



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



**“EFECTO DEL ENROFLOXACINO SOBRE LA COMPOSICIÓN Y SENSIBILIDAD DE LA MICROBIOTA INTESTINAL
EN GALLINAS DE POSTURA”**

Javier Ignacio Lobos González

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

Profesor Guía: Dra. Betty San Martín N.

SANTIAGO-CHILE

2012

Agradecimientos

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer por este logro, por miedo a olvidarme de alguna no voy a mencionarlas una a una así que simplemente lo resumo en gracias a mis familias por el apoyo continuo pero principalmente por la paciencia y no haber perdido nunca la fe en mi.

ÍNDICE

	Página
Índice de Tablas y Gráficos.....	4
Resumen.....	5
Summary.....	6
Introducción.....	7
Revisión Bibliográfica.....	8
Características de la microbiota normal en aves.....	8
Principales enfermedades bacterianas en las aves.....	9
Consecuencias del uso de antimicrobianos sobre la microbiota intestinal.....	10
Multirresistencia.....	11
Quinolonas y fluoroquinolonas.....	12
Objetivos.....	13
Material y Método.....	14
Animales en estudio.....	14
Obtención de muestras.....	14
Aislamiento de cepas bacterianas y análisis de sensibilidad.....	15
Prueba de sensibilidad <i>in vitro</i>	16
Preparación e inoculación de Suspensiones Bacterianas.....	16
Lectura e interpretación de resultados.....	17
Análisis Estadístico.....	17
Resultados	18
Objetivo 1: Evaluar los cambios cuantitativos en las poblaciones de <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp. aisladas de la microbiota intestinal de gallinas ponedoras tratadas con enrofloxacino en dosis terapéuticas	18
1. Recuento de colonias de <i>E. coli</i>	18
2. Recuento de colonias de <i>Enterococcus</i> spp.	19
3. Recuento de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp.	19
Objetivo 2: Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) a 8 antimicrobianos en cepas de <i>Enterococcus</i> spp. y <i>E. coli</i> aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura sometidas a tratamiento con enrofloxacino.....	20
Objetivo 3: Establecer los perfiles de resistencia en <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> aislados desde la microbiota intestinal de gallinas ponedoras sometidas a tratamiento con enrofloxacino.....	21
1. Perfiles de Multirresistencia de <i>E. coli</i>	21
2. Perfiles de Multirresistencia de <i>Enterococcus</i>	23

Discusión.....	24
Aislamiento bacteriano posterior al tratamiento con enrofloxacino.....	24
Resistencia fenotípica de las poblaciones bacterianas.....	25
Multirresistencia.....	27
Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

	Página
Tabla 1: Protocolo para el aislamiento e identificación bacteriana.....	15
Tabla 2: Antimicrobianos utilizados en las pruebas de sensibilidad frente a cepas de <i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.....	17
Tabla 3: Población media de <i>E. coli</i> expresadas como log ₁₀ ufc/g de fecas aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura tratadas con enrofloxacino.....	18
Tabla 4: Población media de <i>Enterococcus</i> spp. expresadas como log ₁₀ ufc/g de fecas aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura tratadas con enrofloxacino....	19
Tabla 5: Población media de <i>Lactobacillus</i> spp. expresadas como log ₁₀ ufc/g de fecas aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura tratadas con enrofloxacino....	19
Tabla 6: Porcentajes de cepas de <i>E. coli</i> resistentes y multirresistentes aisladas de gallinas de postura sometidas a tratamiento con enrofloxacino según día del estudio.....	22
Tabla 7: Perfiles de multirresistencia para las cepas de <i>E.coli</i>	22
Tabla 8: Porcentajes de cepas de <i>Enterococcus</i> spp. resistentes y multirresistentes aisladas de gallinas de postura sometidas a tratamiento con enrofloxacino según día del estudio.....	23
Tabla 9: Perfiles de multirresistencia para las cepas de <i>Enterococcus</i> spp.....	23
Gráfico 1: Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> resistentes a antimicrobianos aisladas de gallinas sometidas a tratamiento con enrofloxacino según día de muestreo.....	20
Gráfico 2: Porcentaje de cepas de <i>Enterococcus</i> spp. resistentes a antimicrobianos aisladas de gallinas sometidas a tratamiento con enrofloxacino según día de muestreo.....	21

RESUMEN

La microbiota intestinal corresponde a las poblaciones bacterianas que habitan en el sistema gastrointestinal de los animales y humanos, esta participa directamente en la estimulación del sistema inmune, en la síntesis de vitaminas y en la inhibición de poblaciones bacterianas nocivas para el huésped.

En la producción avícola destaca el uso de variados antimicrobianos para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, el efecto de estos antimicrobianos sobre la microbiota intestinal en términos de resistencia y variaciones poblacionales ha sido escasamente estudiado en aves de postura.

Por esto es que el objetivo del presente trabajo fue estudiar la variación de poblaciones intestinales de *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. en aves de postura expuestas a un tratamiento con enrofloxacino y además medir la variación en los niveles de resistencia bacteriana en las poblaciones de *E. coli* y *Enterococcus* spp. en su rol de bacterias indicadoras de resistencia.

Se utilizaron 30 gallinas ponedoras raza leghorn las cuales fueron separadas en un grupo tratado (n=15) y control (n=15), el grupo tratado recibió enrofloxacino 5% por vía oral y el grupo control un placebo (agua destilada) durante 10 días. A los 3, 7 y 15 días posteriores al tratamiento se obtuvieron muestras de contenido intestinal a partir de íleon y ciego de los animales, las cuales se sembraron y cultivaron en los diferentes medios de cultivo para el posterior conteo de colonias intestinales. A partir de estas muestras se aislaron 99 cepas de *E. coli* y 90 cepas de *Enterococcus* spp. para el análisis de la variación en los niveles de resistencia frente a amoxicilina, cefotaxima, enrofloxacino, ácido nalidíxico, estreptomina, oxitetraciclina y sulfametoxazol + trimetoprim para *E. coli*; y frente a amoxicilina, enrofloxacino, eritromicina y oxitetraciclina para *Enterococcus* spp.

En el caso del conteo de colonias bacterianas solo se encontraron diferencias significativas posteriores al tratamiento en las colonias de *Lactobacillus* spp.

En el caso de los niveles de resistencia posteriores al tratamiento con enrofloxacino para las cepas de *E. coli*, estos aumentaron respecto del grupo control frente a amoxicilina, enrofloxacino, ácido nalidíxico, estreptomina y sulfametoxazol + trimetoprim. En el caso de las cepas de *Enterococcus* spp. la resistencia se incrementó solo en el caso de enrofloxacino, mientras que para eritromicina y oxitetraciclina disminuyeron respecto al control.

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que la utilización de antimicrobianos afecta directamente a la microbiota intestinal tanto en términos de variación en las poblaciones bacterianas como también en relación a los niveles de resistencia antimicrobiana de estas mismas.

SUMMARY

The gut microbiota consists of the bacterial populations that live in the gastrointestinal system of animals and humans, these populations interact directly in the stimulation of the immune system, the production of vitamins and the inhibition of bacterial populations that could be harmful for the host.

At poultry production, different antimicrobial agents are used to control various kinds of infectious diseases, the effects that these drugs have over the gut microbiota in terms of resistance to antibiotics and changes in the bacterial populations are barely studied in laying hens.

The objective of this study was to evaluate the variation of the intestinal populations of *E. coli*, *Enterococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. in laying hens exposed to treatment with enrofloxacin and also to measure the variation in the levels of antibiotic resistance in the populations of *E. coli* and *Enterococcus* spp. in their role as resistance indicator bacteria.

A total of 30 leghorn laying hens were used for this study, the animals were divided into two groups, corresponding to the treated (n=15) and control group (n=15), the treated group received orally a solution of enrofloxacin 5% and the control group received a placebo (distilled water) during 10 days. At the 3, 7 and 15 days after the treatment samples were taken specifically from ileum and cecum of the animals, these samples were cultured in different growth media for the subsequent count of bacterial colonies. From these samples, 99 strains of *E. coli* and 90 strains of *Enterococcus* spp. were isolated for the study of the variation in the levels of bacterial resistance to amoxicillin, cefotaxime, enrofloxacin, nalidixic acid, streptomycin, oxytetracycline and sulfamethoxazole + trimethoprim for *E. coli*; and to amoxicillin, enrofloxacin, erythromycin and oxytetracycline for *Enterococcus* spp.

For the count of bacterial colonies the only statistically significant differences after the treatment were seen in the *Lactobacillus* spp. colonies.

In the case of the bacterial resistance levels after the treatment, for the *E. coli* strains these levels increased compared to the control group for amoxicillin, enrofloxacin, nalidixic acid, streptomycin, and sulfamethoxazole + trimethoprim. In the case of the *Enterococcus* spp. strains the resistance levels increased only for enrofloxacin, while for erythromycin and oxytetracycline these levels decreased compared to the control group.

According to the results obtained from this study we can conclude that the use of antibiotics affects directly the gut microbiota both in terms of variations of the bacterial populations as well as in the antibiotic resistance levels.

INTRODUCCIÓN

El sistema gastrointestinal de los animales, ha sido objeto de variados estudios ya que en este sistema no solo se llevan a cabo los procesos de absorción y digestión de los alimentos, sino que además es el sustrato de diferentes especies de microorganismos que interactúan entre sí, participando en la estimulación del sistema inmune, en la síntesis de vitaminas y en la inhibición de poblaciones bacterianas nocivas para el huésped. El sistema digestivo de las aves no está exento de esta situación y es altamente dependiente del correcto equilibrio de la microbiota intestinal para mantener la salud y el bienestar animal así como también, un adecuado nivel productivo.

Hoy en día, en la avicultura industrial se utiliza una amplia variedad de agentes antimicrobianos para el tratamiento de diversas enfermedades bacterianas entre los cuales se puede mencionar el enrofloxacin. Los antimicrobianos, además de su efecto terapéutico, tienen un efecto detrimental sobre la microbiota intestinal comensal. Este daño podría incluso aniquilar completamente algunas poblaciones de bacterias benéficas lo que se podría traducir en un detrimento para la salud y producción animal (Bartosch *et al.*, 2004). Además de los efectos ya señalados, el uso de antimicrobianos genera una emergencia de cepas zoonóticas resistentes que podrían transferirse vía cadena alimentaria a la población humana.

Las fluoroquinolonas como el ciprofloxacino son comúnmente utilizadas en humanos para el tratamiento de infecciones provocadas por especies de *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. En medicina humana los casos de infecciones causadas por estas bacterias que presentan resistencia a fluoroquinolonas es un fenómeno cada vez más común, estos hallazgos han determinado que la "Food and Drug Administration" de los Estados Unidos de América (FDA) prohibiera la utilización de enrofloxacin en aves de corral desde el 2005 (Nelson *et al.*, 2007).

Con estos antecedentes, es importante tener mayor información sobre el efecto que tiene la utilización de un antimicrobiano como enrofloxacin sobre la composición de la microbiota bacteriana así como también sobre la selección de bacterias resistentes en aves de postura, con el objetivo de prevenir las posibles alteraciones de la microbiota y la diseminación de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características de la microbiota normal en aves

La microbiota intestinal es considerada como un ecosistema dentro de los animales. Está formada por diferentes géneros bacterianos cuyas proporciones e importancia varían de acuerdo a diferentes factores como edad de los animales, alimentación, presencia de enfermedades y el uso de antimicrobianos, entre otros.

Durante la etapa de crecimiento de las aves, existen cambios sucesivos en los patrones de composición de la microbiota intestinal. Es así como en los pollos de cuatro y siete días de edad especies de *Lactobacillus* spp. representan alrededor de un 25% del total de bacterias presentes en el intestino; por otra parte, existen proporciones relativamente altas de *Salmonella* spp. (40%), mientras que *Campylobacter* spp. se encuentran en proporciones menores (2%). Por otro lado, casi un tercio de las bacterias en el ciego de los pollos de esta edad corresponden a *E. coli* y especies de *Clostridium* (Amit-Romach *et al.*, 2004; Wise y Siragusa., 2006).

A los 14 días de edad se establece una prevalencia de microorganismos anaerobios estrictos, aumentando la proporción relativa de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium*, alcanzando estos dos géneros un 40% del total de las bacterias dentro del intestino. De manera opuesta, la proporción relativa de *Salmonella* spp. disminuye en aproximadamente un 10%, *Campylobacter* spp. disminuye a cantidades traza, mientras que las proporciones de *E. coli* y *Clostridium* se mantienen constantes (Amit-Romach *et al.*, 2004).

A los 25 días de edad, casi la mitad de las bacterias del ciego de los pollos corresponden a especies de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. mientras que, la proporción de cepas de *Salmonella* spp. disminuye aproximadamente en un 50% en comparación con los animales de cuatro días de edad. Las poblaciones de *Campylobacter* spp. se mantienen en bajas proporciones, mientras que las proporciones de *E. coli* y *Clostridium* spp. continúan bordeando aproximadamente el 30%. Luego de este periodo, las poblaciones bacterianas dentro del intestino se mantienen constantes (Amit-Romach *et al.*, 2004).

El desarrollo normal de la microbiota intestinal, provee un importante mecanismo natural de defensa tanto contra los microorganismos patógenos invasores como en la prevención del sobrecrecimiento de microorganismos oportunistas que se encuentran presentes dentro del tracto digestivo, proceso conocido como resistencia de colonización (Bartosch *et al.*, 2004).

Principales enfermedades bacterianas de las aves

Las enfermedades bacterianas en las aves de corral no son un problema nuevo, como tampoco lo son los diferentes tratamientos antimicrobianos usados para combatirlas. A continuación se detallan algunas de las principales enfermedades de origen bacteriano de prevalencia mundial y también con presencia en nuestro país.

Las salmonelas paratíficas (móviles) encontradas a través del mundo, han sido aisladas de humanos, animales salvajes y domésticos, incluidas las aves. En estas últimas producen una infección asintomática y una condición de portadora, y solo a veces hay signos clínicos de enfermedad. La posible presencia de estas salmonelas en la carne de aves o en los huevos tienen un interés en Salud Pública. La prevención y control de estos patógenos es abordada por la industria avícola mundial y nacional con diversas estrategias preventivas, incluida la vacunación para algunas de estas salmonelas paratíficas. El uso de antibióticos es bastante controversial, pero son usados en diversas situaciones. Antimicrobianos como las sulfonamidas, nitrofuranos, gentamicina, espectinomicina, etc., han demostrado ser útiles disminuyendo los porcentajes de mortalidad (R. Gast, 2003).

El término colibacilosis se refiere a cualquier infección localizada o sistémica causada por *E. coli*, incluyendo colisepticemia, coligranuloma, enfermedad de los sacos aéreos, peritonitis y salpingitis entre otros. La colibacilosis en aves de corral es típicamente una enfermedad, originada como consecuencia de un proceso primario que genera una disminución de la inmunidad de las aves. *E. coli* puede ser sensible a diferentes antimicrobianos como ampicilina, florfenicol, clortetraciclina y neomicina. El tratamiento con fluoroquinolonas como enrofloxacino ha demostrado ser altamente efectivo. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* suelen presentar resistencia a más de un antimicrobiano, especialmente a aquellos ampliamente utilizados en la industria, como por ejemplo las tetraciclinas; por lo tanto es imprescindible determinar el grado de sensibilidad a los antimicrobianos de una cepa de *E. coli* involucrada en un brote antes de establecer un tratamiento (Barnes *et al.*, 2003).

Pasteurella multocida es el agente causante de la pasteurellosis o cólera aviar, enfermedad que se expresa en su fase aguda con fiebre, anorexia, descarga mucosa desde el pico e incremento de la frecuencia respiratoria. El estado crónico de la enfermedad puede ocurrir luego de una infección aguda o ser resultado de una infección con cepas de baja virulencia. Los signos de la infección crónica se asocian principalmente a infecciones localizadas, con inflamación de las articulaciones de las alas y las patas además de lesiones exudativas faríngeas y conjuntivales. Las terapias con antimicrobianos han sido utilizadas extensivamente para el tratamiento del cólera aviar, con resultados variables dependiendo del momento de inicio del tratamiento y las propiedades farmacocinéticas del antibacteriano utilizado. Es conveniente el uso de pruebas de sensibilidad previas al inicio del tratamiento debido a que algunas cepas pueden presentar

resistencia, especialmente cuando el agente antimicrobiano es utilizado por períodos prolongados. Como tratamiento se han utilizado diferentes fármacos como sulfas, penicilina, estreptomicina, combinaciones de penicilina con estreptomicina y oxitetraciclina (Néstor *et al.*, 1999). En Chile no es una enfermedad reportada en la industria de los pollos broilers, ni de las gallinas ponedoras. Solo se reconocen algunos brotes en pavos comerciales, a raíz de lo cual este tipo de aves son protegidas con vacunas comerciales o autovacunas.

La infección por *Mycoplasma gallisepticum* es denominada comúnmente como enfermedad respiratoria crónica de los pollos. Los signos más característicos de esta patología en grupos de animales adultos son crépitos traqueales, descarga nasal, tos y reducción del peso como producto de un menor consumo de alimento. En las aves de postura la producción de huevos disminuye. Se sabe que *M. gallisepticum* es susceptible a una gran variedad de antimicrobianos, entre los que se incluyen estreptomicina, oxitetraciclina, eritromicina, espiramicina, tilosina y lincomicina. Sin embargo, algunos aislados de *M. gallisepticum* han mostrado ser altamente resistentes a estreptomicina, eritromicina, espiramicina y tilosina (Kleven y Ley, 2003). En nuestro país la micoplasmosis está bajo control y erradicación en la industria de la carne (pollos y pavos), pero si tiene una variable prevalencia en las explotaciones de gallinas ponedoras.

La enteritis necrótica es una enfermedad causada por el bacilo gram positivo *Clostridium perfringens*, de gran importancia para la industria avícola de la carne de pollo, producto de los altos niveles de morbilidad y mortalidad que presenta. Suele expresarse en brotes caracterizados por depresión, anorexia y muerte sobreaguda. Los brotes pueden ser tratados con antimicrobianos como lincomicina, bacitracina, oxitetraciclina o tilosina (Wages y Opengart, 2003). En Chile también ha sido reconocida la enteritis necrótica en pollos, pero no es una patología que afecte a las gallinas ponedoras.

El coriza infeccioso es una infección bacteriana, producida por *Haemophilus paragallinarum*, que tiene alta prevalencia entre las poblaciones de gallinas ponedoras a nivel mundial y también en nuestro país. Aunque hay vacunas para su prevención, muchas veces estas no son efectivas y ante la presentación de un brote estas aves son tratadas con antibióticos (Blackall y Matsumoto).

Consecuencias del uso de antimicrobianos sobre la microbiota intestinal

A pesar de que históricamente se ha recurrido al uso de antimicrobianos dentro de los sistemas productivos tanto en aves de corral, como en otras especies, los efectos de éstos sobre la microbiota intestinal no han sido completamente estudiados.

En un estudio se comparó el efecto de las dietas comerciales con antimicrobianos sobre la microbiota intestinal respecto de las dietas libres de antimicrobianos, observándose que, tanto a los

14 como a los 21 días de edad de los pollos, el tamaño de las poblaciones bacterianas cecales como *Clostridium* es mayor en las dietas libres de antimicrobianos, mientras que dentro de las muestras ileales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Wise y Siragusa, 2006).

Como se dijo anteriormente la administración de antimicrobianos, ya sea de forma terapéutica o como profilaxis, podría causar alteraciones en el balance ecológico entre el hospedero y la microbiota normal (Bartosch *et al.*, 2004). Las alteraciones en la microbiota dependen de las diferentes propiedades farmacocinéticas del antimicrobiano utilizado, como su ruta absorción, eliminación y posible inactivación enzimática y/o unión a material fecal. Por lo tanto, se recomienda la utilización de agentes antimicrobianos que no alteren la resistencia de colonización o el balance entre las poblaciones microbianas, y que disminuyan el riesgo de aparición y de diseminación de cepas y determinantes de resistencia entre pacientes y animales (Sullivan *et al.*, 2001).

Por otro lado, los antimicrobianos que puedan causar alteraciones de importantes especies benéficas como los *Lactobacillus*, deberían tratar de ser reducidos de los esquemas de tratamiento (Bartosch *et al.*, 2004).

Es evidente que la aparición en los animales de producción de bacterias multirresistentes a los antimicrobianos ha tenido un gran impacto a nivel mundial, por lo que muchos países han implementado programas de monitoreo de la resistencia con el propósito de proteger la salud de los humanos así como también, la salud de los animales (Von Baum y Marre, 2005).

Diversos estudios han demostrado un aumento en la presencia de algunas cepas de *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp y *E. coli* resistentes a las quinolonas y fluoroquinolonas. Cabe destacar que esta última especie bacteriana es parte de la microbiota entérica normal, por lo que la presencia de resistencia en este grupo de bacterias puede servir como reservorio de genes transferibles a otras bacterias zoonóticas las cuales podrían provocar graves enfermedades en pacientes humanos (Von Baum y Marre, 2005).

Multirresistencia

El término resistencia múltiple o multirresistencia se utiliza para referirse a bacterias que presentan en forma conjunta resistencia a dos o más antimicrobianos no relacionados entre sí. La importancia de la multirresistencia radica en la disminución de las alternativas de tratamiento. Se ha observado en diversas cepas aisladas desde animales y pacientes humanos, que los perfiles de multirresistencia se repiten; esto tendría relación con diversos factores como el género bacteriano y la utilización de los antimicrobianos. Estudios realizados en nuestro país, utilizando cepas de *Salmonella* spp, *E. coli* y *Enterococcus* spp aisladas desde aves y cerdos han arrojado como

resultado la presencia de altos niveles de multirresistencia, alcanzando niveles de un 50%, 86% y 61% respectivamente, destacándose especialmente las quinolonas, fluoroquinolonas y tetraciclinas (San Martin *et al.*, 2005).

Quinolonas y fluoroquinolonas

Las quinolonas fueron descubiertas casualmente, cuando se observó que un producto utilizado para tratar el paludismo (cloroquina) poseía actividad antimicrobiana. Las primeras cuatro - quinolonas sintetizadas, ácido nalidíxico y ácido oxolínico ofrecían un estrecho margen de actividad antimicrobiana, baja biodisponibilidad oral, distribución limitada en el organismo y gran capacidad para inducir emergencia de resistencia bacteriana. Sus usos clínicos se limitaban principalmente al tratamiento de infecciones por bacterias gram negativas en el tracto urinario. Subsecuentemente, la molécula fue modificada, siendo tres las modificaciones claves: 1) sustitución del grupo CH por N en posición 8; 2) introducción de un anillo de piperazina en posición 7 (mejorando el espectro de acción a bacterias gram negativas, incluyendo *Pseudomonas*; y 3) Introducción de un átomo de flúor en la posición 6 (lo cual aumentó aún más el espectro del grupo y amplió la actividad a bacterias gram positivas), constituyendo las fluoroquinolonas (Lees *et al.*, 2002).

El espectro de acción de las fluoroquinolonas incluye bacterias aerobias gram negativas y algunos microorganismos gram positivos, aunque tienen capacidad limitada frente a *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. y solo una débil actividad frente a anaerobias obligadas. Tienen excelente actividad en particular contra bacterias aerobias gram negativas, incluyendo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Manheimia haemolytica* y *P. multocida* (Lees *et al.*, 2002).

Su acción se basa en la inhibición de la enzima ADN girasa bacteriana, uniéndose a la subunidad A de esta enzima, impidiendo la replicación bacteriana (Lees *et al.*, 2002).

La resistencia bacteriana se produce por la mutación de la subunidad α de la DNA-girasa (Reyna *et al.*, 1995) y por alteraciones en la permeabilidad de la pared celular, lo que impide el ingreso del fármaco a la bacteria. Las fluoroquinolonas utilizadas en animales son distintas a las utilizadas en medicina humana, pero la resistencia a este tipo de las drogas es cruzada, es decir, que el uso de una fluoroquinolona específica genera resistencia al resto de ellas. Esto influye en los tratamientos en pacientes humanos, generando un problema de salud pública asociado a las bacterias zoonóticas resistentes a este grupo de fármacos. Esto se ha observado especialmente en cepas de *Salmonella* spp y *Campylobacter* spp resistentes a fluoroquinolonas aisladas desde pollos broiler (Nelson *et al.*, 2007).

Con estos antecedentes, la "Food and Drug Administration" de los Estados Unidos de América (FDA), el 12 de septiembre de 2005, anunció la prohibición del uso de enrofloxacin en pollos y pavos (FDA, 2005). En el ámbito productivo nacional, las fluoroquinolonas están

autorizadas para su uso en pollos broiler y pavos en crecimiento, para el control de mortalidad temprana, colibacilosis y otras infecciones bacterianas. De acuerdo al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), existen 43 formulaciones diferentes de enrofloxacino para su uso en medicina veterinaria (SAG, 2012). Al no existir a nivel nacional un control sobre el uso extra etiqueta, es decir, sin considerar las instrucciones establecidas en el prospecto oficialmente autorizado, éstos podrían ser utilizados como terapia o como medida preventiva en aves de postura, por lo que es importante conocer los distintos efectos que podrían involucrar el uso de este antimicrobiano tanto en la composición de la microbiota intestinal como en la selección de cepas resistentes.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la terapia de enrofloxacino sobre la composición de algunas poblaciones bacterianas aisladas desde la microbiota intestinal de gallinas ponedoras y la selección de cepas resistentes.

Objetivos específicos

1. Evaluar los cambios cuantitativos en las poblaciones de *E. coli*, *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. aisladas de la microbiota intestinal de gallinas ponedoras tratadas con enrofloxacino en dosis terapéuticas.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) a ocho antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp. y *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura sometidas a tratamiento con enrofloxacino.
3. Establecer los perfiles de resistencia en *E. coli* y *Enterococcus* aislados desde la microbiota intestinal de gallinas ponedoras sometidas a tratamiento con enrofloxacino.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales en estudio

El presente estudio se realizó de acuerdo con las indicaciones sobre bienestar animal del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se utilizaron 30 gallinas Leghorn de 16 semanas de edad provenientes del plantel avícola Chorombo ubicado en la zona de Pirque. Las aves fueron criadas en la Unidad Experimental de Nutrición y Producción Avícola ubicada en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se alojaron en jaulas convencionales con comederos lineales de canoa y bebederos automáticos de niple. El alimento fue preparado en la unidad con el fin de asegurar que estuviese libre de antibióticos; durante todo el experimento el agua fue administrada *ad libitum*. La dieta fue elaborada en base a los requerimientos nutricionales para la raza según lo señalado por el National Research Council (1994).

A las 25 semanas de edad los animales fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimentales, considerando las recomendaciones de Zhou *et al.* (2007) para el tamaño de muestra. Al grupo tratamiento (GT; n=15) se le administró una formulación comercial de enrofloxacino al 5% vía oral en dosis de 10 mg/kg cada 24 horas por 10 días. El grupo control (GC; n=15) recibió placebo (agua destilada) de acuerdo al mismo esquema que los animales del GT. Los tratamientos fueron administrados mediante sonda oro-gástrica para asegurar la ingesta completa de la dosis.

Obtención de las muestras

Para la obtención de las muestras, las aves fueron sacrificadas por dislocación cervical, de acuerdo con la normativa vigente en relación con el bienestar animal. Se identificaron los sectores correspondientes al íleo y ciego, para luego extraer asépticamente al menos 10 cm. de intestino, el cual se ligó en sus extremos mediante "fórceps" o "clamps". Las muestras fueron obtenidas a los 3, 7 y 15 días posteriores al tratamiento, cada muestra fue depositada individualmente en frascos estériles.

Aislamiento de cepas bacterianas y análisis de sensibilidad

El aislamiento y caracterización bacteriana de las muestras se realizó en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Desde las muestras de intestino se obtuvo 1g de contenido intestinal y se homogeneizó con 9 mL de agua peptonada estéril constituyendo así la dilución 10⁻¹. Desde ésta, se efectuaron 7 diluciones con factor 1/10, generando una serie de diluciones que van desde la 10⁻¹ hasta 10⁻⁸. Cada una de estas diluciones se sembró en duplicado utilizando un volumen de 100µl para cada placa. Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de cada bacteria, tiempos y condiciones de incubación, como también el método utilizado para su identificación, se detallan en la Tabla 1.

Los microorganismos representativos de la microbiota intestinal que se aislaron fueron *Lactobacillus* spp.; *E. coli*, y *Enterococcus* spp.

Tabla 1: Protocolo para el aislamiento e identificación bacteriana.

Cepa Bacteriana	Agar	Condiciones	Incubación a37° C	Verificación
<i>E. coli</i>	MacConkey	Aerobio	24 h	Gram y RapID® one
<i>Enterococcus</i> spp	BBL Enterococosele	Aerobio	24 h	Gram y RapID® Str
<i>Lactobacillus</i> spp	MRS	Microaerobio en jarra ANAEROJAR	48 h	Gram y RapID® ANA II

Finalizado el tiempo de incubación se procedió a verificar las cepas aisladas por medio de los kit comerciales RapID® y realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando un contador de colonias Suntex, seleccionando las placas inoculadas que contenían entre 30 y 300 colonias típicas (Escobar 1994). Una vez identificadas las cepas de cada género bacteriano se seleccionaron cinco y fueron almacenadas en ceparios a -20°C en medio de cultivo TSB (Tryptic Soy Broth) y glicerol al 15% para su posterior análisis de sensibilidad. Las UFC fueron expresadas por gramo de muestra, utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde *N* corresponde a la unidad formadora de colonia por gramo de muestra; *C* a la media del número de colonias obtenidas en las dos placas y *D* al factor o inverso de la dilución.

Prueba de sensibilidad in vitro

Las cepas aisladas de *E. coli*, y *Enterococcus* spp. fueron sometidas al Método de Dilución en Placa. Esta técnica determina la concentración mínima de antimicrobianos que inhiben el crecimiento bacteriano (CIM). Se efectuó siguiendo las normas recomendadas por el "Clinical and Laboratory Standards Institute" (NCCLS, 2002; CLSI, 2006).

Los estándares de antimicrobianos (droga pura) que fueron utilizados se obtuvieron con su potencia conocida. Con cada uno de ellos, se prepararon soluciones stock de 1280 µg/mL, los cuales se mantuvieron refrigerados a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un periodo máximo de una semana. A partir de ellas se prepararon diluciones seriadas en base 2 (1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5) en el momento del análisis. Las diluciones se mezclaron con agar Mueller-Hinton en una proporción de 1:10 (2 mL de dilución de antimicrobiano en 18mL de agar). Con estas diluciones de agar se prepararon 10 placas con las diferentes concentraciones para cada antimicrobiano en estudio. Se incluyeron dos placas control sin antimicrobianos.

Preparación e Inoculación de Suspensiones Bacterianas

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

Como cepas controles se utilizaron *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *E. coli* ATCC 25922. Como cada cepa de una misma especie bacteriana se comporta individualmente frente a las diferentes concentraciones de un antimicrobiano determinado, las CIM se expresaron en valores absolutos (µg/mL). Los antimicrobianos que se analizaron frente a cada especie bacteriana se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Antimicrobianos utilizados en las pruebas de sensibilidad frente a cepas de *E. coli* y *Enterococcus* spp.

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

Lectura e Interpretación de Resultados

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las placas inoculadas registrando la concentración más baja de antimicrobiano que inhibió el crecimiento de cada una de las cepas en estudio. Con esta información se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) expresada en µg/mL. Con los valores de CMI se calculó el porcentaje de cepas sensibles, resistentes o con sensibilidad intermedia, utilizando como pauta los puntos de corte establecidos para cada antimicrobiano por el Clinical and Laboratory Standards Institute (Emborg y Heuer, 2003).

Análisis estadístico

Obj. 1. El análisis estadístico para establecer los cambios cuantitativos en la composición de la microbiota intestinal entre los grupos se realizó por medio de la prueba de ANDEVA

Obj. 2. Se realizó un estudio de frecuencia para determinar el porcentaje de resistencia a cada antibiótico.

Obj. 3. Se realizó un estudio de frecuencia para determinar el porcentaje de cepas multirresistentes.

RESULTADOS

Objetivo 1: Evaluar los cambios cuantitativos en las poblaciones de E. coli, Enterococcus spp. y Lactobacillus spp. aisladas de la microbiota intestinal de gallinas ponedoras tratadas con enrofloxacino en dosis terapéuticas.

Para el recuento de colonias de las distintas especies bacterianas, se sembraron e incubaron las diluciones de contenido intestinal en placas petri según las especificaciones mencionadas en la tabla 1 para cada género bacteriano, se eliminaron las placas cuyos conteos bacterianos estuvieran fuera del rango aceptable (<30 UFC y > 300 UFC) (Escobar *et al.* 1994), los resultados restantes fueron promediados por cada gallina, para cada día del estudio y posteriormente sometidos a una prueba de ANDEVA con un ($\alpha=0.05$) a través del software "Infostat" (Di Rienzo *et al.*, 2008).

1. Recuento de colonias de *E. coli*

En el caso de las colonias de *E. coli*, se concluyó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones bacterianas aisladas en el intestino de los animales sometidos al tratamiento con enrofloxacino y el grupo control. Asimismo, el análisis estadístico demostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los días post tratamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Población media de *E. coli* aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura tratadas con enrofloxacino expresadas como log₁₀ ufc/g de fecas.

Día	Control \pm DE*	Tratamiento \pm DE*
3	6,64 \pm 1,44 ^{a**}	5,66 \pm 0,56 ^{a**}
7	6,74 \pm 1,26 ^a	6,52 \pm 1,08 ^a
15	6,77 \pm 1,23 ^a	5,88 \pm 1,16 ^a

* D.E.: desviación estándar

**Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre grupos ni entre días ($p \leq 0,05$)

2. Recuento de colonias de *Enterococcus* spp.

Las diferencias entre las medias de los grupos estudiados no fueron estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control (Tabla 4).

Tabla 4. Población media de *Enterococcus* spp. aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura tratadas con enrofloxacino expresadas como log₁₀ ufc/g de fecas.

Día	Control ± DE*	Tratamiento ± DE*
3	5,62 ± 1,94 ^{a**}	5,21 ± 0,58 ^{a**}
7	5,65 ± 1,92 ^a	4,38 ± 0,18 ^a
15	5,65 ± 1,91 ^a	4,98 ± 0,61 ^a

* D.E.: desviación estándar

**Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre grupos ni entre días (p≤0,05)

3. Recuento de colonias de *Lactobacillus* spp.

Con un α de 0.05 las diferencias entre las medias de las poblaciones bacterianas no fueron estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo correspondiente al día 7 post tratamiento. Sin embargo, estas diferencias si fueron significativas al comparar las muestras tomadas el día 3 y el día15 post tratamiento (Tabla 5).

Tabla 5. Población media de *Lactobacillus* spp. expresadas como log₁₀ ufc/g de fecas aisladas de la microbiota intestinal de aves de postura tratadas con enrofloxacino.

Día	Control ± DE*	Tratamiento ± DE*
3	7,99 ± 0,31 ^{a**}	9,21 ± 0,7 ^a
7	8,01 ± 0,31 ^{b**}	8,69 ± 0,65 ^b
15	8,00 ± 0,3 ^b	7,22 ± 0,57 ^b

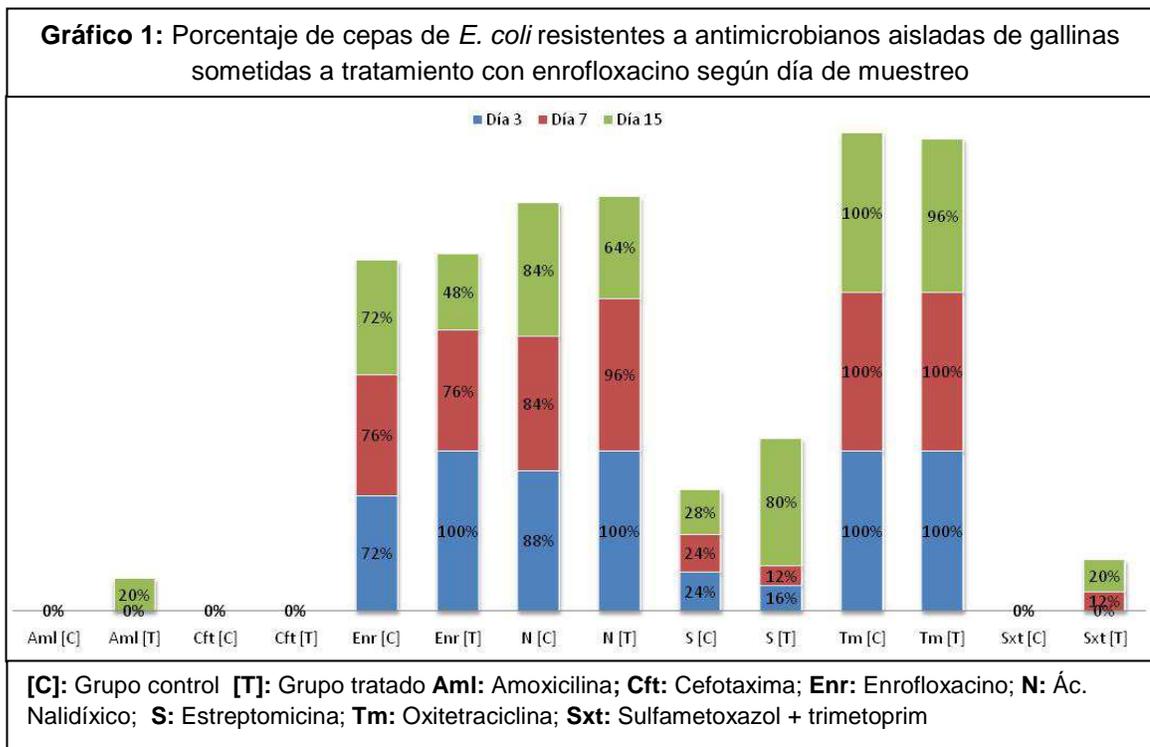
* D.E. desviación estándar

** Letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre grupos o entre días (p≤0,05)

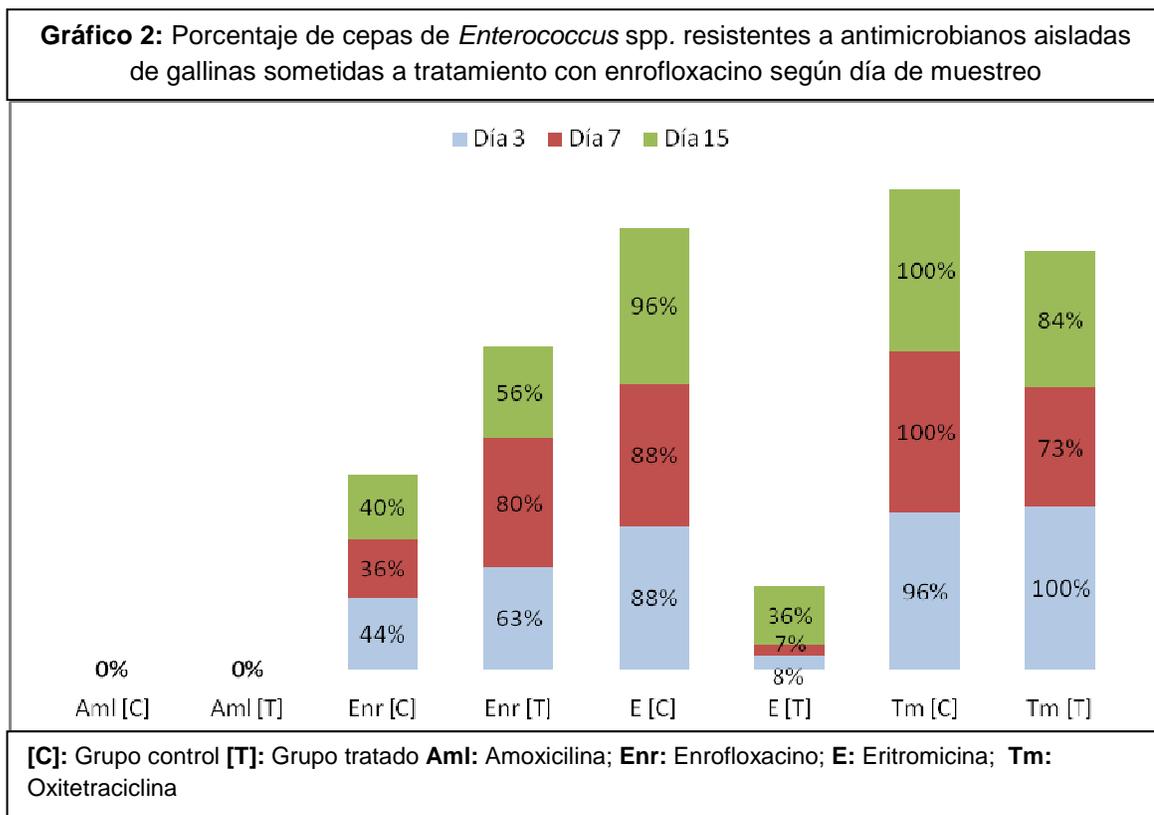
Objetivo 2: Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) a 8 antimicrobianos en cepas de *Enterococcus spp.* y *E. coli* aisladas desde la microbiota intestinal de aves de postura sometidas a tratamiento con enrofloxacino.

Del total de las muestras, se aislaron y tipificaron 99 cepas de *E. Coli* y 90 cepas de *Enterococcus spp.*

En el gráfico 1 se señalan los porcentajes de resistencia a cada antimicrobiano en las cepas de *E. coli* aisladas del grupo control y del grupo tratado.



En el gráfico 2 se observan los niveles de resistencia de las cepas de *Enterococcus* a cada antimicrobiano en estudio.



Objetivo 3: Establecer los perfiles de resistencia en E. coli y Enterococcus aislados desde la microbiota intestinal de gallinas ponedoras sometidas a tratamiento con enrofloxacino.

1. Perfiles de multiresistencia de *E. coli*

En el caso de las cepas de *E. coli*, el 95% de las cepas presentaron resistencia a dos o más de los antimicrobianos en estudio, considerando todos los grupos de muestreo.

Tanto en el grupo control como en el grupo tratado, el 100% de las cepas estudiadas al tercer día post tratamiento presentaron multiresistencia, predominando la resistencia simultanea a 3 antimicrobianos (Tabla 6). El perfil de multiresistencia más común encontrado fue enrofloxacino, ácido nalidíxico y oxitetraciclina (Tabla 7).

Tabla 6. Porcentajes de cepas de *E. coli* resistentes y multirresistentes aisladas de gallinas de postura sometidas a tratamiento con enrofloxacino según día del estudio

	Cepas control	3 días post tratamiento	7 días post tratamiento	15 días post tratamiento
Cepas sensibles a todos los antimicrobianos	0%	0%	0%	4%
Resistentes a un antimicrobiano	0%	0%	4%	12%
Resistentes a dos antimicrobianos	4%	8%	12%	32%
Resistentes a tres antimicrobianos	88%	76%	72%	36%
Resistentes a cuatro o más antimicrobianos	8%	16%	12%	16%

Tabla 7. Perfiles de multirresistencia para las cepas de *E.coli*

Perfiles multirresistencia	Cepas control	3 días post tratamiento	7 días post tratamiento	15 días post tratamiento
N-tm	4%	8%	12%	16%
tm-sxt	0%	0%	0%	8%
S-tm	0%	0%	0%	4%
enr-tm	0%	0%	0%	4%
enr-N-tm	88%	76%	64%	28%
N-tm-S	0%	0%	4%	0%
N-tm-sxt	0%	0%	4%	0%
N-S-tm	0%	0%	0%	4%
aml-tm-sxt	0%	0%	0%	4%
enr-N-S-tm	8%	16%	4%	0%
enr-N-tm-sxt	0%	0%	4%	0%
N-S-tm-sxt	0%	0%	4%	0%
aml-enr-N-tm	0%	0%	0%	8%
aml-N-tm-sxt	0%	0%	0%	4%
aml-enr-N-S-sxt	0%	0%	0%	4%

Aml: Amoxicilina; **Cft:** Cefotaxima; **Enr:** Enrofloxacino; **N:** Ác. Nalidíxico; **S:** Estreptomicina; **Tm:** Oxitetraciclina; **Sxt:** Sulfametoxazol + trimetoprim

2. Perfiles de multirresistencia de *Enterococcus*

En el caso de las cepas de *Enterococcus* spp., sobre el 60% de las cepas fueron multirresistentes, predominando la resistencia simultanea a 2 antimicrobianos (Tabla 8). Siendo el perfil de multirresistencia más común el de enrofloxacino y ácido nalidíxico (Tabla 9).

Tabla 8. Porcentajes de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes y multirresistentes aisladas de gallinas de postura sometidas a tratamiento con enrofloxacino según día del estudio

	Cepas control	3 días post tratamiento	7 días post tratamiento	15 días post tratamiento
Cepas sensibles a todos los antimicrobianos	8%	0%	13%	4%
Resistentes a un antimicrobiano	12%	42%	47%	44%
Resistentes a dos antimicrobianos	58%	58%	40%	52%
Resistentes a tres o más antimicrobianos	23%	0%	0%	0%

Tabla 9. Perfiles de multirresistencia para las cepas de *Enterococcus* spp.

Perfiles multirresistencia	Cepas control	3 días post tratamiento	7 días post tratamiento	15 días post tratamiento
enr/E/tm	23%	0%	0%	0%
enr/tm	0%	50%	33%	16%
E/tm	58%	8%	7%	36%

Enr: Enrofloxacino; **Tm:** Oxitetraciclina; **E:** Eritromicina

DISCUSIÓN

En Chile, la industria avícola es una de las con mayores producciones y también de mayor crecimiento en los últimos años, presentando al 2010 un total de 224 millones de animales sacrificados para consumo. Por otra parte, la producción de huevos en el país también presenta una elevada tasa de crecimiento, aumentando desde 199 millones de huevos para consumo en 1998 hasta 558 millones de huevos el 2010 (ODEPA, 2011). Debido al alto impacto en el consumo nacional, así como también en la economía local, las industrias pecuarias deben realizar esfuerzos para generar una producción lo más inocua posible tanto en términos de contaminación bacteriana como cargas de residuos, entre ellos los antibióticos.

La tendencia mundial apunta cada vez más a disminuir el uso de antimicrobianos como parte del tratamiento de ciertas enfermedades y a eliminarlos completamente como promotores de crecimiento en medicina veterinaria, ésto basado principalmente en la existencia de posibles residuos que pudieran quedar en los productos de origen animal destinados a consumo humano y al traspaso de bacterias y genes de resistencia entre los animales y el hombre.

Aislamiento bacteriano posterior al tratamiento con enrofloxacino.

En este estudio, además del género *Lactobacillus* spp, se incluyeron dos enterobacterias consideradas como comensales e indicadoras en los planes de vigilancia de resistencia a antimicrobianos. Como representante de los Gram negativos se consideró a *E. coli*, bacilo aislado con alta frecuencia en los laboratorios de salud animal (Moreno *et al.*, 2000); este microorganismo tiene la particularidad de adquirir resistencia de forma más rápida que otras bacterias, siendo un buen indicador de resistencia en bacterias potencialmente patógenas (Miranda *et al.*, 2008). El género *Enterococcus*, fue incluido como representante de bacterias Gram positivas; estas cocáceas forman parte de la microbiota intestinal y pueden encontrarse en los alimentos o en el agua (Kuhn *et al.*, 2003). Además, se les ha descrito un rol potencial como reservorio de genes de resistencia (Aarestrup *et al.*, 2000).

El tratamiento fue realizado con enrofloxacino, debido a que diversos estudios registran un aumento en las tasas de resistencia frente a este antimicrobiano, especialmente en pacientes que han estado sometidos a un tratamiento previo con fluoroquinolonas (Cooke *et al.*, 2002; Ogeer-Gyles *et al.*, 2006; Briceño *et al.*, 2007).

Existe variada información científica que describe que la antibioticoterapia produce alteraciones en la microbiota intestinal (Zhou *et al.*, 2007; Sekirov *et al.*, 2008; Ubeda *et al.*, 2010) y que la cantidad de bacterias en el intestino puede verse disminuida hasta siete días posteriores al

termino del tratamiento y además, las proporciones en las distintas poblaciones bacterianas del intestino se pueden ver afectadas durante semanas (Crosswell *et al.*, 2009).

Al considerar el efecto del tratamiento con enrofloxacino sobre las poblaciones bacterianas, en este estudio, se observó que tanto para *E. coli* como para *Enterococcus* spp. los cambios no fueron significativos. Estos resultados difieren a los encontrados por otros autores los cuales encontraron diferencias importantes en la cantidad y diversidad de la microbiota intestinal por hasta 90 días después de terminado el tratamiento con antimicrobianos, estas diferencias podrían estar marcadas, entre otros, por la alta variabilidad encontrada entre las muestras, asociado al limitado tamaño de muestra (Manichanh *et al.*, 2009). Por otro lado, los cambios en las poblaciones de *Lactobacillus* spp. sí fueron significativos a través del tiempo, ya que las UFC disminuyeron hacia el día 15, a pesar de que la información sobre el efecto de los antimicrobianos sobre las poblaciones de *Lactobacillus* spp. es escasa, diversos estudios coinciden en señalar que el uso de antibióticos altera tanto la diversidad de la microbiota intestinal como también la salud del hospedero, efecto que puede durar hasta 6 meses (Jernberg *et al.*, 2007; Dethlefsen *et al.*, 2008; Mason *et al.*, 2012).

Resistencia fenotípica de las poblaciones bacterianas

El método para definir la resistencia bacteriana en este trabajo es reconocido como oficial para los análisis de sensibilidad a escala internacional. Para su interpretación se siguieron las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standard (Malbrán *et al.*, 2001). Este método tiene un carácter cuantitativo, determinando de manera exacta la concentración a la cual el antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano.

Cabe destacar que las tasas de resistencia bacteriana pueden variar tanto entre países como entre regiones, principalmente asociados a las diferencias en las cantidades y variedades de antimicrobianos utilizados y a la existencia de programas de vigilancia y control de resistencia (Goossens *et al.*, 2005; Witte., 1998).

Al analizar los resultados obtenidos en este trabajo y considerando la metodología utilizada, se pudo observar que un alto porcentaje de las cepas aisladas del grupo control fueron resistentes al menos a uno de los antimicrobianos estudiados. Estos porcentajes de resistencia, en el caso de las cepas de *E. coli*, fueron semejantes a los observados por otros autores, donde describen una resistencia hasta de un 85,5% (Furtula *et al.*, 2010) y en las cepas de *Enterococcus* spp. alcanzan un 94,12% (Oliveira *et al.*, 2010). La resistencia en los grupos controles podría ser explicada en parte porque a la edad a la que las aves fueron adquiridas (16 semanas de edad), comúnmente ya han sido tratadas con antimicrobianos.

En el caso particular de las cepas aisladas de *E. coli*, los niveles de resistencia frente a amoxicilina, cefotaxima y sulfametaxol+trimetoprim fueron bajos, tanto en las cepas del grupo control como en las cepas aisladas del grupo tratado, existiendo diferencias importantes hacia el día 15 post tratamiento donde la resistencia bacteriana aumentó hasta 20%, tanto para amoxicilina como para sulfametoxazol + TMP. El tratamiento con sulfametaxol + TMP suele ser uno de los más utilizados en el caso de infecciones causadas por *E. coli*. Sin embargo, el uso de sulfas se ha reemplazado cada vez más por fluoroquinolonas, las que se recomiendan frente a las cepas de *E. coli* resistentes a este primer antimicrobiano. Los niveles de resistencia en el grupo control frente a sulfametaxol + TMP y cefalosporinas son similares a los encontrados en la bibliografía, sin embargo para β -lactámicos el nivel encontrado en este estudio es un 20% menor (Zhanet *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2008).

Para las quinolonas en estudio (enrofloxacino y ácido nalidíxico) los mayores niveles de resistencia se observaron al tercer día post tratamiento con incrementos de un 20% y un 12% respecto del control, disminuyendo luego a un 4% y 12% de diferencia respecto al control para el segundo grupo de muestreo (día 7 post tratamiento). Estos resultados son similares a los de otros autores, quienes encontraron aumentos de un 9% en las tasas de resistencia en cepas de *E. coli* frente a fluoroquinolonas 7 días después de un tratamiento con ciprofloxacino (Osama *et al.*, 2011). En las cepas aisladas el día 15 posterior al tratamiento, los niveles de resistencia fueron menores al control, tanto para enrofloxacino (con una disminución de un 28%) como para ácido nalidíxico, cuyo nivel de resistencia disminuyó en un 20%. Estos resultados son similares a los encontrados por Raum *et al.* (2008) quienes señalaron que pasadas las dos semanas de un tratamiento con antibióticos las cepas resistentes permanecen dentro de la microbiota intestinal pero en una menor proporción (Giraud *et al.*, 2003).

Para estreptomycinina, el nivel de resistencia fue menor en el grupo tratado en relación al control. Esto podría explicarse porque las fluoroquinolonas habrían eliminado la población de cepas bacterianas resistentes a aminoglucosidos. Sin embargo, cabe señalar además que ambas familias de antimicrobianos comparten un mecanismo de resistencia en común, la modificación de la pared celular al ingreso de antibióticos, por medio de la modificación de porinas de membrana, es por esto, que la disminución de las tasas de resistencia puede ser causada por la eliminación de las cepas bacterianas que presentaron resistencia de forma nativa a aminoglucósidos pero fueron sensibles a quinolonas, mientras que la disminución progresiva posterior fue debida a la pérdida de cepas resistentes a ambos antibióticos las que fueron desapareciendo debido a su menor adaptabilidad (Mella *et al.*, 2004).

Para las cepas de *Enterococcus* spp. aisladas en este estudio, el único antimicrobiano al que no se presentó resistencia, fue la amoxicilina, pudiendo este fármaco ser una muy buena alternativa de tratamiento en caso de infecciones aviarias causadas por esta bacteria. Los altos

niveles de resistencia en el grupo control a oxitetraciclina nos indica su probable utilización previa a la adquisición de las aves, es importante mencionar además que estos niveles de resistencia son mayores a los observados por Oliveira *et al.* (2010), que estudió la resistencia de *Enterococcus* spp. aisladas de pollos broilers criados de manera intensiva y extensiva, señalando niveles de resistencia de un 55% para oxitetraciclina, porcentaje que en términos terapéuticos debería excluir en ambos casos el uso de este antimicrobiano en infecciones causadas por coccáceas gram positivas.

Para enrofloxacino, los niveles de resistencia en el grupo control fueron alrededor de un 40%, mientras que en las cepas del grupo tratado este porcentaje aumentó a un 80% para el día 7 y disminuyó hasta un 56% al día 15. Al comparar estos resultados con otros estudios los niveles de resistencia encontrados por nosotros son menores, sin dejar de ser ambos lo suficientemente altos para descartar o al menos evitar la utilización terapéutica de este antibiótico para infecciones con este origen (Oliveira *et al.*, 2010). Existen además estudios en hospitales humanos que han observado que la utilización terapéutica de quinolonas y fluoroquinolonas en animales de producción se relaciona con el aumento en los niveles de resistencia en cocos gram positivos, asociándose a la aparición de *S. aureus* resistentes a metilina y enterococos resistentes a vancomicina (Paterson *et al.* 2004).

Multirresistencia

En el caso de *E. coli*, de las 99 cepas aisladas el 95% presentó multirresistencia, siendo el perfil más frecuente el de quinolonas más tetraciclinas, con un 64% del total de cepas aisladas. Los niveles de resistencia encontrados en distintas poblaciones bacterianas pueden variar según países, regiones e incluso según el tipo de muestra, es por esto que los estudios respecto a multirresistencia pueden tener diferentes resultados. Sayah *et al.* (2005) realizaron en Estados Unidos de América un estudio que involucraba diferentes especies productivas, aislando 1.286 cepas de *E. coli* encontrando multirresistencia en el 21% de las cepas aisladas y en el caso particular de las aves un 28% fueron multirresistentes, incluyendo en la mayoría de los casos resistencia a tetraciclinas. Por otro lado estudios como los realizados por Akond *et al.* (2009) en Bangladesh encontraron que dentro de las 50 cepas de *E. coli* aisladas desde aves el 100% de estas presentó multirresistencia.

Para *Enterococcus* spp. fueron aisladas 90 cepas de las cuales sobre el 60% mostró multirresistencia, siendo el perfil más común eritromicina más oxitetraciclina con un 30%. Estos elevados niveles de multirresistencia están dentro de lo esperado. Otros autores como Hayes *et al.* (2004) encontraron niveles de multirresistencia superiores al 90% en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas desde pollos broiler, con un 53% de multirresistencia a 4 antibióticos simultáneamente.

En el presente estudio, los niveles de resistencia y multirresistencia fueron elevados, incluyendo a las cepas bacterianas aisladas desde los grupos que no recibieron tratamiento, este fenómeno no era esperado por nosotros ya que los animales fueron adquiridos a temprana edad y mantenidos sin tratamiento durante nueve semanas con una dieta libre de antimicrobianos antes de comenzar el experimento. Esto podría estar explicado por el elevado uso de antimicrobianos en la industria avícola durante la etapa de precría de las aves, manteniendo elevados y prolongados niveles de resistencia tanto en los individuos como en el medio ambiente (Miranda *et al.* 2008; Sayah *et al.* 2005).

CONCLUSIONES

- El tratamiento con enrofloxacino no afecta cuantitativamente a las poblaciones de *E. coli* ni *Enterococcus* spp comensales del tracto intestinal en gallinas
- El fenómeno de multirresistencia es más frecuente en cepas de *E. coli* que en *Enterococcus* spp. no pudiéndose relacionar este aspecto con el uso de enrofloxacino, debido a que las cepas aisladas del grupo control también presentaron elevados niveles de resistencia.
- La resistencia a oxitetraciclina estuvo presente en todos los perfiles de multirresistencia, excepto uno, tanto para *E. coli* como para *Enterococcus* spp., por lo que se recomienda no utilizar este antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA

- AARESTRUP, F.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L.** 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotype and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37: 127 – 137.
- AKOND, M.; HASSAN, S.; ALAM, S.; SHIRIN, M.** 2009. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Internet j. food safety* 11: 19 – 23.
- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z.** 2004. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA primers. *Poult. Sci.* 83: 1093-1098.
- BARNES H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B.** 2003 Chapter 18, Colibacillosis. In: *Diseases of Poultry*, Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. 11th edition. Iowa State Press 631-656.
- BARTOSCH, S.; FITE, A.; MACFARLANE, G.; McMURDO, M.** 2004. Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers in Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3575-3581.
- BLACKALL, P.J.; MATSUMOTO, M.** 2003. Salmonella Infections. In: *Diseases of Poultry*, Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. 11th edition. Iowa State Press 691-704.
- BRICEÑO, L.; NARVÁEZ, C.; GONZÁLEZ, A.; WITTUM, T.; HOET, A.** 2007. Resistencia a las Fluoroquinolonas y Otros Antimicrobianos en Cepas de *Salmonella* spp. Aisladas en el Procesamiento de Pollo Entero. *Rev. Cient.* 15: 521 – 528.
- CLSI.** Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth National Supplement. M100-S16. 26: 188 p.
- COOKE, C.; SINGER, R.; JANG, S.; HIRSH, D.** 2002. Enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs with urinary tract infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220: 190-192.
- CROSSWELL, A.; AMIR, E.; TEGGATZ, P.; BARMAN, M.; SALZMAN, N.** 2009. Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric *Salmonella* infections. *Infect. Immun.* 77: 2741 -2753.

- DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, ML; RELMAN, DA.** 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. PLoS Biol. 6: 2383 - 2400.
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZÁLEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W.** 2008. Infostat, version 2008, Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- EMBORG, D.; HEUER, E.** 2003. DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Staten's Serum Institute, Danish Veterinary and Food Administration, Danish Medicines Agency, Danish Veterinary Institute, Copenhagen, Denmark. 68 p.
- ESCOBAR, D.** 1994. Manual de técnicas y procedimientos. Programa Latinoamericano de microbiología e higiene de los alimentos. Universidad de Antioquía, Facultad de Salud Pública, Medellín. 354 p.
- FDA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION,** 2005. Enrofloxacin for poultry: Final decision of withdrawal of new animal drug application following formal evidentiary public hearing: availability. Federal Register. 70: 44105.
- FURTULA, V.; FARRELL, E.; DIARRASSOUBA, F.; REMPEL H.; PRITCHARD, J.; DIARRA, M.** 2010. Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. Poult. Sci. 89: 180 – 188.
- GAST, R. K.** 2003. Salmonella Infections. In: Diseases of Poultry, Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. 11th edition. Iowa State Press 583-614.
- GIRAUD, E.; CLOECKAERT, A.; BAUCHERON, S.; MOULINE, C.; CHASLUS-DANCLA, E.** 2003. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium*. J Med Microbiol 52: 697-703.
- GOOSSENS, H.; FERRECH, M.; VANDER STICHELE, R.; ELSEVIERS, M.** 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. Lancet 365: 579 – 587.
- HAYES, J.; ENGLISH, L.; CARR, L.; WAGNER, D.; JOSEPH, S.** 2004. Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from Commercial Poultry Production Environments. Appl. Environ. Microbiol. 70:6005-6011.

- JERNBERG, C.; LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; JANSSON, J.** 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 1: 56-66.
- KLEVEN, S. H.; LEY, D. H.** 2003. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Poultry*, Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. 11th edition. Iowa State Press 719-743.
- KÛHN, I.; IVERSEN, A.; BURMAN, L.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; FRANKLIN, A.; FINN, M.; AARESTRUP, F.; SEYFARTH, A.; BLANCH, A.; VILANOVA, X.; TAYLOS, H.; CAPLIN, J.; MORENO, M.; DOMÍNGUEZ, L.; HERRERO, I.; MÔLLBY, R.** 2003. Comparison of enterococcal populations in animal, human, and environment – a European study. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 133-145.
- LEES, P; SHOJAE F.** 2002. Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. In: *Farmacología y terapéutica veterinaria*, Botana, L.M.; Landoni, F; Martín-Jiménez, T. 1^a edición. McGraw-Hill Interamericana. 484-489.
- MALBRÁN C.** 2001. Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: test de difusión por discos y test de dilución. Buenos Aires: Ministerio de Salud, Subsecretaría de Investigación y Tecnología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Departamento Bacteriología, Servicio Antimicrobianos; 2001 (Documento M31-A NCCLS- Junio 1999). 32 p.
- MANICHANH C.; GIBERT P.; LLOPIS M.; VARELA E.; ANTOLIN M.; GUIGO R.; GUARNER F.** 2009. Persistent Effect of Antibiotics On the Intestinal Microbiota. *Gastroenterology.* 136: 410.
- MASON, K.; DOWNWARD, J.; FALKOWSKI, N.; YOUNG, V.; KAO, J.; HUFFNAGLE, G.** 2012. Interplay between the Gastric Bacterial Microbiota and *Candida albicans* during Postantibiotic Recolonization and Gastritis. *Infect. Immun* 80: 150 – 158.
- MELLA, S.; SEPÚLVEDA, M.; GONZÁLEZ, G.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; ZEMELMAN, R.; RAMÍREZ, C.** 2004. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev. Chil. Infect.* 21: 330 – 338.
- MIRANDA, J.; VASQUEZ, B.; BARROS-VELASQUEZ, J.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.** 2008. Evolution of resistance in poultry intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. *Poult. Sci.* 87: 1643-1648.
- MORENO, M.; TESHAGER, T.; HERRERO, A.; PORRERO, M.** 2000. Antibiotic resistance monitoring: The Spanish Program. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14: 285 – 290.

- NATIONAL RESEARCH COUNCIL** 1994. Nutrient Requirements of poultry, ninth Revised Edition. 157 p.
- NCCLS.** National Committee for Clinical and Laboratory Standards 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Second edition: Approved Standard M31-A2. NCCLS, wayne, PA: USA. 22: 11 p.
- NELSON, J.; CHILLER, T.; POWERS, J.; ANGULO, F.** 2007. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clin. Infect. Dis.* 44:977-980.
- NESTOR, K.; SAIF, Y.; ANDERSON, J.; PATTERSON, R.; LI, Z.** 1999. Variation in Resistance to *Pasteurella multocida* Among Turkey Lines. *Poult. Sci.* 78:1377-1379
- ODEPA, OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS.** 2011. Beneficio pollo broilers-oferta huevos, total país. [En línea]. < http://www.odepa.gob.cl/jsp/sesa/sesa_eBnf_EC.jsp [Consulta 15-12-2011].
- OGEER-GYLES, J.; MATHEWS, K.; SEARS, W.; PRESCOTT, J.; WEESE, J.; BOERLIN, P.** 2006. Development of antimicrobial drug resistance in rectal *Escherichia coli* isolates from dogs hospitalized in an intensive care unit. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229: 694-699.
- OLIVEIRA M.; SANTOS V.; FERNANDES A.; BERNARDO F.; VILELA C. L.** 2010 Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of enterococci from intensive and extensive farming broilers. *Poult. Sci.* 89: 1065–1069
- OSAMA M. ZAYTOUN; ETHAN H. VARGO, RAMANATHAN RAJAN; BERGLUND RYAN; STEVEN GORDON; J. STEPHEN JONES.** 2011. Emergence of Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* as Cause of Postprostate Biopsy Infection: Implications for Prophylaxis and Treatment. *Urology.* 77: 1035 – 1041.
- PATERSON D.** 2004. “Collateral Damage” from Cephalosporin or Quinolone Antibiotic Therapy. *Clin. Infect. Dis.* 38: 341 – 345.
- RAUM, E.; LIETZAU, S.; VON BAUM, H.; MARRE, R.; BRENNER, H.** 2008. Changes in *Escherichia coli* resistance patterns during and after antibiotic therapy: a longitudinal study among outpatients in Germany. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:41-48.
- REYNA, F.; HUESCA, M.; GONZÁLEZ, V.; FUSCH, Y.** 1995. *Salmonella tiphimurium gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1621 – 1623.

- SAG, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2012. Medicamentos de uso veterinario autorizados. [En línea]. <http://www2.sag.gob.cl/pecuaria/medicamentos/medicamentos_list.asp> [Consulta 23-04-2012].
- SAN MARTIN, B.; LAPIERRE, L.; TORO C.; BRAVO, B.; CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J.; BORIE, C.** 2005 Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet Microbiol.* 110: 239-244.
- SÁNCHEZ J. M.; GUILLÁN C.; FUSTER C.; LÓPEZ R.; GONZÁLEZ M.; RAYA C.; GARCÍA J.** 2008. Evolución de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. *Arch. Esp. Urol.*, 61: 776-780.
- SAYAH, R.; KANEENE, J.; JOHNSON, Y.; MILLER, R.** 2005. Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1394–1404.
- SEKIROV, I.; TAM, N.; JOGOVA, M.; ROBERTSON, M.; LI, Y.; LUPP, C.; FINLAY, B.** 2008. Antibiotic-Induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect. Immun.* 76: 4726 – 4736.
- SULLIVAN, A.; EDLUND, C.; NORD, C.** 2001 Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect. Dis.* 1: 101 – 114
- UBEDA, C.; TAUR, Y.; JENQ, R.; EQUINDA, M.; SON, T.; SAMSTEIN, M.; VIALE, A.; SOCCI, N.; VAN DEN BRINK, M.; KAMBOJ, M.; PAMER, E.** 2010. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J. Clin. Invest.* 120: 4332 – 4341.
- VON BAUM, H; MARRE, R.** 2005 Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int. J. Med. Microbiol.* 295: 503-511.
- WAGES, D. P.; OPENGART, K.** 2003. Clostridial Diseases. In: *Diseases of Poultry*, Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. 11th edition. Iowa State Press 781-784.
- WISE, M.; SIRAGUSA, G.** 2006. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J. App. Microbiol.* 10: 1365-2672.
- WITTE, W.;** 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279: 996 – 997.

ZHANEL G.; HISANAGA T.; LAING N.; DECORBY M.; NICHOL K.; WESHNOWESKI B.; JOHNSON J.; NOREDDIN A.; LOWF D.; KARLOWSKY J.; for the NAUTICA Group, Hoban D. 2006. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27: 468–475.

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