



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DE TILOSINA SOBRE LA SENSIBILIDAD DE CEPAS DE
Escherichia coli AISLADAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE
GALLINAS DE POSTURA

MARTÍN PAÚL SEGOVIA TAPIA

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

PROFESOR GUÍA: BETTY SAN MARTÍN NUÑEZ

SANTIAGO, CHILE

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFECTO DE TILOSINA SOBRE LA SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE GALLINAS DE POSTURA

MARTÍN PAÚL SEGOVIA TAPIA

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	DRA. BETTY SAN MARTÍN N.
PROFESOR CONSEJERO:	DRA. CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CONSEJERO:	DRA. LISETTE LAPIERRE A.

SANTIAGO, CHILE

2012

MEMORIA DE TÍTULO

“Tylosin effect on the sensitivity of strains of *Escherichia coli* isolated from the intestinal microbiota of laying hens”

MARTÍN SEGOVIA TAPIA*

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

ABSTRACT

Bacterial resistance is a consequence of microorganism evolutionary process; this process has been increasing together with the consumption of antimicrobials. *Escherichia coli* is used in monitoring programs of bacterial resistance in animal production. This ubiquitous bacterium is found in the intestinal tract and can also be pathogenic. It is potentially able to act as a reservoir of resistance genes that can be transferred to another kind of bacteria. The aim of this study was to evaluate the tylosin effects therapy on the sensitivity of *E. coli* strains isolated from the intestinal microbiota of laying hens. In the study were used 16 one day old chicks divided into two equal groups: control group (group I) and tylosin-treated group (group II). From the first thru the eighth week of age feces samples were taken weekly, and during the second week tylosin treatment was done in group II. To determinate the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) against nine antimicrobials, two strains were isolated from each sample. The results in group II showed a significant increment ($p \leq 0.05$) in the bacterial sensitivity to ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, amikacin and tetracycline. Multiresistance was also found in the isolated strains of both groups. In the group I against florfenicol/chloramphenicol/tylosin/ciprofloxacin/tetracycline/erythromycin was the most frequent and besides those ones, in group II multiresistance to ampicillin was also found. The obtained results in the control group showed that there is a high intrinsic level resistance in *E. coli* strains, which increases together with the use of tylosin in therapeutic doses. These results could be used to set up watching programs of bacterium resistance and also to promote a cautious use of this kind of drug in flock of laying hens, mainly considering the basal levels of bacterial sensitivity.

Key words: Resistance, antimicrobials, *E. coli*, sensitivity, tylosin, poultry.

RESUMEN

La resistencia bacteriana es una consecuencia de los procesos evolutivos propios de los microorganismos, que ha ido aumentando junto con el uso de los antimicrobianos. Una de las bacterias utilizadas en los programas de monitoreo de resistencia bacteriana en animales de producción es *Escherichia coli*, especie ubicua en el tracto intestinal y que puede además comportarse como bacteria patógena, tiene la capacidad potencial de actuar como reservorio de genes de resistencia que pueden ser transferidos a otro tipo de bacterias. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la terapia con tilosina sobre la sensibilidad de cepas de *E. coli* aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura. Se utilizaron 16 pollitas de un día de edad divididas en dos grupos iguales: grupo control (grupo I) y grupo tratado con tilosina (grupo II). Se tomaron muestras de heces semanales desde la primera a la octava semana de edad y se realizó el tratamiento con tilosina en el grupo II durante la segunda semana. De cada muestra se aislaron dos cepas para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CIM) frente a nueve antimicrobianos. Los resultados obtenidos en el grupo II mostraron un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la resistencia bacteriana frente a ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacino, amikacina y tetraciclina. Además, se encontró multiresistencia en las cepas aisladas de ambos grupos, siendo el patrón florfenicol/cloranfenicol/tilosina/ciprofloxacino/tetraciclina/eritromicina el más observado en el grupo I y a éstos se sumó ampicilina en el grupo II. Los datos obtenidos en el grupo control, demostraron que existe un alto nivel de resistencia intrínseco en cepas de *E. coli*, el cual aumenta con el uso de tilosina en dosis terapéutica. Estos resultados podrían servir para instaurar programas de vigilancia de resistencia bacteriana y fomentar el uso prudente de estos fármacos en planteles de gallinas ponedoras, considerando fundamentalmente los niveles basales de sensibilidad bacteriana.

Palabras clave: Resistencia, antimicrobianos, *E. coli*, sensibilidad, tilosina, aves.

INTRODUCCIÓN

Entre las especies bacterianas presentes en la microbiota intestinal de las aves, *Escherichia coli* (*E. coli*) es una de las más ampliamente estudiadas, ya que puede comportarse como bacteria comensal o patógena, tanto en seres humanos como animales. Particularmente en las aves de producción, *E. coli* es considerada un importante patógeno, pudiendo causar enfermedades tales como colibacilosis e inflamación de los sacos aéreos, generando grandes pérdidas económicas a la industria (Amit-Romach y col., 2004).

Por otra parte, en su rol como bacteria comensal, y junto a *Enterococcus* spp. es comúnmente utilizada para monitorear la resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos utilizados en medicina veterinaria y humana, ya que se encuentran entre los géneros más numerosos en el ciego de las aves y tienen la capacidad potencial de actuar como reservorios de genes de resistencia que pueden ser transferidos a otro tipo de bacterias (Fairchild y col., 2005).

La resistencia bacteriana, descrita como la capacidad que tiene una bacteria de multiplicarse en presencia de concentraciones antimicrobianas superiores a la concentración mínima inhibitoria definida para su especie frente a un antimicrobiano en particular, es un fenómeno natural producto del uso de estas drogas (McEwen y Fedorka-Cray, 2002). Ésta puede ser intrínseca, cuando ha sido expuesta a un determinado antimicrobiano, o adquirida, cuando no lo ha sido (Fajardo & Martínez, 2008).

La transmisibilidad de factores de resistencia puede dar lugar a un problema aún mayor, la multiresistencia (Errecalde, 2004); la cual ocurre por la acumulación de material genético exógeno incluido en plasmidios, transposones conjugativos o integrones que codifican la resistencia a un antimicrobiano específico y/o por la acción de bombas de eflujo multidroga, las cuales pueden bombear más de un tipo de antimicrobiano. En algunas especies Gram negativas, estos mecanismos pueden ser potenciados por la disminución de permeabilidad en la membrana externa (Nikaido, 2009).

Otro importante mecanismo de resistencia bacteriana es la alteración o inactivación enzimática de la estructura química de los antimicrobianos. El ejemplo más clásico de inactivación enzimática es la hidrólisis del anillo β -lactámico de las penicilinas y cefalosporinas llevada a cabo por la enzima hidrolítica β -lactamasa, presente en bacterias resistentes a β -lactámicos (Walsh, 2000).

Por otra parte, existen cepas bacterianas que alteran la conformación molecular del blanco de acción del antimicrobiano. Un ejemplo de esto son las mutaciones en la enzima bacteriana DNA girasa que determinan la resistencia a fluoroquinolonas (Jacoby, 2005).

La protección del sitio blanco es otro mecanismo de resistencia que está representado fundamentalmente por la proteína Qnr, la misma que confiere resistencia a quinolonas en bacterias Gram negativas. Esta proteína, codificada en plasmidios e integrones protege la girasa y probablemente la topoisomerasa IV, de la acción inhibitoria de las quinolonas (Nordmann & Poirel, 2005).

En cuanto al uso de antimicrobianos, los más utilizados en producción avícola como agentes terapéuticos y/o profilácticos son: amoxicilina, sulfonamidas, tilosina, fluoroquinolonas, lincosamidas, aminoglicósidos, tetraciclinas, colistinas y pleuromutilinas (Gyles, 2008).

Los macrólidos, como la tilosina, se utilizan para el control de las enfermedades respiratorias crónicas causadas principalmente por bacterias Gram positivas. La tilosina evita la síntesis de proteínas al unirse al 23S RNA de la subunidad ribosomal 50S. En Chile el uso de estos fármacos sólo se encuentra autorizado en pollos broiler, con algunas excepciones para gallinas de postura (aquellas aves en etapa de crianza o cuyos huevos no sean destinados a consumo humano) (SAG, 2005).

Considerando que las bacterias pueden adquirir genes de resistencia vía horizontal mediante elementos genéticos móviles de otras bacterias que pueden o no ser del mismo género, es importante determinar si la terapia con tilosina afecta los perfiles de resistencia bacteriana en cepas de *E. coli* presentes en el tracto intestinal en aves de postura.

HIPÓTESIS

Los patrones de sensibilidad de *E. coli*, bacteria comensal de la microbiota intestinal, cambian después de aplicar una terapia con tilosina en gallinas de postura.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la terapia con tilosina sobre la sensibilidad de cepas de *Escherichia coli* provenientes de la microbiota intestinal de gallinas de postura.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Aislar y caracterizar cepas de *E. coli* desde el contenido fecal a nivel cloacal de gallinas de postura.
- 2.- Realizar estudios de sensibilidad de las cepas de *E. coli* frente a tilosina.
- 3.- Evaluar la sensibilidad de las cepas de *E. coli* frente a otros antimicrobianos que tengan mecanismos de acción semejante a tilosina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Grupo de animales: se utilizaron 16 pollitas Leghorn, adquiridas de un día de edad. Las pollitas fueron seleccionadas al azar e identificadas con un crotal colocado en una de sus extremidades, para después ser distribuidas en dos grupos de ocho aves cada uno. El grupo I se utilizó como grupo control y el grupo II fue tratado con tilosina. Las pollitas fueron criadas en el pabellón experimental del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las condiciones de crianza de las aves durante el período experimental se llevaron a cabo bajo los preceptos establecidos por el comité de Bioética y Bienestar Animal de la misma facultad. La dieta fue elaborada en base a los requerimientos nutricionales para la raza recomendados por el *National Research Council* (NRC,

1994), y además se descartó la presencia de antimicrobianos efectuando un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para: tilosina, florfenicol, oxitetraciclina, enrofloxacino, ciprofloxacino, ácido oxolínico y flumequina. Los análisis fueron realizados en el laboratorio de farmacología (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La dosis de tilosina utilizada fue la recomendada por el fabricante, 35 mg/kg pv/ave, disuelta en agua destilada. El tratamiento se realizó durante siete días, en la segunda semana de estudio y se administró mediante sonda gástrica, para asegurar que la dosis recibida por cada ave fuera la indicada. Para el grupo control se tomaron las mismas medidas administrando agua destilada en dosis de 0,5 ml.

Recolección de muestras: utilizando tómulas estériles (BD BBL®) enriquecidas con medio de transporte Cary Blair, se tomaron muestras de heces semanales a nivel cloacal desde la primera a la octava semana de estudio, aislando dos cepas de cada muestra (n= 256). Las cepas aisladas durante la primera semana (n=32) fueron utilizadas para determinar el nivel basal (NB) de resistencia antimicrobiana de la población de *E. coli*.

Aislamiento y caracterización de las cepas de *E. coli*: las bacterias recolectadas con tómulas se sembraron directamente en placas de agar McConkey como medio selectivo e indicador, y posteriormente fueron incubadas en una estufa de cultivo a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 24 horas. Finalizada la incubación se seleccionaron dos colonias sospechosas (lactosa positiva). Las cepas fueron verificadas mediante el kit BBL CRYSTAL™ para microorganismos entéricos y no fermentadores. La lectura de resultados se realizó con el software BBL CRYSTAL MIND. Las cepas aisladas e identificadas fueron almacenadas en tubos con medio Tripticasa Soya Base (TSB) y glicerol al 15%. Posteriormente se congelaron a -20 °C .

Pruebas de sensibilidad *in vitro*: las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) fueron determinadas usando el método de dilución en placa, siguiendo las normas recomendadas por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) y por el *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP, 2005). Se utilizaron

placas de agar Mueller-Hinton con concentraciones crecientes de antimicrobiano en un rango de 1-256 µg/ml. Se prepararon suspensiones de cada cepa en estudio, las cuales fueron ajustadas con suero fisiológico hasta alcanzar la turbidez estándar de 0,5 de Mc Farland. Las placas fueron inoculadas con un multinoculador de Steers, que aplica una alícuota de 1-2 µl de cada suspensión, con una concentración de $1-2 \times 10^8$ UFC (Unidades Formadoras de Colonia)/ml, y posteriormente se incubaron por 18-20 horas a 37°C. Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922.

Las CIM fueron interpretadas usando los puntos de corte definidos por el CLSI (2006), el DANMAP (2005) y para tilosina se tomó el punto de corte usado en un estudio previo por Schwaiger y col., (2010), los cuales se describen a continuación: ampicilina (AMP), 32 µg/ml; florfenicol (FF), 8 µg/ml; cloranfenicol (CHL), 32 µg/ml; tilosina (TLS), 4 µg/ml; ciprofloxacino (CIP), 4 µg/ml; amikacina (AMK), 64 µg/ml; tetraciclina (TET), 16 µg/ml; gentamicina (GEN), 16 µg/ml y eritromicina (ERI), 32 µg/ml.

Análisis estadístico: se realizó un análisis de frecuencia para determinar el porcentaje de cepas resistentes a cada antimicrobiano en ambos grupos. Además, se hizo un análisis de varianza multivariado usando la prueba de Hotelling corregida por Bonferroni con un $\alpha=0,05$, con la finalidad de determinar si existieron diferencias significativas entre las cepas del grupo I y II, así como también entre las aves de cada grupo. Para procesar los datos se utilizó el *Software InfoStat* versión 2008 (Di Rienzo y col., 2008). Las CIM del grupo control fueron comparadas con las del grupo tratado con tilosina frente a los nueve antimicrobianos, siendo los valores con $p \leq 0,05$ significativos.

Finalmente, para comparar los porcentajes de sensibilidad entre ambos grupos, se realizó una prueba de independencia utilizando la distribución de chi cuadrado (χ^2); se consideró un nivel de confianza del 95%, permitiendo establecer si existe una relación significativa entre el tratamiento con tilosina y la presencia de resistencia.

RESULTADOS

1.- Niveles de sensibilidad de cepas de *E. coli* aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura durante la primera semana de vida.

Los resultados del estudio de frecuencia realizado a las cepas bacterianas aisladas de heces de las 16 pollitas durante la primera semana de edad, demostraron un 100% de susceptibilidad frente a amikacina.

Se presentaron niveles de resistencia bajos frente a ampicilina y a gentamicina, siendo éstos de 9,38% y 6,25% respectivamente. Mientras que a cloranfenicol fue de 28,13%, a ciprofloxacino de 59,38% y a tetraciclina del 75%. Por otra parte, la resistencia frente a florfenicol, tilosina y eritromicina fue del 100%. Para el estudio, estos valores se consideraron como niveles basales de resistencia (Tabla 1).

2.- Niveles de sensibilidad de cepas de *E. coli* provenientes de gallinas de postura sin tratamiento antimicrobiano (grupo I).

Los resultados obtenidos en el grupo I, utilizado como control durante todo el estudio, demostraron que los porcentajes de resistencia para algunos antimicrobianos varían a medida que las aves van creciendo. Por lo tanto, al comparar el porcentaje de resistencia promedio de cada antimicrobiano desde la segunda a la octava semana con el porcentaje del nivel basal de resistencia de la primera semana de edad, se observaron pequeñas diferencias en la mayoría de ellos, con excepción de la resistencia a ciprofloxacino cuyo nivel fue considerablemente más bajo en el grupo I (Tabla 1).

3.- Niveles de sensibilidad de cepas de *E. coli* provenientes de gallinas de postura tratadas con tilosina (grupo II).

Los resultados obtenidos del análisis de varianza multivariado, donde se comparon las CIM de cada cepa frente a cada antimicrobiano entre el grupo I y el grupo II revelaron que existen

diferencias significativas en ampicilina ($p=0,0012$), ciprofloxacino ($p=0,0217$), amikacina ($p=0,0086$), tetraciclina ($p=0,0046$), gentamicina ($p=0,0086$) y eritromicina ($p=0,0004$); mientras que para florfenicol, cloranfenicol y tilosina no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre las aves de ambos grupos.

Con el objetivo de establecer la posible asociación entre el uso de tilosina y la presencia de resistencia en las cepas de *E. coli*, se realizó la prueba de independencia mediante la distribución de χ^2 entre las cepas aisladas del grupo I y grupo II, la cual señaló un aumento significativo en cinco de los nueve antimicrobianos evaluados.

Los antimicrobianos que presentaron un aumento de resistencia significativo fueron: ampicilina ($\chi^2=30,35$) de 5,35% en el grupo I a 28,58% en el grupo II, cloranfenicol ($\chi^2=45,03$) de 23,22% en el grupo I a 32,15% en el grupo II, ciprofloxacino ($\chi^2=37,04$) de 22,34% en el grupo I a 62,52% en el grupo II, amikacina ($\chi^2=9,41$) de 0% en el grupo I a 8,05% en el grupo II y tetraciclina ($\chi^2=12,91$) de 83% en el grupo I a 97,34% en el grupo II.

Por otra parte, los antimicrobianos que presentaron un leve aumento de su resistencia, siendo ésta no significativa ($p\leq 0,05$), fueron: florfenicol, gentamicina, tilosina y eritromicina. Cabe mencionar que las cepas aisladas frente a los macrólidos tilosina y eritromicina, mantuvieron su alto nivel de resistencia del 100% en ambos grupos (Tabla 1).

Tabla 1. Sensibilidad antimicrobiana de aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de heces recolectadas de aves de postura con y sin tratamiento antimicrobiano.

Antimicrobianos Punto de Corte (µg/ml)	Aislados resistentes (%)		
	NB n=32	Grupo I n=112	Grupo II n=112
Ampicilina ≥ 32	9,38	5,35	28,58 *
Florfenicol ≥ 8	100,00	99,10	100,00
Cloranfenicol ≥ 32	28,13	23,22	32,15 *
Tilosina ≥ 4	100,00	100,00	100,00
Ciprofloxacino ≥ 4	59,38	22,34	62,52 *
Amikacina ≥ 64	0,00	0,00	8,05 *
Tetraciclina ≥ 16	75,00	83,00	97,34 *
Gentamicina ≥ 16	6,25	2,70	5,38
Eritromicina ≥ 32	100,00	100,00	100,00

*: Diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre las cepas resistentes del grupo I y el grupo II.

NB: Nivel Basal de resistencia.

n: número de cepas aisladas.

4.- Determinación de Multiresistencia.

Al revisar los fenotipos de resistencia frente a diferentes antimicrobianos en las cepas de *E. coli* provenientes de gallinas de postura sin tratamiento (grupo I), éstas fueron multiresistentes a seis, siete y hasta ocho antimicrobianos, de los cuales, los más recurrentes fueron: florfenicol, cloranfenicol, tilosina, ciprofloxacino, tetraciclina y eritromicina, y los menos frecuentes ampicilina y gentamicina (Tabla 2).

Tabla 2. Fenotipos multiresistentes observados en 112 aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de heces recolectadas de ocho aves de postura sin tratamiento antimicrobiano (grupo I).

N° de aislados	112						
Edad (semanas)	Segunda	Tercera	Cuarta	Quinta	Sexta	Séptima	Octava
Antimicrobiano							
FF, CHL, TLS, CIP, TET, ERI		68	73	66			
FF, CHL, TLS, CIP, TET, GEN, ERI	74						60
AMP, FF, CHL, TLS, CIP, TET, ERI					70		
AMP, FF, CHL, TLS, CIP, TET, GEN, ERI						77	

AMP=ampicilina; FF=florfenicol; CHL=cloranfenicol; TLS=tilosina; CIP=ciprofloxacino; TET=tetraciclina; GEN=gentamicina; ERI=eritromicina.

Por otra parte, las cepas de *E. coli* provenientes de gallinas de postura que recibieron tratamiento con tilosina (grupo II) demostraron ser multiresistentes a siete, ocho y hasta a nueve antimicrobianos, de los cuales florfenicol, cloranfenicol, tilosina, ciprofloxacino, tetraciclina y eritromicina fueron los más recurrentes y los menos frecuentes ampicilina y gentamicina, además a éstas se sumó amikacina, que no presentó resistencia en el grupo I (Tabla 3).

Tabla 3. Fenotipos multiresistentes observados en 112 aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de heces recolectadas de ocho aves de postura del grupo tratado con tilosina (grupo II).

N° de aislados	112						
Edad (semanas)	Segunda	Tercera	Cuarta	Quinta	Sexta	Séptima	Octava
Antimicrobiano							
AMP, FF, CHL, TLS, CIP, TET, GEN, ERI					81	80	
FF, CHL, TLS, CIP, TET, GEN, ERI							69
AMP, FF, CHL, TLS, CIP, AMK, TET, ERI		84	91	89			
AMP, FF, CHL, TLS, CIP, AMK, TET, GEN, ERI	104						

AMP=ampicilina; FF=florfenicol; CHL=cloranfenicol; TLS=tilosina; CIP=ciprofloxacino; AMK=amikacina; TET=tetraciclina; GEN=gentamicina; ERI=eritromicina.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la presencia de un elevado nivel basal de resistencia en las cepas de *E. coli* aisladas de muestras de heces recolectadas de pollitas de una semana de edad, frente a los antimicrobianos más usados en producción avícola. Los mismos señalan la existencia de un alto nivel de resistencia intrínseca en los planteles de producción de aves de postura.

Considerando que los dos grupos fueron alimentados con una dieta libre de antimicrobianos desde el primer día de edad, se puede suponer que la resistencia presente en estas aves estaría dada por mecanismos de transmisión vertical desde sus padres (Bortolaia y col., 2010) o por bacterias ambientales resistentes, a las cuales están expuestas desde su eclosión (Lu y col., 2003). Estos altos niveles de resistencia podrían estar dados por el amplio uso de antimicrobianos en la industria avícola nacional, situación que también ha sido descrita en otros países (EFSA, 2012).

En relación al antimicrobiano ampicilina, representante de la familia de los β -lactámicos, se encontró un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la resistencia en el grupo II. Este fenómeno podría explicarse por el aumento en la expresión de bombas de eflujo y/o la disminución de la expresión de porinas, determinada por la presencia de tilosina. Se describe que las bacterias Gram negativas presentan resistencia intrínseca frente a β -lactámicos, la cual está dada por la barrera de permeabilidad de la membrana externa y por bombas de eflujo multidroga. La expresión de bombas de eflujo ha sido recientemente señalada como un mecanismo importante de resistencia a β -lactámicos y a otros antimicrobianos incluyendo a los macrólidos (Li y col., 2007). Principalmente las bombas de eflujo pertenecientes a la familia RND (*Resistance Nodulation Cell Division*) presentes en bacterias Gram negativas como *E. coli* (Alekhshun & Levy, 2007). Además, existen cientos de β -lactamasas como AmpC, enzima encontrada en muchas especies de enterobacterias, la cual es codificada en genes localizados en plasmidios y transposones, así como a nivel cromosómico, pudiendo ser transferidos a otras bacterias (Alekhshun & Levy, 2007).

En el caso de la sensibilidad frente a ciprofloxacino, fluoroquinolona de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, se observó que el grupo I presentó niveles altos de resistencia (22,3%), comparados con los niveles reportados en la literatura internacional, que indica una resistencia a ciprofloxacino en aves no medicadas, de alrededor del 4% (Bywater y col., 2004). Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en Chile en el año 2005 por San Martín y col., quienes encontraron niveles de resistencia a ciprofloxacino del orden de 20,4% en las cepas de *E. coli* provenientes de aves. Por otra parte, el grupo II presentó niveles de resistencia aún más altos (62,5%), similares a los descritos por Lee y col. (2005), quienes reportaron altos niveles de resistencia a ciprofloxacino (60,2%) en 128 aislados de *E. coli* en pollos, ésto podría deberse a que los genes de resistencia que se expresan frente a tilosina se comparten con los genes de resistencia frente a fluoroquinolonas. La FDA (*Food and Drug Administration*) prohibió el uso de estos antimicrobianos como resultado del aumento de la resistencia a fluoroquinolonas en *Campylobacter* spp. (McEwen y Fedorka-Cray, 2002), bacteria zoonótica responsable junto a *Salmonella* spp. de infecciones agudas del tracto intestinal en humanos.

En el caso de los macrólidos como eritromicina y tilosina, la resistencia fenotípica que presentaron las cepas de *E. coli* en ambos grupos fue de un 100%, resultado esperable ya que estos antimicrobianos se utilizan ampliamente contra bacterias Gram positivas. Entonces, en una bacteria Gram negativa como *E. coli* su efecto es menor, ya que estas bacterias poseen bombas de eflujo codificadas cromosómicamente que contribuyen a la resistencia intrínseca a una gran variedad de antimicrobianos, incluyendo los macrólidos (Leclercq, 2002).

El grupo II presentó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de resistencia a tetraciclina, confirmando que el uso de tilosina estaría relacionado con el aumento de resistencia a tetraciclinas. La literatura internacional señala que existe relación especialmente entre los genes de resistencia a macrólidos con genes de resistencia a tetraciclinas. Estos genes de multiresistencia estarían ubicados en los mismos elementos genéticos móviles, es así como genes de resistencia para macrólidos que incluyen metilasas codificadas por genes del tipo *erm* pueden encontrarse unidos a genes de resistencia a tetraciclina del tipo *tet* dentro de plasmidios y/o transposones transfiriéndose en forma conjunta (Roberts, 2004; Hummel y col., 2007).

En cuanto a la resistencia fenotípica frente a anfenicoles como cloranfenicol, ésta presentó niveles moderados en ambos grupos, aún cuando su uso fue prohibido en animales cuyos productos o subproductos estén destinados a la alimentación humana (SAG, 1996), ya que podría inducir anemia aplásica. Estos niveles de resistencia pueden estar dados por el uso de otro miembro de esta familia, como lo es florfenicol (Harada y col., 2006), ya que existe resistencia cruzada dentro de la misma. Por otra parte, florfenicol presentó niveles de resistencia altos en ambos grupos por lo que no se pudo estimar la relación entre el uso de tilosina y la generación de resistencia a este antimicrobiano.

En el caso de los aminoglucósidos, amikacina y gentamicina presentaron niveles bajos de resistencia antimicrobiana, similares a los reportados por San Martín y col. (2005). En el caso de amikacina, el grupo sin tratamiento fue 100% sensible, mientras que el grupo tratado con tilosina presentó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la resistencia. Por otra parte, gentamicina presentó un leve incremento de resistencia en el grupo II el cual no fue estadísticamente significativo. Por

lo tanto ambos antimicrobianos siguen siendo una buena alternativa terapéutica en infecciones bacterianas producidas por *E. coli*.

En cuanto al estudio de la multiresistencia en ambos grupos, el alto número de cepas que fueron resistentes frente a dos o más antimicrobianos, señala que el fenómeno de multiresistencia descrito a nivel mundial, no es ajeno en nuestro país. Se observaron cepas resistentes a ocho antimicrobianos en el grupo que no recibió tratamiento y a nueve antimicrobianos en el grupo tratado con tilosina. El patrón de resistencia más observado se presentó frente a: florfenicol/tilosina/eritromicina/tetraciclina/ampicilina/cloranfenicol/ciprofloxacino. En Japón, Ozaki y col., (2011) estudiaron la sensibilidad de cepas de *E. coli* aisladas de heces de pollos broiler, encontrando una multiresistencia frente a dos y siete drogas en cuatro granjas, siendo uno de los patrones más frecuentes ampicilina/oxitetraciclina/ cloranfenicol/enrofloxacino/ácido nalidíxico.

Es importante mencionar que la aplicación de un antimicrobiano en forma terapéutica, no solo puede resultar en la selección directa de resistencia a la droga utilizada, sino también en el desarrollo de resistencia cruzada (resistencia a varios antimicrobianos estructuralmente relacionados) y de coresistencia (resistencia a varios antimicrobianos estructuralmente no relacionados) (Schwarz y col., 2001, Catry y col., 2003).

Este estudio demostró que existen altos niveles de resistencia en los aislados de *E. coli*, los cuales aumentaron con el uso de tilosina en dosis terapéutica. Por lo tanto, es de suma importancia fomentar el uso prudente de antimicrobianos a nivel nacional, con el fin de que éstos continúen siendo una herramienta útil en el control de enfermedades tanto en animales como en el hombre.

A corto plazo, resulta fundamental la creación de un programa de vigilancia de resistencia bacteriana en plantales de gallinas ponedoras, el mismo que permita identificar y controlar la presencia de organismos patógenos, indicadores y zoonóticos, considerando especialmente los niveles basales de sensibilidad bacteriana, permitiendo así, mejorar los niveles de producción del sector avícola.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue posible gracias al financiamiento otorgado por el Laboratorio de Farmacología (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Agradezco a todos los profesionales, técnicos y funcionarios de FARMAVET que aportaron para la realización de esta memoria de título.

BIBLIOGRAFÍA

ALEKSHUN, M.; LEVY, S. 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 128: 1037-1050.

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

BORTOLAIA, V.; BISGAARD, M.; BOJESEN, A. 2010. Distribution and possible transmission of ampicillin and nalidixic acid resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. *Vet. Microbiol.* 142: 379-386.

BYWATER, R.; DELUYKER, H.; DEROOVER, E.; DE JONG, A.; MARION, H.; McCONVILLE, M.; ROWAN, T.; SHRYOCK, T.; SHUSTER, D.; THOMAS, V.; VALLÉ, M.; WALTERS, J. 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 744-754.

CATRY, B.; LAEVENS, H.; DEVRIESE, L.A.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. 2003. Antimicrobial resistance in livestock, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26(2): 81-93.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement (M100-S16). CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA. ISBN 1-56238.

DANMAP (Danish Programme for Surveillance of Antimicrobial Resistance). 2005. Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark, ISSN 1600–2032.

DI RIENZO, J.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

EFSA (European Food Safety Authority). 2012. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. EFSA J. 10(3): 2598.

ERRECALDE, J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. FAO. Producción y Salud Animal. 162: 1014-1200.

FAIRCHILD, A.; SMITH, J.; IDRIS, U.; LU, J.; SÁNCHEZ, S.; PURVIS, L.; HOFACRE, C.; LEE, M. 2005. Effects of Orally Administered Tetracycline on the Intestinal Community Structure of Chickens and on *tet* Determinant Carriage by Commensal Bacteria and *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 5865-5872.

FAJARDO, A.; MARTÍNEZ, J. 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. Curr. Opin. Microbiol. 11: 161-167.

GYLES, C. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. Anim. Health Res. Rev. 9(2): 149-158.

HARADA, K.; ASAI, T.; KOJIMA, A.; ISHIHARA, K.; TAKASHI, T. 2006. Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *Am. J. Vet. Res.* 67(2): 230–235.

HUMMEL, A.; HOLZAPAPFEL, W.; FRANZ, CH. 2007. Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30(1): 1-7.

JACOBY, G. 2005. Mechanisms of resistance to quinolonas. *Clin. Inf. Dis.* 41: 120-126.

LECLERCQ, R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Inf. Dis.* 34: 482–492.

LEE, Y.; CHO, J.; KIM, K.; TAK,R.; KIM, A.; KIM, J.; IM, S.; KIM, B. 2005. Fluoroquinolone resistance and gyrA and parC mutation of *Escherichia coli* isolated from chicken. *J. Microbiol.* 43: 391-397.

LI, X.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. 2007. β -lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet. Microbiol.* 121: 197-214.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.; LEE, M. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6816-6824.

McEWEN, S.; FEDORKA-CRAY, P. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Inf. Dis.* 34(3): 93-106.

NIKAIDO, H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78: 119–146.

NORDMANN, P.; POIREL, L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 463-469.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). 1994. Nutrients of poultry. Ninth Revised Edition. National Academy Press. Washington, D.C.

OZAKI, H.; ESAKI, H.; TAKEMOTO, K.; IKEDA, A.; NAKATANI, Y.; SOMEYA, A.; HIRAYAMA, N.; MURASE, T. 2011. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Vet. Microbiol.* 150: 132-139.

ROBERTS, M. 2004. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Mol. Biotechnol.* 28:47–62.

SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, Chile). 1996. Resolución Exenta N° 3599 del 29 de noviembre del 2006.

SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, Chile). 2005. Decreto N° 25. Reglamento de Productos Farmacéuticos de uso exclusivamente veterinario. Título II. Del Registro Sanitario de los Productos.

SAN MARTÍN, B.; CAMPOS, L.; BRAVO, V.; ADASNE, M.; BORIE, C. 2005. Evaluation of Antimicrobial resistance using indicator bacteria isolated from pigs and poultry in Chile. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 3(2): 171-178.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17(6): 431–437.

SCHWAIGER, K.; SCHMIED, V.; BAUER, J. 2010. Comparative analysis on antibiotic resistance characteristics of *Listeria* spp. and *Enterococcus* spp. isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany. *Zoonoses Public Health.* 57: 171-180.

WALSH C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* 406: 775-781.