caso de la amoxicilina, todas las cepas de *Enterococcus spp* resultaron ser sensibles a este antimicrobiano.

La resistencia al enrofloxacino presentó valores variables en ambos grupos. En el grupo tratado con oxitetraciclina hubo un 29% en el día 2, luego aumentó a 50% para posteriormente volver al mismo porcentaje del día 2. Se evidenció un porcentaje de sensibilidad intermedia de 6,3% y 22% en el grupo tratado con oxitetraciclina.

Con respecto a la eritromicina, el grupo control presentó un nivel más alto de resistencia comparado al grupo tratado con oxitetraciclina.

La resistencia de las cepas a oxitetraciclina fue alta y de comportamiento similar en ambos grupos experimentales. Pese a ello, el grupo control mostró una resistencia más elevada. Los valores del día 2 para el grupo control y experimental, fue 96 y 87% respectivamente, y en las determinaciones posteriores la resistencia fue total.

3.- Perfiles de multiresistencia en cepas de *E. coli* y *Enterococcus spp.*

El análisis de la tabla 11 permite observar que ambos grupos experimentales presentaron multiresistencia, donde el perfil más común en cepas de *E. coli* fue el de tetraciclinas/quinolonas. Al realizar una comparación entre los grupos, se evidencia que el grupo que fue tratado con oxitetraciclina presentó menos cepas con resistencia múltiple. En cambio, el grupo control presentó un 100% de multiresistencia.

TABLA 11: Perfiles de resistencia múltiple en cepas de *E. coli* aisladas de gallinas tratadas con Oxitetraciclina.

TRATAMIENTOS	GRUPO		Total % (n)
	I % (n)	II % (n)	
T + Q	26,5 (13)	91,7 (22)	59,1 (35)
T + A	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0(0)
T + β	2,0 (1)	0,0 (0)	1,0 (1)
T + Q + A	32,7 (16)	8,3 (2)	20,5 (18)
T + Q + β	2,0 (1)	0,0 (0)	1,0 (1)
T + Q + A + β	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
TOTAL multiresistencia	62,7 (31)	100 (24)	75.3 (55)
TOTAL cepas	49	24	73

T: tetraciclinas; Q: quinolonas; A: aminoglucósidos; β : betalactámicos.

En el caso de las cepas de *Enterococcus spp* el perfil más común de multiresistencia fue el de tetraciclinas/macrólidos (tabla 12). Al realizar una comparación entre los grupos experimentales, el grupo control fue el que presentó los mayores porcentajes.

TABLA 12. Perfiles de resistencia múltiple en cepas de *Enterococcus spp* aisladas de gallinas tratadas con Oxitetraciclina.

TRATAMIENTOS	GRUPO		Total % (n)
	I % (n)	II % (n)	
Antimicrobianos			
T + Q	2,1 (1)	0 (0)	1,3 (1)
T + M	55,3 (26)	75,0 (18)	60,2 (44)
T + Q + M	0,0 (0)	23,1 (6)	8,2 (6)
TOTAL multiresistencia	57,4 (27)	92,3 (24)	69,8 (51)
TOTAL cepas	47	26	73

T: tetraciclinas; Q: quinolonas; M: macrólidos.

En general, en términos porcentuales, se encontró mayor resistencia múltiple en las cepas de *E. coli* que en las de *Enterococcus spp*.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se seleccionaron bacterias que poseen un importante rol en el equilibrio de la microbiota de los animales. Para los estudios de sensibilidad, se seleccionaron cepas de *E. coli* y *Enterococcus spp* ya que son consideradas como comensales e indicadoras en los planes de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos. La elección de *E. coli* se justifica fundamentalmente por su elevada frecuencia de aislamiento e identificación en los laboratorios de salud animal (Moreno *et al.*, 2000), y por ser un buen indicador de resistencia en bacterias potencialmente patógenas (Miranda *et al.*, 2008). El mismo papel cumple entre las bacterias Grampositivas, el grupo de los *Enterococcus spp*, el cual también es considerado como reservorio de genes de resistencia (Aarestrup *et al.*, 2000), razón por la que también forma parte de los programas de vigilancia.

Para evaluar los efectos de los antimicrobianos sobre la microbiota, se utilizó la oxitetraciclina, fármaco que posee un amplio espectro sobre bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Se caracteriza por ser bacteriostático, poseer amplia distribución en los tejidos, alcanzando altas concentraciones en el tracto gastrointestinal. Debido al gran uso de este antimicrobiano, se describe a nivel internacional una alta resistencia (Chopra y Roberts, 2001).

Al considerar el efecto de la oxitetraciclina sobre el número de cepas de *E. coli*, se observó una disminución significativa en los recuentos en relación al grupo control. Esta diferencia fue más marcada en el género *Enterococcus spp*. Por otra parte, en las poblaciones de *Lactobacillus spp* no se observaron variaciones significativas en comparación al grupo control. Estos resultados son distintos a los encontrados por Fairchild *et al.* (2005), quienes describieron que la administración de oxitetraciclina oral ejercía un mínimo efecto sobre la composición de las bacterias del compartimiento cecal en las aves estudiadas.

Diferentes publicaciones señalan que la terapia antimicrobiana produce cambios cuantitativos sobre la microbiota intestinal, pero que después de finalizado el tratamiento, las poblaciones bacterianas se recuperarían en número, a pesar de que los grupos se mantendrían alterados por semanas (Fairchild *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Sekirov *et al.*, 2008; Croswell *et al.*, 2009). Esta situación no se observó en este estudio, ya que el efecto del tiempo no tuvo un impacto significativo sobre el número de cepas de *E. coli*, *Enterococcus spp* y *Lactobacillus spp*, durante las dos semanas posteriores al tratamiento.

Variación en la resistencia de las poblaciones bacterianas

El método para definir la resistencia en este trabajo es reconocido como oficial para los análisis de sensibilidad a escala internacional; para su aplicación se siguieron las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Este método tiene un carácter cuantitativo, determinando de manera exacta la concentración a la cual el antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano.

Se ha descrito que los antimicrobianos alteran la microbiota intestinal eliminando las cepas sensibles y permitiendo el sobrecrecimiento de las cepas resistentes preexistentes (Edlund y Nord, 2000). También se ha descrito que después de dos semanas de finalizado el tratamiento, la microbiota sensible vuelve a ser dominante, sin embargo, aún es posible encontrar cepas resistentes (Raum *et al.*, 2008).

Como era previsible, las cepas aisladas del grupo tratado con oxitetraciclina mostraron altos niveles de resistencia. También se pudo observar que un alto porcentaje de las cepas aisladas del grupo control presentaron elevados niveles de resistencia al menos a uno de los antimicrobianos estudiados. Esta última situación se podría explicar por la edad en que fueron adquiridas las aves. Estas fueron trasladadas desde el plantel a las 16 semanas de edad, pudiendo haber sido expuestas con anterioridad a terapias antimicrobianas a nivel predial. Así también se

sabe que los genes de resistencia se pueden transferir a otras bacterias vía horizontal a través de plámidios; esto es uno de los principales problemas en los sistemas de producción ya que la resistencia se mantiene aún cuando no exista exposición de los animales a terapias antimicrobianas.

Resistencia a sulfametoxazol + trimetoprim:

Con relación a las sulfonamidas se encontró que todas las cepas de *E. coli* fueron sensibles, a diferencia de lo descrito en otros estudios, donde se han señalado cifras de resistencia de hasta un 61% (Miranda *et al.*, 2008) y 100% (Li *et al.*, 2007). La elevada sensibilidad observada en este trabajo se puede explicar por la ausencia de una presión selectiva previa a favor de cepas resistentes a este antimicrobiano.

Resistencia a β -lactámicos:

La resistencia a β -lactámicos fue baja. Cinco cepas de *E. coli* de un total de 188 presentaron resistencia en el grupo experimental. Con respecto a la cefotaxima, se encontró una cepa (2,8%) resistente. En el caso de *Enterococcus spp* se observó que todas las cepas fueron sensibles; estos resultados son coincidentes con estudios previos, donde se describe que las bacterias Gram negativas tienen cierto grado de resistencia intrínseca a β -lactámicos por medio de membranas externas y por bombas de transporte (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

Resistencia a macrólidos:

En relación a la eritromicina en cepas de *Enterococcus spp*, se observaron altos porcentajes de resistencia tanto en el grupo control como en el grupo tratado con oxitetraciclina, siendo un 91 y 70% respectivamente. Esto podría deberse a que las aves hayan sido tratadas con eritromicina antes de las 16 semanas de edad a nivel de plantel. También destaca que en ambos grupos la resistencia mantiene alta a lo largo del periodo.

Resistencia a aminoglucósidos:

Para el aminoglucósido estreptomicina los niveles de resistencia en el grupo tratado tuvieron valores elevados hasta el día 7 (69%), para luego disminuir y quedar con valores similares al control (22%). Esto podría deberse a que las bacterias resistentes a la oxitetraciclina comparten genes de resistencia que también reconocen a estreptomicina (Chopra y Roberts, 2001).

Resistencia a oxitetraciclina:

Al analizar la resistencia del total de cepas de *E. coli* y *Enterococcus spp* frente al tratamiento con oxitetraciclina, destaca la alta resistencia encontrada, situación que no difiere con la literatura internacional donde se describen valores de 87% (Zhao *et al.*, 2005), 100% en China (Yang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007), 75% en España (Saenz *et al.*, 2001) y 84% en Jamaica (Miles *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Aarestrup *et al.*, (2000) señalaron que es frecuente encontrar resistencia a oxitetraciclinas en bacterias patógenas, zoonóticas e indicadoras tales como *E. coli*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, discutiendo esto como una probable consecuencia de la presión de selección resultante del masivo uso de este grupo de fármacos.

Los altos valores encontrados en el grupo control podrían estar explicados por una contaminación de las instalaciones donde se alojaron las aves. Se sabe que el ambiente puede estar contaminado con bacterias que portan resistencia a uno o más antimicrobianos, siendo los galpones los lugares más contaminados con bacterias resistentes (Brooks *et al.*, 2010). Otro antecedente conocido es que la resistencia a tetraciclinas es mediada por plasmidios y es un rasgo inducible y transferible, es decir, las bacterias se hacen resistentes posterior a la exposición a la droga y son capaces de transmitirla mediante plasmidios (Rodríguez *et al.*, 1998). Lo anterior avala la hipótesis de la contaminación ambiental.

Resistencia a quinolonas:

En este caso se encontró con una resistencia que fue alta tanto para el enrofloxacino como para el ácido nalidíxico, en las cepas de *E. coli* de ambos grupos experimentales, con valores entre 65 y 96%. Esto indica que las aves podrían haber portado genes de resistencia previa a la administración de los tratamientos. Un estudio realizado por Miranda *et al.*, (2008) demostró una situación similar, en la que describieron la presencia de resistencia previa y obtuvieron porcentajes posterior al tratamiento cercanos al 89%. Esta resistencia también podría ser explicada en parte por la edad a la cual fueron adquiridas las aves para el estudio (16 semanas de edad), pudiendo haber adquirido cepas resistentes en el plantel del origen.

En relación a las cepas de *Enterococcus spp*, la resistencia a enrofloxacino fue variable con porcentajes entre 29 a 44%. Estos resultados son similares a un estudio realizado en Taiwan, donde la resistencia a ciprofloxacino fue de 54% (Kuo *et al.*, 2009).

Multiresistencia

De las 73 cepas resistentes de *E. coli*, un 75,3% evidenció multiresistencia a dos o tres grupos de antimicrobianos, donde el perfil de multiresistencia más frecuente fue el de tetraciclinas junto con las quinolonas. Esta alta frecuencia de resistencia múltiple es comparable a los resultados obtenidos por Zhao *et al.*, (2005), quienes obtuvieron un 92% de cepas multiresistentes. Otro trabajo realizado en China informó que el 80% de 71 cepas de *E. coli* aisladas desde hígado de aves fueron resistentes a 8 o más antimicrobianos (Yang *et al.*, 2004).

Respecto a la resistencia múltiple en *Enterococcus spp*, se aislaron en total 73 cepas resistentes, de las cuales el 69,8% presentó resistencia a dos o tres grupos de antimicrobianos. El perfil de resistencia más frecuente fue el de tetraciclinas junto con macrólidos.

De acuerdo a los resultados de esta investigación, como también de otros trabajos realizados a nivel nacional, se debería tener presente las recomendaciones dadas por la Organización Mundial de la Salud, quienes señalan que los antimicrobianos en medicina veterinaria se deben utilizar bajo el concepto de Buenas Prácticas de Uso, con el fin de disminuir la resistencia bacteriana. Además, se deberían instaurar programas permanentes de vigilancia de la resistencia bacteriana en animales de producción.

Los hallazgos en este estudio muestran elevados niveles de resistencia en el grupo control, es decir, presentaban resistencia previa, ya que fueron adquiridas a las 16 semanas de edad. La resistencia previa podría ser explicada por el uso indiscriminado en producción animal, favoreciendo la presencia de genes de resistencia en los individuos y en el ambiente por períodos prolongados (Diarra *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

- El tratamiento con oxitetraciclina a dosis terapéuticas disminuye significativamente el recuento en las poblaciones de *E. coli* y *Enterococcus spp* aisladas desde íleo y ciego de gallinas de postura, durante al tiempo en que duró este estudio.
- El tratamiento con oxitetraciclina a dosis terapéuticas no tiene efectos significativos sobre los recuentos de *Lactobacillus spp.* aislados desde ileo y ciegos de gallinas de postura, durante el tiempo en que duró este estudio.
- La multiresistencia observada es más frecuente en cepas de *E. coli* que en *Enterococcus spp.*
- El perfil de multiresistencia más frecuente en cepas de *E. coli* fue el de tetraciclinas y quinolonas, mientras que para *Enterococcus spp* fue el de tetraciclinas y macrólidos.
- El uso de oxitetraciclina en dosis terapéuticas no se pudo relacionar con la inducción de resistencia a este antimicrobiano, debido a que el grupo control también presentó altos niveles de resistencia.
- Se recomienda que estos estudios se realicen en aves que no hayan sido expuestas a terapias con antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

AAERESTRUP, F.M.; AGERSO, Y; GERNER-SMIDT, P; MADSEN, M; JENSEN, L.B. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology Infecting Disease* 37: 127-37.

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. 2004. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poultry Science* 83:1093–1098.

BACKHED, F.; LEY, R.; SONNENBURG, D.; PETERSON, D.; GORDON, J. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915-1920.

BINEK, M.,W. BORZEMSKA, R. PISARSKI, B. BLASZCZAK, G. KOSOWSKA,H. MALEC, AND E. KARPINSKA. 2000. Evaluation of the efficacy of feed providing on development of gastrointestinal microflora of newly hatched broiler chickens. *Arch Geflugelkd.* 64:147–151.

BROOKS, J.; McLAUGHLIN, M; SCHEFFLER, B.; MILES, D. 2010. Microbial and antibiotic resistant constituents associated with biological aerosols and poultry litter within a commercial poultry house. *Science of the Total Enviroment* 15: 4770-4777.

BRUNTON, L.; LAZO, J.; PARKER,K. 2007. Farmacoterapia de las enfermedades bacterianas. In: Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la Terapéutica.* 11 ed. Editorial McGrawl Hill Interamericana. Colombia. Pp 1095-1314.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. M100-s16 Vol 26 N°3.

- CHOPRA, I.; ROBERTS, M.** 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(2):232-26.
- CORRIER, D.; NISBET, D.; SCANLAN, C.; HOLLISTER, A.; DELOACH, J.** 1995. Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of cecal bacteria. *Poultry Science* 74: 916-924.
- CROSWELL, A.; AMIR, E.; TEGGATZ, P.; BARMAN, M.; SALZMAN, N.** 2009. Prolonged impacts of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric Salmonella infection. *Infection and Immunology* 77: 2741-2753.
- DA SILVA, G.; FERREIRA DA SILVA, C.; FREIRE, S.; COSTA, D.** 2004. Enterobacteriaceae identification of the intestinal microbiota in laying hens (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758) from Lohmann S.L.S. lineage. *Revista Brasileira de Ciencias Veterinarias* 11: 153-155.
- DIARRA, M.; SILVERSIDES, F.; DIARASSOUBA, F.; PRITCHARD, J.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; BONNET, C.; DELAQUIS, P.; BACH, S.; TOPP, E.** 2007. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* counts, and antibiotics resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *E. coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6566-6576.
- DIRECTIVA 93/119 COMUNIDAD EUROPEA.** 1993. Directiva de la protección de los animales en el momento de su sacrificio. [Http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/animal_welfare/l12054_es.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/animal_welfare/l12054_es.htm)
- DUMONCEAUX, T.; HILL, J.; HEMMINGSEN, S.; VAN KESSEL, A.** 2006. Characterization of Intestinal Microbiota and Response to Dietary Virginiamycin Supplementation in the Broiler Chicken. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4): 2815-2823.

EDLUND, C.; NORD, C. 2000. Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 41-48.

EMBOG, D.; HEUER, E. 2003. DANMAP. Use of antimicrobial agents of occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Statens Serum Institute, Danish Veterinary and Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Institute, Copenhagen, Denmark. 68 pp.

FAIRCHILD A. S.; SMITH J. L.; IDRIS U.; LU J.; SANCHEZ S. L.; PURVIS B.; HOFACRE C.; LEE M. D. 2005. Effects of Orally Administered Tetracycline on the Intestinal Community Structure of Chickens and on tet Determinant Carriage by Commensal Bacteria and *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5865-5872.

FLUIT, A.; VISSER, M.; SCHMITZ, F. 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 14; 836-871.

GARCÍA, P. 2003. Resistencia bacteriana en Chile. *Revista Chilena de Infectología* 20: 11-23.

GAVINI, F.; CAYUELA, C.; ANTOINE, J.; LECOQ, C.; LEVFEBRE, B.; MEMBRE, J.; NEUT, C. 2001. Differences in the distribution of bifidobacterial and enterobacterial species in human faecal microflora of three different (children, adult, elderly) age groups. *Microbial Ecology in Health and Disease* 13: 40-45.

GILL, S.; POP, M.; DEBOY, R.; ECKBURG, P.; TURNBAUGH, P.; SAMUEL, B.; GORDON, J.; RELMAN, D.; FRASER, C.; NELSON, K. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312: 1355-1359.

GONG, J.; FORSTER, R.; B, YU, H.; CHAMBERS, J.; SABOUR, P.; WHEATCROFT, R.; CHEN, S. 2002. Diversity and phylogenetic analysis of

bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. FEMS Microbiology Letters 208: 1-7.

GYLES, C. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. Animal Health Research Reviews 9:149-158.

KANARREBORG, A.; SIMON, A.; ENGBERG, R.; JENSEN, B.; TANNOCK, G. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. Applied and Environmental Microbiology 68: 5918-5924.

KOUTSOS, E. A.; ARIAS, V. J. 2006. Intestinal Ecology: Interactions Among the Gastrointestinal Tract, Nutrition, and the Microflora. The Journal of Applied Poultry Research 15: 161-173.

KUO, H.; CHOU, CH.; CHANG, CH.; GONG, S.; WANG, M. 2009. Characterization of quinolone-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from healthy chickens and pigs in Taiwan. Journal of Food and Drugs Analysis 17: 443-450.

LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.; BORIE, C.; TORO, C.; SAN MARTÍN, B. 2008. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. Microbial Drug Resistance 14: 265-272.

LI, S.; WANG, X.; DU, X.; CUI, B.; ZHANG, S.; SHEN, J. 2007. Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among *E. coli* isolates from diseased chickens. Veterinary Science 8: 243-247.

LI, S.; ZHAO, X.; WANG, J. 2009. Synergy of Astragalus polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. Poultry Science 88: 519-525.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.; LEE, M. 2003. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. Applied and Environmental Microbiology 69 (11): 6816-6824.

- MILES, T.; MCLAUGHLIN, W.; BROWN, P.** 2006. Antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from broiler chickens and human. *BMC Veterinary Research* 2: 7-15.
- MIRANDA, J.; VAZQUEZ, B.; FENTE, C.; BARROS, J.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.** 2008. Evolution of resistance in poultry intestinal *E. coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. *Poultry Science* 87: 1643-1648.
- MORENO, M.; DOMINGUEZ, L.; TESHAGER, T.; HERRERO, A.; PORRERO, M.** 2000. Antibiotic resistance monitoring: The Spanish program. *International Journal Antimicrobial Agents* 14: 285-290.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC.** 1994. Nutrient requirement of poultry. Ninth revised Edition. National Academy Press, Washington D.C. USA. 155p.
- O'HARA, A.; SHANAHAN, F.** 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports* 7: 688-693.
- PORTER, R.** 1998. Bacterial Enteritides of Poultry. *Poultry Science* 77:1159–1165.
- RAUM E, LIETZAU S, VON BAUM H, MARRE R, BRENNER H.** 2008. Changes of *E. coli* resistance patterns during and after antibiotic therapy: a longitudinal study among outpatients in Germany. *Clinical Microbiology and Infection*: 41-48.
- RICKE, S.; PILLAI, S.** 1999. Conventional and molecular methods for understanding probiotic bacteria functionality in gastrointestinal tracts. *Critical Reviews in Microbiology* 25: 19-38.
- RODRÍGUEZ, M; GONZALEZ, J.; BARRETO, J.; LIM, N.; AREU, A.; PARDO, A.** 1998. Tetraciclinas. *Acta Médica* 8: 75-79
- SADER, H.** 2002. Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica. *Revista Chilena de Infectología* 19: 5-13.

- SAENZ, Y.; ZARAGAZA, L.; BIÑAS, L.; LANTERO, M.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C.** 2001. Antibiotic resistance in *E. coli* isolates obtained from animals, food and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18: 353-358.
- SAIF, Y.** 2003. *Diseases of Poultry* 11th ed. Iowa State University Press 56: 719-743.
- SAN MARTIN, B.; LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.; BUCAREY, S.** 2008. Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella spp* isolated from swine. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 569–576.
- SAVAGE, D.** 2001. Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientist. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 54: 569-576.
- SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E.** 2001. Use of antimicrobial in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* 32: 201-225.
- SEKIROV, I.; TAM, N.; JOGOVA, M.; ROBERTSON, M.; LI, Y.; LUPP, C.; FINLAY, B.** 2008. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infection and Immunity* 76: 4726-4736.
- SULLIVAN, A.; EDLUND, C.; NORD, C.** 2001. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases* 1:101-114.
- WOODMANSEY E.J.** 2007. Intestinal bacteria and ageing. *Journal of Applied Microbiology* 102 (5): 1178-1186.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 1999. Containing antimicrobial resistance. Review of the literature and report of a WHO workshop on the development of a global strategy for the containment of antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland, 4 - 5 February 1999. Geneva, WHO/CDS/CRS/DRS/99.2.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2000. Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Geneva, Switzerland, 5 – 9 June. Report of a WHO consultation, Annex 1: Glossary pp 9 – 11.

YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, S.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 3483-3489.

ZHAO, S.; MAURER, J.; DE VILLENA, J.; MCDERMOTT, P.; MENG, J.; AYERS, S.; ENGLISH, L.; WHITE, D. 2005. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Veterinary Microbiology* 107: 215-224.

ZHOU, H.; GONG J.; BRISBIN, J.; YU, H.; SANEI, B.; SABOUR, P.; SHARIF, S. 2007. Appropriate Chicken Sample Size for Identifying the Composition of Broiler Intestinal Microbiota Affected by Dietary Antibiotics, Using the Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Technique. *Poultry Science* 86: 2541-2549.