



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFEECTO DE FLORFENICOL SOBRE LA SENSIBILIDAD DE *Escherichia coli*
PROVENIENTE DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE GALLINAS DE
POSTURA**

OSCAR NICOLÁS CHACÓN MIÑO

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

PROFESOR GUÍA: Dra. Betty San Martín Núñez

SANTIAGO, CHILE

JUNIO, 2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTO DE FLORFENICOL SOBRE LA SENSIBILIDAD DE *Escherichia coli*
PROVENIENTE DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE GALLINAS DE
POSTURA**

OSCAR NICOLÁS CHACÓN MIÑO

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

	Nota Final:.....	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	DRA. BETTY SAN MARTÍN NUÑEZ
PROFESOR CORRECTOR:	DRA. CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CORRECTOR:	DRA. DANIELA IRAGÜEN CONTRERAS

SANTIAGO, CHILE
JUNIO, 2012

MEMORIA DE TÍTULO

“EFECTO DE FLORFENICOL SOBRE LA SENSIBILIDAD DE *E. coli* PROVENIENTE DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE GALLINAS DE POSTURA”.

“EFFECT OF FLORFENICOL ABOUT THE SENSIBILITY OF *E.coli* FROM INTESTINAL MICROBIOTA OF HENS”

Oscar Nicolás Chacón Miño

Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,
Universidad de Chile.

Financiamiento

Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET), Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

RESUMEN

Escherichia coli es una bacteria comensal presente en la microbiota intestinal normal de las aves, la cual, es utilizada como bacteria indicadora de resistencia antimicrobiana en los programas de vigilancia. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la terapia con florfenicol sobre los patrones de susceptibilidad en cepas de *E.coli* provenientes de la microbiota intestinal de aves de postura. Se utilizaron 14 pollas raza Leghorn de 1 día de edad, las que fueron sometidas a un muestreo inicial para analizar sus niveles basales de susceptibilidad bacteriana; dicho grupo se denominó Grupo control I (GCI). Posteriormente, se asignaron a dos grupos: Grupo Control II (GCII), sin tratamiento y Grupo Florfenicol (GF), que recibió tratamiento con florfenicol (dosis: 30mg/kg p.v. durante 7 días, mediante sonda gástrica). Se aislaron a partir de muestras cloacales, 112 cepas en el GCII y 86 cepas en el GF. Se analizó, mediante pruebas de Concentración Inhibitoria Mínima la sensibilidad de *E. coli* frente a florfenicol, tilosina, eritromicina, ciprofloxacino, amikacina, gentamicina, ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol. Se registraron altos niveles de resistencia en ambos grupos a florfenicol, tilosina y eritromicina, mientras que amikacina y gentamicina presentaron bajos niveles de resistencia. Hubo una asociación significativa ($p \leq 0,05$) entre el uso de florfenicol y la modificación de los patrones de susceptibilidad en cepas de *E. coli*, específicamente frente a amikacina ($\chi^2=5,43$), tetraciclina ($\chi^2=16,8$), gentamicina ($\chi^2=6,35$), ciprofloxacino ($\chi^2=24,1$) y cloranfenicol ($\chi^2=3,91$).

Palabras Clave: Florfenicol, *E. coli*, Resistencia bacteriana.

ABSTRACT

Escherichia coli is a commensal bacteria which is present in normal intestinal microflora of poultry, this organism is used as an indicator antimicrobial resistance in monitoring programs. The goal of this study was to evaluate the effect of therapy with florfenicol on susceptibility patterns of *E.coli* strains from intestinal microflora of poultry. Four-teen day old Leghorn hens were sampled to analyze their basal level of bacterian susceptibility, these were considered as Control Group I (CGI). Later, they were separated in two groups: Control Group II (CGII), without treatment, and Florfenicol Group (FG). This last group was treated with oral florfenicol (dose: 30mg/kg during 7 days administrated through gastric intubation). One hundred and twelve strains were isolated from cloacal swabs in GCII and 86 strains in FG. The susceptibility of *E. coli* to a variety of antimicrobial agents was evaluated through a minimum inhibitory concentration analysis. These antimicrobials were florfenicol, tylosin, erythromycin, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, ampicillin, tetracyclin and chloramphenicol. High levels of resistance were detected in both groups to florfenicol, tylosin and erythromycin; while, amikacin and gentamicin presented low levels of resistance. There was a significant association ($p \leq 0.05$) between the use of florfenicol and the modification of susceptibility

patterns in *E.coli* strains, specifically to amikacin ($\chi^2=5.43$), tetracilin ($\chi^2=16.8$), gentamicin ($\chi^2=6.35$), ciprofloxacin ($\chi^2=24.1$) and chloranphenicol ($\chi^2=3.91$).

Key words: Florfenicol, *E.coli*, Bacterial resistance.

INTRODUCCIÓN

Durante décadas, ha existido una enorme presión sobre el sector pecuario mundial para responder a la creciente demanda de alimentos de origen animal, existiendo la constante necesidad de aumentar la eficiencia de los sistemas productivos. Esto ha traído como consecuencia, el uso excesivo de antimicrobianos para el tratamiento de animales; es así que la *Danish Integrated Antimicrobial resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP) estimó que en el año 2009, en Dinamarca, el consumo total de agentes antimicrobianos en animales de producción fue de 129,7 toneladas (DANMAP, 2009), situación que también ha sido descrita en otros países.

Los antimicrobianos son una de las principales herramientas terapéuticas para tratar y prevenir enfermedades de tipo bacterianas en aves de corral; son ampliamente utilizados en la industria avícola, siendo administrados en la comida o en el agua, con fines terapéuticos, profilácticos y metafilácticos (Gyles, 2008).

Dentro de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de las aves, se encuentran múltiples bacterias comensales, una de ellas es *Escherichia coli*. Sin embargo, existe un patotipo denominado *E. coli* patógena aviar (según su sigla en inglés Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC), que posee factores de virulencia específicos, siendo el agente patógeno causal de infecciones bacterianas secundarias importantes en la industria avícola, como la colibacilosis (Zhao *et al.*, 2005).

La colibacilosis genera cuadros patológicos como coligranuloma, enfermedad de los sacos aéreos, celulitis, síndrome de cabeza hinchada, salpingitis, coliseptisemia, entre otros (Salehi y Bonab, 2006). Es la enfermedad infecciosa con los mayores índices de morbilidad, mortalidad y decomiso de canales en la industria avícola, siendo además, considerada una enfermedad económicamente devastadora en todo el mundo. Es por esto que, las medidas de control que incluyen el uso terapéutico de antimicrobianos, son esenciales en el rubro en cuestión.

La literatura internacional señala que las cepas de APEC han desarrollado altos niveles de resistencia frente a diferentes antimicrobianos utilizados en la industria avícola, como por ejemplo cefradina, tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglicósidos, fluoroquinolonas y β -lactámicos (Kabir, 2010). Es por esto, que se han buscado nuevas herramientas terapéuticas

con el fin de realizar una correcta rotación de los antimicrobianos, donde el florfenicol surge como una excelente alternativa frente a patologías entéricas en avicultura (Li *et al.*, 2007).

El florfenicol es un compuesto antimicrobiano sintético, derivado fluorado del tiamfenicol y cloranfenicol. Este antimicrobiano difiere principalmente del cloranfenicol en que contiene un átomo de flúor no susceptible de acetilación (Ríos, 2004), previniendo así la acción enzimática por parte de las bacterias, logrando un mayor efecto antibacteriano y menores tasas de resistencia en comparación a su predecesor (Shen *et al.*, 2002). En 1996 fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de patógenos respiratorios del bovino. El florfenicol se desarrolló para la lucha contra microorganismos cloranfenicol/tiamfenicol resistentes y a su vez, para evitar el desarrollo de efectos negativos propios de estos antimicrobianos, como la anemia aplásica irreversible y la supresión reversible de la médula ósea en humanos (Ríos, 2004).

Los anfenicoles como el cloranfenicol, tiamfenicol y el florfenicol tras ingresar a la bacteria por difusión facilitada, ejercen su acción mediante la unión reversible a la proteína L16, localizada en la sub unidad ribosomal 50S. Esta proteína media la fijación del ARNt a la enzima peptidiltransferasa, evitando así la formación de enlaces peptídicos. Este grupo de antimicrobianos tiene un amplio espectro de acción, afectando a microorganismos grampositivos, gramnegativos y anaerobios (Calvo y Martínez-Martínez, 2007).

Como se mencionó anteriormente, *E. coli* es una bacteria residente comensal del tracto gastrointestinal de aves, y es utilizada como bacteria indicadora en los programas de vigilancia de la resistencia bacteriana, ya que es considerada como reservorio de genes de resistencia que pueden, vía horizontal, ser transferidos a otras bacterias del mismo o diferente género, a través de elementos genéticos móviles (Tenover, 2006).

La resistencia bacteriana, se define como la capacidad de una bacteria de multiplicarse en presencia de concentraciones de antimicrobiano superiores a la concentración inhibitoria mínima definida para una especie bacteriana (Mcewen y Fedorka-Cray, 2002). El mal uso de antimicrobianos es, posiblemente, el principal factor de promoción, selección y diseminación de microorganismos resistentes, tanto en medicina veterinaria como humana. La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) consideran que la resistencia a los antimicrobianos es un problema grave, complejo y de dimensión internacional (FAO, 2007).

La producción avícola utiliza un sistema de crianza altamente intensificado, donde la adición de grandes cantidades de antimicrobianos en el alimento, determina una elevada presión de selección sobre las bacterias intestinales, de modo que, aquellas que son capaces de multiplicarse, darán origen a una población resistente (Ozaki *et al.*, 2011). Diversos estudios han comprobado que la administración oral de antimicrobianos a pollos de engorda, puede modificar las poblaciones de bacterias comensales de la flora intestinal, generando una presión de selección a favor de cepas resistentes de microorganismos como *E. coli* y *Enterococcus spp.* En el estudio de Diarra *et al.*, (2007) se corroboró que la administración de penicilina, bacitracina, bambamicina y salinomina vía oral, aumenta los niveles de resistencia en cepas de *E. coli* aisladas desde muestras cloacales, frente a ceftiofur (80,8%), estreptomicina (53,8%) y gentamicina (42,3%). Da costa *et al.*, (2009), obtuvieron resultados similares luego de la administración oral de enrofloxacin, gentamicina y amoxicilina, registrando un aumento en el número de cepas de *E.coli* resistentes a kanamicina (23%), tetraciclina (30%), trimetoprim-sulfametoxazol (46%), cloranfenicol (58%), gentamicina (58%) ampicilina (61%), estreptomicina (69%) y enrofloxacin (92%). Adicionalmente, Smith *et al.*, (2007), determinaron que luego de la administración oral de enrofloxacin, oxitetraciclina y sarafloxacin, aumentaron no solo los niveles de resistencia frente a tetraciclina (36% a 97%), sulfonamidas (50% a 100%) y estreptomicina (53% a 100%) sino que además, el 75% de las cepas analizadas desarrollaron multiresistencia.

Las bacterias pueden desarrollar resistencia frente a los antimicrobianos mediante mecanismos intrínsecos y adquiridos. La resistencia bacteriana intrínseca o innata, es una característica de ciertas bacterias en particular y depende de la biología del microorganismo; por ejemplo, *E. coli* presenta resistencia innata frente a vancomicina (Giedraitienė *et al.*, 2011). En este tipo de mecanismo, los genes propios del cromosoma bacteriano impiden el efecto de un antimicrobiano, por ejemplo AmpC β -lactamasas y sistemas de eflujo “Multidrug Resistance” (MDR) (Alekshun y Levy, 2007). La resistencia bacteriana adquirida ocurre frente a la exposición de un antimicrobiano y puede diseminarse mediante dos grandes procesos: (i) “*evolución vertical*”, donde las mutaciones en el cromosoma bacteriano se transmiten a la descendencia y (ii) “*evolución horizontal*”, con un traspaso de genes de resistencia mediante procesos de conjugación, transducción y transformación (Tenover, 2006). El proceso de evolución horizontal puede determinar el paso de genes de resistencia provenientes de bacterias que estén o no relacionadas filogenéticamente (González *et al.*, 2004). La adquisición de genes de resistencia vía horizontal ocurre a través de plasmidios

(conjugación o transformación), transposones (conjugación), integrones y bacteriófagos (transducción) (Tenover, 2006).

La importancia de monitorear la resistencia en bacterias indicadoras como *E. coli*, se debe a que los determinantes genéticos de resistencia pueden ser transferidos, vía horizontal, a microorganismos zoonóticos presentes en el intestino del ave, especialmente *Salmonella* spp., uno de los principales microorganismos transmitidos a través de alimentos de origen animal al humano. Por lo tanto, el desarrollo de cepas de *E. coli* resistentes a múltiples antimicrobianos ha encendido las alarmas mundiales tomando en consideración el grave riesgo que esto conlleva (Gyles, 2008).

El traspaso y acumulación de elementos genéticos puede desarrollar cepas multirresistentes, es decir, cepas resistentes a dos o más antimicrobianos. Este tipo de cepas, no poseen un solo mecanismo de resistencia, si no que una combinación de ellos, siendo el principal mecanismo de multirresistencia los sistemas de eflujo (Tenover, 2006). El aumento de bacterias multirresistentes genera mayores fallas terapéuticas y grandes pérdidas económicas, ya que aumenta la morbilidad y/o mortalidad de los animales. Sin dejar de lado estos aspectos, es sin duda, el traspaso de organismos zoonóticos multirresistentes a los humanos, el punto de mayor relevancia y preocupación a nivel mundial.

Frente a esta situación, en el año 2011, el Codex Alimentarius propuso el desarrollo de estrategias estructuradas y coordinadas, en medicina veterinaria y humana, para analizar el riesgo que representan los microorganismos multirresistentes para la salud humana. Para esto, se crean actividades preliminares de gestión de riesgo, que permiten decidir cuáles son las mejores medidas a adoptar. Así también, en el año 2009, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) promovió el uso responsable y prudente de medicamentos veterinarios, especialmente los antimicrobianos.

De acuerdo a lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios en los patrones de sensibilidad en cepas de *E. coli*, bacteria comensal de la microbiota intestinal de las aves, después de ser expuestas a una terapia con florfenicol.

HIPÓTESIS

Cepas de *Escherichia coli* provenientes de la microbiota intestinal de aves de postura, modifican sus patrones de sensibilidad luego de ser expuestas a un tratamiento oral con florfenicol.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la terapia con florfenicol sobre cepas de *E.coli* aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura.

Objetivos específicos

- 1.- Aislar e identificar cepas de *E. coli* provenientes de la microbiota intestinal de aves de postura.
- 2.- Determinar la sensibilidad frente a florfenicol en cepas de *E. coli* aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura, previamente tratadas con florfenicol.
- 3.- Evaluar la sensibilidad de las cepas de *E.coli* aisladas frente a antimicrobianos con mecanismos de acción semejantes al de florfenicol.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Se trabajó con 14 pollas provenientes de un único criadero de la Región Metropolitana, raza Leghorn, de un día de edad. Durante el estudio fueron mantenidas en un bioterio dentro de las dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las condiciones de crianza de las aves, durante el periodo experimental se llevaron a cabo bajo los preceptos establecidos por el comité de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se realizó un muestreo cloacal en la primera semana de vida, a la totalidad de los individuos con el fin de determinar el nivel basal de susceptibilidad de las cepas de *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de las aves. Dicho grupo se denominó Grupo Control I (GCI).

En la segunda semana de edad fueron separadas en dos grupos en forma aleatoria, Grupo Control II (GCII) constituido por ocho individuos, los cuales recibieron como placebo una dosis de 0,5 mL de agua destilada, utilizando sonda gástrica. El Grupo Florfenicol (GF) constituido por seis individuos, a los cuales se les administró un tratamiento con florfenicol (30 mg/kg p.v.) durante 7 días vía oral, utilizando sonda gástrica con el fin de asegurar la ingesta de la dosis total. Ambos grupos fueron muestreados semanalmente durante siete semanas más.

Las aves tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*. Fueron alimentadas con una dieta libre de antimicrobianos, la que fue elaborada en base a los requerimientos nutricionales para la raza y edad de las aves (NRC, 1994). Para asegurar la ausencia de residuos, los insumos utilizados fueron analizados para pesquisar la presencia de antimicrobianos que puedan interferir en el estudio. El análisis de antimicrobianos presentes en el alimento se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) y contempló: florfenicol, tilosina, ciprofloxacino, enrofloxacino, oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina. Dicho análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET), Universidad de Chile.

2. *Recolección de muestras*

Las muestras fueron obtenidas a nivel cloacal, utilizando tómulas - BD BBL® enriquecidas con medio de transporte Cary-Blair.

3. *Aislamiento e Identificación bacteriana*

Se realizó siembra directa de la tórula con contenido cloacal en placas de agar selectivo e indicador para *E. coli* (agar McConkey). Estas placas fueron incubadas durante 24 horas a 37° C. Finalizada la incubación, se seleccionaron dos colonias lactosa positivas (color rosado) por cada muestra. Se llevó a cabo la confirmación individual de estas colonias mediante el uso de una prueba bioquímica miniaturizada (BBL CRYSTAL™ Enteric/Nonfermenter (E/NF) Identification (ID) System). Las colonias identificadas como *E. coli* fueron traspasadas a caldo Trypticase de Soya; se tomaron 700 µL de este caldo, a los que se adicionaron 300 µL de glicerol estéril para ser conservadas a -20°C.

Durante la recolección de muestras, las aves fueron contenidas por personal capacitado para la manipulación de animales. La toma de muestras se realizó utilizando guantes desechables, pecheras desechable, mangas desechables, mascarillas desechables y botas, previo paso por pediluvio de amonio cuaternario. El contenido fecal no utilizado fue incinerado para su eliminación.

El proceso de aislamiento e identificación bacteriana se llevó a cabo siguiendo como normas de bioseguridad, el trabajo bajo campana de flujo laminar, uso de pecheras desechables, guantes desechables, mangas desechables y mascarillas desechables cuando fuese necesario. Para la eliminación del material contaminado, se llevo a cabo su esterilización mediante el uso de autoclave.

4. *Pruebas de susceptibilidad in vitro de E. coli frente a florfenicol y antimicrobianos con mecanismos de acción semejantes a florfenicol*

La susceptibilidad bacteriana se evaluó mediante el Método de Dilución en Placa, con el fin de determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM); se realizó siguiendo las normas recomendadas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Se utilizaron placas con agar Mueller-Hinton con concentraciones crecientes de antimicrobiano, en un rango de 1 a 256 µg/mL. Para el inóculo de las cepas, se utilizó un multi-inoculador de tipo Steers. Con el fin de realizar suspensiones bacterianas ajustadas, se utilizó como patrón el 0,5 de Mc Farland, lo cual permite la inoculación de $1-2 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colonias por cada mililitro (UFC/mL) aproximadamente.

La gran mayoría de los antimicrobianos utilizados en esta prueba fueron elegidos en base al mecanismo de acción en común de éstos (inhibición de la síntesis proteica), a excepción de la ampicilina (inhibición síntesis pared celular) y del ciprofloxacino (inhibición de la DNA girasa) (Tabla N° 1). Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922. A partir de los muestreos semanales, desde la segunda a la octava semana de vida de las aves, se obtuvieron los porcentajes de resistencia para el GCII y GF.

Para determinar la eficacia “*in vitro*” de los antimicrobianos utilizados se calculó la MIC₅₀ y la MIC₉₀; estos parámetros indican la concentración inhibitoria mínima a la cual el 50 y 90% de las cepas detienen su crecimiento, respectivamente.

Para definir la susceptibilidad de *E. coli*, se utilizaron los parámetros específicos para Enterobacterias, establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006), donde se establecen los puntos de corte para cada antimicrobiano (Tabla N°1), permitiendo así la clasificación de las cepas como sensibles, sensibilidad intermedia o resistentes frente a la droga en particular.

La CLSI no presenta registros de puntos de corte para eritromicina, tilosina y florfenicol en enterobacterias, por lo que fue necesario la obtención de dicho parámetro a partir de publicaciones científicas. Para el caso de la eritromicina, se utilizó el punto de corte para *Campylobacter coli*, determinado por Chen *et al.* (2010); mientras que para tilosina, se usó el punto de corte para *Brachyspira intermedia*, determinado por Hampson *et al.* (2006) y para florfenicol, el determinado por Singer *et al.* (2004).

Tabla N° 1: Antimicrobianos utilizados en las pruebas de sensibilidad y puntos de corte ($\mu\text{g/mL}$) para definir la sensibilidad de Enterobacterias (CLSI, 2006).

Familia	Antimicrobiano	Puntos de corte ($\mu\text{g/mL}$)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Macrólidos	Eritromicina	≤ 8	16	≥ 32
Macrólidos	Tilosina	≤ 1	4	≥ 4
Anfenicoles	Florfenicol	≤ 2	4	≥ 8
Anfenicoles	Cloranfenicol	≤ 8	16	≥ 32
β -lactámicos	Ampicilina	≤ 8	16	≥ 64
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Aminoglucósidos	Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
Aminoglucósidos	Amikacina	≤ 16	32	≥ 64
Tetraciclinas	Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16

5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) que, mediante la prueba de *Hotelling*, compara entre grupos, determinando si existen diferencias significativas entre ellos, cuando $p \leq 0,05$. (Infostat; Di Rienzo, 2008).

Además, los datos obtenidos fueron analizados a través de una prueba de independencia, mediante la distribución de χ^2 , la cual, permite establecer una asociación significativa entre el tratamiento y la presencia de resistencia cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. Niveles de susceptibilidad en cepas de E.coli aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura, previo al tratamiento antimicrobiano (primera semana de vida), GCI

El análisis de los patrones de susceptibilidad de las cepas aisladas desde gallinas durante la primera semana de vida, sin recibir tratamiento antimicrobiano, demostró que estas fueron resistentes a más de un antimicrobiano. Los porcentajes de resistencia frente a los antimicrobianos en estudio fueron: florfenicol (100%), tilosina (100%) y eritromicina (100%); cloranfenicol (32,1%), ciprofloxacino (46,4%) y tetraciclina (57,1%). Las cepas analizadas, registraron bajos niveles de resistencia frente a ampicilina (10,7%), amikacina (3,5%) y gentamicina (7,1%).

En la Tabla N°2 se presentan las CIM₅₀, CIM₉₀ y porcentajes de resistencia de las cepas de *E.coli* aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura durante su primera semana de vida, sin recibir tratamiento antimicrobiano.

Tabla N°2: CIM₅₀, CIM₉₀ y niveles de susceptibilidad de cepas de *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura, durante la primera semana de vida que no han recibido tratamiento antimicrobiano (GCI).

CIM (µg/mL)	Susceptibilidad (n=28)
-------------	------------------------

Antimicrobiano	<i>Punto de corte resistencia</i>	<i>Rango</i>	<i>CIM₅₀^a</i>	<i>CIM₉₀^b</i>	<i>%S^c</i>	<i>%R^d</i>
Ampicilina	≥ 32	2-128	4	16	85,7	10,7
Florfenicol	≥ 8	8-128	16	32	0	100
Cloranfenicol	≥ 32	8-32	16	32	25	32,1
Ciprofloxacino	≥ 4	1-64	1	64	53,5	46,4
Amikacina	≥64	4- >256	16	16	89,2	3,5
Tetraciclina	≥ 16	2-128	16	64	7,1	57,1
Gentamicina	≥ 16	1-32	8	8	39,2	7,1
Eritromicina	≥ 32	64-256	256	256	0	100
Tilosina	≥ 4	>256	>256	>256	0	100

^aCIM a la que se inhibe el crecimiento del 50% de las cepas aisladas; ^bCIM a la que se inhibe el crecimiento del 90% de las cepas aisladas; ^c Porcentaje de cepas sensibles; ^d Porcentaje de cepas resistentes.

2. Niveles de susceptibilidad de cepas de E. coli aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura que no recibieron tratamiento antimicrobiano (hasta la octava semana de vida), GCII

Se mantienen altos niveles de resistencia frente a antimicrobianos como el florfenicol (99,2%), Tilosina (100%) y eritromicina (100%); a su vez, la resistencia a tetraciclina aumento el doble (97,3%) mientras que se detectaron niveles intermedios de resistencia en ampicilina (16%), cloranfenicol (20,5%), ciprofloxacino (22,3%). A su vez, amikacina (6,25%) y gentamicina (7,1%) siguen presentando bajos niveles de resistencia (Tabla N°3).

3. Niveles de susceptibilidad de cepas de E.coli aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura que recibieron tratamiento antimicrobiano con florfenicol (hasta la octava semana de vida), GF

A partir del grupo tratado con florfenicol, se aislaron 2 cepas por cada individuo durante 7 semanas, obteniéndose un total de 84 cepas. La administración del tratamiento generó pequeñas diferencias en los patrones de susceptibilidad a lo largo de las 7 semanas de muestreo, manteniendo un bajo porcentaje de resistencia de las cepas frente a ampicilina (26,1%), mientras que amikacina y gentamicina no registraron cepas resistentes. Por otro lado, las cepas aisladas siguen demostrando altos niveles de resistencia frente a antimicrobianos como florfenicol (100%), tilosina (100%), tetraciclina (69%) y eritromicina

(100%), mientras que estas desarrollaron un aumento en los niveles de resistencia frente a ciprofloxacino (44%), en comparación al GCII. Finalmente, se mantuvieron los niveles intermedios de resistencia frente a cloranfenicol (32,1%) (Tabla N°3).

Respecto al GCII, amikacina y gentamicina mantienen su eficacia *in vitro*, ya que, sus registros de CIM₉₀ siguen siendo menores a los puntos de corte específicos para cada uno de ellos (Tabla N°3).

El análisis de varianza multivariado (MANOVA), arrojó como resultado que existen diferencias significativas en los niveles de susceptibilidad entre grupos. Las cepas del GF presentaron modificaciones en los niveles de susceptibilidad frente a amikacina ($p=0,0287$), ampicilina ($p=0,002$), ciprofloxacino ($p=0,0025$), gentamicina ($p=0,0170$) y tetraciclina ($p=0,0066$); no hubo diferencias significativas en los niveles de susceptibilidad frente a florfenicol.

Se realizó además, una prueba de independencia, mediante la distribución de chi cuadrado (χ^2), con el fin de determinar si existe asociación significativa entre el tratamiento realizado con florfenicol y las modificaciones en los niveles de resistencia en las cepas aisladas. Se observó una asociación significativa entre la administración del tratamiento con florfenicol y la modificación de los niveles de susceptibilidad de cepas de *E.coli*, específicamente frente a amikacina ($\chi^2=5,43$), tetraciclina ($\chi^2=16,8$), gentamicina ($\chi^2=6,35$), ciprofloxacino ($\chi^2=24,1$) y cloranfenicol ($\chi^2=3,91$).

Tabla N°3: CIM₅₀, CIM₉₀ y niveles de susceptibilidad de cepas de *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura que no recibieron tratamiento (GCII) y gallinas que recibieron tratamiento antimicrobiano (GF).

Antimicrobiano	CIM($\mu\text{g/mL}$)					
	GCII (n=112)			GF (n=84)		
	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%R*	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%R*
Ampicilina	4	64	16	8	256	26,1 ^{a, b}
Florfenicol	16	32	99,2	16	32	100
Cloranfenicol	16	64	20,5	16	64	32,1
Ciprofloxacino	1	64	22,3	2	64	44 ^{a, b}
Amikacina	16	32	6,25	16	32	0 ^{a, b}

Tetraciclina	64	256	97,3	16	128	69 ^{a, b}
Gentamicina	8	16	7,1	4	8	0 ^{a, b}
Eritromicina	128	256	100	128	256	100
Tilosina	>256	>256	100	>256	>256	100

*Porcentaje de cepas resistentes, desde la segunda a la octava semana de muestreo.

^a Diferencias significativas entre los niveles de susceptibilidad de cepas entre GCII y GF (análisis MANOVA; $p \leq 0,05$).

^b Asociación significativa entre tratamiento con florfenicol y la modificación de los niveles de susceptibilidad de cepas de *E. coli* (Prueba de independencia, distribución de chi cuadrado; $p \leq 0,05$).

GCII: Grupo Control II; GF: Grupo Florfenicol

4.- Perfiles de multirresistencia de cepas de *E. coli* aisladas desde muestras cloacales de aves de postura

El total de las cepas aisladas de pollas durante la primera semana de edad (GCI) presentaron multirresistencia (resistencia a dos o más antimicrobianos). El patrón de multirresistencia que predominó en este grupo fue de tilosina, eritromicina y florfenicol, alcanzando un 42,8% del total de cepas aisladas (Tabla N°4).

En el GCII se evidenció un 99,1% de multirresistencia, donde predomina el patrón frente a tilosina, eritromicina, florfenicol y tetraciclina, en un 75% de las cepas (Tabla N°4).

El 100% de las cepas pertenecientes a al GF presentaron multirresistencia, siendo más frecuente el perfil frente a tilosina, eritromicina y florfenicol, con un 30,9% del total (Tabla N°4).

Tabla N°4: Perfiles de multirresistencia cepas *E. coli* aisladas desde muestras cloacales de aves de postura.

Perfiles Multirresistencia	GCI (%)	GCII (%)	GF (%)
TIL+ERI	-	0,8	-
TIL+ERI+FF	42,8	1,7	30,9
TIL+ERI+FF+TET	10,7	75	25
TIL+ERI+FF+TET+ CIP	14,2	1,7	11,9
TIL+ERI+FF+TET+ CIP+CLOR	21,4	4,4	5,9
TIL+ERI+FF+TET+ CIP+CLOR+AMP	3,5	8,9	26,1
TIL+ERI+FF+TET+ CIP+CLOR+AMP+GENT	3,5	-	-
TIL+ERI+FF+TET+ CIP+CLOR+AMP+GENT+AMIK	3,5	7,1	-
Resistencia ≥ 3 antimicrobianos	100	99,1	100
Resistencia ≥ 5 antimicrobianos	46,4	22,3	44
Resistencia ≥ 9 antimicrobianos	3,5	7,1	-

TIL: Tilosina, ERI: Eritromicina, FF: Florfenicol, TET: Tetraciclina, CIP: Ciprofloxacino, CLOR: Cloranfenicol, AMP: Ampicilina, GENT: Gentamicina, AMIK: Amikacina.
GCI: Grupo Control I; GCII: Grupo Control II; GF: Grupo Florfenicol.

DISCUSIÓN

Resistencia antimicrobiana y salud pública

El uso de antimicrobianos en animales de producción, es sin duda, una de las principales preocupaciones a nivel mundial ya que puede generar residuos en los alimentos de consumo humano y aumento de la resistencia bacteriana en medicina humana y veterinaria (FAO, 2007).

Es un hecho que el uso inapropiado de antimicrobianos es el principal factor de desarrollo de resistencia bacteriana, por lo que entidades como la Organización Mundial de Sanidad Animal y la Organización Mundial de la Salud, actuando en conjunto, han tomado participación activa en el control de este problema. Estas organizaciones intergubernamentales recomiendan que los antimicrobianos considerados críticos para el tratamiento de personas no sean utilizados en animales de producción.

Para el registro de antimicrobianos, actualmente el Servicio Agrícola y Ganadero exige a la industria farmacológica adjuntar información relativa a la resistencia del antimicrobiano, estudios de MIC₉₀ para patógenos prevalentes y estudios farmacocinéticos (Zambrano, 2007). Adicionalmente, es importante destacar que el expendio de todos los antimicrobianos debe ser bajo receta médica veterinaria (SAG, 2006). Estas medidas se han implementado para enfrentar la emergencia de la resistencia antimicrobiana en nuestro país.

Debido a las características intensivas en las que son criados los animales de producción, específicamente las aves, se generan condiciones favorables para la selección y diseminación de bacterias resistentes. Debido al gran número de individuos que necesitan tratamiento, resulta más eficiente administrar antimicrobianos a través del agua o alimento, determinando así, que animales sanos reciban tratamiento en forma preventiva. Esta situación, determina la emergencia, persistencia y diseminación de grupos bacterianos resistentes. Estos grupos bacterianos pueden colonizar tempranamente el tracto gastrointestinal de aves recién eclosionadas mediante el contacto con detritus del medio ambiente como las nacedoras e incubadoras, medios de transporte, instalaciones avícolas, agua y alimento (Morales, 2007). Esto puede explicar los altos niveles de resistencia presentado en cepas de *E. coli* aisladas en pollas de una semana de edad, sin haber sido expuestas a antimicrobianos, donde se registraron elevados niveles de resistencia intrínseca frente a florfenicol, tilosina, eritromicina y tetraciclina.

Cabe mencionar que *E. coli* es una bacteria ambiental que sirve de reservorio de genes de resistencia por lo que se utiliza como indicadora en los programas de vigilancia de la resistencia bacteriana (Moreno, 2008).

Resistencia a tetraciclinas

Las cepas aisladas del GCII y el GF presentaron altos niveles de resistencia frente a tetraciclina. Estos altos niveles de resistencia coinciden con estudios internacionales, donde países como Francia, Irán, Holanda y Canadá reportan porcentajes de resistencia del 94%, 85%, 71%, 61% y 57%, respectivamente (Gyles, 2008, Salehi y Bonab, 2006), incluyendo cepas de *E. coli* aislada desde gallinas. Tetraciclina es un antimicrobiano ampliamente utilizado en la industria avícola a nivel mundial, siendo esta la principal causa de la selección de bacterias resistentes a este fármaco (Salehi y Bonab, 2006).

La modificación de los patrones de susceptibilidad de cepas de *E. coli* frente a tetraciclina, registró una disminución en la resistencia entre las cepas del GF (69%) en relación al GCII ($\chi^2=16,8$). Sugiriendo que el tratamiento con florfenicol podría desarrollar una presión de selección que elimina un porcentaje de cepas resistentes a tetraciclina, lo que corrobora la importancia de la rotación de antimicrobianos. La rotación de antimicrobianos consiste en la sustitución programada de agentes antimicrobianos para el tratamiento de procesos

infecciosos en un plantel determinado, a través de un ciclo preestablecido, con el fin de disminuir la emergencia y diseminación de resistencia antimicrobiana.

Resistencia a amikacina y gentamicina

Dentro de los antimicrobianos estudiados, amikacina y gentamicina presentaron bajos niveles de resistencia. En las cepas aisladas del GCII, se registraron porcentajes de resistencia de 6,25 y 7,1%, respectivamente, disminuyendo en el GF a 0%. Estos cambios tienen una asociación significativa al tratamiento con florfenicol. Niveles bajos de resistencia a estos antimicrobianos también han sido reportados por otros investigadores. Shen *et al.*, 2002 reportaron niveles de resistencia en *E.coli* para amikacina del 3% y frente a gentamicina de un 0%. Estos bajos niveles de resistencia pueden deberse a que la amikacina es usada principalmente en medicina humana y gentamicina en medicina veterinaria es utilizada exclusivamente por vía parenteral (endovenosa o intramuscular), por lo que, el uso de estos antimicrobianos en la industria avícola es prácticamente nulo (Salehi y Bonab, 2006).

Existió una asociación significativa entre el tratamiento con florfenicol y la disminución en los porcentajes de resistencia de las cepas de *E.coli* frente a amikacina ($\chi^2=5,43$) y gentamicina ($\chi^2=6,35$). Estos resultados indican que el tratamiento con florfenicol, puede generar una presión de selección que favorece la sobrevivencia de bacterias con mayores niveles de sensibilidad frente a estos antimicrobianos.

Resistencia a florfenicol y cloranfenicol

El florfenicol es un antimicrobiano que fue introducido en medicina veterinaria hace aproximadamente 10 años; contribuyó enormemente a la disminución en pérdidas económicas por enfermedades producidas por patógenos como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, entre otros (Shen *et al.*, 2002), sin embargo, rápidamente se desarrollaron altos niveles de resistencia. Li *et al.*, (2007), también registraron altos niveles de resistencia de *E. coli* frente a florfenicol, lo mismo expuesto por Salehi y Bonab (2006). Estos resultados se condicen con los datos obtenidos en nuestra investigación, donde se registraron elevados niveles de resistencia frente a florfenicol en todos los grupos, llamando la atención los altos niveles de resistencia a este antimicrobiano en las aves de un día.

Los altos niveles de resistencia frente a florfenicol en las cepas aisladas desde aves de un día de edad, puede deberse a que, gracias a su gran eficacia frente a patógenos como *E. coli*, el florfenicol es ampliamente utilizado en la industria avícola, desarrollando una presión de selección de bacterias resistentes a este antimicrobiano (Salehi y Bonab, 2006). La resistencia a florfenicol se asocia a la presencia del gen *flo*, que forma parte de plasmidios y transposones, por lo que es fácilmente transferible a otros microorganismos vía vertical u horizontal (Butaye *et al.*, 2003). Estudios recientes han demostrado la presencia de una variante del gen *flo* en *E. coli*, proveniente del plasmidio R55 de *Klebsiella pneumoniae*. La relevancia de este hecho radica en que el plasmidio R55, fue detectado por primera vez en la década del 70, lo que sugiere que la diseminación de cepas de *E. coli* portadoras de la variante del gen de resistencia frente a florfenicol *flo* comenzó mucho antes de la introducción de este antimicrobiano en la industria pecuaria (Hashem *et al.*, 2012).

Se registró un aumento de la resistencia frente a cloranfenicol en el grupo que fue tratado con florfenicol ($\chi^2=3,91$), lo cual se condice con lo expuesto por Berge *et al.* (2005), donde establecen que el tratamiento con florfenicol, se asocia a la selección de cepas de *E. coli* con resistencia a múltiples antimicrobianos, entre ellos, el cloranfenicol.

Tomando en consideración, las altas tasas de resistencia a florfenicol y el aumento de resistencia frente a cloranfenicol en el grupo tratado, es muy probable que las cepas de *E. coli* estén expresando el gen *flo*, el que, confiere resistencia a ambos antimicrobianos. Este gen codifica bombas de eflujo encargadas de remover el florfenicol y cloranfenicol del citoplasma bacteriano y no el mecanismo de resistencia comúnmente conocido hasta el día de hoy para cloranfenicol mediante la síntesis de enzimas denominadas “cloranfenicol acetiltransferasas” (CAT) (White *et al.*, 2000).

Resistencia a ciprofloxacino

El grupo que recibió tratamiento con florfenicol evidenció un aumento significativo a un 44% en los niveles de resistencia en las cepas aisladas ($\chi^2=24,1$). Este hallazgo es sin duda un importante riesgo para la Salud Pública, dado que el ciprofloxacino es un antimicrobiano de uso exclusivo en humanos.

Un hipótesis de lo ocurrido es que, el tratamiento con florfenicol puede estimular la expresión de sistemas de eflujo comunes a múltiples antimicrobianos, uno de estos sistemas es el *AcrB-TolC* presente en *E. coli*. Este sistema de eflujo está involucrado en la resistencia bacteriana

frente a múltiples antimicrobianos; de hecho, es considerado como el sistema que juega el rol más importante en la expresión de fenotipos multirresistentes (Giraud *et al.*, 2000), siendo los β -lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas, acriflavina y trimetropim los antimicrobianos comúnmente afectados por este sistema, aún cuando la bacteria no se halla expuesto a ellos (Giedraitienė *et al.*, 2011).

Estos sistemas de eflujo comunes a múltiples antimicrobianos explicarían en cierta medida, el aumento de resistencia a ciprofloxacino y cloranfenicol después del tratamiento con florfenicol.

Tomando en consideración lo expuesto en esta investigación, se demuestra que en los sistemas productivos es esencial la rotación de antimicrobianos, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollo de resistencia antimicrobiana. Además, es fundamental la creación de políticas gubernamentales en nuestro país para el desarrollo de una red de vigilancia veterinaria de resistencias a antimicrobianos, la cual, proporcione datos fiables y contrastables de los niveles de resistencia a los antimicrobianos en las bacterias presentes en nuestro país.

CONCLUSIONES

- 1.- Los altos niveles de resistencia basal en cepas de *E. coli* aisladas de pollas de 1 semana de edad frente a los antimicrobianos estudiados evidencia el excesivo uso de estos fármacos en el criadero que aportó las aves.
- 2.- Se registraron altos niveles de resistencia en cepas de *E. coli* provenientes de la microbiota intestinal de aves de postura, frente a tetraciclina, eritromicina, tilosina y florfenicol en todos los grupos estudiados.
- 3.- El tratamiento oral con florfenicol modifica los patrones de sensibilidad en cepas de *E.coli* aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura, aumentando la resistencia frente a ciprofloxacino y cloranfenicol y disminuyéndola frente a tetraciclina, amikacina y gentamicina.

BIBLIOGRAFÍA

Alekshun MN, Levy, SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007; 128 (6):1037-1050.

Berge AC, Epperson WB, Pritchard RH. Assessing the effect of a single dose florfenicol treatment in feedlot cattle on the antimicrobial resistance patterns in faecal *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 2005; 36 (5-6): 723–734.

Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2003; 22 (3): 205-210

Calvo J, Martínez-Martínez, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2007; 27(1):44–52.

Chen X, Naren G, Wu C, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet. Microbiol.* 2010; 144 (1-2):133-139.

CODEX ALIMENTARIUS. Informe de la cuarta reunión del grupo de acción intergubernamental especial del codex sobre la resistencia a los antimicrobianos 2011; Disponible

en:<http://www.cclac.org/documentos/TFAMR/2011/1%20Alinorm/REP11_AMs.pdf>.

Acceso: 12 de Febrero de 2012.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2006; 26 (3):182.

DANMAP. Danish Integrated Antimicrobial resistance Monitoring and Research Programme. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. 2009; 136. Disponible: <http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2010.ashx>. Acceso: 20 de Septiembre de 2011.

Da costa PM, Belo A, Gonçalves J, et al. Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. Vet. Microbiol. 2009; 139 (3-4):284-292.

Diarra MS, Silversides FG, Diarrassouba F, et al. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73(20): 6566-6576.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Joint FAO/WHO/OIE expert meeting on critically important antimicrobials. FAO headquarters, Roma 26-30 Noviembre, 2007; 60.

Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas) 2011; 47(3):137-146.

Giraud E, Cloeckaert A, Kerboeuf D, et al. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2000; 44(5):1223–1228.

González G, Mella S, Zemelman R, et al. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev. Méd. Chile* 2004; 132(5): 619-626.

Gyles CL. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Health. Res. Rev.* 2008; 9 (2); 149–158.

Hampson DJ, Oxberry SL, Stephens CP. Antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* isolates from Australian chickens. *Avian. Pathol.* 2006; 35(1):12-16.

Hashem MM, Ramdan A, El Zorda HY, et al. The effect of *Bacillus subtilis* spores – based probiotic and florfenicol on the colonization of *Salmonella enteritidis* in intestine of the broilers. *Sci. J.* 2012; 4(2): 77-85.

Kabir SM. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2010; 7(1):89-114.

Li XS, Wang GQ, Du XD, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular detection of chloramphenicol and florfenicol resistance among *Escherichia coli* isolates from diseased Chickens. *J. Vet. Sci.* 2007; 8(3):243–247.

Mcewen SA, Fedorka-Cray P. Antimicrobial use and resistance in animals. *CID* 2002; 34(3):93-106.

Morales R. Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: Un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Tesis Doctoral. Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona, 2007; 261.

Moreno MA. Red de vigilancia veterinaria de resistencias a antimicrobianos, *in Proceedings*. Conferencia en la Real Academia de Ciencias Veterinarias; 2008; 38-44:7.

NRC. National Research Council. Composition of Feedstuffs Used in Poultry Diets. In: Nutrient requirement on poultry. 9th rev ed. Washington D. C. 1994: 115-142.

Ozaki H, Esaki H, Takemoto K, et al. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. Vet. Microbiol. 2011; 150 (1-2): 132-139.

Ríos A. Biodisponibilidad y metabolismo de un derivado fluorado del tianfenicol en pollos broiler. Tesis Doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, 2004.

Salehi ZT, Bonab FS. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz Province, Iran. Int. J. Poult. Sci. 2006; 5 (7): 677-684.

SAG. Servicio Agrícola y Ganadero. Reglamento de productos farmacéuticos de uso exclusivamente veterinario. 2006. Disponible en: <
<http://www.sag.gob.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GPI TkT XdhRJAS2Wp3v88hCbDmzSZiso5&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=1257>> Acceso: 15 de Junio de 2012.

Singer RS, Patterson SK, Meier AE, et al. Relationship between phenotypic and genotypic florfenicol resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents. Chemother. 2004; 48 (10): 4047–4049.

Shen J, Wu X, Hu D, et al. Pharmacokinetics of florfenicol in healthy and *Escherichia coli*-infected broiler chickens. Res. Vet. Sci. 2002; 73(2): 137–140.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Infect. Control. 2006; 34 (5): 3-10.

White DG, Hudson C, Maurer JJ, et al. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 2000; 38 (12): 4593-4598.

Zambrano F. Resistencia antimicrobiana desafíos de hoy y el futuro. *in Proceedings: Conferencia Virtual "Resistencia Antimicrobiana: Desafíos de Hoy y el Futuro"*, con motivo de la celebración del Día Mundial de la Salud. Santiago, 7 de Abril de 2011; 238. Disponible en: < <http://new.paho.org/chi/images/PDFs/sr.%20fernando%20zambrano%20c.pdf>>. Acceso: 07 Enero de 2012.

Zhao S, Maurer JJ, Hubert S, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Vet. Microbiol.* 2005; 107: 215–224.