



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A
MACRÓLIDOS Y AMINOGLUCÓSIDOS EN BACTERIAS
INDICADORAS AISLADAS DE LA MICROBIOTA
INTESTINAL DE GALLINAS DE POSTURA.

EVELYN ANDREA MUÑOZ MARTÍNEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Clínicas

PROFESOR GUÍA: DRA. BETTY SAN MARTÍN NÚÑEZ

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A MACRÓLIDOS Y AMINOGLUCÓSIDOS EN BACTERIAS INDICADORAS AISLADAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE GALLINAS DE POSTURA

EVELYN ANDREA MUÑOZ MARTÍNEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : BETTY SAN MARTÍN N.
PROFESOR CONSEJERO: CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CONSEJERO: DANIELA IRAGÜEN C.

SANTIAGO, CHILE

2011

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

La resistencia bacteriana a antimicrobianos y su diseminación son una de las mayores epidemias del mundo en la actualidad. Hoy en día, el uso masivo, y en algunos casos, el mal uso de los antimicrobianos, han generado una presión de selección en los microorganismos, creando nuevos y mejores mecanismos de resistencia tanto en cepas bacterianas comensales como en cepas patógenas, generando un grave problema de salud pública que no cesa de aumentar de forma alarmante en todo el mundo.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los perfiles de resistencia genotípica frente a macrólidos y aminoglucósidos en cepas indicadoras de *Enterococcus* spp. y *Escherichia coli* fenotípicamente resistentes a estos fármacos, que fueron aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura. Se determinaron los genes de resistencia a eritromicina *ermB*, *ermA*, *mefA*, *msrA/B* y *msrC* en 37 cepas de *Enterococcus* spp. resistentes fenotípicamente a eritromicina y los genes de resistencia a estreptomicina *aadA1*, *aadA2*, *aadE*, *strA* y *strB* en 26 cepas de *E. coli* resistentes fenotípicamente a estreptomicina. Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El gen de resistencia a eritromicina más frecuente en cepas de *Enterococcus* spp. fue *ermB* encontrándose en 48,6% de las cepas. Los genes *ermA*, *mefA*, *msrA/B* y *msrC* no fueron encontrados en ninguna de las cepas del estudio. En cuanto a los genes de resistencia a estreptomicina, los genes más frecuentes encontrados fueron *strA* y *strB*, encontrándose en un 57,7% de las cepas de *E. coli* del estudio. Estos genes se encontraron siempre juntos. Los genes *aadA1*, *aadA2* y *aadE* no fueron encontrados en ninguna de las cepas del estudio.

Los resultados de este estudio entregan información actualizada de la situación de resistencia bacteriana en cepas indicadoras aisladas de animales productores de alimentos de alto consumo en nuestro país. Finalmente se puede señalar que los datos presentados en este trabajo podrían servir de base junto a otros estudios, para promover el desarrollo de un programa de monitoreo de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobials and its dissemination is one of the largest epidemics in the world today. These days, widespread use, and in some cases, the misuse of antimicrobials have generated a selection pressure on microorganisms, creating new and better methods of resistance in the commensal bacterial strains as pathogenic, causing a serious public health problem that continues to grow at an alarming rate worldwide.

The objective of this study was to characterize the genotypic resistance profiles against macrolides and aminoglycosides in indicator strains of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* phenotypically resistant to these drugs, which were isolated from the intestinal microbiota of laying hens. Erythromycin resistance genes *ermB*, *ermA*, *mefA*, *msrA / B* and *msrC* in 37 strains of *Enterococcus* spp. phenotypically resistant to erythromycin, and streptomycin resistance genes *aadA1*, *aadA2*, *aadE*, *strA* and *strB* in 26 strains of *E. coli* phenotypically resistant to streptomycin were determined. The technique of polymerase chain reaction (PCR) was used.

The most frequently resistance gene to erythromycin found in isolated strains of *Enterococcus* spp. was *ermB* (48.6% of the strains). *ErmA*, *mefA*, *msrA / B* and *msrC* genes were not found in any of the isolated strains. As for the streptomycin resistance genes, the genes most frequently found were *strA* and *strB* (57.7% of strains of *E. coli* strains). It must be noted the fact that both genes were always found together. The genes *aadA1*, *aadA2* and *aadE* were not found in any of the strains of the study.

The results of this study provide information update on the development of bacterial resistance in indicator strains isolated from food-producing animals of high consumption in our country. Finally, it can be suggested that the data presented in this research, in agreement with results from previous studies, can be considered as primary support for an official program of antimicrobial resistance in veterinary medicine establishment.

INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos se han utilizado por más de 50 años, transformando la práctica de la medicina humana y veterinaria en todo el mundo. Sin embargo, junto con el descubrimiento de los antimicrobianos, se puso en evidencia en los microorganismos el fenómeno de la resistencia antimicrobiana. Así por ejemplo, al poco tiempo de haberse obtenido la penicilina, en la década de 1940, Abraham y Chain aislaron y caracterizaron una enzima desde *E. coli* que era capaz de hidrolizar la penicilina. En 1944 Kirby, informó la presencia de una enzima similar tipo penicilasa en *Staphylococcus aureus*. En 1959, se observó la existencia de resistencia a múltiples drogas en cepas de *Shigella dysenteriae* en Japón, descubriéndose después que esta resistencia se podía pasar a una cepa de *E. coli* vía célula-célula. A fines de los años 60 y comienzo de los 70, la resistencia múltiple emergió de nuevo en *S. aureus* (actualmente uno de los principales patógenos causantes de las mastitis clínicas en el ganado bovino lechero), y, luego en una gran variedad de bacterias.

Actualmente, la resistencia antimicrobiana es un importante problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que existe evidencia que los animales de producción, entre ellos las aves de postura, son un reservorio de bacterias resistentes y que deben hacerse esfuerzos entre médicos humanos y veterinarios para abordar este problema. De acuerdo a lo señalado por esta organización, la aparición de resistencia a antimicrobianos en Medicina veterinaria ha causado un incremento en la incidencia de infecciones humanas y animales por patógenos resistentes, con sus consecuentes fallas en la terapia farmacológica y el aumento en la probabilidad de transmisión de patógenos resistentes entre animales y desde los animales a los hombres. Además, puede traer graves consecuencias económicas en la producción animal, ya que se han descrito toxiinfecciones alimentarias causadas por salmonelas multirresistentes, trayendo desconfianza entre los consumidores.

Hoy en día, los antimicrobianos siguen empleándose, como tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas en la producción animal. Es por esto que La Asociación Americana de Microbiología (ASM), la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) y la Asociación Médica Americana (AMA) han solicitado restricciones en el uso de estos fármacos en la producción animal, incluyendo la supresión de todos los usos no terapéuticos.

En Chile, no se encuentran disponibles registros oficiales de la situación de resistencia bacteriana en cepas aisladas desde animales y existe escasa información acerca de cuáles son los antimicrobianos que muestran mayores porcentajes de resistencia y de los mecanismos genéticos involucrados en conferir esta característica en las cepas bacterianas. De acuerdo a lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los perfiles de resistencia genotípica frente a macrólidos y

aminoglucósidos en cepas de *Enterococcus* spp., y *E. coli* fenotípicamente resistentes a estos fármacos y aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Vigilancia de la resistencia bacteriana a nivel mundial

Los programas de vigilancia de la resistencia a antimicrobianos existentes en diversos países, son un pilar fundamental para controlar el aumento y diseminación de la resistencia bacteriana, con interés en resguardar la salud y seguridad de la población humana y animal. Un programa de monitoreo de resistencia tiene como objetivo proporcionar, analizar y distribuir los datos relativos a la extensión y tendencias temporales de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos de uso común tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. Esto incluye observar la evolución de la resistencia, detectar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia, proporcionar los datos necesarios para llevar a cabo los análisis de riesgo implicados en el uso indiscriminado de antimicrobianos, proporcionar una base para formular recomendaciones sobre políticas de sanidad humana y animal, y aportar información para elaborar normas y recomendaciones de uso prudente de antimicrobianos de manera de prolongar su eficacia y vida útil y tratar de frenar de alguna manera la rápida diseminación de bacterias resistentes y multiresistentes a nivel mundial (OIE, 2010).

El problema de la resistencia a los antibióticos se ha vuelto ampliamente conocido en gran parte debido al surgimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), un agente bacteriano cada vez más común en los hospitales con consecuencias alarmantes. En 1974, 2% de las infecciones intrahospitalarias por *S. aureus* en Estados Unidos era por MRSA según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Para 1995, esta cifra se elevó a un 22% y para 2004 había alcanzado el 64% (Rosenblatt-Farrell, 2009).

Dada la preocupación mundial por este factor de riesgo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) pone en marcha en el año 1996 un plan global de monitoreo y vigilancia de resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas de importancia clínica. Inicialmente, la vigilancia estaba dirigida a las siguientes bacterias entéricas: *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Vibrio cholerae*, pero a partir del año 2000, se incluyeron a esta lista otras especies comensales y nosocomiales, tales como *Enterococcus* spp. y *E. coli* (OMS, 2004).

En los Estados Unidos de América (EE.UU), se formó en el año 1996, el Sistema de Monitoreo de la Resistencia a los Antibióticos (NARMS) como un esfuerzo conjunto de la Administración Federal de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (FDA), el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y el Departamento de Agricultura estadounidense, con el fin de recolectar datos sobre las bacterias presentes en seres humanos y animales. El informe anual del año 2006 de carnes vendidas al por menor emitido por el NARMS, presentó cifras

perturbadoras. En pruebas realizadas en muestras de pechuga de pollo recolectadas entre 2002 y 2006, un promedio de 51,1% de las muestras arrojaron resultados positivos a *Campylobacter*, 11,9% a *Salmonella* spp., 97,7% a *E. coli*, y 82,6% a *Enterococcus* spp. En muchos casos, estos aislamientos bacterianos también resultaron positivos en cuanto a resistencia a uno o más fármacos (Rosenblatt-Farrell, 2009).

En la Unión Europea por su parte, numerosos países han implementado programas de monitoreo de resistencia antimicrobiana, siendo Dinamarca uno de los países pioneros en este tipo de programas. Es así, que en el año 1994 crea el programa “The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme” (DANMAP), el cual monitorea las tendencias de resistencia a antimicrobianos en bacterias de origen animal, bacterias aisladas desde diversos alimentos y bacterias aisladas desde pacientes humanos. Además, este programa monitorea el consumo de antimicrobianos y proyecta posibles modelos de transmisión de resistencia desde humanos a animales y viceversa (Bager, 2000).

En España, por otra parte, se creó en el año 1996 la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antimicrobianos (VAV), con el objetivo de proporcionar datos fiables y contrastables de los niveles de resistencia a los antimicrobianos en bacterias presentes en dicho país, y especialmente, en las de mayor relevancia en salud pública. Esta red de vigilancia propone una clasificación de las bacterias en tres grandes grupos: bacterias indicadoras (*E. coli* y *Enterococcus faecium* y/o *faecalis*), bacterias zoonóticas (géneros *Salmonella* y *Campylobacter*) y bacterias patógenas (*S. aureus*, *Pasteurella* spp., etc). Las bacterias indicadoras forman parte del protocolo contemplado oficialmente por la Unión Europea en todos sus programas de Vigilancia de Resistencias. La importancia de las bacterias indicadoras se debe a que la microflora normal de los animales es considerada un reservorio de bacterias y determinantes genéticos de resistencia que podrían ser transmitidos a bacterias patógenas y zoonóticas. El monitoreo de este tipo de microorganismos permite dar a conocer a los médicos veterinarios cuáles antimicrobianos están generando resistencia, evitando un riesgo en salud pública, además de disminuir el riesgo de un fracaso terapéutico que genera grandes pérdidas económicas al productor (Moreno, 2008).

Por otra parte, la Comunidad Europea, considerando que no se debe incrementar el reservorio de bacterias resistentes en los animales de producción, prohíbe utilizar antimicrobianos que se utilizan en enfermedades graves en humanos y/o que generen resistencia cruzada con antimicrobianos de primera línea de elección en medicina humana. Es así, que en el año 1997 prohíbe el uso de avoparcina (Directiva 97/6/CEE)¹ y en 1998 de bacitracina-zinc, espiramicina,

¹ CEE/DIRECTIVA 97/6. 1997. UNION EUROPEA. http://europa.eu.int/index_es.htm

virginiamicina y fosfato de tilosina (Directiva 70/524/CEE)² en animales de producción (San Martín *et al.*, 2005).

A nivel latinoamericano, en el año 2002 se creó una red de vigilancia de resistencia a antimicrobianos bajo el auspicio de la Organización Panamericana de Salud (OPS), donde participan Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Perú, México y Chile. Esta red, estudia la resistencia de bacterias clínicamente importantes como *Shigella* spp. y *V. cholerae* entre otras especies bacterianas, todas de origen humano. En nuestro país, el Instituto de Salud Pública (ISP) es el encargado de recibir las muestras de las cepas de notificación obligatoria (*Neisseria meningitidis*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *V. cholerae*, entre otras), realizar los estudios de sensibilidad a antimicrobianos correspondientes e informar periódicamente a esta red de vigilancia latinoamericana. Por otro lado, el Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, desarrolló un programa de vigilancia de la resistencia bacteriana, el proyecto PRONARES (Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia), el cual funcionó entre los años 1998 y 2002. Este programa tenía como objetivo analizar la susceptibilidad de patógenos prevalentes, agrupados por síndromes clínicos (infecciones invasoras, urinarias, de piel y tejidos blandos, entéricos y respiratorios). Sin embargo los Centros Clínicos participantes fueron muy acotados y el Programa finalmente no dio mayores resultados llegando a su fin (González, 2002; Trucco *et al.*, 2002; García, 2003).

Por otro lado, respecto a la situación en medicina veterinaria en Chile, si bien a partir del año 1996 las exigencias en el Registro de Productos Farmacéuticos han aumentado por parte del Servicio Agrícola y Ganadero del Ministerio de Agricultura (desde el año 2002 no se pueden registrar en nuestro país antimicrobianos destinados a la promoción del crecimiento) implementándose, además, un Plan Nacional de Control de Residuos de Medicamentos en cerdos, aves y bovinos, no existe actualmente un programa de monitoreo de la resistencia bacteriana, como tampoco restricción en la adquisición y uso de estos fármacos. Al respecto cabe señalar que aún cuando no existe un programa oficial de vigilancia de resistencia bacteriana en animales de producción, existe suficiente información científica que avala la existencia de este riesgo en nuestro país (Wolff, 2004; San Martín *et al.*, 2005; Lapierre, 2007).

Por último, la Comisión del Codex Alimentario creó un Grupo de Trabajo sobre Resistencia Antimicrobiana (Task Force on Antimicrobial Resistance) en el que participan conjuntamente la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS. Este grupo de trabajo se estableció formalmente en una reunión celebrada en Seúl (Corea) en octubre de 2007 y se divide en tres subgrupos que se

² CEE/DIRECTIVA 70/524. 1997. UNION EUROPEA. http://europa.eu.int/index_es.htm

ocupan de diversas facetas del Análisis de Riesgo del desarrollo de resistencias a los antimicrobianos derivado de su uso en animales y plantas (Moreno, 2008).

Resistencia bacteriana a antimicrobianos en sistemas de producción animal y el medio ambiente.

La resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos es un grave problema que afecta tanto la salud humana como a los animales y por lo tanto los sistemas productivos pecuarios. En medicina veterinaria, paralelamente a lo que ocurría en medicina humana, los antimicrobianos comenzaron a ser utilizados en el tratamiento y profilaxis de diversas enfermedades infecciosas, tanto en los animales de compañía como en los animales de producción. Es indiscutible que la utilización de estos fármacos ha reducido la mortalidad causada por enfermedades infecciosas de origen bacteriano, sin embargo, en la últimas décadas, el intensivo uso de este arsenal terapéutico ha incrementado el desarrollo de resistencia bacteriana en todo el mundo (Wolff, 2004).

Dentro de los Sistemas productivos animales, sin duda, el uso más controversial de los antimicrobianos es su uso como promotor del crecimiento. Se estima que más de un 70% de todos los antibióticos utilizados en EE.UU (más de 10.800 toneladas al año) se añaden cotidianamente a los alimentos y el agua del ganado sano. Estos fármacos son utilizados en los animales de engorda no sólo para controlar las enfermedades de origen infeccioso, sino también para mejorar su metabolismo y reducir los requerimientos alimentarios al estimular el crecimiento de los microbios que producen vitaminas y aminoácidos. Sin embargo, se calcula que el aumento de peso del ganado sometido a esta práctica no supera el 10-15% del peso vivo. En aquellos países de la Unión Europea en donde esta práctica se ha eliminado y reemplazado por técnicas más higiénicas de alimentación se ha obtenido el mismo peso que el de animales alimentados con suplemento antibiótico (Mellon *et al.*, 2001).

La práctica de utilizar antibióticos en dosis no terapéuticas, produce una selección de resistencia en las bacterias comensales y en las patógenas, que afectan a los animales, y que se pueden aislar de productos alimentarios de origen animal, como en muestras de agua, aire y suelo recolectadas alrededor de los sistemas productivos (Sapkota *et al.*, 2007). Al respecto, en un estudio realizado el año 2001 en planteles de cerdo de EE.UU, se informó que hasta el 75% de la tetraciclina administrada a los cerdos era excretada sin alteración persistiendo en el ambiente, creando una oportunidad de selección de resistencia dentro de las poblaciones bacterianas ambientales (Chee-Sanford *et al.*, 2001).

Por otro lado, las prácticas de manejo de desechos animales varían considerablemente de una granja a otra, pero en general se basan en el esparcimiento de los desechos sobre la

superficie del suelo a manera de fertilizante, lo cual puede dar como resultado la contaminación del suelo y del agua superficial o subterránea. Muchas operaciones de crianza convencionales utilizan también lagunas de desechos, las cuales proporcionan una vía alternativa por la que las aves silvestres, roedores y los insectos pueden contaminarse con bacterias resistentes, y transmitirlos a otros animales de producción y/o mascotas (Chee-Sanford *et al.*, 2001; Campagnolo *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2004). En este aspecto, no sólo los planteles de producción animal contribuyen en la contaminación ambiental con bacterias resistentes, ya que los residuos fecales provenientes de hospitales y hogares, también son derramados en diversos cursos de agua sin ningún tratamiento previo, al igual que los residuos provenientes de fábricas de productos farmacéuticos (Mallon *et al.*, 2002; Rosenblatt-Farrell, 2009).

Un estudio publicado por Graham *et al.* (2009) demostró la presencia de resistencia en bacterias aisladas de moscas recolectadas de las áreas que rodeaban una planta de producción de aves de corral, congruente con los tipos de antibióticos que se utilizaban allí. Estos autores sugirieron que "la contaminación de las moscas con bacterias entéricas resistentes a los antibióticos en la producción de aves de corral, incrementa el potencial de la exposición humana a las bacterias resistentes a los fármacos."

Uno de los trabajos más interesantes relacionados con la diseminación de la resistencia bacteriana, es un estudio realizado el año 2008 que documentó la presencia inesperadamente elevada de *E. coli* resistente a fármacos en la fauna del Ártico (Sjöland *et al.*, 2008). En otro estudio reciente, publicado el año 2009, se tomaron 472 aislamientos bacterianos de vertebrados de las aguas costeras del noreste de EE.UU, incluyendo mamíferos marinos, tiburones y aves, y encontraron que el 58% de las bacterias aisladas presentaban resistencia a por lo menos un antibiótico, mientras que 43% eran resistentes a múltiples fármacos (Rose *et al.*, 2009).

La existencia de microorganismos resistentes en producción animal, puede traer además graves implicancias económicas para el productor al traer desconfianza en los consumidores. Estos microorganismos presentes en productos alimenticios de origen animal, especialmente carnes, pueden causar infecciones graves en humanos, y dificultar enormemente el tratamiento. Así por ejemplo, se han descrito diversos brotes de intoxicación alimentaria causados por *Salmonella* Typhimurium multiresistentes DT104 ACSSUT (resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas, sulfametoxazol-trimetoprim y tetraciclina), que además presentan resistencia a fluoroquinolonas. Esta salmonela multiresistente ha sido aislada de diversos animales y productos alimenticios de origen animal como carne de cerdos, aves, quesos y leche (Michanie *et al.*, 2001; Carramiñana *et al.*, 2004).

En un estudio realizado por Johnson *et al.* (2005) en supermercados en Minneapolis–St. Paul (EE.UU), se concluyó que los alimentos vendidos al por menor, sobre todo carne y sus derivados, pueden constituir un importante vehículo para la difusión de *E. coli* resistentes a antimicrobianos en la comunidad.

La resistencia antimicrobiana también trae consecuencias en la salud animal, pero la magnitud de este problema ha sido poco investigada. Se señala que la vigilancia de la resistencia en patógenos animales como *Moraxella* spp., *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*, es bastante reducida en comparación a la realizada para enteropatógenos zoonóticos. Esto sin embargo, se atribuye a varios factores: los altos costos de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, la dificultad de tomar de muestras en animales de acuerdo al sitio de infección y la lenta respuesta de los laboratorios al productor (OMS, 2001; Apley, 2003). No obstante, pese al reducido número de estudios, se ha demostrado la existencia de resistencia a diversos antimicrobianos en una amplia variedad de patógenos animales tales como; *E. coli* patógena en ganado bovino, cerdos y aves (Lee y Maurer, 2000, San Martín *et al.*, 2002), *P. multocida* y *Mannheimia haemolytica* en bovinos (Schwarz *et al.*, 2004), *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Streptococcus suis* en cerdos (Vela *et al.*, 2005) y *S. aureus* multiresistentes aislados de ganado lechero (San Martín *et al.*, 2002).

Antimicrobianos en producción aviar.

En la avicultura moderna, las aves son criadas bajo condiciones extremadamente intensivas, utilizando el mínimo espacio vital durante 35-40 días para alcanzar el máximo crecimiento y producción posible. En estas explotaciones, casi cualquier problema infectocontagioso se disemina rápidamente, reduciendo el margen de ganancia, o causando enormes pérdidas económicas. Evidentemente, la mortalidad, la morbilidad, las ganancias de peso e índices de conversión son las variables económicas y de salud más sensibles de estas explotaciones. De aquí que el uso de antimicrobianos en dosis subterapéuticas en el agua de bebida o el alimento, como prevención de enfermedades y promotor del crecimiento sea una práctica común en este tipo de producción animal. Por lo tanto, la presión de selección de resistencia provocada por los antibióticos en las bacterias comensales de las aves de corral es alta y por consiguiente, su flora fecal contiene una proporción relativamente alta de bacterias resistentes (Sumano y Gutiérrez, 2000; Miles *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Miles *et al.* (2006) en Jamaica en pollos de engorde, se demostró altos niveles de resistencia en *E. coli* a tetraciclina (82%), kanamicina (91%) y ácido nalidíxico (85%). Estas bacterias pueden ser diseminadas durante el sacrificio de las aves a las

canales, o se pueden transmitir a los huevos durante su producción, pudiendo infectar a los humanos directamente, como indirectamente a través de los alimentos.

Dentro de los antimicrobianos de mayor uso y desarrollo en producción aviar se encuentran las quinolonas. Sin duda el enrofloxacino ha sido el antimicrobiano más ampliamente utilizado, lo cual ha generado la aparición de resistencia bacteriana a este antimicrobiano y disminución de la eficacia percibida por el médico veterinario en los últimos años (Sumano y Gutiérrez, 2000).

En EE.UU y Canadá, los agentes antimicrobianos que están disponibles para su uso como promotores del crecimiento en aves, incluyen la bacitracina-zinc, la penicilina procaína, tetraciclinas, tilosina, virginiamicina y monensina, mientras que los antimicrobianos que se utilizan para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades en aves de producción son la amoxicilina, sulfamidas, tilosina, fluoroquinolonas, lincosamidas, aminoglucósidos, tetraciclinas, colistina y pleuromutilina (Gyles, 2008). En Europa, está suprimido el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento en animales de producción, y los antibióticos permitidos para su uso en el tratamiento de enfermedades en avicultura incluyen betalactámicos (sólo del grupo aminopenicilinas), aminoglucósidos, quinolonas, polipeptidos, macrólidos, tetraciclinas, anfenicoles, lincosaminas y sulfonamidas (Borrell *et al.*, 2006).

En Dinamarca, según el último reporte anual del DANMAP (2009), el consumo de agentes antimicrobianos en aves de corral casi se duplicó, de 556 kg de sustancias activas de fármacos vendidas a empresas y fábricas de producción avícola en el año 2008, a 1.070 kg para el año 2009. Los antimicrobianos mayormente usados fueron las tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos y amoxicilina (que hasta el año 2007 constituía el 90% de los antimicrobianos de uso en aves de corral).

Con respecto a la situación en Chile, se estima que los antimicrobianos de mayor uso en producción aviar son las tetraciclinas, quinolonas y fluoroquinolonas. Es importante señalar que la avicultura en nuestro país ha enfrentado la aparición y estabilización endémica de *Salmonella* Enteritidis, esto ha significado establecer planes de control para este patógeno. Con este propósito la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Aves (AMEVEA) junto con el SAG (Servicio Agrícola y Ganadero), elaboraron un plan de control de *Salmonella* Enteritidis, el cual sugirió el uso de antimicrobianos específicos como flumequina (quinolona) para la prevención de la infección por este patógeno (González *et al.*, 1998). Esta situación podría favorecer la selección de cepas resistentes a quinolonas en las cepas aisladas desde aves y sus productos.

***Escherichia coli*: características generales y reportes de su resistencia.**

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, caracterizado en 1885 por el médico Theodor Escherich, que junto a otras especies forma el género *Escherichia*. Constituye la especie dominante de la flora normal digestiva del hombre y los animales, donde más de 10 serotipos coexisten normalmente en un mismo individuo (Algorta y Schelotto, 2006).

Son estas mismas bacterias integrantes de la flora normal las que pueden causar en diversas circunstancias, infecciones abdominales, septicemias, meningitis, infecciones del tracto urinario, diarreas hemorrágicas, etc. Es la causa más frecuente de infecciones por bacterias Gram negativas y es el primer o segundo microorganismo más frecuentemente aislado desde sangre en humanos (Algorta y Schelotto, 2006).

E. coli es utilizada como cepa indicadora en los programas de vigilancia de resistencia bacteriana a antimicrobianos en la mayoría de los países, ya que es capaz de desarrollar una serie de elaborados métodos para la adquisición y difusión de determinantes genéticos de resistencia sirviendo como reservorio de estos. Estudiar estos determinantes moleculares, permite comprender de mejor manera la importancia de las bacterias comensales en el desarrollo y transferencia de la resistencia entre bacterias (Gow *et al.*, 2008). Además, la elección de *E. coli* como bacteria indicadora se justifica por su elevada frecuencia de aislamiento e identificación en los laboratorios de sanidad animal. En las pautas que siguen diversos programas de monitoreo se considera a *E. coli* como el mejor indicador entre los microorganismos Gram negativos (Moreno *et al.*, 2000).

En los últimos años, ha existido un aumento de la resistencia de *E. coli* a betalactámicos y fluoroquinolonas en diversos países, incluso en países donde las tasas de resistencia a antimicrobianos son bajas. Se han reportado además, gran cantidad de cepas multirresistentes (Oteo *et al.*, 2002).

Uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia en *E. coli*, es la disminución en la expresión de proteínas de entrada de la membrana externa, más conocidas como porinas. La disminución en la expresión de estas porinas, o mutaciones estructurales en las mismas, disminuyen la entrada de los antimicrobianos, confiriéndole a la bacteria resistencia a uno o más antimicrobianos. Son muy estudiadas las alteraciones a nivel de las porinas OmpF, OmpC y PhoE, que confieren resistencia a fármacos como cloranfenicol, tetraciclinas, estreptomina y fluoroquinolonas (Hooper, 2001 y De Spiegeleer *et al.*, 2005).

Otro mecanismo, común de multirresistencia es la expresión de bombas de eflujo para múltiples antimicrobianos. En *E. coli* este sistema de transporte es denominado AcrAB, y está formado por una proteína transportadora activa que expulsa a una amplia variedad de antimicrobianos hacia el exterior (Fluit *et al.*, 2001 y Bambeke *et al.*, 2003).

Además, un reciente estudio realizado a finales del año 2009, sugiere que *E. coli* podría ser reservorio de genes de resistencia a macrólidos, al aislarse un plásmido con el gen *mph(A)* (que confiere resistencia a azitromicina y eritromicina), en cepas aisladas de cuatro continentes (Europa, Asia, América y África). Se describe además que es muy probable que *E. coli* sea la responsable de la transmisión de este gen a *Shigella* spp. y *Salmonella* spp.; esto basado en que desde 1950 la transferencia mediada por plásmidos entre *E. coli* y *Shigella* ha sido informada en varias oportunidades; este estudio fue realizado luego que se reportaran diversos brotes de shigelosis en París, resistentes a azitromicina (Nguyen *et al.*, 2009).

Enterococcus spp.: Características generales y reportes de su resistencia.

Los enterococos son cocos Gram positivos, aerobios facultativos. El género bacteriano *Enterococcus* fue creado en 1980, retirándolo del género *Streptococcus* al cual pertenecía como parte del grupo D, por diferencias genéticas. Se describen 16 especies (Tabla 1), pero la mayoría de las enfermedades las causan dos de ellas: *E. faecalis* como principal agente (95%) y *E. faecium* en menor proporción (5%) (Chrystal, 2002). Entre ambas especies hay grandes diferencias, no tanto en las infecciones que puedan causar, sino en su patrón de resistencias y en el ámbito en que se aíslan (Causse *et al.*, 2006).

Forman parte de la flora comensal intestinal de humanos, otros mamíferos, aves e insectos. Son capaces de sobrevivir en medios poco enriquecidos como agua y suelo, como también en el alimento. Son causantes de diferentes infecciones tales como; infección del tracto urinario (lo más frecuente), bacteremia, endocarditis, diverticulitis y meningitis (Luczkiewicz *et al.*, 2010).

Tabla 1. Especies del género *Enterococcus* (Juliet, 2002):

<i>S. avium</i>	<i>S. gallinarum</i>
<i>S. calcorum</i>	<i>S. hirae</i>
<i>S. casseliflavus</i>	<i>S. malodoratus</i>
<i>S. columbae</i>	<i>S. mundtii</i>
<i>S. dispar</i>	<i>S. pseudoavium</i>
<i>S. durans</i>	<i>S. raffinosus</i>
<i>S. faecalis</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>S. faecium</i>	<i>S. sulfureus</i>

El género *Enterococcus* surgió como consecuencia de la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos ya que es intrínsecamente más resistente a los antimicrobianos que otras especies bacterianas, siendo ésta la mayor característica del género (Sander, 2002); presenta alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos, donde se incluyen las cefalosporinas, la clindamicina y el cotrimoxazol. Además tiene la capacidad de adquirir resistencia a otros antimicrobianos (Tabla 2), incluidos los glucopéptidos (vancomicina), en ocasiones la única alternativa para el tratamiento de infecciones severas por *Enterococcus* spp. resistentes a ampicilina (Juliet, 2002). Esta situación fue la que determinó que la Comunidad Europea a partir del año 1997 revocara la autorización de la utilización de avoparcina, un promotor de crecimiento del mismo grupo de la vancomicina, por la capacidad de generar resistencia cruzada a este fármaco de uso exclusivo en medicina humana. Más tarde, en el año 1999 se prohíbe la utilización de bacitracina, espiramicina, virginiamicina y fosfato de tilosina como promotores del crecimiento, debido al potencial riesgo que el uso de estos antimicrobianos en dosis subterapéuticas significan para la salud pública. Al respecto está demostrado que cepas de *Enterococcus* spp. pueden adquirir y diseminar genes de resistencia a vancomicina, los cuales pueden ser transferidos a bacterias patógenas como MRSA (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001; Casewell *et al.*, 2003; Causse *et al.*, 2006). Estudios realizados en Dinamarca, muestran que luego de la prohibición del uso de virginiamicina como promotor del crecimiento en 1997, los niveles de cepas resistentes de *E. faecium* a este antimicrobiano, disminuyeron de un 60% a un 30% en pollos destinados a consumo (Bager, 2000).

Esta capacidad de *Enterococcus* spp. para adquirir y diseminar determinantes genéticos de resistencia, es uno de los motivos más importantes por lo cual, al igual que *E. coli*, se considera dentro de las bacterias indicadoras en todos los programas de vigilancia de resistencia bacteriana a los antimicrobianos en el mundo, además de su alta frecuencia de aislamiento en diversos alimentos y en el agua (Juliet, 2002 y Arias *et al.*, 2003).

Tabla 2. Tipos de resistencia en *Enterococcus* spp (Juliet, 2002):

Natural	Adquirida
• Cefalosporinas	• Ampicilina-penicilina
• Oxacilinas	• Cloranfenicol
• Clindamicina	• Eritromicina
• Lincomicina	• Tetraciclinas
• Cotrimoxazol	• Quinolonas
• Aminoglucósidos (bajo nivel)	• Vancomicina-teicoplanina
	• Nitrofurantoina
	• Aminoglucósidos (alto nivel)

La resistencia adquirida a los betaláctamicos está causada por la modificación de las proteínas fijadoras de penicilina (especialmente las PBP-5) y por la producción de betalactamasas. La resistencia intrínseca a los aminoglucósidos es de bajo grado, mientras que la adquirida se debe a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Causse *et al.*, 2006).

En cuanto a los reportes existentes sobre la resistencia de este género bacteriano, durante la última década, la investigación mundial ha estado enfocada al estudio de los enterococos resistentes a vancomicina (EVR), debido a la aparición y diseminación de EVR en los hospitales, que constituyen un gran riesgo para los pacientes hospitalizados (Silva *et al.*, 2005). En 1986 se descubrieron las primeras cepas de enterococcus resistentes a vancomicina en Inglaterra, posteriormente en ese mismo país se incrementaron en un 50% por año las infecciones por este agente en algunos hospitales (Chrystal, 2002). Además, en 1990 emergen cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a ampicilina y también bacterias multiresistentes que dificultan los tratamientos con impacto en la mortalidad, lo que pone en evidencia la gravedad del problema (Martel *et al.*, 2000; Power, 2004).

Antimicrobianos y su mecanismo de Acción

Los antimicrobianos son sustancias químicas producidas por microorganismos (bacterias u hongos), o bien derivados sintéticos de estas sustancias, los cuales pueden producir la muerte bacteriana (acción bactericida) o impedir su multiplicación (acción bacteriostática), cuando estos microorganismos son sensibles (Walsh, 2000). Su uso comenzó a principios de 1940, con la utilización clínica de penicilina en pacientes humanos. Lamentablemente, en esa misma década se identificó la enzima penicililasa obligando a los científicos a crear nuevos y mejores antibióticos, como las penicilinas ácido-resistentes. En esa misma década además, se descubren nuevas drogas como la estreptomicina, el cloranfenicol y la clortetraciclina. En 1950, aparece la eritromicina y la vancomicina, gentamicina, ampicilina, cefalotina y la amikacina. Más tarde en 1970, aparece la carbenicilina, ceftioxitina y cefaclor. A principios de 1990, se desarrollaron nuevas moléculas como cefotaxima, moxalactam, ácido clavulánico en combinación con amoxicilina, imipenen-cilastatina, aztreonam y fluoroquinolonas de amplio espectro (Power, 2004).

Los antimicrobianos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo; tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, siendo mínima la toxicidad para las células eucariotas (Seija y Vignoli, 2006).

Los agentes antimicrobianos son a menudo clasificados según su mecanismo de acción principal, distinguiéndose de esta forma 5 mecanismos de acción (Tenover, 2006):

- 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular (por ejemplo, betalactámicos y glucopéptidos).
- 2) Inhibición de la síntesis de proteínas (macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclinas).
- 3) Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos (fluoroquinolonas y rifampicina).
- 4) Inhibición de una vía metabólica (trimetoprim-sulfametoxazol).
- 5) Alteración de la estructura de la membrana bacteriana (polimixinas y daptomicina).

Aminoglucósidos: estreptomina

Los aminoglucósidos son bactericidas, descubiertos en 1943 por Waksman quien descubrió el primer aminoglucósido, la estreptomina. Estas sustancias se caracterizan por la presencia de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Según los aminoazúcares se clasifican en familias (Tabla 3). Son altamente polares, policationes solubles en agua y generalmente estables al calor y cambios de pH entre 5 y 8 (Borrell *et al.*, 2006).

En cuanto a su espectro de acción, los aminoglucósidos generalmente son activos frente a los bacilos aerobios Gram negativos (*E. coli*) y estafilococos y tienen poca actividad frente a estreptococos y anaerobios (Seija y Vignoli, 2006).

Actualmente, gracias a su alta potencia y amplio espectro son muy usados para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por bacilos Gram negativos, incluyendo *Pseudomona aeruginosa* (Seija y Vignoli, 2006).

En cuanto a su mecanismo de acción, tienen como sitio blanco el ribosoma bacteriano, uniéndose a la subunidad 16s del RNAr, con lo cual inhiben la síntesis proteica. Secundariamente, interrumpen la integridad de la membrana celular, al alterar los puentes de Mg^{2+} que unen los lipopolisacáridos de la membrana (Shakil *et al.*, 2008).

Tabla 3. Clasificación de los aminoglucósidos (Borrell *et al.*, 2006).

Familia	Miembros
Estreptomicina	Estreptomicina
Kanamicina	Kanamicina Amicacina Tobramicina Dibekacina
Gentamicina	Gentamicina Netilmicina
Neomicina	Neomicina

Macrólidos: eritromicina

Los macrólidos son antimicrobianos descubiertos en 1952 a partir de los productos metabólicos derivados de *Streptomyces erytherus*. Estos se clasifican según el número de carbonos: 14 carbonos (eritromicina y claritromicina), 15 carbonos (azitromicina) y 16 carbonos (espiramicina, tilosina, tilmicosina). En avicultura actualmente, sólo se usan macrólidos de 14 y 16 átomos. Las pleuromutilinas (tiamulina) en muchas publicaciones recientes, se consideran un grupo aparte de los macrólidos (Borrell *et al.*, 2006).

En cuanto a su espectro de acción, la eritromicina presenta buena actividad sobre *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *Corynebacterium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Actinomyces* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* spp. y Rickettsias. Claritromicina y azitromicina tienen actividad sobre *Mycobacterium avium*. Actualmente los macrólidos son usados en aves de postura principalmente para el tratamiento de enfermedades respiratorias, actuando sobre bacterias del género *Mycoplasma* y bacterias Gram positivas (Seija y Vignoli, 2006).

En cuanto a su mecanismo de acción, actúan principalmente inhibiendo la síntesis proteica a nivel del ribosoma bacteriano; sin embargo, estos se unen a la subunidad 23s del RNAr, la unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación (Alekhshun y Stuart, 2007). Es importante destacar que los ribosomas bacterianos difieren estructuralmente de sus homólogos eucariotas, por lo que los antimicrobianos que actúan sobre este organelo, lo hacen de manera selectiva, atacando solo a las células bacterianas.

Mecanismos de resistencia bacteriana

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos. Estos mecanismos muestran una elevada sofisticación bioquímica y genética, limitando seriamente la utilidad de la terapia antimicrobiana. La sola presencia de estos antimicrobianos ejerce una presión selectiva sobre las bacterias, permitiendo que aquellas que son capaces de sobrevivir y multiplicarse generen una población o progenie resistente (McEwen y Fedorka-Cray, 2002 y Fernández *et al.*, 2003).

Esta resistencia puede ser clasificada como natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, y su aparición es anterior al uso de los antimicrobianos, como lo demuestra el aislamiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos, de una edad estimada de 2000 años, encontradas en las profundidades de los glaciales de las regiones árticas de Canadá. En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y esto les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico. Un claro ejemplo de este tipo de resistencia es lo que sucede con el género *Mycoplasma*, que al carecer de pared celular, no son afectados por los antibióticos betalactámicos que actúan interviniendo con la síntesis de dicha pared (Fernández *et al.*, 2003 y Vignoli y Seija, 2006).

La resistencia adquirida, en cambio, se produce cuando las cepas bacterianas sufren mutaciones cromosomales o incorporan material genético exógeno extracromosomal, llevando finalmente al fracaso terapéutico frente a una infección (Vignoli y Seija, 2006). Las mutaciones son relativamente raras; ocurren únicamente en un evento por cada 10^7 - 10^{10} , y son transferibles sólo a la progenie de la bacteria a través de la denominada Transferencia Vertical de genes de resistencia, por lo tanto son de poca importancia. Resultan mucho más preocupantes los sistemas de transferencia de genes, a través de determinantes genéticos móviles que permiten compartir el material genético entre las bacterias. Una estrategia de transferencia genética es el intercambio de plásmidos conjugativos. Estos círculos de ADN, que están separados del cromosoma bacteriano, pueden replicarse independientemente y desplazarse entre las bacterias portando genes con resistencia a los antibióticos, con lo cual se multiplica la resistencia a los antibióticos entre las generaciones sucesivas dentro de una colonia bacteriana (Tenover, 2006 y Rosenblatt-Farrell, 2009). Las bacterias también pueden adquirir genes de resistencia a través de la propagación de transposones conjugativos y no conjugativos, y más recientemente, integrones y *cassettes* genéticos de resistencia. Hasta la fecha se han descrito varias clases de integrones de acuerdo a la secuencia nucleotídica del gen *intI*, donde al menos tres de ellas están relacionadas con la expresión de genes de resistencia (González *et al.*, 2004).

Este traspaso de genes, desde bacterias resistentes a bacterias sensibles, puede ocurrir a través de tres procesos (Tenover, 2006):

1) Conjugación: es el proceso de transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, promovido por determinados tipos de plásmidos, que portan un conjunto de genes cuyos productos participan en el proceso, y que requiere de contacto directo entre ambas células, con intervención de estructuras superficiales especializadas y de funciones específicas (*pilus* sexuales en los Gram negativos, y contacto íntimo en los Gram positivos). Este mecanismo es el más importante en la transferencia de genes de resistencia.

2) Transducción: Es la transferencia de genes de resistencia desde una bacteria a otra a través de bacteriófagos (virus bacteriano). Este es un evento relativamente raro.

3) Transformación: Es el proceso mediante el cual las bacterias adquieren e incorporan segmentos de DNA liberados al medio ambiente producto de procesos de lisis bacteriana.

Estos tres mecanismos forman parte de la denominada transferencia horizontal de genes (HGT). De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos. Este proceso es ampliamente reconocido como el mecanismo responsable de la emergencia de multiresistencia a antimicrobianos en bacterias y la amplia distribución de genes de resistencia, no solo entre bacterias de la misma especie, sino también inter especie (De la Cruz y Davies, 2000).

Los mecanismos de resistencia, ya sean adquiridos o naturales, pueden ser agrupados en las siguientes categorías (Fernández *et al.*, 2003; Tenover 2006; Vignoli y Seija, 2006):

- Inactivación enzimática: Corresponde a la modificación enzimática de la estructura molecular de un antimicrobiano, de manera que este pierde su funcionalidad. El principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis enzimática, por ejemplo aquella realizada por las betalactamasas. Existen además otro tipo de modificaciones bioquímicas tales como acetilaciones (acetiltransferasas), adenilaciones (adeniltransferasas) o fosforilaciones (fosfotransferasas) inactivantes, mecanismos principales de resistencia a aminoglucósidos y cloranfenicol. En años recientes la aparición de beta lactamasas de amplio espectro que incluyen a las antibetalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), dificulta el uso de estos antibióticos tan utilizados.

- Modificaciones del sitio blanco: Consiste en la alteración química del sitio de acción del antimicrobiano. Un ejemplo de este mecanismo es la alteración en las PBP (proteínas de unión a penicilinas) en *Streptococcus pneumoniae*, que confiere resistencia a penicilina e incluso a ceftriaxona, cefalosporina de tercera generación.
- Alteraciones en la permeabilidad: Consiste en la modificación de la permeabilidad de la célula bacteriana para disminuir la concentración efectiva de antimicrobiano al interior de ésta. Este mecanismo incluye las alteraciones a nivel de la membrana bacteriana como es la disminución de la expresión de porinas (por ejemplo OmpF en *E. coli*), y alteraciones en la entrada de antibióticos dependiente de energía (primera etapa de ingreso de aminoglucósidos), como también aumento en la salida de los antibióticos (bombas de eflujo).

Es importante destacar, que si bien, pueden existen arsenales genéticos que determinan mecanismos moleculares de resistencia en las bacterias, es necesario además, que ésta cuente con la maquinaria metabólica necesaria para expresar estos genes. Ese gen o esos genes deben ser expresados en cantidad y calidad suficiente, y muchas veces deben interactuar distintos mecanismos de resistencia para alcanzar la sobrevivencia bacteriana. Como ejemplo se puede destacar la expresión en *E. coli* de su betalactamasa de clase C (tipo Amp-C). El gen que codifica para esta enzima capaz de romper distintos antibióticos betalactámicos, se encuentra naturalmente codificado en el cromosoma de dicha bacteria, sin embargo la expresión de esta enzima es mínima debido a que este microorganismo carece del promotor natural (Amp-R). De este modo, si bien *E. coli* posee un gen capaz de producir un efectivo mecanismo de resistencia, su escasa expresión (asociada a la acción residual de algún promotor que se encuentre corriente arriba en el cromosoma bacteriano) hace que el microorganismo pueda comportarse como sensible a ampicilina (Vignoli y Seija, 2006).

Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos y genes que codifican su resistencia

Los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos incluyen: a) La inactivación enzimática del antibiótico por N-acetilación, adenilación y fosforilación, b) La disminución de la concentración intracelular, por cambios en la permeabilidad de la membrana externa, disminución del transporte interno de membrana, y bombas de eflujo c) Alteración de la subunidad 30s ribosomal por mutación y, d) Metilación de la subunidad 16s del RNAr (Vignoli y Seija, 2006).

De estos, el mecanismo más importante es la modificación enzimática, resultando en una disminución de la actividad del fármaco debido a una disminución de la afinidad por su sitio blanco, el ribosoma, específicamente la subunidad 16s del RNAr. Estas enzimas, generalmente están

codificadas en plásmidos y transposones. La transferencia de los genes que codifican estas enzimas a través de la conjugación es un fenómeno común (Shakil *et al.*, 2008).

Dentro de los genes más prevalentes que codifican resistencia para estreptomicina se encuentran: *strA*, *strB*, *aadA1*, *aadA2*, *aadE*. Los genes *aadA* y *aadE* son responsables de la inactivación enzimática por adenilación, mientras que los genes *str* actúan inactivando el aminoglucósidos por fosforilación (Sunde y Norström, 2006 y Gow *et al.*, 2008).

Mecanismos de resistencia a macrólidos y genes que codifican su resistencia

En cuanto a los macrólidos, los mecanismos de resistencia que los afectan implican básicamente los grandes mecanismos ya mencionados, siendo importantes la metilación del RNAr y las bombas de eflujo (Vignoli y Seija, 2006).

La resistencia a eritromicina en *Enterococcus* spp. incluye metilasas que actúan sobre el sitio blanco, bombas de eflujo e inactivación enzimática (Hummel *et al.*, 2007 y Toomey *et al.*, 2010). Las metilasas que actúan sobre la subunidad 23s del RNAr son codificadas por genes *erm*, los cuales confieren resistencia cruzada con macrólidos, lincosamidas y estreptogaminas. El gen *ermB* es el más ampliamente distribuido en el género *enterococcus* y generalmente se encuentra asociado a plásmidos conjugativos o a transposones, junto a otros determinantes genéticos de resistencia. Existen además el gen *ermA* y *ermC* que al igual que *ermB* actúan metilando la subunidad 23s del RNAr pero son menos frecuentes (Hummel *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2009; Toomey *et al.*, 2010). Otro gen de importancia en la resistencia a eritromicina es el gen *msrA/B* y *mefA* que codifican bombas de eflujo. Estos genes se encuentran principalmente en organismos Gram positivos, aunque *mefA* ha sido identificado también en Gram negativos. Se describe además que en *enterococcus* existe el gen *msrC* que codifica una bomba de flujo específica para este género bacteriano (Hummel *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2009; Toomey *et al.*, 2010). Se describen además en enterobacterias, la inactivación enzimática de macrólidos. En este mecanismo participan esterases codificadas por los genes *ereA* y *ereB*, y fosfotransferasas codificadas por los genes *mphA*, *mphB* y *mphD*. Todos estos genes confieren resistencia cruzada entre eritromicina y azitromicina (Nguyen *et al.*, 2009).

Técnicas utilizadas en la identificación de bacterias resistentes y determinantes genéticos de resistencia.

Para llevar a cabo un buen programa de monitoreo y vigilancia de la resistencia bacteriana es necesario llegar a un acuerdo de cuáles serán las cepas bacterianas a estudiar, las especies animales de origen en estudio, los antimicrobianos implicados y además, es necesario estandarizar las técnicas empleadas en el estudio, así como las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos que se aplican para establecer si una cepa bacteriana es o no resistente (Moreno *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2003).

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, tienen como objetivo caracterizar a una cepa aislada como sensible o resistente a uno o más agentes antimicrobianos, basados en un mecanismo o fenotipo de resistencia. Algunas de estas pruebas tienen suficiente sensibilidad y especificidad, y sus resultados pueden ser informados sin ninguna prueba adicional. Otras, requieren pruebas adicionales para confirmar los resultados presuntivos del screening. En la actualidad existen diversas pruebas para evaluar la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos. Las dos pruebas de referencia que son utilizadas, tanto en medicina humana como veterinaria, son la prueba de difusión en placa (Kirby-Bauer) y la prueba de dilución en placa o caldo.

La prueba de dilución en placa, fue creada en 1992 por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) quien define la Concentración Mínima Inhibitoria de un fármaco (CIM). La CIM de un antimicrobiano es la mínima concentración que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Esta CIM se determina incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas de un agente antimicrobiano. Los resultados son interpretados como susceptible, intermedio o resistente. Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medios de cultivo caldo o agar, pero la microdilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos.

La prueba de difusión y dilución en placa, se basan en las descripciones realizadas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS) y son utilizadas por los laboratorios microbiológicos de diagnóstico y de referencia en todo el mundo (Quin *et al.*, 2004; CLSI, 2010).

Las dos pruebas mencionadas son los métodos de referencia, sin embargo, son muy laboriosas, requieren de personal entrenado y se encuentran reservadas principalmente a laboratorios especializados. Debido a esto, nuevas alternativas menos engorrosas de realizar y con buena reproducibilidad, han surgido en el mercado para laboratorios que no cuentan con estos

métodos. Un ejemplo de estos nuevos métodos, es el E-Test, el cual es un método de difusión en agar, que consta de una tira con una gradiente de concentración del antibiótico y permite cuantificar, mediante la lectura de un elipse de inhibición, las concentraciones mínimas inhibitorias (CIMs). Este método ha demostrado una buena concordancia con el método de referencia en diversos estudios. Se trata de una prueba más sencilla que las clásicas y que tiene la ventaja de ser cuantitativa, pero es de un mayor costo (Tapia *et al.*, 2003).

Es importante destacar, que algunas de las fallas que no permiten la rápida detección y notificación de las bacterias resistentes, incluyen la falta de compromiso de los Laboratorios Clínicos por compartir y publicar sus resultados de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, error al interpretar los resultados de estas pruebas, y falta de un sistema colectivo que reúna esta información, la analice y la informe a tiempo a todos los centros de Salud Mundial (Counts *et al.*, 2007). Tenover *et al.* (2001) también documentaron errores en la detección de bacterias resistentes a antimicrobianos y fallas en las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos en diversos laboratorios internacionales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar los perfiles de resistencia genotípica frente a macrólidos y aminoglucósidos en cepas de *Enterococcus* spp. y *E. coli* aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura y fenotípicamente resistentes a estos fármacos.

Objetivos específicos

1. Identificar los genes de resistencia más frecuentes a eritromicina en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura y fenotípicamente resistentes a este fármaco.
2. Identificar los genes de resistencia más frecuentes a estreptomicina en cepas de *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura y fenotípicamente resistentes a este fármaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Origen de las cepas bacterianas en estudio.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio fueron obtenidas el año 2009 en el marco de una memoria de título, la cual lleva por nombre: “Caracterización genotípica de la resistencia antimicrobiana en cepas aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura sometidas a tratamiento con antimicrobianos” (Araya, en ejecución). Las cepas, una vez aisladas e identificadas se almacenaron en solución TSB (Tryptic Soy Broth) y glicerol al 15% a una temperatura de -20°C en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

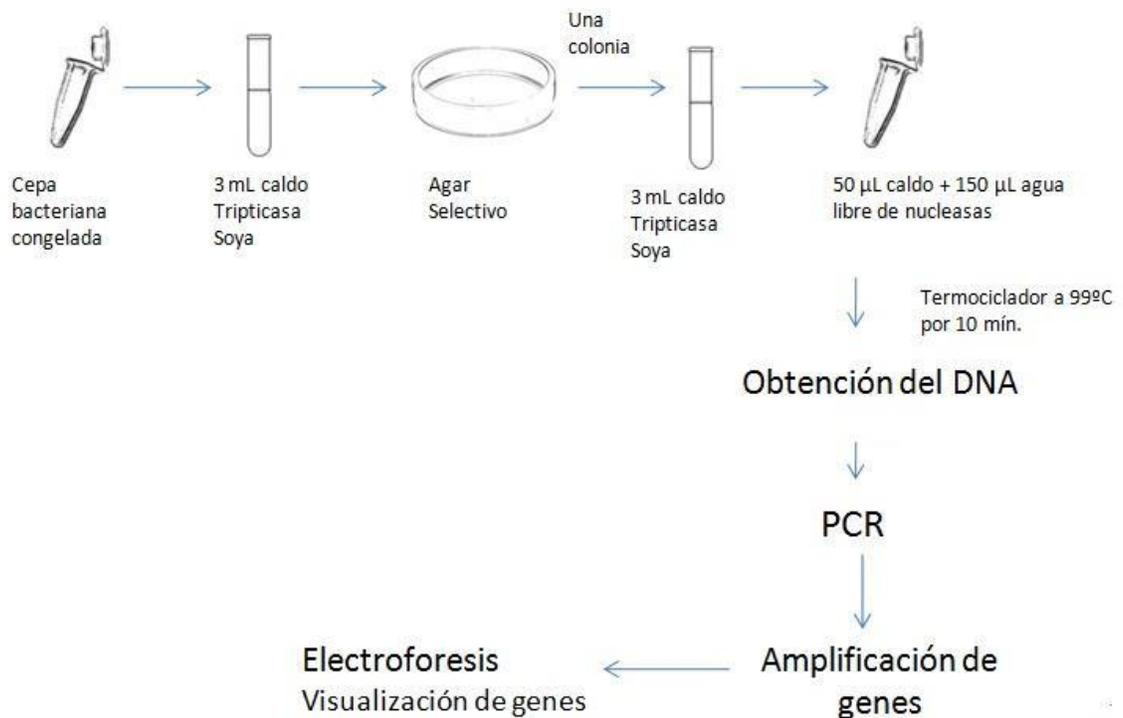
En este estudio, se trabajó con un total de 63 cepas, de las cuales 26 fueron cepas de *E. coli* fenotípicamente resistentes a estreptomycin y 37 fueron cepas de *Enterococcus* spp. fenotípicamente resistentes a eritromicina.

2) Viabilidad de las cepas bacterianas.

Para verificar la viabilidad de las cepas bacterianas se realizó una resiembra de estas. Para esto, se extrajo con asas bacteriológicas estériles, un inóculo y se cultivó en 3 ml de caldo Tripticasa Soya a 37±1°C por 18 a 24 horas. Luego, se sembró con la técnica del reloj, una muestra de este caldo en agar selectivo (agar McConkey para *E. coli* y agar BBL Enterococcosel para *Enterococcus* spp.) y se incubó a 37±1°C por 18 a 24 horas. Posteriormente, se extrajo una colonia representativa de la placa con asa estéril y se cultivó nuevamente en 3 mL de caldo Tripticasa Soya a 37±1°C por 18 a 24 horas para la extracción del DNA bacteriano.

A continuación, en la figura 1 se esquematiza la metodología necesaria para obtener el DNA de una cepa bacteriana y luego los pasos a seguir, hasta la visualización de los genes de resistencia.

Figura 1. Esquematación de la obtención del DNA bacteriano, amplificación de un gen y su visualización.



3) Obtención del DNA bacteriano.

Posterior a la incubación del caldo con la colonia más representativa, se extrajeron 50 µl de este y se agregaron 150 µl de agua libre de nucleasas en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. La mezcla se introdujo al termociclador Labnet^R durante 10 minutos a 99°C, para realizar la lisis bacteriana y obtener el DNA, el cual se utilizó para la amplificación.

4) Identificación de los genes de resistencia.

Para determinar la presencia de los genes de resistencia más frecuentes, se llevó a cabo la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR).

Los genes involucrados en la resistencia a estreptomicina y eritromicina más frecuentes y que fueron identificados en el presente estudio fueron:

- Resistencia a estreptomicina: *aadA1*, *aadA2*, *aadE*, *strA*, *strB*.
- Resistencia a eritromicina: *ermB*, *ermA*, *mefA*, *msrA/B*, *msrC*.

4.1) Amplificación del DNA por PCR

La amplificación del DNA se realizó mezclando en tubos Eppendorf de 0.2 mL, 3 µl de cada lisado bacteriano como templado, 10 µl de PCR Master Mix^R (Taq polimerasa, buffer, MgCl₂, dNTPs), 1 µl de cada partidor (Forward y Reverse) y 10 µl de agua libre de nucleasas, de manera de obtener 25 µl de mezcla total.

Las muestras fueron procesadas en un termociclador Labnet^R programado de la siguiente manera: temperatura inicial de 95°C por tres minutos, 30 ciclos de un minuto a 94°C, 30 segundos a la temperatura de hibridación específica para cada partidor, 30 segundos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Al terminar todos los ciclos, las muestras se mantienen a 4°C.

Estos procesos se realizaron bajo campana de bioseguridad dispuesta en el Laboratorio de Farmacología, y se trabajó siempre con material estéril, libre de DNAsas y RNAsas que pudieran haber interferido con los resultados del estudio. Además fue de uso obligatorio el delantal blanco debidamente cerrado, guantes y mangas desechables cuando fue necesario.

Los genes identificados, su tamaño de amplificado, su temperatura de hibridación y la secuencia de sus partidores se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Genes identificados, tamaño del amplificado, temperatura de hibridación y secuencia de los partidores.

Antimicrobiano	Gen	Tamaño Producto (pb)	Temperatura Hibridación (°C)	Secuencia de Partidores (5' a 3')
Estreptomicina	<i>aadA1</i>	198	48	GAGAACATAGCGTTGCCTTGG TCGGCGCGATTTTGCCGGTTAC
	<i>aadA2</i>	282	60	GCAGCGCAATGACATTCTTG ATCCTTCGGCGCGATTTTG
	<i>aadE</i>	597	50	ACT GGC TTA ATC AAT TTG GG GCC TTT CCG CCA CCT CAC CG
	<i>strA</i>	548	53	CTTGGTGATAACGGCAATTC CCAATCGCAGATAGAAGGC
	<i>strB</i>	509	53	ATCGTCAAGGGATTGAAACC GGATCGTAGAACATATTGGC
Eritromicina	<i>ermB</i>	616	50	CGAGTGAAAAAGTACTCAACC GGCGTGTTTCATTGCTTGATG
	<i>ermA</i>	206	50	GCATGACATAAACCTTCA AGGTTATAATGAAACAGA
	<i>mefA</i>	348	50	AGTATCATTAACTACTAGTGC TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG
	<i>msrA/B</i>	350	55	GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC ATCATGTGATGTAAACAAAAT
	<i>msrC</i>	1040	55	TATAACAAACCTGCAAGTTC CTTCAATTAGTCGATCCATA

4.2) Visualización de los genes de resistencia

La visualización de los genes de resistencia amplificados por PCR, se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa.

La concentración del gel es dependiente del tamaño de cada gen, variando entre 0.8% y 3%. Para fines prácticos, se utilizó una concentración del 2%. Para preparar el gel se realizó la siguiente mezcla: 100 ml de Solución buffer TAE 1X (Tris-base, Acido acético y EDTA), 2 gr de agarosa y 10 µl de GelRed^R (tinción de ácidos nucleicos de acción equivalente al bromuro de etidio). Luego, se rellenaron los pocillos del gel de agarosa, y para esto se mezclaron 10 µl de cada amplificado con 2 µl de buffer de carga (glicerol al 30% en agua, xylecianol FF 0,25%, azul de bromofenol 0,25%).

En otro pocillo del gel, y como control positivo se colocaron 7 µl de un indicador de peso molecular en pares de bases (GeneRulerTM DNA Ladder) específico para cada tamaño del gen (se utilizó DNA Ladder de 50 bp, 100 bp y 1 Kb). Se utilizaron los siguientes marcadores para cada gen:

Genes de Resistencia a estreptomycin

- Gen *aadA1*: Tamaño del gen de 198 pb, y se utilizó Ladder de 50 pb y Ladder de 100 pb.
- Gen *aadA2*: Tamaño del gen de 282 pb, y se utilizó Ladder de 50 pb y Ladder de 100 pb.
- Gen *aadE*: Tamaño del gen de 597 pb, y se utilizó Ladder de 100 pb.
- Gen *strA*: Tamaño del gen de 548 pb y se utilizó Ladder de 100 pb.
- Gen *strB*: Tamaño del gen de 509 pb y se utilizó Ladder de 100 pb.

Genes de Resistencia a eritromicina

- Gen *ermB*: Tamaño del gen de 616 pb y se utilizó Ladder de 50 pb y Ladder de 100 pb.
- Gen *ermA*: Tamaño del gen de 206 pb y se utilizó Ladder de 50 pb y Ladder de 100 pb.
- Gen *mefA*: Tamaño del gen de 348 pb y se utilizó Ladder de 50 pb y Ladder de 100 pb.
- Gen *msrA/B*: Tamaño del gen de 350 pb y se utilizó Ladder de 50 pb y Ladder de 100 pb.
- Gen *msrC*: Tamaño del gen de 1040 pb y se utilizó Ladder de 1 Kb.

Luego de transcurrido el tiempo de la electroforesis (de 2 horas y media a 3 horas), a modo constante con 80 Volt, se visualizaron los genes en un transiluminador de luz ultravioleta, con las medidas de bioseguridad requeridas (cámara de acrílico, y lentes de protección contra luz ultravioleta). Se tomaron fotografías de cada resultado.

RESULTADOS

Primer objetivo:

“Identificar los genes de resistencia más frecuentes a eritromicina en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura y fenotípicamente resistentes a este fármaco”

1. Detección de Determinantes genéticos de resistencia a eritromicina en cepas de *Enterococcus* spp.

Se investigó en 37 cepas de *Enterococcus* spp. fenotípicamente resistentes a eritromicina (*in vitro*), la presencia de los genes involucrados con mayor frecuencia en la resistencia a este fármaco: *ermB*, *ermA*, *mefA*, *msrA/B* y *msrC*.

1.1 Detección del gen *ermB*.

De las 37 cepas de *Enterococcus* spp. 18 (48.6%) fueron positivas para este gen, y 19 (51.4%) fueron negativas (Figura 1). Estos resultados demuestran una prevalencia importante del gen *ermB* en las cepas estudiadas. Los resultados fueron visualizados como muestran las fotografías (Figura 2).

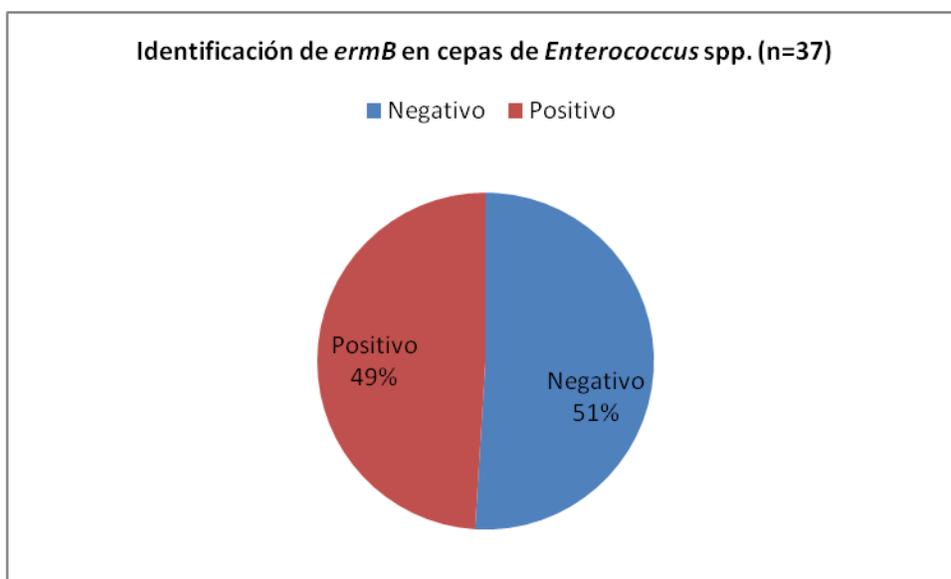
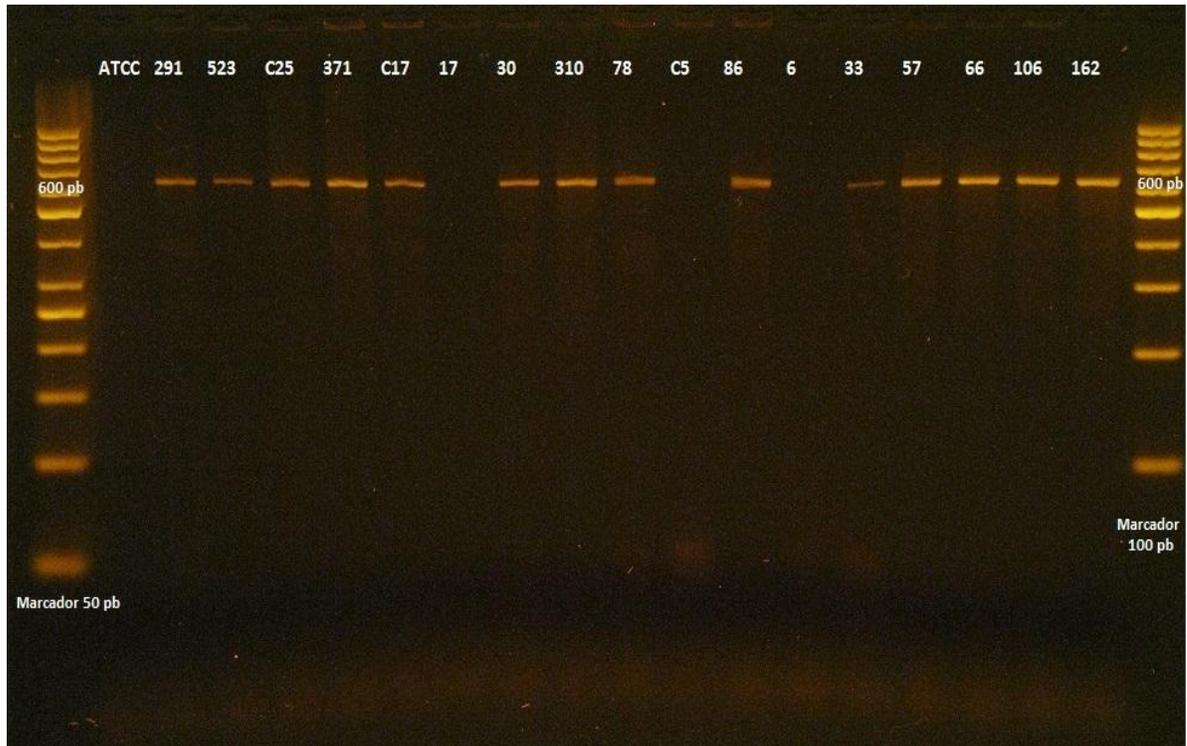


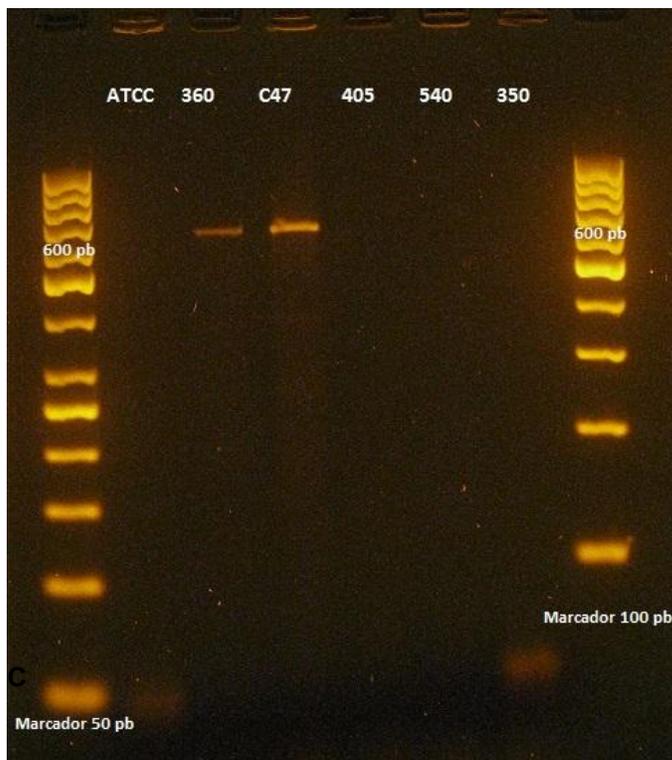
Figura 1. Prevalencia del gen *ermB* en cepas de *Enterococcus* spp. fenotípicamente resistentes a eritromicina.

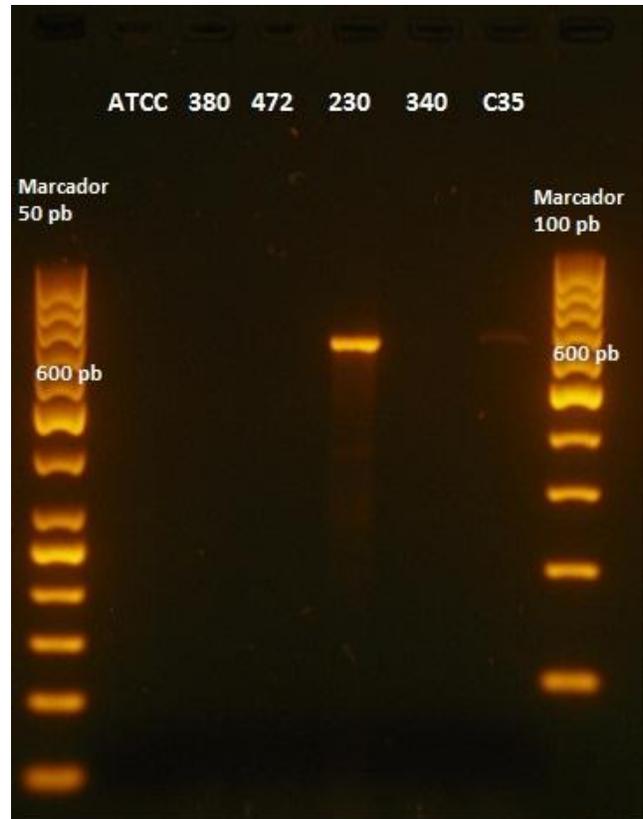
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa para visualización del gen de resistencia a eritromicina *ermB*, en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura. Los fragmentos amplificados coinciden con el tamaño del gen esperado de 616 pb (Panel A,B,C y D).

A

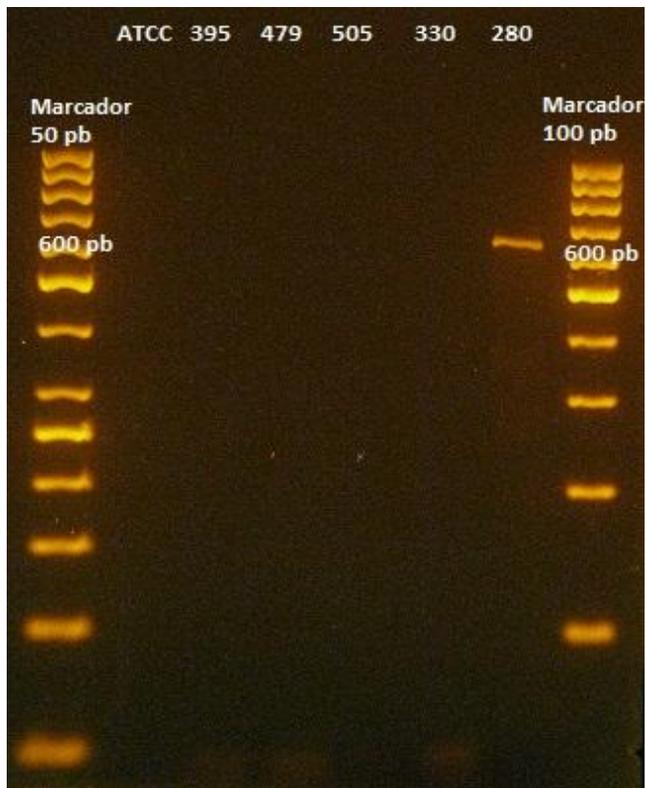


B





D



1.2 Detección de los genes *ermA*, *mefA*, *msrA/B* y *msrC*.

Todas las cepas de *Enterococcus* spp. resistentes fenotípicamente a eritromicina fueron negativas a *ermA*, *mefA*, *msrA* y *msrC*. Esto demuestra la nula implicancia de estos genes en la resistencia a eritromicina en las cepas de enterococos de este estudio.

En la tabla 1, se presentan los resultados de la identificación de los genes de resistencia a eritromicina.

Tabla 1. Resultados de la identificación de genes de resistencia a eritromicina en 37 cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura. Las cepas están identificadas con sus respectivos números, y el resultado se muestra como positivo para la presencia del gen (+), o negativo para la presencia del gen (-), según corresponda.

<i>Enterococcus</i> spp. resistentes	<i>ermB</i>	<i>ermA</i>	<i>mefA</i>	<i>msrA/B</i>	<i>msrC</i>
6	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-
33	+	-	-	-	-
57	+	-	-	-	-
66	+	-	-	-	-
78	+	-	-	-	-
86	+	-	-	-	-
106	+	-	-	-	-
380	-	-	-	-	-
395	-	-	-	-	-
405	-	-	-	-	-
421	-	-	-	-	-
435	-	-	-	-	-
450	-	-	-	-	-
462	-	-	-	-	-
472	-	-	-	-	-
479	-	-	-	-	-
488	-	-	-	-	-
505	-	-	-	-	-
523	+	-	-	-	-
540	-	-	-	-	-
162	+	-	-	-	-
230	+	-	-	-	-
280	+	-	-	-	-
291	+	-	-	-	-
310	+	-	-	-	-
330	-	-	-	-	-
340	-	-	-	-	-
350	-	-	-	-	-
360	+	-	-	-	-
371	+	-	-	-	-
c5	-	-	-	-	-
c17	+	-	-	-	-
c25	+	-	-	-	-
c35	-	-	-	-	-
c47	+	-	-	-	-

Segundo Objetivo:

“Identificar los genes de resistencia más frecuentes a estreptomicina en cepas de *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura y fenotípicamente resistentes a este fármaco”.

2. Detección de Determinantes genéticos de resistencia a estreptomicina en cepas de *E. coli*.

Se investigó en 26 cepas de *E. coli* fenotípicamente resistentes a estreptomicina (*in vitro*), la presencia de los genes involucrados con mayor frecuencia en la resistencia a este fármaco: *strA*, *strB*, *aadA1*, *aadA2* y *aadE*.

2.1) Detección del gen *strA*.

De las 26 cepas de *E. coli*, resistentes fenotípicamente a estreptomicina, 15 (57.7%) fueron positivas para el gen, y 11 (42.3%) fueron negativas (Figura 3). Estos resultados demuestran una prevalencia importante del gen *strA* en las cepas estudiadas. Los resultados fueron visualizados como se muestra en la Figura 4.

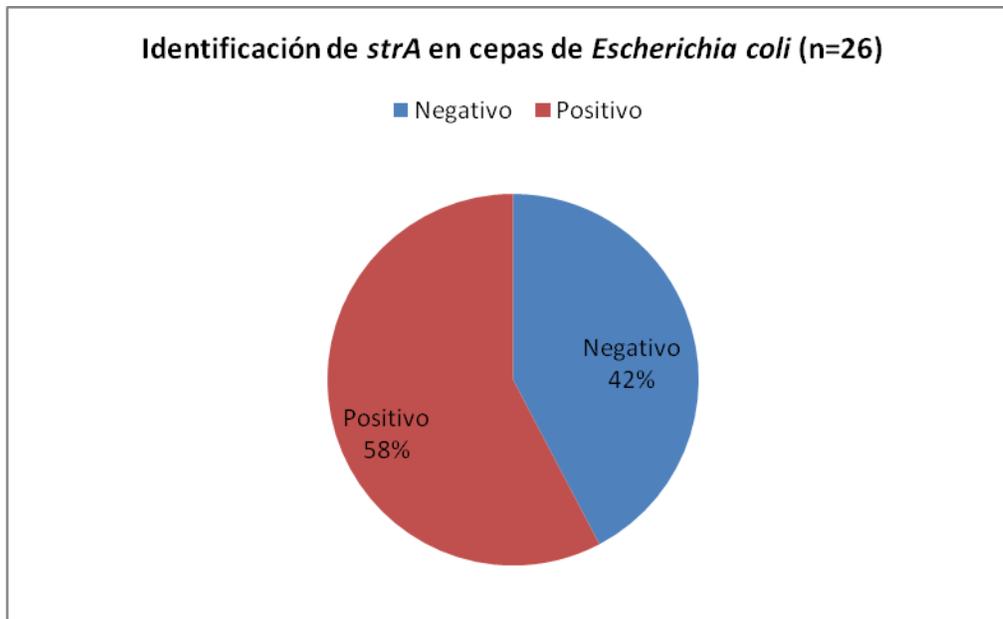
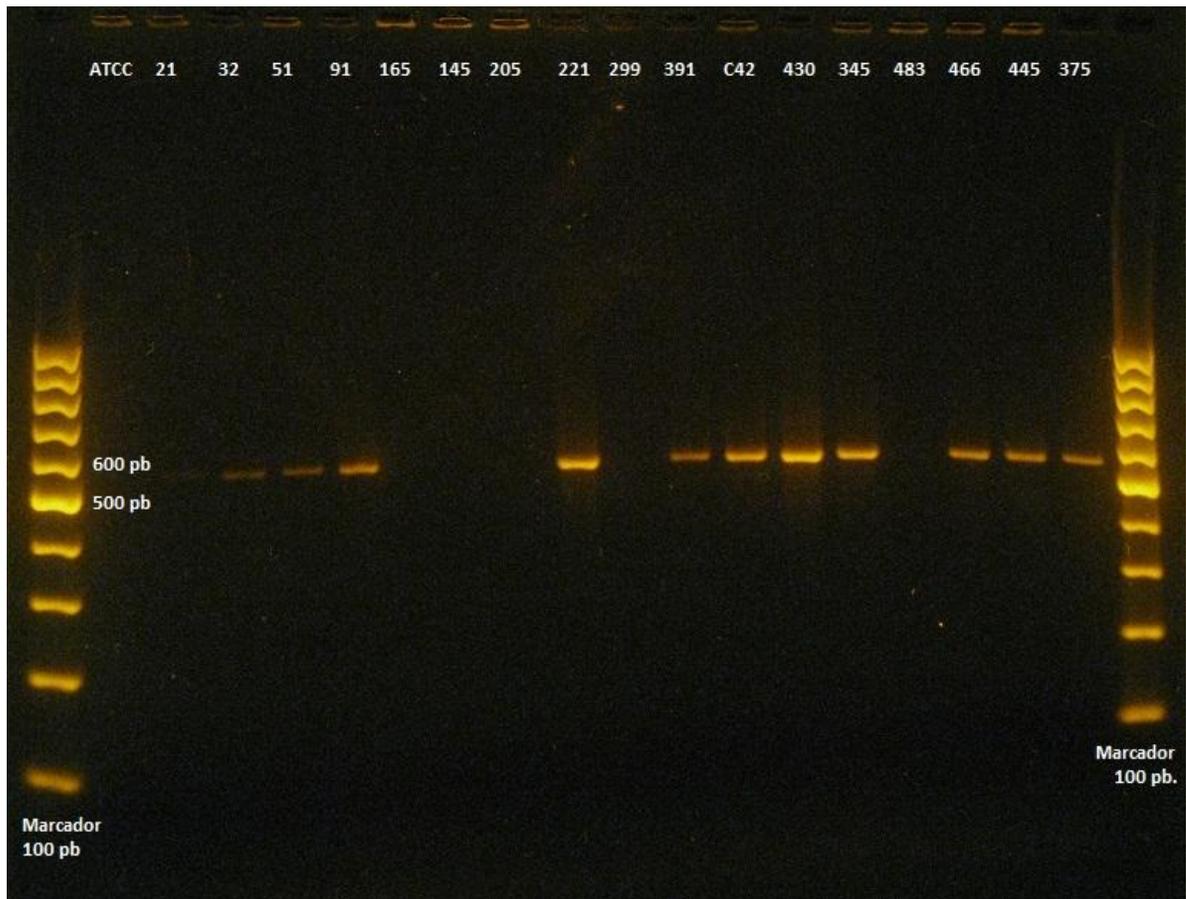


Figura 3. Prevalencia del gen *strA* en 26 cepas de *E. coli* resistentes fenotípicamente a estreptomicina.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa para visualización del gen de resistencia a estreptomicina *strA* en cepas de *E. coli*. aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura. Los fragmentos amplificados coinciden con el tamaño del gen esperado de 548 pb (Panel A, B y C).

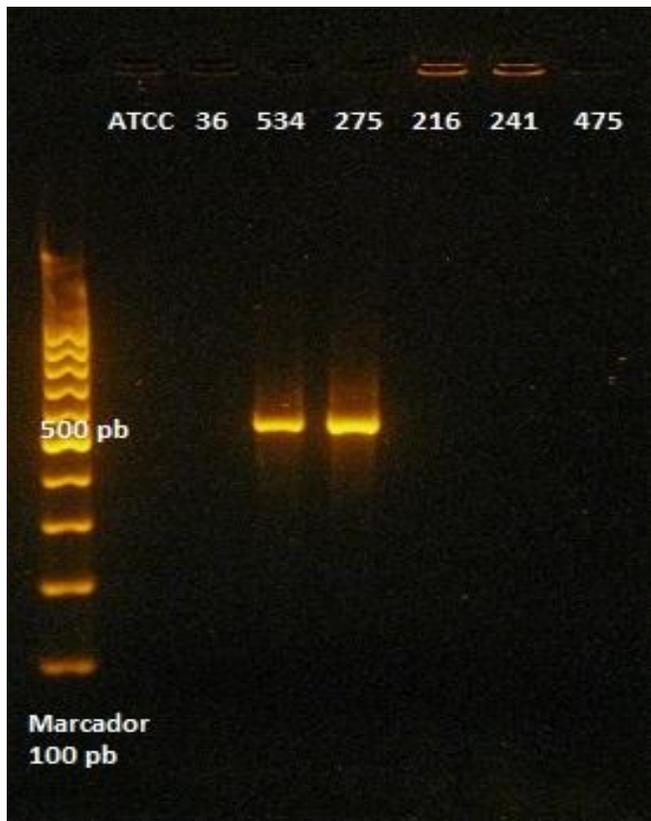
A



B



C



2.2 Detección del gen *strB*.

De las 26 cepas de *E. coli*, resistentes fenotípicamente a estreptomina, 15 (57.7%) fueron positivas para el gen, y 11 (42.3%) fueron negativas (Figura 5). Estos resultados demuestran una prevalencia importante del gen *strB* en las cepas estudiadas. Además, las cepas positivas para el gen *strB* coinciden exactamente con las cepas positivas del gen *strA*, es decir, las cepas que contienen el gen *strB* contienen a la vez el gen *strA*. Los resultados fueron visualizados como muestra la Figura 6.

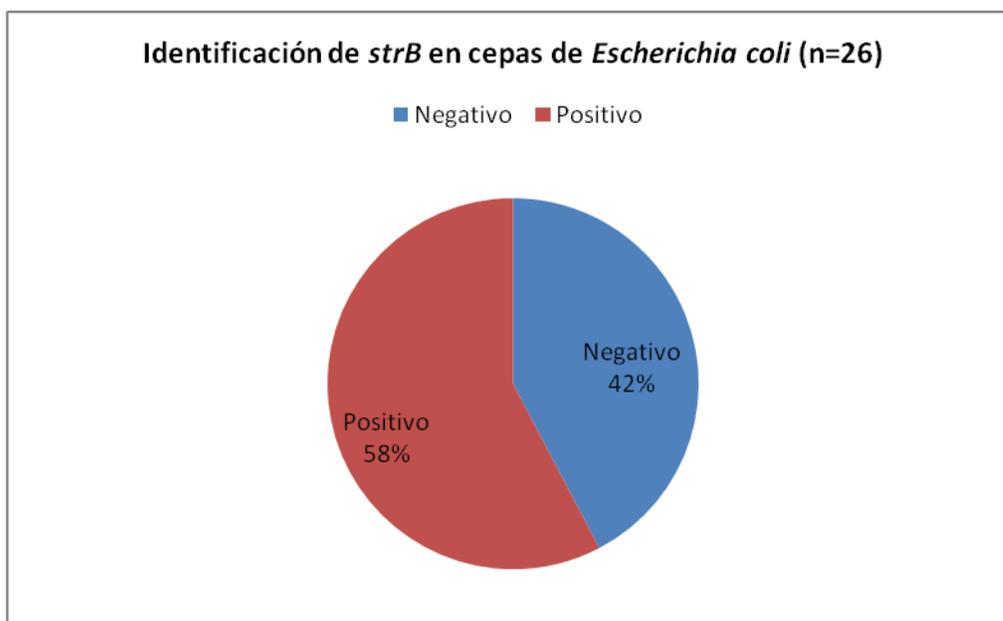
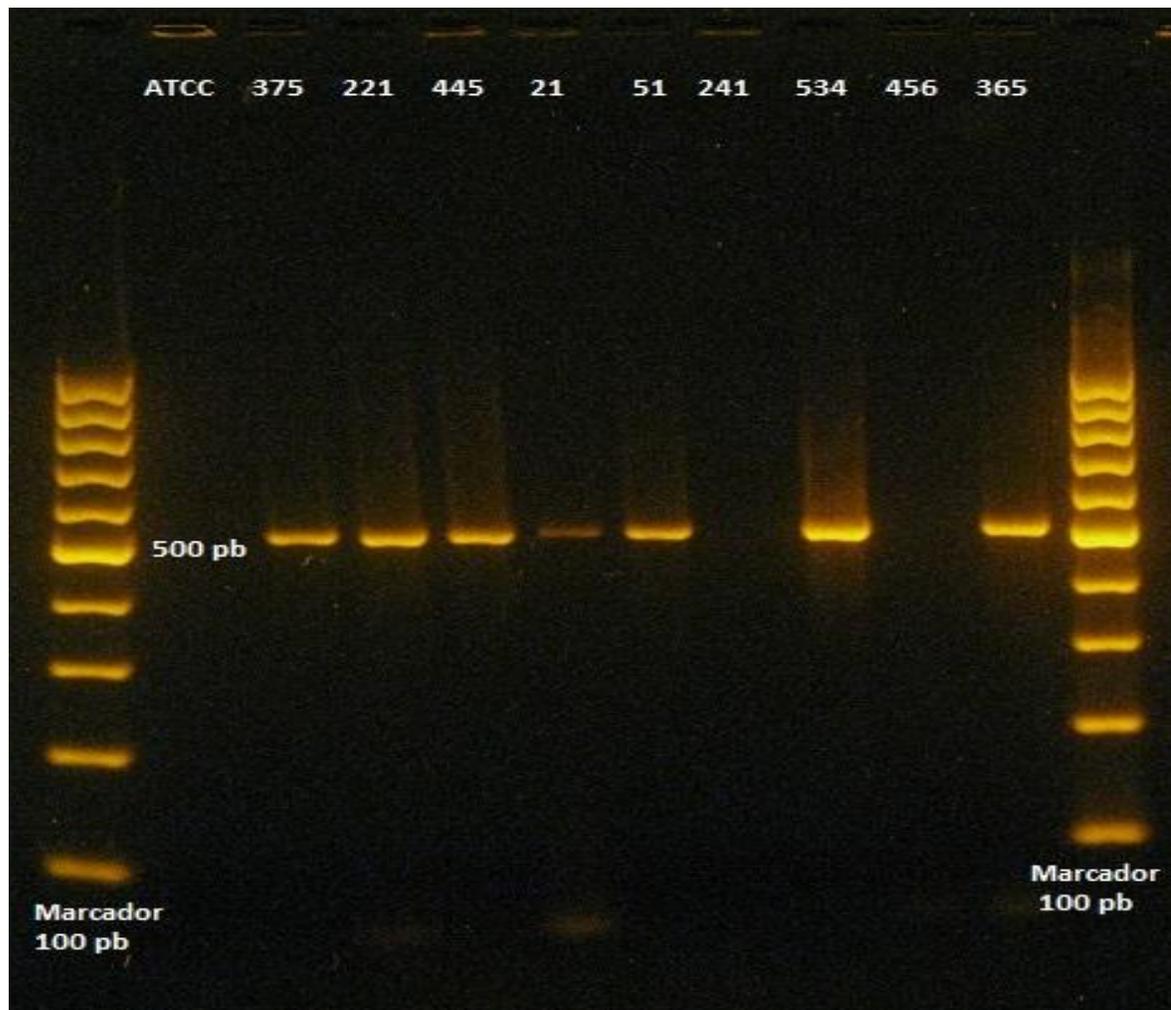


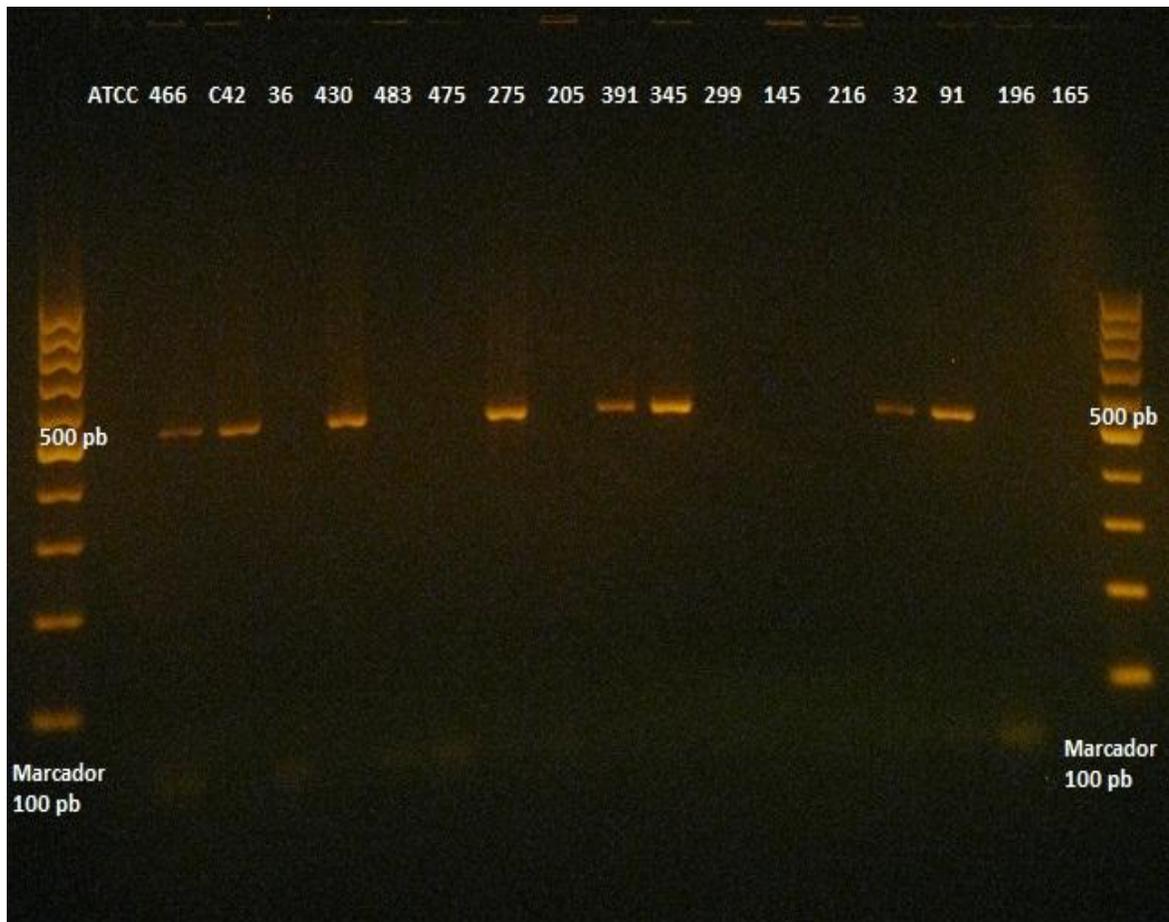
Figura 5. Prevalencia del gen *strB* en 26 cepas de *E. coli* resistentes fenotípicamente a estreptomina.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa para visualización del gen de resistencia a estreptomicina *strB* en cepas de *E. coli*. aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura. Los fragmentos amplificados coinciden con el tamaño del gen esperado de 509 pb (Panel A y B).

A



B



2.3 Detección de los genes *aadA1*, *aadA2* y *aadE*.

Todas las cepas de *E. coli* resistentes fenotípicamente a estreptomicina fueron negativas a *aadA1*, *aadA2* y *aadE*. Esto demuestra la nula implicancia de estos genes en la resistencia a estreptomicina en las cepas de *E. coli* de este estudio.

En la tabla 2, se presentan los resultados de la identificación de los genes de resistencia a estreptomicina.

Tabla 2. Resultados de la identificación de genes de resistencia a estreptomicina en 26 cepas de *E. coli* aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura. Las cepas están identificadas con sus respectivos números, y el resultado se muestra como positivo para la presencia del gen (+), o negativo para la presencia del gen (-), según corresponda.

<i>E. coli</i> resistentes	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadE</i>	<i>strA</i>	<i>strB</i>
21	-	-	-	+	+
32	-	-	-	+	+
36	-	-	-	-	-
51	-	-	-	+	+
91	-	-	-	+	+
375	-	-	-	+	+
391	-	-	-	+	+
430	-	-	-	+	+
445	-	-	-	+	+
456	-	-	-	-	-
466	-	-	-	+	+
475	-	-	-	-	-
483	-	-	-	-	-
534	-	-	-	+	+
145	-	-	-	-	-
165	-	-	-	-	-
196	-	-	-	-	-
205	-	-	-	-	-
216	-	-	-	-	-
221	-	-	-	+	+
241	-	-	-	-	-
275	-	-	-	+	+
299	-	-	-	-	-
345	-	-	-	+	+
365	-	-	-	+	+
c42	-	-	-	+	+

DISCUSIÓN

La aparición de patógenos resistentes a los antimicrobianos que impactan la salud de los animales ha sido una preocupación creciente en la medicina veterinaria (White y McDermott, 2001). Sin embargo, el uso de los antimicrobianos en animales de producción sigue siendo la principal herramienta terapéutica para prevenir y tratar enfermedades de origen bacteriano, a pesar del riesgo que significa que residuos de estos fármacos permanezcan en carne, leche o huevos de estos animales tratados. Además, el uso de estas drogas aumenta los riesgos de selección y diseminación de cepas bacterias resistentes (Lapierre, 2007).

Algunos autores señalan que los factores más importantes de selección de bacterias resistentes en animales de producción es el uso inadecuado de fármacos y el hacinamiento (Fedorka-Cray *et al.*, 2002). En nuestro país, algunos de estos factores podrían encontrarse en determinadas circunstancias de producción intensivas como la avícola, donde las existencias para el 2008 superaron las 44 millones de aves (ODEPA, 2008). En la avicultura moderna, las aves son criadas bajo condiciones extremadamente intensivas, utilizando el mínimo espacio vital durante 35-40 días para alcanzar el máximo crecimiento y producción posible. En estas explotaciones, casi cualquier problema infectocontagioso se disemina rápidamente, reduciendo el margen de ganancia y causando enormes pérdidas económicas. Evidentemente, la mortalidad, la morbilidad, las ganancias de peso e índices de conversión son las variables económicas y de salud más sensibles de estas explotaciones. De aquí que el uso de antimicrobianos en dosis subterapéuticas en el agua de bebida o el alimento, como prevención de enfermedades y promotor del crecimiento sea una práctica común en este tipo de producción animal. Por lo tanto, la presión de selección de resistencia provocada por los antibióticos en las bacterias comensales de las aves de corral es alta y, por consiguiente, su flora fecal contiene una proporción relativamente alta de bacterias resistentes (Sumano y Gutiérrez, 2000 y Miles *et al.*, 2006), considerando además que todos los antimicrobianos usados en el rebaño pueden afectar la resistencia en coliformes (Lehtolainen *et al.*, 2003).

Contribuyendo a la gravedad del problema, los antimicrobianos en los sistemas de producción, en general son usados en forma empírica, sin contar con pruebas de sensibilidad o información acerca de la presencia de resistencia bacteriana dentro de los planteles, lo que deriva en fallas terapéuticas, aumento en la morbilidad y mortalidad de los animales, aumento de los costos de producción y aumento de los riesgos para la salud animal y la salud pública (Anderson *et al.*, 2003). Esto se ve empeorado, ya que como se mencionó anteriormente en la revisión bibliográfica, Chile no cuenta con un programa oficial de Vigilancia de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria, desconociéndose por lo tanto los niveles de resistencia reales existentes en nuestros animales, y desconociéndose además el impacto que produce el uso de diversos

antimicrobianos en las especies productivas. Sería sumamente importante crear un programa de vigilancia de la resistencia bacteriana a antimicrobianos, ya que se ha demostrado que en países en los cuales se han desarrollado por más de una década programas de este tipo, como es el caso de Dinamarca (DANMAP), Suecia (SVARM), Estados Unidos (NARMS) y Japón (JVARM), los porcentajes de resistencia bacteriana son más bajos en comparación con países que no han desarrollado estos programas y lo que es aun más importante, estos porcentajes disminuyen año tras año (Bywater *et al.*, 2005; Asai *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; DANMAP, 2009).

Antes de analizar los resultados de este estudio, es necesario recordar que en este trabajo, se investigaron cepas indicadoras aisladas de gallinas de postura, específicamente; 37 cepas de *Enterococcus* spp. resistentes fenotípicamente (*in vitro*) a eritromicina, en las que se identificó la presencia de los genes de resistencia *ermB*, *ermA*, *mefA*, *msrA/B* y *msrC*, y 26 cepas de *E. coli*. resistentes fenotípicamente (*in vitro*) a estreptomycin, en las que se identificó los genes de resistencia *strA*, *strB*, *aadA1*, *aadA2* y *aadE*. Es importante mencionar, que los dos antimicrobianos en estudio, han sido muy utilizados en medicina veterinaria desde 1950, principalmente por su bajo costo, pero produciendo altos niveles de resistencia en la producción nacional (Lapierre, 2007).

Resistencia genotípica de *Enterococcus* spp. frente a eritromicina.

Existen altos niveles de resistencia a eritromicina a nivel mundial, esto se explica porque estos fármacos son de primera elección en las distintas producciones pecuarias, especialmente en la producción porcina (Aaerstrup *et al.*, 2002). En aves está indicada para casos de enfermedades producidas por *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. especialmente, como la enfermedad crónica respiratoria, sinusitis y sinovitis.

En general, los genes de resistencia para eritromicina en *Enterococcus* spp. incluyen metilasas que tienen como sitio blanco el ribosoma bacteriano y son codificadas por genes *erm*, siendo el gen *ermB* el más frecuente (Khan *et al.*, 2002; Hummel *et al.*, 2007; Lapierre, 2007; Toomey *et al.*, 2010). Portillo y compañía (2000) indican que los genes *erm* pueden estar presentes sólo en cepas de *Enterococcus* spp. altamente resistentes a macrólidos. Existen además genes de resistencia, que codifican mecanismos de bombas de eflujo como los genes *mefA*, *msrA/B* y *msrC* (Hummel *et al.*, 2007).

En un estudio realizado en Italia por Hummel *et al.* (2007), con cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de quesos, se detectó el gen *ermB* en 18 cepas de un total de 21 cepas resistentes a eritromicina (86%). En este mismo estudio, el gen *ermA* no fue detectado en ninguna de las cepas resistentes a eritromicina al igual que en este estudio. Sin embargo, el gen *msrA/B* fue detectado en

un 18,2%. Estos datos concuerdan además con los estudios de Khan *et al.* (2002), quienes encontraron que *ermB* fue el gen de resistencia a eritromicina que domina entre los enterococos con una incidencia del 88%. Hummel *et al.* (2007) observaron que el hecho de que sólo el 86% de sus aislamientos resistentes fueran positivos a *ermB*, mientras que *ermA* y *ermC* no se detectaran, indicaba que la resistencia a eritromicina en enterococcus ocurría por otros mecanismos además de la metilación del sitio blanco. Al igual que Portillo *et al.* (2000), estos investigadores sugirieron la presencia de bombas de eflujo en el mecanismo de resistencia a eritromicina en enterococcus, mediadas por los genes *msr* y *mef*. Sin embargo estos genes no fueron detectados en este estudio.

El gen *ermB*, fue el único detectado en este estudio, encontrándose en 18 de las 37 cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a eritromicina (48% de positividad). Esto concuerda con publicaciones donde se describe este gen como el factor dominante responsable de la resistencia a eritromicina en enterococcus. Este gen ha sido encontrado en diferentes cepas de *Enterococcus* spp., *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. aureus* resistentes a macrólidos y se ha asociado a CIM altos (Portillo *et al.*, 2000; Aarestrup *et al.*, 2002). Además, se sabe que este gen se encuentra integrado en diversos plásmidos conjugativos como pAM β 1, pRE25, pUW1965, o en transposones como Tn917, Tn1545, Tn5384 y Tn5385, generalmente asociado a otros determinantes genéticos de resistencia a antibióticos. Es por este motivo, que este gen se encuentra tan diseminado a nivel mundial (Werner *et al.*, 2000; Teuber *et al.*, 2003; Hummel *et al.*, 2007).

Dieciocho de las 37 cepas resistentes a eritromicina no presentaron ninguno de los genes en estudio; posiblemente, la base molecular de esta resistencia se deba a un gen poco frecuente no incluido en este trabajo como *ermC*, *ermF*, *ereA/B*, *mphA* o a mutaciones puntuales en los nucleótidos que constituyen el sitio de unión al fármaco como: A2058, A2059 del dominio V y A725 del dominio II del RNA ribosomal (Lapierre, 2007).

Resistencia genotípica de *E. coli* frente a estreptomina

La estreptomina es un antimicrobiano utilizado en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales producidas por enterobacterias, especialmente en la producción porcina (Lapierre, 2007). En aves es usado en conjunto con otros antibióticos, para tratar enfermedades causadas por *E. coli* y *Staphylococcus* spp., como colisepticemia, coriza infecciosa y septicemias.

Dentro de los determinantes genéticos de resistencia frente a estreptomina, el más común descrito en la literatura es el gen *aadA1* responsable de la resistencia por el mecanismo de inactivación enzimática por adenilación (Lapierre, 2007; Srinivasan *et al.*, 2007). Este gen se encuentra generalmente asociado a integrones móviles asociado a otros determinantes genéticos

de resistencia (Fluit y Schmitz, 2004; Kang *et al.*, 2005; Shahada *et al.*, 2006). Sin embargo, este gen no fue detectado en nuestro estudio.

Por otro lado, los genes *strA* y *strB*, responsables de inactivar aminoglucósidos por fosforilación, se detectaron juntos en 15 de las 26 cepas (58%) de *E. coli* resistentes fenotípicamente a estreptomicina, superando al porcentaje detectado por Srinivasan *et al.* (2007), quienes detectaron estos genes en un 8,5% de las cepas de *E. coli* aisladas de vacas con mastitis en el estado de New York (EE.UU). El presente estudio concuerda con Srinivasan *et al.* (2007), y Guerra *et al.* (2003), quienes detectaron estos genes siempre juntos. Srinivasan *et al.* (2007) detectaron además el gen *aadA* en un 74,4% (muy alta frecuencia) junto con *strA* y *strB* y también como único gen.

Estos resultados contrastan con Lanz *et al.* (2003) quienes concluyeron que tanto *strA* como *strB* debían estar presentes en las cepas para obtener resistencia a estreptomicina en forma funcional, ya que como se observa en nuestro estudio y en el de Srinivasan *et al.* (2007) hubo cepas resistentes fenotípicamente a estreptomicina que no presentaron los genes *str*.

Sunde y Norström (2006) detectaron una asociación negativa entre los genes *strA-strB* y *aadA1*. Ellos explican que existiría cierta incompatibilidad de plásmidos que explicaría porque encontrar genes de resistencia que codifiquen para la resistencia frente a un mismo antimicrobiano en una misma cepa es poco frecuente.

Los genes *aadA1*, *aadA2*, *aadE* no fueron detectados en ninguna de las cepas en estudio. Un total de 11 de las 26 cepas de *E. coli* resistentes fenotípicamente a estreptomicina no presentaron ninguno de los genes de resistencia en estudio. Esto podría explicarse al igual que en enterococcus, porque en estas cepas podrían estar siendo seleccionados otros genes de resistencia de menor frecuencia como *aphE*, *aphA*, *aacC2* o estar primando mutaciones puntuales que afecten la resistencia de la bacteria al fármaco (Gow *et al.*, 2008).

En resumen, las cepas resistentes en estudio contenían solo un gen de resistencia en el caso de los *Enterococcus* spp. resistentes a eritromicina (*ermB*), mientras que las cepas de *E. coli* contenían dos genes de resistencia a estreptomicina juntos (*strA* y *strB*). Sólo un 49% de las cepas de *Enterococcus* spp. fueron portadoras de un gen de resistencia, mientras que en el caso de *E. coli* este porcentaje fue mayor alcanzando el 58%. Aún así, la prevalencia de genes de resistencia en este estudio no fue alto comparado con otros estudios (Khan *et al.*, 2002; Hummel *et al.*, 2007; Lapierre, 2007; Toomey *et al.*, 2010).

En conclusión, sólo algunas de las cepas resistentes tanto de *Enterococcus* spp. como de *E. coli* en este estudio presentaron genes de resistencia, por lo tanto no es necesario que las cepas sean portadoras de algún gen para ser resistentes fenotípicamente a un antimicrobiano (Gow *et al.*, 2008). Esto sugiere la existencia de mecanismos de resistencia alternativos y complejos, aunque no está demás concluir que hayan existido otros genes de resistencia de baja frecuencia en las cepas que no fueron detectados.

Por otro lado, es bien sabido que la presencia por si sola de un gen de resistencia no implica necesariamente que las bacterias vayan a ser resistentes, ya que es posible que estos genes de resistencia no puedan ser expresados (Chen *et al.*, 2005). Por lo tanto, la búsqueda de genes de resistencia a antimicrobianos en estudios futuros no sólo debe limitarse a cepas fenotípicamente resistentes, sino también a cepas sensibles.

Resistencia en Producción Animal y Consumidores

Desde el inicio de la producción industrial de animales para el consumo humano, hasta nuestros días hay algo que ha cambiado totalmente en el enfoque de la producción: la idea que no producimos aves, cerdos o vacunos, sino carne y productos para el consumidor. La expresión “de la granja a la mesa” refleja de manera fiel la preocupación de los profesionales del sector: la sanidad y la calidad del producto obtenido, que sea capaz de cumplir con todos los estándares exigidos por el mercado. La obligación de velar por una correcta condición sanitaria del ganado, no solo es imprescindible para su bienestar, sino también para que llegue en las mejores condiciones sanitarias para el consumidor, que es el último eslabón de la cadena alimenticia. Sin embargo, en la industria moderna de aves de corral los antibióticos se utilizan en grandes cantidades no sólo para el tratamiento y la prevención de enfermedades bacterianas, sino también como promotores del crecimiento (Bogaard *et al.*, 2002). Este alto uso de antibióticos en las aves de corral puede comprometer la terapia veterinaria, pero también es un problema de salud pública. El uso de antibióticos no sólo selecciona resistencia en las bacterias patógenas, sino también en la flora endógena de los animales expuestos.

La correcta utilización de los tiempos de espera o el adecuado cálculo de los mismos, ha ayudado a la disminución de residuos por debajo de los LMRs (Límite Máximo de Residuos) en los productos destinados a consumo humano, no obstante esto no es suficiente (Borrell *et al.*, 2006).

La eliminación estos últimos años de determinadas moléculas del vademécum veterinario para proteger las usadas en humanos, debe ir acompañado de un uso prudente de los antibióticos que se prescriben. Esta es la mejor herramienta para evitar transmisión de resistencias a humanos

y poder continuar de esta manera contando con las moléculas (pocas) que quedan en manos del profesional veterinario.

Es tan grave el problema del abuso de antibióticos en la producción de aves; tanto en su uso como tratamiento de enfermedades como promotores del crecimiento, que en un estudio realizado por Bogaard y compañía (2002) en los Países Bajos, donde se analizaron muestras de heces de los granjeros que trabajaban con estas aves tratadas (aves de engorde), se encontraron niveles muy altos de *Enterococcus* spp. resistentes, incluyendo enterococcus resistentes a vancomicina, con el mismo gen de resistencia *vanA* que las aves. Este estudio demostró la transmisión de enterococcus resistentes desde las aves a los hombres.

La necesidad de una política antibiótica en las empresas adquiere cada vez mayor relevancia. Esto consiste en tener decidido y razonado lo que se debe usar en cada momento y porqué. De acuerdo con estos criterios, se clasifican los antibióticos en moléculas de amplio espectro y de reducido espectro, pensando siempre en cual es el más adecuado para la patología observada. Por ello, son de elección, siempre que sea posible, aquellos antibióticos que actúen sobre la bacteria diagnosticada, evitando que se pueda actuar sobre la población de bacterias que, como salmonella, pueden ser causantes de infecciones graves en la especie humana que requieren tratamiento. En una política antibiótica, se debe disponer de moléculas de primera elección frente a cada agente causal y moléculas de segunda elección, además de dosis y periodos de tratamientos definidos. De esta manera, los antibióticos que se consideran importantes para tratar infecciones en medicina humana como veterinaria, se prescribirán después de un estudio cuidadoso y una justificación razonable de su uso.

El uso de cultivos y pruebas de sensibilidad, ayudarán a realizar un correcto diagnóstico y a escoger el antibiótico más idóneo para cada situación, por lo tanto deben tenerse presentes dentro la producción animal y realizarlas en caso de ser necesario.

Minimizar la contaminación ambiental con antimicrobianos tanto como sea posible es otra de las obligaciones de las industrias de producción animal. Como consecuencia de su catabolismo, algunas moléculas pueden permanecer por largos periodos de tiempo activas en el medio ambiente, y si no sufren una rápida transformación a su forma inactiva, pueden contribuir al desarrollo de bacterias resistentes en el medio ambiente (Chee-Sanford *et al.*, 2001; Borrell *et al.*, 2006).

En vista de todos los antecedentes planteados anteriormente, la emergencia de la resistencia bacteriana a antimicrobianos y su diseminación es una de las mayores epidemias del mundo en la actualidad. Es bien conocida la gran capacidad de adaptación que presentan las

bacterias frente a medios adversos. Como ejemplo de esto se cuentan los diferentes mecanismos desarrollados por estos microorganismos frente a los antimicrobianos disponibles en la actualidad y en muchos casos frente a fármacos que aún se encuentran en su etapa de evaluación (González, 2002). En los años recientes la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y la rapidez con que surgen los microorganismos de resistencia, no es igual a la velocidad con que surgen nuevos antibióticos, por lo que se concibe que pronto habrá un déficit de fármacos disponibles para tratar a pacientes con sepsis graves (Fernández *et al.*, 2003).

Ante la gravedad del problema, existen en la actualidad una serie de medidas y estrategias que deben ser utilizadas con el fin de minimizar la resistencia de las bacterias a la acción de los antimicrobianos. Entre ellas, se encuentran:

- Uso racional de los antibióticos, es decir, en dosis adecuada y durante el tiempo necesario con el fin de disminuir la presión selectiva que estos fármacos ejercen sobre las bacterias. Al respecto es necesario mantener una educación constante a los médicos y la población.
- Incremento en la Investigación en Universidades, Laboratorios privados y públicos y Centros de Salud acerca de las enfermedades infecciosas, el uso de los agentes antimicrobianos y los mecanismos de resistencia frente a estos.
- Establecimiento de programas de vigilancia de la resistencia bacteriana, que tengan como misión; detectar la aparición de cepas resistentes, investigar los factores que influyen en la emergencia de resistencia y elaborar estrategias de control, que luego sean evaluadas.
- Mejoramiento en la calidad de las Pruebas de susceptibilidad frente a los antimicrobianos, para guiar la terapéutica empírica contra los patógenos que producen las enfermedades infecciosas más comunes.
- Racionalización en el empleo de los antimicrobianos en Medicina Veterinaria para la producción de alimento de origen animal. Los efectos del origen de la resistencia bacteriana por medio de esta vía ha sido demostrada en los trabajos de Aarestrup y compañía (2000), al encontrar enterococos resistentes a vancomicina, tetraciclina y otros antibióticos en heces de cerdos, pollos y seres humanos. En los 3 especímenes se halló el mismo gen (*vanA*) de resistencia a vancomicina. El mismo autor en otro estudio (Aarestrup y Wegener, 1999), encontró cepas resistentes de *Campilobacter* y *E. coli* en seres humanos, como consecuencia del uso de antibióticos en la producción de alimentos para animales y recomienda la urgencia de emplear una estrategia para la utilización prudente

de estos agentes con el fin de prevenir la ocurrencia de bacterias patógenas resistentes. Al respecto es necesario el desarrollo de guías para médicos veterinarios con el fin de evitar el sobreuso de antimicrobianos en producción animal, además de aumentar las exigencias y la legislación respecto de los Límites Máximos de Residuos (LMR) permitidos en productos de origen animal.

- Rotación cíclica de antibióticos en las instituciones de salud para reducir la resistencia; se considera un concepto novedoso y atractivo ya que el uso de los antibióticos constituye un estímulo para la emergencia de la resistencia; sin embargo, la existencia de determinantes genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones ponen en duda la efectividad de esta estrategia.
- Mayor promoción en el uso de terapias preventivas contra procesos infecciosos como las vacunas.
- Creación de nuevos y mejores antibióticos, con diferentes mecanismos de acción frente a las bacterias.

De acuerdo a los antecedentes antes expuestos, Chile no está ajeno al riesgo de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria. El problema de la resistencia a los antimicrobianos no es nuevo, pero se está volviendo cada vez más peligroso y son necesarias actuaciones urgentes y unificadas para evitar que regresemos a la era preantibiótica. Al respecto, y con el fin de disminuir este riesgo, la OMS (2011) hace un llamado a las instancias normativas, los planificadores, la población, los pacientes, los clínicos y prescriptores, los farmacéuticos y dispensadores y a la industria farmacéutica, a ponerse en acción para detener la propagación de la resistencia a los antimicrobianos, poniendo énfasis en seis puntos críticos que deben ser tomados en cuenta para combatir la resistencia frente a los antimicrobianos:

- Falta de compromiso
- Debilidad en la vigilancia
- Mala calidad de los medicamentos
- Uso irracional de los medicamentos
- Falta de control en las infecciones
- Insuficiencia en la Investigación

La contención de la resistencia debe ser una prioridad nacional, para la cual deben trabajar en conjunto profesionales de la salud humana, médicos veterinarios, productores, industrias farmacéuticas, gobierno y consumidores entre otros. Para cumplir con este punto, la OMS recomienda asignar recursos gubernamentales para promover la implementación de programas de contención de la resistencia, asegurar la educación de prescriptores y farmacéuticos sobre el uso prudente de antimicrobianos y crear sistemas de monitoreo permanente de los niveles de resistencia.

CONCLUSIONES

- El gen de resistencia a eritromicina más frecuente en cepas de *Enterococcus* spp. fue *ermB* encontrándose en un 48,6% de las cepas.
- Los genes de resistencia a estreptomicina más frecuentes en cepas de *E. coli* fueron *strA* y *strB*, encontrándose en un 57,7% de las cepas.
- Los genes *strA* y *strB* se encontraron siempre juntos.
- Los genes de resistencia a eritromicina *ermA*, *mefA*, *msrA/B* y *msrC* no fueron amplificados en ninguna de las cepas en estudio.
- Los genes de resistencia a estreptomicina *aadA1*, *aadA2* y *aadE* no fueron amplificados en ninguna de las cepas en estudio.
- Sólo algunas de las cepas resistentes tanto de *Enterococcus* spp. como de *E.coli* en este estudio presentaron genes de resistencia, por lo tanto no fue necesario que las cepas fueran portadoras de algún gen para ser resistentes fenotípicamente al antimicrobiano.
- Este estudio demuestra la presencia de resistencia bacteriana en Chile, mediada por determinantes moleculares de resistencia en cepas aisladas de aves de postura. Por lo que es sumamente urgente poner en marcha un Plan de Vigilancia de Resistencia en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

- AARESTRUP, F.; WEGENER, H.** 1999. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*. 8: 639-644.
- AARESTRUP, F.** 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 and Infectious Disease*. 37: 127-137.
- AARESTRUP, F.; HASMAN, H.; JENSEN, L.; MORENO.; HERRERO, I.; DOMINGUEZ, L.; FINN, M.; FRANKLIN, A.** 2002. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 4127-4129.
- ALEKSHUN, M.; STUART, B.** 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 128: 1037-1050.
- ALGORTA, G.; SCHELOTTO, F.** 2006. Principales grupos de bacilos Gram negativos no exigentes. In: *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2ª ed. Universidad de la República, Facultad de Medicina, Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene. Uruguay. 35: 315-349.
- ANDERSON, A.; NELSON, J.; ROSSITER, S.; ANGULO, F.** 2003. Public Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Food Animal in the United States. *Microbial Drug Resistance*. 9: 373-379.
- APLEY, M.** 2003. Susceptibility testing for bovine respiratory and enteric disease. *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*. 19: 625-646.
- ARAYA, C.** En ejecución. Caracterización genotípica de la resistencia antimicrobiana en cepas aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas de postura sometidas a tratamiento con antimicrobianos. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
- ARIAS, C.; REYES, J.; ZÚÑIGA, L., CORTÉZ, C.; CRUZ, C.; RICO, L.; PANESSO, D.** 2003. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001–2002. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 59–68.
- ASAI, T.; ESAKI, H.; KOJIMA, A.; ISHIHARA, K.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.** 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from apparently healthy food-producing animal from 2000 to 2003: the first stage of Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring (JVARM). *The Journal of Veterinary Medical Science*. 68: 881-884.

- BAGER, F.** 2000. DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 14: 271-274.
- BAMBEKE, F.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PECHÉRE, J.; TULKENS, P.** 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51: 1055–1065.
- BOGAARD, A.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J.; STOBBERINGH, E.** 2002. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 497-505.
- BORRELL, J.; BIARNÉS, M.; DOMÍNGUEZ, F.; FAUS, C.; FERNÁNDEZ, N.; GIRÓN, J.; ORDÓÑEZ, J.; PAGÉS, A.; PONTES, M.; SEGURA, J.** 2006. Recursos Terapéuticos. In: Higiene y patología aviar. 2º edición. Real Escuela de Avicultura. Barcelona, España. Pp. 445-487.
- BYWATER, R.; MCCONVILLE, M.; PHILLIPS, I.; SHRYOCK, T.** 2005. The susceptibility to growth-promoting antibiotics of *Enterococcus faecium* isolated from pig and chicken in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56: 538-543.
- CAMPAGNOLO, E.; JONSON, K.; KARPATI, A.; RUBIN, C.; KOLPIN, D.; MEYER, M.; ESTEBAN, J.; CURRIER, R.; SMITH, K.; THU, K.; MC GEEHN, M.** 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry. *Science Total Environment*. 1: 89-95.
- CARRAMIÑANA, J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A.** 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*. 104: 133–139.
- CAUSSE, M.; FRANCO-ALVAREZ DE LUNA, F.; GRACÍA-MAYORGAS, AD.; RODRIGUEZ, F; CASAL, M.** 2006. Sensibilidad a los antimicrobianos de *Enterococcus faecalis* aislados en pacientes de la provincia de Córdoba España. *Revista Española de Quimioterapia*. 19: 140-143.
- CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.** 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 159-161.
- CHEE-SANFORD, J.; AMINOV, R.; KNAPAC, I.** 2001. Nucleotide occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and ground-water underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1494-1502.
- CHEN, S.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; SCHROEDER, C.; WHITE, D.; MENG, J.** 2005. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Probes*. 19: 195-201.

- CHRYSTAL, JL.** 2002. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. Revista Chilena de Infectología. 19: 111-115.
- CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20. Vol 30 N° 1. [En línea] < <http://www.clsi.org/source/orders/free/m100-s20.pdf> > [Consulta: 21/08/2010].
- COUNTS, JM.; ASTLES, JR.; TENOVER, FC.; HINDLER, J.** 2007. Systems Approach to Improving Antimicrobial Susceptibility Testing in Clinical Laboratories in the United States. Journal of Clinical Microbiology. 45: 2230–2234.
- DANMAP. THE DANISH INTEGRATED ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING AND RESEARCH PROGRAMME.** 2009. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. [En línea] <www.danmap.org> [Consulta: 10/08/2010].
- DE LA CRUZ, F.; DAVIES, J.** 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. Trends in Microbiology. 8:128-133.
- DE SPIEGELEER, P.; SERMON, J.; VANOIRBEEK, K.; AERTSEN, K.; MICHIELS, C.** 2005. Role of porins in sensitivity of *Escherichia coli* to antibacterial activity of the lactoperoxidase enzyme system. Applied and Environmental Microbiology. 17: 3512–3518.
- FEDORKA-CRAY, P.; ENGLER, M.; CRAY, J.; HUDSON, C.; HEADRICK, M.** 2002. Programs for monitoring antimicrobial resistance. Animal Biotechnology. 13: 43-55.
- FERNÁNDEZ, F.; LÓPEZ, J.; PONCE, L.; MACHADO, C.** 2003. Resistencia bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar. 32: 44-48.
- FLUIT, A.; VISSER, M.; SCHMITZ, F.** 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. Clinical Microbiology Reviews. 14: 836-871.
- FLUIT, A.; SCHMITZ, F.** 2004. Resistance integrons and super-integrons. Clinical Microbiology and Infection. 10: 272-288.
- GARCÍA, P.** 2003. Resistencia bacteriana en Chile. Revista Chilena de Infectología. 20: 11-23.
- GONZÁLEZ, G.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.** 2004. Integrones y *cassettes* genéticos de Resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. Revista Médica de Chile. 132:619-626.
- GONZÁLEZ, N.; CORREO, J.** 1998. Plan nacional de control de salmonella en la avicultura chilena. Tecnovet. 4: 4-5. [En línea]
< <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/RT/article/view/6246/6102>> [Consulta: 02/04/2011].

- GONZÁLEZ, P.** 2002. Vigilancia de la Resistencia a antimicrobianos. *Revista Chilena de Infectología*. 19: 135-139.
- GORBACH, S.** 2001. Antimicrobial Use in Animal Feed — Time to Stop. *The New England Journal of Medicine*. 345: 1202-1203.
- GOW, S.; WALDNER, CH.; HAREL, J.; BOERLIN, P.** 2008. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolated from cow-calf herd in western Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 3658-3666.
- GRAHAM, JP.; PRICE, LB.; EVANS, SL.; GRACZYC, TK.; SILBERGELD, EK.** 2009. Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Science of The Total Environment*. 407: 2701-2710.
- GUERRA, B.; JUNKER, E.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; LEHMANN, S.; HELMUTH, R.** 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 489-492.
- GYLES, CL.** 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews*. 9: 149–158.
- HOOPER, D.** 2001. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 7: 337-341.
- HUMMEL, A.; HOLZAPFEL, W.; FRANZ, CH.** 2007. Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*. 30: 1-7.
- JOHNSON, JR.; KUSKOWSKI, MA.; SMITH, K.; O'BRYAN, TT.; TATINI, S.** 2005. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *The Journal of Infectious Diseases*. 191: 1029-31.
- JULIET, CH.** 2002. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. *Revista Chilena de Infectología*. 19: 111-115.
- KANG, H.; JEONG, Y.; OH, J.; TAE, S.; CHOI, CH.; MOON, D.; LEE, W.; LEE, Y.; SEOL, S.; CHO, D.; LEE, J.** 2005. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *E. coli* isolated from humans and animals in Korea. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 55: 639-644.

- KHAN, A.; NAWAZ, M.; KHAN, A.; STEELE, R.** 2002. Detection and Characterization of erythromycin-resistant methylase gene in gram-positive bacteria isolated from poultry litter. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 377-381.
- LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P.** 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology*. 91: 73-84.
- LAPIERRE, L.** 2007. Caracterización fenotípica y genotípica de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Salmonella* spp, *E. coli* y *Enterococcus* spp, aisladas de aves y cerdos. Tesis para optar al Grado de Académico de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 101 p.
- LEE, MD.; MAURER, J.** 2000. The Genetic Basis for Emerging Antibiotic Resistance in Veterinary Pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 916: 643-645.
- LEHTOLAINEN, T.; SHWIMMER, A.; SHPIGEL, N.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; PYORALA, S.** 2003. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. *Journal of Dairy Science*. 12: 3927-32.
- LUCZKIEWICZ, A.; JANKOWSKA, K.; KURLEND, J.; OLÁNCZUK-NEYMAN, K.** 2010. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from surface water. *Water Science and Technology*. 62: 466-473.
- MARTEL, L.; TARDY, F.; BRISABOIS, A.; LAILLER, R.; COUDERT, M.; CHASLUS-DANCLA, E.** 2000. The French antibiotic resistance monitoring programmes. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents*. 14: 275-283.
- MALLON, D.; CORKILL, J.; HAZEL, S.** 2002. Excretion of vancomycin-resistant enterococci by wild animals. *Emergency Infectious Diseases*. 8: 636-638.
- McEWEN, S.; FEDORKA-CRAY, J.** 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Microbiology Letters*. 34: 93-106.
- MELLON, M.; BENBROOK, CH.; LUTZ, K.** 2001. Hogging it: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock. Union of Concerned Scientists. [En línea]
<http://www.ucsusa.org/food_and_agriculture/science_and_impacts/impacts_industrial_agriculture/hogging-it-estimates-of.html> [Consulta: 09/08/2010].
- MICHANIE, S.; MEDINA, L.; GHIBERTO, D.; PROSELLO, W.; ALIA, P.; CORIA, P.; COMPAGNUCCI, J.; COSTANTINI, O.; GALLO, J.** 2001. Epidemiología de las enfermedades transmitidas por quesos. *Énfasis Alimentación*. 2: 2:12.
- MILES, T.; MCLAUGHLIN, W.; BROWN, P.** 2006. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*. 6: 2-7.

- MORENO, M.; DOMINGUEZ, L.; TESHAGER, T.; HERRERO, A.; PORRERO, M.** 2000. Antibiotic resistance monitoring: The Spanish Program. *International Journal Antimicrobial Agents*. 14: 285-290.
- MORENO, M.** 2008. Red de vigilancia veterinaria de resistencias a antimicrobianos. Conferencia impartida el 28 de mayo del 2008 en la Real Academia de Ciencias Veterinarias de la Universidad Complutense. Madrid, España. [En línea]<
<http://www.colvema.com/PDF/3844RedVAV.pdf> > [Consulta: 05/08/2010].
- NGUYEN, PM.; WOERTHER, PL.; BOUVET, M.; ANDREMONT, A.; LECLERCQ, R.; CANU, A.** 2009. *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. *Emerging Infectious Diseases*. 15: 1648-50.
- ODEPA.** 2008. Estadística de existencias de porcinos y aves. [En línea]<
<http://www.odepa.gob.cl/menu/MacroRubros.action;jsessionid=E2A56926084BD1DF4CF33DA5E15E0D01?rubro=pecuaria&reporte=>>[01/03/2011].
- OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2010. Armonización de los programas de vigilancia y seguimiento de la resistencia a los antimicrobianos. **In:** Código Sanitario para los animales terrestres. Vol. 1. 6.7. [En línea]<
http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_titre_1.6.htm> [Consulta: 05/08/2010].
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2011. Resistencia a los antimicrobianos: Si no actuamos hoy, no habrá cura mañana. [En línea]< <http://www.who.int/world-health-day/2011/es/index.html>>[Consulta: 03/03/2011].
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2004. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Oficina regional de la Organización mundial de la salud. [En línea]< <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/amr-2004.pdf>> [Consulta: 07/08/2010].
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2001. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2. 105 p. [En línea] <
http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_DRS_2001_2_EN/en/> [Consulta: 08/08/2010].
- OTEO, J.; CAMPOS, J.; BAQUERO, F.; SPANISH MEMBERS OF THE EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS).** 2002. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 945–952.
- PETERSEN, A.; AARESTRUP, F.; HOFSHAGEN, M.; SIPILA, H.; FRANKLIN, A.; GUNNARSSON, E.** 2003. Harmonization of veterinary susceptibility testing among veterinary diagnostic laboratories in the five Nordic countries. *Microbial Drug Resistance*. 9: 381: 388.
- PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, CH.; PRESTON, R.; WADDELL, J.** 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk

- to human health? A critical review of published data. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 28-52.
- POWER, JH.** 2004. Antimicrobial drug development-The past, the present and the future. *Clinical Microbiology Infection*. 10: 23-31.
- PORTILLO, A.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; ALONSO, A.; MARTÍNEZ, J.; TORRES, C.** 2000. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 967-971.
- QUIN, X.; WEISSMAN, S.; CHESNUT, M.; ZHANG, B.; SHEN, L.** 2004. Kirby-Bauer disc approximation to detect inducible third-generation cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 15: 3-13.
- ROSE, JM.; GAST, RJ.; BOGOMOLNI, A.; ELLIS, JC.; LENTELL, BJ.; TOUHEY, K.; MOORE, M.** 2009. Occurrence and patterns of antibiotic resistance in vertebrates off the Northeastern United States coast. *FEMS Microbiology Ecology*. 67: 421-431.
- ROSENBLATT-FARRELL, N.** 2009. The Landscape of Antibiotic Resistance. *Environmental Health Perspectives*. 117:244-250.
- SAN MARTÍN, B.; BRAVO, B.; BORIE, C.** 2005. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 37: 117-123.
- SAN MARTÍN, B.; KRUZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO, H.; LEÓN, B.; ESPINOZA, S.; IRAGÜEN, D.; PUGA, J.; BORIE, C.** 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X Región, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2: 221-234.
- SANDER, HS.** 2002. Enterococcus resistentes a vancomicina: ¿Infección emergente inminente?. *Revista Chilena de Infectología*. 19: 50-55.
- SAPKOTA, A.; CURRIERO, F.; GIBSON, K.; SCHWAB, K.** 2007. Antibiotic-Resistant Enterococci and Fecal Indicators in Surface Water and Groundwater Impacted by a Concentrated Swine Feeding Operation. *Environmental Health Perspectives*. 115:1040-1045.
- SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E.** 2001. Use of antimicrobial in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*. 32: 201-225.
- SCHWARZ, S.; KAHRENBERG, C.; SALMON, S.; WATTS, J.** 2004. *In vitro* activities of spectinomycin and comparator agents against *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* from respiratory tract infections of cattle. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 379-382.
- SEIJA, V.; VIGNOLI, R.** 2006. Principales mecanismos de Resistencia antibiótica. **In:** Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2ª ed. Universidad de la República, Facultad de Medicina, Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene. Uruguay. 35: 649-662.

- SHAHADA, F.; CHUMA, T.; TOBATA, T.; OKAMOTO, K.; SUEYOSHI, M.; TAKASE, K.** 2006. Molecular epidemiology of antimicrobial resistance among *Salmonella* entérica serovar infantis from poultry in Kagoshima, Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 28: 302-307.
- SHAKIL, S.; KHAN, R.; ZARRILLI, R.; KHAN, A.** 2008. Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of Biomedical Science*. 15: 5-14.
- SILVA, J.; LOYOLA, P.; GALLEGUILLOS, J.; RODRÍGUEZ, Y.; COLQUE-NAVARRO, P.; MÓLLBY, R.; KÚHN, I.** 2005. Prevalence of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. in waste waters in the north of Chile. *Revista Médica de Chile*. 133: 1201-1210.
- SJÖLAND, M.; BONNEDAHN, J.; HERNANDEZ, J.; BENGTSSON, S.; CEDERBRANT, G.; PINHASSI, J.; KAHLMEYER, G.; OLSEN, B.** 2008. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerging Infectious Diseases*. 14: 70-2.
- SRINIVASAN, V.; GILLESPIE, B.; LEWIS, M.; NGUYEN, L.; HEADRICK, S.; SCHEKKEN, Y.; OLIVER, S.** 2007. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Veterinary Microbiology*. 124: 319-328.
- SUMANO, H.; GUTIÉRREZ, L.** 2000. Problemática del uso de enrofloxacin en la avicultura en México. *Veterinaria México*. 31: 137-145.
- SUNDE, M.; NORSTRÖM, M.** 2006. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58: 741-747.
- TAPIA, C.; LEON, E.; PALAVECINO, E.** 2003. Susceptibilidad antifúngica de levaduras mediante Etest®. Comparación de 3 medios. *Revista Médica de Chile*. 131: 299-302.
- TENOVER, F.** 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*. 119: 3-10.
- TENOVER, F.; MOHAMMED, M.; STELLING, J.; O'BRIEN, T.; WILLIAMS, R.** 2001. Ability of laboratories to detect antimicrobial resistance, proficiency testing and quality control results for the WHO external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 241-250.
- TEUBER, M.; SCHWARZ, F.; PERRETTEN, V.** 2003. Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 325-329.
- TOOMEY, N.; BOLTON, D.; FANNING, S.** 2010. Characterization and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in Microbiology*. 161: 127-135.

- TRUCCO, O.; PRADO, V.; DURAN, C.; GRUPO PRONARES.** 2002. Red de Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos PRONARES. Informe primer semestre 2001. Revista Chilena de Infectología. 195: 140-148.
- VELA, A.; MORENO, M.; CEBOLLA, J.; GONZALEZ, S.; LATRE, M.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.** 2005. Antimicrobial susceptibility of clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. Veterinary Microbiology 105: 143–147.
- WALSH, C.** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 406:775-781.
- WERNER, G.; HILDEBRANDT, B.; KLARE, I.; WITTE, W.** 2000. Linkage of determinants for streptogramin A, macrolide-lincosamide-streptogramin B, and chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium* and dissemination of this cluster among streptogramin-resistant enterococci. International Journal of Medical Microbiology. 290: 543-548.
- WHITE, D; MCDERMOTT, P.** 2001. Emergence and transfer of antibacterial resistance. Journal of Dairy Science. 84: 151-155.
- WOLFF, M.** 2004. Uso y abuso de antimicrobianos. Momento de su evaluación más allá del ser humano. Revista Médica de Chile. 132: 909-911.
- ZHAO, S.; MCDERMONTT, P.; FRIEDMAN, S.; ABBOTT, J.; AYERS, S.; GLENN, A.; HALL-ROBINSON, E.; HUBERT, S.; HARBOTTLE, H.; WALKER, R.; CHILLER, T.; WHITE, D.** 2006. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among Salmonella from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. Foodborne Pathogens and Disease. 3: 106-111.