

RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS MÁS FRECUENTES

MARTÍNEZ PACHECO, Darío. M.V.

Fundación Universitaria Juan de Castellanos
Pachecomartinez92_6@hotmail.com

CRUZ CARRILLO, Anastasia. M.V. M.Sc.

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Anicata22@hotmail.com

MORENO FIGUEREDO, Giovanni. M.V. Ph.D.

Fundación Universitaria Juan de Castellanos
gio_anny@hotmail.com

Recibido:01/08/2013

Aceptado: 20/09/2013

RESUMEN

La resistencia que desarrollan las bacterias frente a los antimicrobianos utilizados comúnmente, constituye una limitante en el control y tratamiento de las enfermedades infecciosas. En los sistemas de producción de leche bovina, uno de los problemas que más afecta la cantidad y la calidad de la leche producida, es la mastitis, que en la mayoría de los casos es de origen bacteriano. Por lo anterior, fuera de una correcta rutina de ordeño, se utilizan diversos antibacterianos, que por razones farmacocinéticas y farmacodinámicas sean de primera elección para dicha enfermedad. Es así como el uso de antibacterianos para el tratamiento de mastitis, en algunos casos es eficaz, pero en otros no, generalmente debido al desarrollo de resistencia por parte de las bacterias. Con el paso de los años se han ido identificando los diferentes mecanismos de resistencia, desarrollados por las bacterias, lo que ha permitido a los investigadores en farmacología, diseñar nuevos fármacos o modificar los existentes, buscando disminuir la ineficacia que ha generado la mutación sufrida por las bacterias como mecanismo de adaptación. Por lo anterior, el objetivo de esta revisión bibliográfica es ofrecer un documento actualizado sobre los mecanismos de resistencia identificados hasta el momento. Se hizo una consulta de fuentes bibliográficas actualizadas y se elaboró la revisión que aquí se presenta.

Palabras clave: *antimicrobianos, bovinos, mastitis clínica, mastitis subclínica, resistencia bacteriana, sensibilidad bacteriana.*

RESISTANCE OF CAUSING BACTERIA OF BOVINE MASTITIS IN REGARD TO COMMON ANTIMICROBIALS

ABSTRACT

The bacteria develop resistance against to the common antimicrobials, which is a limitant in the control and treatment of infectious diseases. In the systems of production of bovine milk, one problem that affects the quantity and quality of the produced milk, is the mastitis, which in most cases has a bacterian origen. Addition to correct milking routine is used many antibacterial agents that for pharmacokinetics and pharmacodynamics reasons are the first selection for this disease.

Some cases the use of antibacterial agents is effective, while in other cases do not, due to the development of bacterial resistance. Recently, it has been possible to identify different mechanisms of resistance developed by bacteria. This has allowed pharmacology researchers to create new drugs or to modify existing, seeking to decrease the inefficacy caused by the mutation of the bacteria as an adaptative response mechanism. Therefore, the objective of this review is to offer an updated document on resistance mechanisms identified.

Key words: *antimicrobials, bacterial sensitivity, bovines, clinical mastitis, resistance sensitivity, sub-clinic mastitis.*

INTRODUCCIÓN

La leche es el principal alimento para niños y jóvenes, así como para los mamíferos jóvenes antes de que sean capaces de digerir otro tipo de alimento; la leche contiene altos niveles de proteína, grasa, minerales y vitaminas, constituyéndose como un alimento indispensable en la dieta, igual que los derivados lácteos que se preparan a partir de ella. La calidad higiénica de la leche, así como la inocuidad de la misma, dependen de las buenas prácticas ganaderas, de una correcta rutina de ordeño y del cumplimiento de los tiempos de retiro, cuando se aplican tratamientos en animales de producción (Momtaz et al., 2012)

La producción y calidad de leche como la rentabilidad para los productores, se ve disminuida cuando se presentan patologías como la mastitis, la cual es una enfermedad inflamatoria de origen infeccioso, traumático o tóxico, de alta incidencia en los hatos lecheros a nivel mundial, causante de grandes pérdidas

económicas para los productores, debidas al descenso de la producción de leche y a los costos de tratamientos, que también disminuye la calidad de la leche, impactando la inocuidad alimentaria (Imagen No. 1) (Pellegrino *et al.*, 2011; San Martín *et al.*, 2002; Ramírez *et al.*, 2001).

Imagen No. 1. Evaluación de mastitis en un hato de Sotaquirá (Boyacá)



La susceptibilidad de los microorganismos frente a los antibacterianos varía de una región a otra, incluso dentro del mismo país, lo que obliga a los investigadores a realizar estudios epidemiológicos para establecer la presencia de la enfermedad en cada región y sus agentes causales y estudios *in vitro* para determinar la sensibilidad y estado de resistencia de manera periódica (Betancourt *et al.*, 2003).

Existen algunos patógenos que generan mayor impacto en cuanto a la resistencia se refiere, debido a la capacidad de desarrollarla en corto tiempo mediante diferentes mecanismos y contra gran cantidad de agentes y fármacos; tal es el caso de la *Pseudomona aeruginosa* la cual afecta a animales y humanos, y puede encontrarse como contaminante en diferentes fuentes, principalmente, alimentos (Allydice-Francis & Brown, 2012). Con base en la importancia de la pérdida de la eficacia de los tratamientos farmacológicos utilizados para controlar la mastitis, y al impacto que el desarrollo de resistencia genera en la salud animal o humana, con esta revisión se busca dar información actualizada sobre el tema, para que quienes formulan antibacterianos tengan más responsabilidad y lo hagan bajo un criterio médico sustentado.

MASTITIS

La mastitis se clasifica, según los autores, bajo diferentes criterios. Dentro de las clasificaciones más comunes está la que se refiere a mastitis clínica y subclínica. La primera es aquella en la que se presentan signos clínicos, que desencadenan sintomatología sistémica como fiebre, inapetencia y decaimiento; la glándula muestra signos de inflamación (rubor, calor, edema, dolor) y, en algunos casos, llega a estados de fibrosis con pérdida de la función por atrofia de los alvéolos galactóforos. Por su parte, la leche toma aspecto sanguinolento, con coágulos, grumos y notoria disminución de la producción (Calderón et al., 2011; Echeverri et al., 2010; Russi, 2008).

Dentro de los microorganismos causantes de mastitis se destacan bacterias como *Staphylococcus aureus*, que a nivel mundial es la más prevalente y dentro de las que muestran mayor patogenicidad (Fernández et al., 2012; Pellegrino et al., 2011; Boscan et al., 2009; Haveri et al., 2005). Estudios realizados en Chile, indican que esta bacteria es la más frecuente y sobre la cual se ha desarrollado más resistencia (Betancourt et al., 2003). Sin embargo, en otro estudio desarrollado en las regiones V y X de Chile se encuentra una prevalencia de *E. coli* de 40,7%, seguida por *S aureus* con 16% (San Martín et al., 2002). En Argentina, indican que 75,3% de las cepas aisladas fueron del género *Staphylococcus* spp., dentro de las cuales, cerca del 30%, fueron *S. aureus* y el porcentaje restante correspondió a *Streptococcus* spp. (Imagen No. 2), *Escherichia* spp. y *Bacillus* spp. (Pellegrino et al., 2011). En Paraguay, se aislaron 5 géneros bacterianos predominantes en leche cruda, siendo estos *Stafilococcus* spp. (46,4%), *Streptococcus* spp. (18,6%), *Corynebacterium* spp. (18,3%), *Klepsiella* spp. (12,9%) y *E. coli* (3,8%) (Aponte, 2007). Otros microorganismos aislados de la leche, bien como saprofiticos o como patógenos son: *Micrococcus* spp., *Lactobacillos* spp., *Listeria* spp., *Corynebacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Propionibacterium* spp. y *Clostridium* spp. Dentro de las Gram negativas se incluyen: *E. coli*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y la familia *Enterobactereacea* (Russi, 2008). En Montería (Colombia), en hatos de doble propósito, el principal género de bacterias productoras de mastitis fueron diferentes tipos de *Staphylococcus* seguidas por *Streptococcus* y, finalmente, *Corynebacterium* y *E. coli* (Calderón et al., 2011).

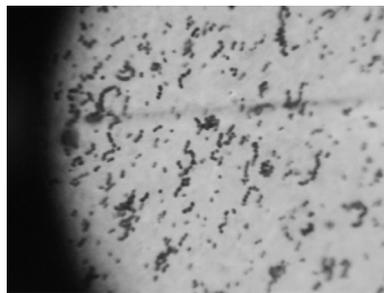


Imagen No. 2. Aislados de *Streptococcus* spp.

La mastitis subclínica no produce manifestaciones visibles, por lo que es difícil de diagnosticar, la glándula mamaria no presenta alteraciones clínicas y el descenso y aspecto de la leche son normales, a pesar de que se encuentran un aumento en el número de células somáticas y células blancas (Fernández *et al.*, 2012; Parada *et al.*, 2011; Echeverri *et al.*, 2010).

En hatos lecheros es más común encontrar casos de mastitis subclínica que de mastitis clínica, en una relación de 30:1, encontrando que la primera produce mayor disminución de leche por persistir durante largos periodos de tiempo (Echeverri *et al.*, 2010). Los diferentes autores indican que la prevalencia, de cualquier tipo de mastitis, se encuentra entre 15-40% del total de animales de producción. En Argentina se reporta menos del 6% de mastitis clínica y cerca del 40% para mastitis subclínica (Manjarrez *et al.*, 2012; Pellegrino *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2007).

En el manejo integral de las mastitis, clínica y subclínica se incluye el uso de antimicrobianos, administrados vía sistémica e intramamaria respectivamente. Dentro de los grupos farmacológicos más utilizados se destacan betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas), nuevos betalactámicos, macrólidos y algunos aminoglicósidos. Sin embargo, algunos de estos antimicrobianos también son utilizados con fines profilácticos, durante el periodo de secado para reducir la mastitis en la siguiente lactancia (Pellegrino *et al.*, 2011; Bajwa *et al.*, 2007; Betancourt *et al.*, 2003)

La “*National Mastitis Council*” propone algunos principios que, aplicados conjuntamente, constituyen un programa eficaz para el control de mastitis en los hatos dentro de los que se destacan:

- Evitar nuevas infecciones.
- Mantener los animales en un lugar seco y limpio.
- Aplicar tratamientos adecuados.
- Eliminar animales incurables (NMC, 2003).

RESISTENCIA A LOS ANTIBACTERIANOS

En el siglo XX fueron descubiertos los antibióticos, constituyendo esto un avance en el control de las enfermedades infecciosas. No obstante, siendo las bacterias organismos vivos, poseen mecanismos biológicos que les permiten adaptarse a situaciones adversas para ellas, como es el caso de la presión que ejercen los antibacterianos. Surge así, la resistencia a los antimicrobianos que es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana (Cabrera *et al.*,

2007). En consecuencia, a los pocos años del inicio de la era antibiótica, se desarrolló resistencia, encontrándose el primer reporte para *Staphylococcus aureus* (San Martín et al., 2002). La resistencia se define como la relativa ausencia de susceptibilidad de una bacteria a un tratamiento en particular, se mide con base en la concentración mínima inhibitoria (CMI) y se debe a mutaciones del genoma bacteriano que pueden ser mutaciones puntuales, deleciones, inversiones o inserciones o bien, ocurre por recepción horizontal de genes de resistencia (transferencia génica horizontal) (Cabrera & Mejía, 2008).

Aunque la resistencia es un proceso normal dentro de la biología de los microorganismos, algunos factores pueden favorecer el desarrollo de la misma, dentro de estos se destacan el uso indiscriminado de antibacterianos, la utilización de los mismos en dosis subterapéuticas, la formulación de estos fármacos como promotores de crecimiento, residualidad de antimicrobianos en alimentos de origen animal, administración de antibacterianos por personal no autorizado, formulación de antibacterianos sin diagnósticos confirmados y suspensión de tratamientos antes de su culminación, entre otros. Es así como el antibacteriano seleccionado no solamente debe actuar contra el agente causal, sino también cumplir con la concentración mínima inhibitoria en la glándula mamaria con un tiempo de permanencia suficiente para cumplir su acción (Parada et al., 2011; Betancourt et al., 2003).

Cepas de *S. aureus*, aisladas de vacas con mastitis en varias regiones de Argentina, muestran resistencia frente a eritromicina, estreptomina, gentamicina, ampicilina-sulbactam, rifampicina y oxacilina; destacándose multiresistencia (Pellegrino et al., 2011; Russi, 2008). Por su parte, en Chile se reporta resistencia de agentes causales de mastitis frente a penicilina G y a ampicilina mediante la producción de diferentes tipos de beta-lactamasas; sin embargo, hubo sensibilidad para cloxacilina, enrofloxacina y neomicina (Betancourt et al., 2003). En las regiones Chilenas V y X se reporta resistencia de los agentes causales de mastitis frente a amoxicilina, ampicilina, estreptomina y lincomicina por parte de *S. aureus*, así como, contra cefoperazona, cectiofur, cloxacilina, enrofloxacina, gentamicina, oxitetraciclina, sulfadiazina-trimetropin, por parte de otras bacterias (San Martín et al., 2003). Los reportes en Paraguay indican que 77% de los *Staphylococcus coagulasa* negativos son resistentes a la neomicina, 47% a la ampicilina, 41% a la nitrofurantoina y con menor porcentaje sulfa-trimetropin, tetraciclina, kanamicina, estreptomina y gentamicina. Por su parte, *Corynebacterium* spp. muestra 34% resistente a la neomicina, 69% al grupo de las penicilinas naturales, 66% a sulfa-trimetropin y 50% a ampicilina. Finalmente, *Klebsiella* y *E.coli* muestran 100% resistencia a penicilinas naturales y estreptomina, respectivamente

(Aponte, 2007). En Montería (Colombia), se encontraron cepas de *S. aureus* resistentes a tetraciclinas y eritromicina, pero sensibles a oxacilina (Calderón *et al.*, 2011). Estudios de resistencia realizados de *E. coli*, en vacas aisladas de vacas con mastitis, muestran resistencia de 92% contra tetraciclina, 90% contra estreptomycinina, 88% contra ácido nadilixico, 86% contra amikacina y 84% contra cefalotina; así mismo, se identifican 65% de casos de resistencia múltiples fármacos (Montaz *et al.*, 2012; Idres *et al.*, 2010; Srinivasan *et al.*, 2007).

La resistencia se ha clasificado en dos tipos, según la forma en que la adquiere la bacteria:

- Resistencia natural o intrínseca, es aquella donde el microorganismo por sus características estructurales carece de sensibilidad a los medicamentos. Este tipo de resistencia, se transmite en forma vertical durante la replicación. Como ocurre con las bacterias Gram negativas, que poseen en su membrana celular externa, canales proteicos denominados porinas que se caracterizan por ser muy selectivos, impidiendo el paso de sustancias hidrofóbicas. Este tipo de resistencia es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, por lo que esta no es una resistencia variable (Cabrera *et al.*, 2007; Vignoli & Seija, 2003).
- Resistencia adquirida, es aquella en que la bacteria muta su ADN perdiendo la sensibilidad a los medicamentos. Este tipo de resistencia puede ser transmitida de forma vertical o bien en forma horizontal, en consecuencia es una resistencia variable y es la que conduce al fracaso de los tratamientos farmacológicos. Para *Pseudomona aeruginosa*, se ha demostrado que buena parte de la resistencia desarrollada no se debe a contacto con antibióticos sino a un proceso adaptivo, lo que demuestra que la presión generada por el uso adecuado o no de los antibacterianos, no es el único factor desencadenante del desarrollo de resistencia a nivel mundial (Cabrera *et al.*, 2007; Betancourt *et al.*, 2003; Vignoli & Seija, 2003). Durante el proceso de resistencia, las bacterias desarrollan un elemento conocido como integrón, el cual aumenta la eficiencia para captar y difundir genes de resistencia; de tal manera que los integrones copian e incorporan genes de resistencia dentro de las bacterias, los cuales están asociados con los plásmidos y los transposones (Chaisatit *et al.*, 2012).

Como se mencionó, la adquisición de genes de resistencia por parte de las bacterias ocurre de forma vertical durante la replicación celular, en el proceso de división celular, de colonias “madre” a bacterias “hijas”. Otro mecanismo de intercambio genético es la trasmisión horizontal, dentro de la que se incluye

la transformación, en la cual, las bacterias mueren quedando segmentos de su ADN, libres en el ambiente que pueden ser captados por otras bacterias a través de receptores para luego ser integrados al ADN (Denap & Hergenrother, 2005; Normark & Normark, 2002). También se incluyen los procesos donde los genes de resistencia pasan de una bacteria a otra por conjugación, transducción o transformación, a través de elementos génicos móviles como transposones, bacteriófagos o plásmidos, la cual ocurre de manera rápida desde las cepas resistentes hasta las cepas sensibles (Warnes *et al.*, 2012; Becerra *et al.*, 2009; Cabrera & Mejía, 2008). La conjugación ocurre de célula a célula, donde una que contiene un plásmido de resistencia, actúa como donante, que con la intervención de un elemento de naturaleza proteica llamado pili sexual, ocurre el apareamiento entre ambas para la formación de un puente de conjugación, que pase el ADN de una bacteria a otra y con ello ocurra el “apareamiento” entre ambas células.

En la transducción, el ADN cromosómico o plasmídico se incorpora a su ADN viral, que luego se integra a genes de otra bacteria, cumpliéndose con esto las transmisiones de la información genética de resistencia. Se ha demostrado que algunas bacterias Gram positivas producen feromonas que facilitan la unión de dos bacterias para que ocurra el intercambio de ADN (Sharma *et al.*, 2005; Grohmann *et al.*, 2003). Por su parte, en la transducción, algunos virus bacterianos o bacteriófagos transfieren de una bacteria a otra segmentos génicos de resistencia, los cuales la bacteria incluye en su genoma haciéndose resistente; este mecanismo se ha reconocido en procesos de multiresistencia (Sharma *et al.*, 2005). Finalmente, en la transformación un fragmento de ADN entra a una bacteria receptora ocurriendo la recombinación genética y la incorporación de información de resistencia (Orman, 2006).

La transmisión de genes de resistencia en forma horizontal, incrementan notablemente la incidencia de resistencia a nivel mundial y depende en buena parte de la capacidad de los patógenos de persistir en diferentes entornos y particularmente en superficies inertes, así como en organismos vivos (Warnes *et al.*, 2012). Se ha identificado otro elemento que puede ser transmitido por conjugación y son las islas de patogenicidad, que corresponde a segmentos de ADN que transportan factores facilitadores de la supervivencia de algunos microorganismos en condiciones de estrés (Cabrera & Mejía, 2008).

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Teniendo en cuenta la forma por la cual las bacterias se han vuelto resistentes a los antibacterianos, se pueden identificar varios mecanismos de resistencia dentro de los que se destacan: inactivación del fármaco, bombas de eflujo, modificación del sitio blanco y para *P. aeruginosa* se ha reportado el sistema de formación de un biocapa en la cubierta externa de la bacteria (Allydice-Francis & Brown, 2012).

Inactivación del fármaco

Este mecanismo de resistencia es desarrollado contra antibacterianos del grupo de los *B*-Lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos) principalmente. La enzima es sintetizada por diferentes tipos de bacterias y se conoce como beta-lactamasa, siendo un complejo enzimático dentro de los cuales se han identificado cuatro clases:

- a. Clase A: penicilinasas. Actúan contra las penicilinas.
- b. Clase B: betalactamasas. Actúan contra los betalactámicos.
- c. Clase C: cefalosporinasas. Actúan contra las cefalosporinas.
- d. Clase D: oxacilinasas. Actúan contra la oxacilina (Russi, 2008; Cabrera *et al.*, 2007; Poole, 2002).

Dentro de la estructura química de las betalactamasa se destaca la presencia de la serina, que participa en el proceso de catálisis mediante la formación del complejo acil-enzima necesario para unirse al antibiótico e hidrolizar el anillo B-Lactámico (Fuschs *et al.*, 1994).

En respuesta al surgimiento de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, resistentes a la beta-lactamasa tradicional, con el paso de los años las bacterias Gram negativas, generaron un nuevo grupo de betalactamasas, de espectro extendido, disminuyendo la eficacia a los nuevos fármacos. Así mismo, posterior al surgimiento de los carbapenems, las bacterias produjeron enzimas que los destruyen perdiendo con ello la eficacia a dicho grupo (Cabrera *et al.*, 2007). Lo anterior, permite identificar una situación en que la industria farmacéutica produce antibacterianos y en pocos años las bacterias generan resistencia, lo que dificulta la eficacia de los tratamientos. Además, afecta la morbi-mortalidad de las enfermedades infecciosas en animales y humanos.

La síntesis de enzimas que destruyen los antibacterianos, también se ha demostrado en bacterias resistentes a la eritromicina que, a través de una esterasa, hidrolizan el anillo lactona del antibiótico. Igualmente, algunas bacterias, inactivan a los aminoglicósidos mediante la síntesis de enzimas que producen N-acetilación de los grupos amino y los fármacos de este grupo y una O-fosforilación de grupos hidroxilo. Estos genes de resistencia se han encontrado en transposones y en plásmidos (Lewis, 2007; Fuschs *et al.*, 1994).

El desarrollo de resistencia contra los antibióticos betalactámicos generalmente ocurre por excesivo y prolongado uso de los mismos, lo que genera una presión de selección que va reduciendo la disponibilidad de principios activos eficaces. Por otra parte, en términos generales, la transmisión de los genes de resistencia que codifica la formación de betalactamasas se hace en forma horizontal mediante plásmidos y transposones (Warnes *et al.*, 2012).

Bombas de eflujo

Las bacterias procariotas y eucariotas poseen sistemas de transporte que intervienen en procesos vitales, como la toma de nutrientes, expulsión de componentes tóxicos y mantenimiento de homeostasis celular, en tal sentido, las bacterias expresan proteínas membranales de transporte denominadas translocasas de membrana, que expulsan el fármaco que ingrese a la bacteria, impidiendo que este ejerza su efecto, dichas enzimas se han identificado en células eucariotas confirmando resistencia a los medicamentos anticancerígenos y en células procariotas como mecanismos de multirresistencia (Thomson & Smith, 2000). Para el caso de las bacterias Gram negativas, este sistema de eflujo funciona en 3 niveles, una proteína en la membrana citoplasmática, otra en espacio periplásmico y otra en la membrana externa, y pueden producir resistencia a varios antibacterianos (Cabrera *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los genes que codifican las bombas de eflujo, se localizan en los cromosomas o en plásmidos; igualmente, este mecanismo se asocia con aquellos casos en que incrementa la concentración mínima inhibitoria de varios antimicrobianos contra una misma bacteria. Dentro de las familias de proteínas de eflujo que se han podido identificar, se han determinado aquellas expresadas por bacterias Gram negativas que son diferentes a las producidas a las de las bacterias Gram positivas, sin embargo, ese mecanismo es más común en las primeras (Becerra *et al.*, 2009; Tafur, 2008; Nikaido & Zgurskaya, 2001).

Estas bombas pueden ser específicas para un fármaco, en tal caso son codificadas por plásmidos y fácilmente transmisibles, o bien inespecíficas expresadas por el cromosoma bacteriano y como consecuencia se encuentra

un aumento en el CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y una resistencia clínicamente manifiesta (Derpardieu *et al.*, 2007).

Bloqueo en la entrada

La mayoría de antibacterianos requieren pasar la pared y la membrana de las bacterias, para ejercer su efecto al interior de las mismas, que para el caso de las bacterias Gram negativas, implica el paso por una barrera adicional que es la membrana celular externa, la cual tiene proteínas selectivas (porinas) que son canales acuosos donde atraviesan los fármacos (Wright *et al.*, 2005). Algunas bacterias modifican la estructura de los canales proteicos (porinas) de la membrana celular, impidiendo la entrada de los antibacterianos. La falta de porinas o el cambio en su estructura, evita o disminuye la entrada del antimicrobiano a la bacteria, dificultando su llegada al sitio blanco a ejercer su acción. Dentro de este mecanismo también se incluyen aquellas mutaciones en que se altera, por falta de ATP, el transporte activo para aquellos antimicrobianos de acción intracelular que deben entrar por este mecanismo a la célula bacteriana (Russi, 2008; Goodman, 2003).

Modificación del blanco

Uno de los mecanismos de resistencia más importante, es aquel en el que la mutación bacteriana se manifiesta en un cambio de la estructura del sitio de acción del fármaco. En este grupo se puede destacar las modificaciones por metilación del RNAr (Ácido Ribonucleico Ribosomal), que hacen resistentes a algunas bacterias Gram negativas, frente a los macrólidos, este mecanismo constituye el método por el cual disminuye la afinidad del antibiótico por el ribosoma, sin afectar la síntesis de las proteínas bacterianas (Chambers, 2006; Yoneyama & Katsumata, 2006). Así mismo, los cambios en las PBP (proteínas ligadoras de penicilinas), específicamente las modificaciones en la peptidasa y carboxipeptidasa, que conduce a una baja afinidad del fármaco por el sitio de acción, explican la resistencia de algunos microorganismos a los beta-lactámicos. Finalmente, algunos genes de resistencia, imitan la estructura del ADN que se une a la ADN girasa, evitando que la enzima fragmente la cadena de ADN durante la replicación o transcripción, conduciendo al súper enrollamiento de la cadena. Mediante este mecanismo se desarrolla la resistencia a las quinolonas y fluorquinolonas (Orman, 2006; Poppe *et al.*, 2005).

RESISTENCIA A ALGUNOS ANTIBACTERIANOS

Hay evidencias de que el aumento de la resistencia a los antimicrobianos y la presencia de genes de resistencias a los mismos, ha aumentado en el medio ambiente por los factores ya mencionados y plenamente identificados. Sin embargo, existe un factor adicional al cual no se le presta mucha atención y parece ser determinante en el aumento de la resistencia a nivel mundial. Dicho factor es la movilización de genes de resistencia en los diferentes componentes del ecosistema que determinan la presencia de los mismos, pudiendo transmitirse a diferentes colonias bacterianas diseminándolos a gran escala. En consecuencia, la presencia de resistencia bacteriana a diferentes fármacos, puede darse también, aun cuando las bacterias no hayan estado expuestas a los antibacterianos, sino por transmisión de genes de resistencia entre colonias expuestas y no expuestas (Knapp *et al.*, 2012; Knapp *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2010).

Resistencia a los beta-lactámicos

Se ha demostrado que los microorganismos que desarrollan resistencia a los betalactámicos lo hacen modificando el blanco de acción y sintetizando las betalactamasas. En el primer caso, las bacterias modifican la estructura de las PBP (Proteínas Ligadoras de Penicilina), estructuras donde ejercen su efecto estos antibióticos. En tal caso las PBP resultan menos afines a penicilinas y cefalosporinas, disminuyendo o anulando la acción de las mismas. Este mecanismo se ha reportado en cepas de *S. pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae*. Por otra parte, las betalactamasas se clasifican en cuatro clases: A, B y D están codificadas por plásmidos y la C es codificada en el cromosoma bacteriano, y es la responsable de la resistencia de la cefalosporina de segunda y tercera generación. En uno y otro caso son proteínas globulares que, mediante un enlace covalente reversible, se unen por acilación al anillo betalactámico generando una “tensión” sobre el grupo carbonilo, que rompe el grupo amida del grupo betalactámico conduciendo a su hidrólisis y posterior pérdida de la capacidad antibacteriana. La expresión de betalactamasa C, conduce a alteración de la síntesis y reciclaje del peptidoglicano, afectando la pared bacteriana (Castellano & Perozo-Mena, 2010; Vignoli & Seija, 2003).

Dentro de los betalactámicos que tienen menores tasas de resistencia son los carbapenems, sin embargo, estos valores han aumentado en los últimos años en Latinoamérica, Estados Unidos y Europa, y se ha aislado e identificado el tipo beta-lactamasa causantes de la resistencia al aztreonam e imipenem, denominadas carbapenemasas, que son las mismas que producen resistencia a cefoxotin y cefotetan y se encuentran en los plásmidos. Igualmente, para este grupo de antibacterianos se ha demostrado alteraciones en las purinas y

expresión exagerada de bombas de eflujo (Suárez *et al.*, 2006). Se reconoce un grupo de betalactamasas de espectro extendido, producidas por bacterias Gram negativas como *Klebsiella* spp. y *E.coli*, las cuales dan resistencia a las cefalosporinas de primera y tercera generación, penicilinas y aztronam, pero no actúa contra los carbapenems. Este tipo de enzimas son bloqueadas por los inhibidores de las betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam) (Tafur, 2008).

Resistencia de las quinolonas y fluorquinolonas

Para este grupo de antibacterianos se reportan tres tipos de resistencia.

- Resistencia de tipo cromosómico en la que se producen mutaciones de los segmentos de los genes que codifican la ADN girasa, específicamente la sub unidad A tras lo cual, el antibacteriano no se puede ligar a la enzima. Hace cerca de 15 años, se viene reportando este mecanismo de resistencia, para *E.coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *P. aeuroginosa*, *S. aureus*, *S. peunominae* (Vignoli & Seija, 2003).
- Resistencia por alteración en la membrana bacteriana externa con lo que disminuye la penetración intracelular del fármaco. Es sabido que para que las quinolonas y fluorquinolonas ejerzan su acción antibacteriana deben superar la cubierta bacteriana, para llegar a su sitio blanco de acción, la ADN girasa. En consecuencia, las mutaciones en los genes que codifican la formación de las porinas bloquean la entrada de estos fármacos a la bacteria. Este tipo de resistencia es reportada principalmente en bacterias Gram negativas.
- Formación de bombas de eflujo o de transportador endógeno activos que expulsan el fármaco que haya entrado a la célula sin haberlo dejado actuar. De manera similar al mecanismo anterior, éste se manifiesta en bacterias Gram negativas, aunque también se ha identificado en *Bacillus subtilis* y *S aureus* (Vignoli & Seija, 2003; Talens-Visconti *et al.*, 2002). Dicho sistema de expulsión se localiza en la membrana celular interna y está compuesto por un transportador y una proteína periplásmica accesoria, la cual se alarga hacia la membrana externa formando un trímero con la proteína periplásmica bombeando el fármaco hacia el exterior.

Aminoglicósidos

Se describen tres mecanismos de resistencia que en su orden son: inactivación enzimática, alteración de la permeabilidad y modificación del sitio de acción, es decir, la sub-unidad 30 S de ARN ribosomal. Las bacterias sintetizan enzimas acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfottransferasas,

de carácter cromosómico o plasmídico capaces de alterar la estructura del antibiótico y con ello, perder su actividad. Adicionalmente la entrada de los aminoglicósidos a las bacterias requiere un sistema de transporte acoplado al gradiente protónico dependiente de ATP, el cual es modificado por las bacterias resistentes, impidiendo la entrada del mismo a ejercer acción (Molina *et al.*, 2009). La resistencia a los aminoglicósidos, generalmente es desarrollada por bacterias que han estado expuestas a concentraciones sub-terapéuticas, esto es concentraciones inferiores a la CMI y se considera una resistencia adaptativa. Esta situación se ha logrado disminuir, con la utilización de los esquemas unidosis, es decir, el uso de estos fármacos en dosis elevadas pero únicas, con lo que se logran mayores concentraciones plasmáticas y, por ello, mayor efecto bactericida (Shakil *et al.*, 2008; Palomino & Pachón, 2003).

Macrólidos

En este grupo de antibacterianos se han descrito cuatro mecanismos de resistencia:

- La resistencia intrínseca que es un mecanismo natural de las enterobacterias mediante el cual, estas modifican la estructura de las porinas, disminuyendo la permeabilidad de la membrana bacteriana por lo que el macrólido no puede penetrar a ejercer su efecto (Mensa *et al.*, 2003).
- Modificación del ARN ribosomal es un mecanismo de resistencia mediado por plásmidos y transposones los cuales codifican una metilasa, que altera por metilación, la estructura de la sub-unidad 50 S, de ARN ribosomal, sitio blanco de acción de los macrólidos. Dicha mutación conduce a una disminución de la afinidad de los macrólidos, lincomicinas y estreptogaminas por su sitio de acción (Samaniego, 2005).
- Bombas de eflujo, las bacterias que desarrollan este tipo de resistencia forman canales proteicos para la expulsión del fármaco, impidiendo que este ejerza su efecto. Los más afectados por este mecanismo son los macrólidos de 14 (eritromicina, claritromicina, oleandomicina, roxitromicina, diritromicina, fluritromicina) y de 15 carbonos azitromicina (Caballero, 2007).
- Modificación enzimática, se han identificado estereasas y fosfotransferasas producidas por enterobacterias que inactivan los antibióticos de este grupo (Núñez, 2004; Vignoli & Seija, 2003).

El conocimiento de los mecanismos de resistencia antibacteriana, constituye un soporte para el desarrollo de nuevos fármacos o grupos farmacológicos que molecularmente estén diseñados para no perder su eficacia frente a cepas

bacterianas que han adquirido algún tipo de resistencia. Es de anotar que la síntesis de nuevas moléculas con acción antibacteriana o la purificación de productos naturales, resulta costosa y prolongada, por lo que a partir del conocimiento de estos procesos se han podido generar fármacos modificados, que recobran su eficacia como ocurrió con el tianfenicol, molécula modificada a partir del cloranfenicol, ocloxacilina y dicloxacilina que son resistentes a betalactamasas a las cuales son sensibles las penicilinas naturales (Allen *et al.*, 2010; Becerra *et al.*, 2009; Goodman, 2003). La comprensión de la complejidad de los mecanismos de resistencia debe hacer que los profesionales de las áreas médicas, tomen conciencia sobre la responsabilidad que tienen, respecto al uso correcto de los antibacterianos para disminuir los niveles de resistencia a nivel mundial.

CONCLUSIONES

El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo y adaptativo de los microorganismos, por lo cual inevitablemente, se va a presentar e irá aumentando con el paso del tiempo. Sin embargo, la presencia de la misma al variar de una región a otra, determina la necesidad de que sea estudiada periódicamente en las diferentes regiones de cada país (Imagen No. 3). Adicionalmente, el conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia, permite hacer modificaciones farmacológicas para recuperar la sensibilidad de los antibacterianos y con ello contrarrestar la ineficacia producto del desarrollo de resistencia.



Imagen No. 3. Antibiograma con sensibilizadores

LITERATURA CITADA

ALLYDICE-FRANCIS, K. & BROWN. 2012. Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. *International Journal of Microbiology* 4: 262-271.

ALLEN, H.K. DONATOS, J. & WANGS, A. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature. Reviews. Microbiology* 8 (4): 251-259.

APONTE, C.C. F. 2007. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 5(1): 19-25.

BAJWA, N.S., BANSAL, B.K., SRIVASTAVA, A.K. & RANJAN, R. 2007. Pharmacokinetic profile of erythromycin after intramammary administration in lactating dairy cows with specific mastitis. *Veterinary Research Communication* 31: 603-610.

BECERRA, G., PLASCENCIO, A., LUÉVANOS, A., DOMÍNGUEZ, M. & HERNÁNDEZ, I. 2009. Mecanismos de resistencia a antibacterianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas* 29 (2): 70-78.

BETANCOURT, O, SCARPA, C. & VILLAGRÁN, K. 2003. Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX región de Chile. *Revista Científica FCV-LUZ* 13 (5): 413-417.

BOSCAN O. J., VILLARROEL N. R., OVIEDO B.A., SÁNCHEZ V.A., PINO, R. D., GARCÍA, B., HERNÁNDEZ, G, L., GONZÁLEZ & PÉREZ, B. M. 2009. Bacterias patógenas potenciales al inicio del periodo seco de vacas doble propósito con mastitis subclínica. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=95911669010>. Accesado: 20/01/2013.

CABALLERO, R. J. 2007. Actualización en farmacología clínica: Macrólidos. *Revista Paceaña de Medicina Familiar* 4(6): 149-153.

CABRERA, C. E., GÓMEZ, R. F. & ZÚÑIGA, A. E. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* 38 (2): 149-158.

CABRERA, A. C. E. & MEJÍA, O. C. 2008. Los mecanismos de resistencia a antibióticos: ¿Podremos lograr un equilibrio entre el uso – abuso de los antibióticos y así lograr la disminución de la resistencia bacteriana a estos medicamentos? Revista Colombiana de Salud Humano 3 (1): 83-104.

CALDERÓN, R. A., RODRÍGUEZ, R. V., ARRIETA, B. G & MATTAR, V. L. 2011. Prevalence of mastitis in dual-purpose cattle farms in Montería (Colombia): etiology and antibacterial susceptibility. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 24:19-28.

CASTELLANO, G. M & PEROZO-MENA, A. 2010. Mecanismos de resistencia a antibióticos B-Lactámicos en *Staphylococcus aureus*. Revista Kasmara 38 (1):18-35.

CHASITIT, C., TRIBUDDHARAT C, PULSRIKARN C & DEJSIRILERT, S. 2012. Molecular characterization of antibiotic-resistant bacteria in contaminated chicken meat sold at supermarkets in Bangkok, Thailand. Japanese Journal of Infectious Diseases 65: 527-534.

CHAMBERS H.F. 2006. General principles of antimicrobial therapy. Chapter – 42. Section VIII - Chemotherapy of microbial diseases. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics- 11th ed.

CRUZ, C.A., ESPITIA, C.E., HERNÁNDEZ, L.J.J.A & SANABRIA, V.J.P. 2007. Identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos. Revista UDCA. Actualidad & Divulgación Científica 10: 81-89.

DENAP, J.C.B. & HERGENROTHER, P. J. 2005. Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. Organic & Biomolecular Chemistry 3: 959-966.

DEPARDIEU, F., PODGLAJEM, I., LECLERCQ, R., COLLATZ, E & COURVALIN, P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin. Microb. Resistance 20: 79-114.

ECHEVERRI, Z. J. J., JARAMILLO, M. G. & RESTREPO, B. L. F. 2010. Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. Revista. Lasallista Investigación 7(1): 49-57.

FERNÁNDEZ, B. O. F., TRUJILLO, G. J. E., PEÑA, C. J. J. & CERQUERA, G. J. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. Redvet. 13 (11):1-11. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111112.html>. Accesado: 10/01/2013.

FUCHS, L. Y., CHIHU, L., CONDE, C., GONZÁLEZ, V. M., NOGUEZ, A. H., CALDERÓN, E., AVONCE, N. & OVANDO, C. 1994. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Salud Pública México 36 (4):428-438.

GOODMAN G. A. 2003. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ª. Ed. Mc Graw Hill. Vol. II. Cap. 40. México. 330 pp.

GROHMANN, E., MUTH, G. & ESPINOSA, M. 2003. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(2): 277-301.

HAVERI, M.; SUOMINEN, S.; RANTALA, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. & PYÖRÄLÄ, S. 2005. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. Veterinary Microbiology 106: 97-102.

IDRESS M, MUSSARAT U, BADSHAH Y, QAMAR R. & BOKHARI H. 2010. Virulence factors profile of drug-resistant *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Punjab, Pakistan. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 29 (12):1533-1537.

KNAPP, C.W., LIMA, L., OLIVARES-RIEUMONT, S., BOEN, E., WERNER, D. & GRAHAM, D.W. 2012. Seasonal Variations in Antibiotic Resistance Gene Transport in the Almendares River, Havana, Cuba. Front Microbiol. 3: 396.

KNAPP, C.W.; DOLFING, J; EHLERT, P.A. & GRAHAM, D.W. 2010. Evidence of increasing antibiotics resistance gene abundance in archived soils since 1940. 44 (2): 580-587.

LEWIS K. 2007. Persistent cells, dormancy and infectious disease. Nature Reviews Microbiology 5: 49-56.

MANJARREZ, L.A.M., DÍAZ, Z.S., SALAZAR, G.F., VALLADARES, C.P., GUTIÉRREZ, C.A., BARBABOSA, P.A., M. TALAVERA, R.M., ALFONSO, S.M. & VELÁSQUEZ, O.V. 2012. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis

subclínica en la región centro-este del Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 3(2): 265-274.

MENSA, J., GARCÍA-VÁSQUEZ E. & VILA J. 2003. Macrólidos, estóolidos y estreptograminas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 21(4): 200-208.

MOMTAZ, H., FARHAD SAFARPOOR D., TAGHI, T REZVANI, A. & YARALI, S. 2012. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitic Milk: Serogroups, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance Properties. *Scientific World Journal*. 618-709.

MOLINA, J; CORDERO, E., PALOMINO, J. & PACHÓN, J. 2009. Aminoglicósidos y polimixinas. *Microbiol Clin*. 27(3):178-188.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). 2003. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4th ed. National Mastitis Council, W.D. Hoard and Sons Co. Fort Atkinson, WI. 39-44.

NIKAIDO, H. & ZGURSKAYA, H.I. 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3: 215-218.

NORMARK, B.H. & NORMARK, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 252: 91-106.

NÚÑEZ, F.B. 2004. Macrólidos. *Uso racional de antibióticos* 4: 17-22.

ORMAN, B. 2006. La resistencia bacteriana y sus mecanismos de dispersión. *Revista de la Facultad de Odontología Universidad de Buenos Aires*. 21 (50/51): 13-19.

PALOMINO, J. & PACHÓN, J. 2003. Aminoglicósidos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 21(2): 105-115.

PARADA, J.L., GONCALVES, D., SOCCOL, V.S., LIMA, M. & SOCCOL, C.R. 2011. Bovine Mastitis in the Metropolitan Area of Curitiba: Antibiotic Resistance and Antimicrobial Control of the Infection. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54 (4): 709-716.

PELLEGRINO, M.S, FROLA, I.D., ODIERNO, L.M. & BOGNIA, C.I. 2011. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus*

aureus asiladas de leche. REDVET Rev. Electrón. Vet. 12 (7). Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070711/071110.pdf>. Accesado: 26/12/2012.

POOLE K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 92: 55S-64S.

POPPE, C., MARTIN, L. C., GYLES, C. L., REID-SMITH, R., BOERLIN, P., MCEWEN, S. A., PRESCOTT, J. F. & FORWARD, K. R. 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. Applied and Environmental Microbiology 71(3):1184-1192.

RAMÍREZ, N., GAVIRIA, G., ARROYABE, O., SIERRA, B. & BENJUMEA, J. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 14 (1): 76-87.

RUSSI, N. 2008. Susceptibilidad de antibióticos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina. Tesis para optar el título de Magíster Scientiae en Ciencias Veterinarias, Mención Salud Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Litoral. Esperanza, Argentina.

SAMANIEGO, E. 2005. Macrólidos y lincosamidas En: Fundamentos de Farmacología Clínica. 6ª. Edición. Ed. C.C.E. Quito. II: 1129-1134.

SAN MARTÍN, B., MORALES, M.A., AGÜERO, H., LEÓN, B., ESPINOZA, S., IRAGÜEN, D., PUGA, J. & BORIE, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región Metropolitana y Xa Región, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria 34 (2): 221-234.

SHAKIL, S., KHAN, R., ZARRILLI, R. & KHAN, A.U. 2008. Aminoglycosides versus bacteria a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. Journal Biomedical Sciences 15: 5-14.

SHARMA R, SHARMA CL. & KAPOOR B. 2005. Antibacterial Resistance: Current Problems and Possible Solutions. Indian Journal Medicine Science 59(3):120-129.

SRINIVASAN, V., GILLESPIE, B. E. & LEWIS, M. J. 2007. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. Veterinary Microbiology 124 (3-4): 319-328.

SUÁREZ, C.J., KATTAN, J, N, GUZMÁN, A.M. & VILLEGAS, M.V. 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Asociación Colombiana de Infectología 10(2): 85-93.

TAFUR, J. D., TORRES, J.A. & VILLEGAS, M.V. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Asociación Colombiana de Infectología 12 (3): 227-232.

TALÉNS-VISCONTI, R., GARRIGUERS, T.M. & CANTÓN, E. 2002. Mecanismo de resistencia bacteriana a las quinolonas. Disponible en http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0102/rev1/rev1. Accesado: 15/01/2013.

THOMSON, KS. & SMITH ME. 2000. The New b-lactamasas on gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and Infection Journal* 2: 1225-1235.

VIGNOLI, R. & SEIJA, V. 2003. Principales Mecanismos de Resistencia. Cap 35: 649-662. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>. Accesado: 12/12/2012.

WARNES, S.L., HIGHMORE, C.J. & KEEVIL, W. 2012. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes on Abiotic Touch Surfaces: Implications for Public Health. *mBio*. Nov-Dec: 3(6).

WRIGHT, G. D. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:1451-1470.

YONEYAMA H. & KATSUMATA R. 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience. Biotechnology Biochemical* 70(5):1060-1075.