



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**"ESTUDIO DE INTEGRONES CLASE 1 Y 2 DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DESDE AVES
Y CERDOS FAENADOS EN LA REGIÓN METROPOLITANA DE CHILE"**

LEONARDO ANDRÉS LEÓN CISTERNAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: CECILIA TORO UGALDE

**SANTIAGO, CHILE
2007**



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



**"ESTUDIO DE INTEGRONES CLASE 1 Y 2 DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DESDE AVES
Y CERDOS FAENADOS EN LA REGIÓN METROPOLITANA DE CHILE"**

LEONARDO ANDRÉS LEÓN CISTERNAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CECILIA TORO U.
PROFESOR CONSEJERO: CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CONSEJERO: BETTY SAN MARTIN N.

SANTIAGO, CHILE
2007

RESUMEN

El uso de antimicrobianos en medicina veterinaria al igual que en medicina humana constituye una herramienta fundamental en la terapia y profilaxis de las enfermedades bacterianas. Esto ha llevado a que bacterias de origen animal adquieran resistencia a varios de los antimicrobianos usados y en consecuencia aparezca el riesgo de diseminar este fenotipo de resistencia a bacterias de origen humano o viceversa.

El fenómeno de resistencia a los antimicrobianos es un proceso natural y progresivo que se disemina en la población bacteriana. Se han identificado diferentes elementos que favorecen esta diseminación mediante eventos de transferencia genética. Los integrones son estructuras genéticas móviles con capacidad de integrar la información de uno o varios genes de resistencia a antimicrobianos y facilitan la diseminación horizontal de la resistencia. Debido a que constituyen una fuente muy importante de transmisión y diseminación de la multirresistencia es frecuente encontrar integrones en bacterias que presentan resistencia a antimicrobianos.

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de integrones clase 1 y 2 y su asociación estructural con los genes que codifican resistencia a tetraciclina, estreptomycin y trimetoprim en cepas de *Salmonella* spp y *E. coli* aisladas desde cerdos y aves faenados en la Región Metropolitana de Chile. Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 35 cepas de *Salmonella* spp aisladas desde cerdos y 38 cepas aisladas desde aves; en el caso de *E. coli*, 90 cepas aisladas desde cerdos y 87 cepas aisladas desde aves, cuyo patrón de susceptibilidad a antimicrobianos había sido previamente caracterizado. Se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar la presencia de los integrones y de los genes que codifican resistencia a los antimicrobianos descritos anteriormente.

El 73.4% de las *E. coli* aisladas desde cerdos y el 28.7% aisladas desde aves presentaron al menos una de las clases de integrón. En las cepas de *Salmonella* spp aisladas desde cerdos se determinó que el 45.7% presentó una

de las clases de integrón. En cambio, *Salmonella* spp aisladas desde aves no presentaron integrones. Del total de bacterias que presentaron integrones se determinó que el integrón clase 1 es más frecuente que el clase 2.

En el total de cepas con integrón se evidenció la presencia de los genes que codifican la resistencia a trimetoprim (*dhfrIa*), estreptomicina (*aad1a*) y tetraciclina ((*tetA(A)*; *tetA(B)*). Sin embargo, en ambas clases de integrones sólo se determinó la asociación estructural con los genes que codifican resistencia a trimetoprim (*dhfrIa*) y estreptomicina (*aad1a*).

Finalmente, el análisis de los resultados permite evidenciar que la resistencia bacteriana a ciertos antimicrobianos está asociada a la presencia de integrones, elementos genéticos que favorecen la diseminación de este fenómeno de resistencia. Por ello, esta información aporta antecedentes moleculares que demuestran la urgente necesidad de instaurar e implementar programas de monitoreo y control farmacológico en la industria de productos alimenticios de origen animal. De esta forma, se podrá contar con más herramientas que permitan enfrentar correctamente aspectos relacionados con la inocuidad alimentaria, sobre todo cuando las empresas de producción animal y las políticas nacionales tienen como objetivo posicionar a Chile como una potencia agropecuaria.

SUMMARY

The use of antibiotics in veterinary medicine as in human medicine constitutes a pivotal tool in therapy and prophylaxis of bacterial diseases. Thus, bacteria from animal sources acquire resistance to several antimicrobial agents and consequently appear the risk of transferring this resistance phenotype to bacteria from human or vice versa.

The phenomenon of antimicrobial resistance is a natural and progressive process that is disseminated in the bacterial population. Different elements have been identified that enhance this spreading by horizontal genetic transference. Integrons are mobile genetic structures capable to capture, integrate, and express gene cassettes encoding antibiotic resistance. Because they facilitate the horizontal dissemination of the resistance phenotype is frequent to find integrons in antimicrobial resistant bacteria.

The aim of this study was determine the presence of integrons class 1 and 2, and their structural association with resistance genes cassettes to tetracycline, streptomycin and trimethoprim in *Salmonella* spp and *Escherichia coli* strains isolated from pigs and poultry slaughtered in the Metropolitan Region of Chile. To carry out this work 35 *Salmonella* spp strains isolated from pigs and 38 strains isolated from poultry were analyzed. Furthermore, 90 and 87 *E. coli* strains were isolated from pigs and poultry, respectively. Antimicrobial susceptibility patterns were previously characterized for all these strains. Presence of integrons and resistance gene cassettes were detected by Polymerase Chain Reaction (PCR).

Seventy-three point four per cent and 28.7% of isolated *E. coli* from pigs and poultry, respectively, harbored at least one class of integron. *Salmonella* spp isolated from pigs displayed one class of integrons in 45.7%. However, *Salmonella* spp isolated from poultry did not present integrons. Integron class 1 was more frequent than integron class 2.

In the total strains with integron we evidenced the presence of genes that codified resistance to trimethoprim (*dhfr1a*), streptomycin (*aad1a*), and tetracycline ((*tetA(A)*; *tetA(B)*). However, in both class of integrons we determined the structural association only with the genes that codified resistance to trimethoprim (*dhfr1a*) and streptomycin (*aad1a*)

Finally, the analysis of these results demonstrates that the bacterial resistance to antimicrobial agents is associated to the presence of integrons, genetic elements that enhance the dissemination of this resistance phenomenon. For that reason, this molecular information contributes to demonstrate the urgent requirement to implement programs of monitoring and pharmaceutical control programs in the food-producing animals industry. Thus, more tools will be available to control correctly and improve the food safety, supporting the development of better quality products.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	3
• Historia.	3
• Antimicrobianos en Medicina Veterinaria.	6
• Clasificación de Antimicrobianos.	7
• Familias de Antimicrobianos.	7
• Resistencia Bacteriana.	9
• Mecanismos de Resistencia a Antimicrobianos.	11
• Transferencia de Resistencia a Antimicrobianos.	12
• Integrón Clase 1.	14
• Integrón Clase 2.	15
• Situación en el Mundo.	16
• Situación en Chile.	16
Objetivo General.	19
Objetivos Específicos.	19
Materiales y Métodos.	20
• Diseño.	20
• Determinación de regiones específicas de genes de integrones clase 1 y 2 usando técnica de PCR.	20
• Determinación de genes específicos de resistencia a Tetraciclina, Trimetoprim y Estreptomina.	22
• Asociación estructural de genes de integrones con genes de resistencia a antibióticos.	23
• Electroforesis y visualización de amplificadores de la asociación de partidores.	25
• Bioseguridad.	26
Resultados	27
• Determinación de la presencia de integrones clase 1 y/o 2.	27
• Estudio de cepas de <i>Escherichia coli</i> en muestras aisladas de cerdos y aves.	27
• Estudio de cepas de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de cerdos y aves.	28
• Identificación de genes de Resistencia a antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> .	30
• Asociación estructural de genes de integrasas con genes de resistencia a antibióticos.	31
• Determinación del tamaño molecular de la zona variable.	31
• Asociación de genes de resistencia en cepas con integrón clase 1.	32
• Asociación de genes de resistencia en cepas con integrón	34

clase 2.	
Discusión	37
Conclusiones	47
Bibliografía	48
Anexo	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Tema	Pag.
Nº 1	Secuencias nucleotídicas de los partidores específicos.	21
Nº 2	Componentes utilizados en PCR.	22
Nº 3	Partidores y secuencias nucleotídicas utilizadas en este estudio.	23
Nº 4	Partidores de la zona variable del integrón clase 1 y clase 2.	24
Nº 5	Programa de ciclos térmicos usados en PCR de asociaciones de partidores.	25
Nº 6	Asociaciones de partidores realizadas.	25
Nº 7	Tamaños de amplificado 5'-3' cs del integrón clase 1.	32
Nº 8	Tamaños de amplificado 5'-3' cs del integrón clase 2.	32
Nº 9	Estructura y número de cepas con diferentes cassettes de resistencia en integrón clase 1.	34
Nº 10	Estructura y número de cepas con diferentes cassettes de resistencia en integrón clase 2.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Tema	Pag.
Nº 1	Representación esquemática de integrón clase 1.	15
Nº 2	Esquema estructural e imagen de geles de agarosa de integrón clase 1 y clase 2 en <i>Shigella</i> spp.	24
Nº 3	Gel de agarosa al 2% con diferentes tamaños de integrones.	27
Nº 4	Distribución de integrones clase 1 y clase 2 en cepas de <i>E. coli</i> aisladas desde aves y cerdos.	28
Nº 5	Distribución de integrones clase 1 y clase 2 en cepas de <i>Salmonella</i> spp aisladas desde aves y cerdos.	29
Nº 6	Genes de resistencia a antimicrobianos en cepas con integrones aisladas desde cerdos y aves.	31

INTRODUCCIÓN

El año 1940 comenzó el uso de antibióticos como terapia para las enfermedades causadas por bacterias, al poco tiempo se pudo comprobar que éstas generaban resistencia en forma espontánea a este tipo de fármacos, con lo cual la terapia dejaba de tener la efectividad esperada.

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural progresivo, que trae como consecuencia impactos económicos y sanitarios, reflejados en la pérdida de estrategias efectivas que ayuden a controlar enfermedades provocadas por infecciones bacterianas. Esto último repercute en la necesidad de contar con mayor tiempo de hospitalizaciones y en el aumento de los costos de mantención tanto en personas como en animales.

En la diseminación de la resistencia a antimicrobianos se han identificado diferentes elementos que participan en los eventos de transferencia genética. A inicios de la década de 1970 se descubrió la existencia de los Plasmidios de Transferencia, diez años después el estudio se centraba en nuevos elementos conocidos como Transposones, posteriormente se descubrió la existencia de los Integrones y en la actualidad, el estudio se centra en estos últimos junto a los denominados Cassettes de Genes de Resistencia.

Los integrones son elementos genéticos que pueden ser transferibles entre bacterias de diferentes especies y diferentes hospederos. Los integrones son capaces de integrar la información de uno o varios genes que confieren resistencia a antimicrobianos, así entonces tienen el potencial de otorgar no solo la resistencia a un antimicrobiano en particular sino que también pueden conferir la condición de multirresistencia.

Actualmente las modalidades de crianza de animales de producción consideran el uso de antimicrobianos como control de enfermedades, prevención de las mismas

o bien como promotores de crecimiento. Esto ha llevado a que bacterias de origen animal adquieran resistencia a varios de los antimicrobianos usados y en consecuencia aparece el riesgo que exista transferencia de información genética desde animales o sus productos al humano, debido a la existencia de elementos como los integrones o los cassettes génicos de resistencia que se transfieren entre las poblaciones bacterianas.

Considerando lo antes expuesto y la importancia de contar con información respecto a la situación en la que se encuentra nuestro país, este trabajo presenta un estudio descriptivo de la presencia de integrones y su asociación con la resistencia a antibióticos en *Salmonella* spp y *E. coli* aisladas desde cerdos y aves faenados en la Región Metropolitana de Chile, aportando información útil para el establecimiento de políticas y mecanismos de control que aborden en forma integral este problema.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Historia

La historia de la terapéutica antimicrobiana no se reduce a los últimos setenta años. Puede decirse que desde el principio de la humanidad el hombre tuvo que asumir sus males y trató de combatirlos mediante remedios sintomáticos según su instinto, creencias y conocimientos adquiridos por la experiencia, al no disponer de tratamientos efectivos y encontrarse ante situaciones terribles originadas por enfermedades graves.

Culturas como las de Mesopotamia, Egipto, China, India, Irán, Israel, América precolombina y Grecia antigua, identificaron y cultivaron diferentes plantas que más tarde utilizarían como remedios terapéuticos, con esta conducta dejaron de ver las enfermedades como “un castigo divino” y comenzaron a practicar empirismo. Hasta que los griegos de la época clásica llevaron a cabo la gran transformación del “*mitos*” en “*logos*” y los médicos hipocráticos convirtieron en técnica el “arte de curar”, así la terapéutica antimicrobiana se abordó con criterios de racionalidad, partiendo de la interpretación fisiológica de la enfermedad (González y Calvo, 2005).

Se considera que el inicio de la farmacología se encuentra entre los siglos IV a.C. y II d.C., data que tiene el listado de aproximadamente 600 plantas, más de un centenar de minerales y más de 30 compuestos de origen animal utilizados en la terapéutica de enfermedades y de los cuales hoy encontramos algunos de estos elementos con propiedades antimicrobianas (González y Calvo, 2005).

Si bien existe información que el hombre a lo largo de su historia ha utilizado diferentes compuestos para su beneficio sanitario, los registros de nuestra era datan del siglo XX, cuando Paúl Ehrlich anunció el tratamiento de la sífilis (enfermedad producida por *Treponema pallidum*) con un compuesto en base a arsénico que denominó “salvarsán”, fue tal el impacto científico de este descubrimiento que en 1908 recibió el premio Nóbel (Errecalde, 2004).

Posterior a esto y al parecer a causa de la Primera Guerra Mundial en 1914, la investigación farmacológica estuvo detenida, reapareciendo información al respecto el año 1920, cuando se reinicia el proceso creador e investigador, surgiendo novedades en el terreno de los protozoodicidas como la “atebrina” para el tratamiento del paludismo o de la “triparsamida” para el combate de la enfermedad del sueño (Mateos, 2006).

En 1935 Gerhard Domagk realizó un descubrimiento importante con el que nuevamente se revolucionó el mundo médico y científico. Después de llevar a cabo experimentos con más de 1000 colorantes sintéticos para comprobar si alguno de ellos podía curar las infecciones causadas por estreptococos en ratones sin dañar a los animales, descubrió que un colorante rojo llamado “prontosil” cumplía estas características (Mateos, 2006). Este descubrimiento le valió el premio Nóbel en 1939. Curiosamente, este colorante no era capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias crecidas en laboratorio; solamente era efectivo cuando las bacterias crecían dentro del cuerpo del animal. Esta aparente contradicción fue resuelta en el mismo año por el químico francés Jacques Tréfouël al observar que el “prontosil” era transformado dentro del organismo en un compuesto incoloro diferente que sí tiene actividad específica frente a bacterias. Esta nueva sustancia era la “sulfonamida”. En un corto período de tiempo se determinó su estructura siendo posible sintetizarla en gran escala y desarrollar nuevos compuestos que se denominaron sulfamidas que hasta hoy siguen utilizándose (Errecalde, 2004).

Pero el descubrimiento de los antibióticos, vale decir, de quimioterapéuticos naturales, se le atribuye a Alexander Fleming, que trabajando en el Hospital St. Mary de Londres, demuestra en 1928 que la “penicilina”, compuesto extraído del hongo *Penicillium notatum*, no permite el desarrollo de colonias de *Staphylococcus* y es eficaz en el tratamiento de infecciones supuradas (Errecalde, 2004).

No fue fácil que el mundo médico se interesara por la penicilina, solo en 1939 después del descubrimiento de la “tirotricina”, producto del metabolismo del *Bacillus brevis*, que siendo un compuesto muy efectivo como antibiótico tenía la desventaja de ser muy tóxico para la célula animal. Por esto la investigación se centró nuevamente en la penicilina descubierta por Fleming, ya que al presentar propiedades similares no tenía niveles de toxicidad tan altos. Se administró por primera vez en 1941, en un paciente que presentaba una infección por *Staphylococcus*, sin embargo, a pesar de la importante mejora que se observó, el paciente finalmente murió debido a que no se pudo sintetizar penicilina en cantidad suficiente para terminar el tratamiento (Mateos, 2006).

El problema de síntesis se resolvió mientras los británicos estaban inmersos en la Segunda Guerra Mundial y la fundación Rockefeller de Estados Unidos, invitó al inglés Florey para que investigara la producción a gran escala de la penicilina junto con universidades e industrias farmacéuticas americanas. Esta cooperación hizo posible que un año después estuvieran disponibles grandes cantidades de penicilina. La revolución de los antibióticos había comenzado (Mateos, 2006).

En los años siguientes comenzaron a descubrirse nuevas drogas. A continuación una breve descripción cronológica de los hallazgos más trascendentes (Errecalde, 2004):

- En la década del 40, estreptomina, cloranfenicol y clortetraciclina.
- En la década del 50, eritromicina y vancomicina.
- En la del 60, gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina.
- En la del 70, cefalexina, carbenicilina, cefoxitina y cefaclor.
- En la del 80, cefotaxima, moxalactam, combinación ácido clavulánico-amoxicilina, combinación imipenem-cilastatina, aztreonam.
- En los 90, aparecen las fluoroquinolonas, nuevos macrólidos, y nuevas cefalosporinas y agentes antivirales más efectivos.
- Luego del 2000, se registra la aparición de quinolonas de espectro ampliado.

Antibióticos en Medicina Veterinaria.

La medicina veterinaria no estuvo ajena a la revolución que significó el uso de los antibióticos, en un inicio con la finalidad terapéutica al igual que en humanos, pero a fines de la década de los 40, se observó que había un buen resultado si se trataban animales asintomáticos que convivían con los enfermos, es decir, aplicar antibióticos en tratamientos grupales profilácticos (Errecalde, 2004).

Posteriormente, se demostró que alimentando cerdos con desechos de fermentación de tetraciclinas, crecían más que los que recibían otros alimentos. Por otro lado, se observó que aves alimentadas con productos de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens* mejoraban su desarrollo. Se identificó el factor de crecimiento en dichos extractos como residuos de clortetraciclina (Torres y Zarazaga, 2002). Al analizar las causas de estas diferencias en los parámetros productivos se estaba descubriendo la capacidad de los antibióticos de contribuir al crecimiento de los animales, mejorando los índices de conversión, esto es, crecer más con la misma cantidad de alimento (Errecalde, 2004).

En la actualidad se han definido términos para describir las distintas formas en las que son utilizados los antibióticos en la producción animal:

- Control: administración de un antimicrobiano, usualmente en rebaños, en los cuales la morbilidad o mortalidad de una enfermedad infecciosa ha excedido los niveles normales. Su objetivo fundamental es limitar la progresión de una enfermedad dentro de la población.
- Prevención/Profilaxis: administración de un antimicrobiano a animales sanos en riesgo de adquirir una enfermedad, en donde ningún agente etiológico ha sido aislado.
- Promotores de Crecimiento: administración de un antimicrobiano en animales en crecimiento, usualmente como aditivo en los alimentos durante un periodo prolongado y en bajas dosis, lo que resulta en un mejoramiento de su rendimiento fisiológico (NCCLS, 2002; Lapeña, 1999).

Clasificación de Antimicrobianos.

Se utilizan diversas formas de clasificación de los antimicrobianos que a grandes rasgos son las siguientes:

- Según su origen: pueden ser de origen biológico, sintético o semi sintético.
- Según actividad en bacterias: puede tener actividad bacteriostática o bactericida.
- Según su mecanismo de acción: pueden inhibir o destruir la pared bacteriana; afectar la síntesis o destruir la membrana celular; inhibir la síntesis de ácidos nucleicos; alterar o inhibir la síntesis de proteínas; alterar el metabolismo energético.
- Según su estructura química: de esta forma de clasificación derivan las familias de antimicrobianos.

Familias de Antibióticos.

β - lactámicos

La presencia de un anillo beta lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas.

Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico (Marín y Gudiol, 2003).

Macrólidos.

Antimicrobianos constituidos por un anillo característico de lactosa macrocíclico formado por muchos miembros. La diferencia entre los compuestos de esta familia precisamente está dada por la cantidad de átomos que componen la molécula. Ejercen su actividad antimicrobiana al obstaculizar la síntesis de proteínas en la

bacteria a nivel ribosómico e impiden la reacción de translocación en la cual la cadena de péptido en crecimiento se desplaza del sitio aceptor al donador (González *et al.*, 1998).

Tetraciclinas.

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se ligan a la sub unidad 30S de los ribosomas, impidiendo la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. En las dosis habituales las tetraciclinas producen in vitro un efecto bacteriostático (Rodríguez *et al.*, 1998).

Aminoglucósidos.

Su estructura química se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino. Se clasifican en dos grandes grupos: El primero está compuesto sólo por la estreptomicina y el segundo es más amplio e incluye a la mayoría de los compuestos utilizados en la práctica clínica actual. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis proteica a nivel de la unión del ARN mensajero. Los aminoglucósidos permanecen como una clase de antimicrobianos de uso habitual y eficaz en la práctica clínica, a pesar que existen diversos mecanismos de resistencia continúan siendo activos frente a gran parte de los bacilos Gram negativos aerobios (Palomino y Pachón, 2003).

Glucopéptidos.

Son moléculas de estructura compleja que actúan sobre la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis del peptidoglucano, se utilizan principalmente para el tratamiento de infecciones por microorganismos Gram positivos. Se están desarrollando nuevos glucopéptidos, cuya principal característica es el poseer una mayor actividad sobre los microorganismos multirresistentes, incluidos los enterococos resistentes a la vancomicina (Pigrau, 2003).

Quinolonas

Las quinolonas tienen una estructura principal formada por dos anillos, a esta estructura se van agregando átomos de diferentes elementos químicos en distintas posiciones del anillo y de esta forma varía potencia y espectro de los diferentes antibióticos de este grupo. El principal mecanismo de acción de este grupo de compuestos es inhibir la normal actividad de las topoisomerasas que son las enzimas encargadas del enrollamiento y desenrollamiento de la hebra de ADN, eventos fundamentales en la replicación de los ácidos nucleicos. La importancia de este grupo radica en las modificaciones que se introdujeron en el núcleo de la molécula de la 4-quinolona y que han originado un gran número de agentes antibacterianos, clasificándose según generaciones y con diferentes espectros de acción (Alós, 2003).

Resistencia bacteriana.

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural. Definida como la “Capacidad de una bacteria para crecer en una concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de otras bacterias de su misma especie”.

Cada vez que se ha puesto en uso un nuevo agente antimicrobiano en el ámbito clínico, se seleccionan inmediatamente cepas de microorganismos resistentes, es decir, cepas que pueden reproducirse en presencia de concentraciones mayores del fármaco de las que se administran en dosis terapéuticas. La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas resistentes que se produce a ciertas concentraciones de antimicrobiano (Errecalde, 2004).

La capacidad intrínseca de los microorganismos en general y las bacterias en particular de desarrollar resistencia a antibióticos no ha surgido por acción de los antibióticos, y si lo hizo debió haber ocurrido hace millones de años, pues las bacterias y los antibióticos naturales producidos por otros agentes vivos han convivido desde siempre (Wolf, 2004). Lo importante de destacar, es que incluso en la terapia antibiótica clínicamente adecuada, el antibiótico selecciona bacterias

resistentes en la microbiota del individuo tratado y en su entorno (Cabello, 2004). Esta resistencia se manifiesta con el mero uso de antimicrobianos, pero claramente se acelera e intensifica con el mal uso y abuso, cuando se exponen bacterias a estos agentes en forma innecesaria, prolongadamente o en dosis subterapéuticas, con lo que se desencadenan los mecanismos genéticos de resistencia y se traspasan estas propiedades entre las bacterias (Wolf, 2004).

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos puede ser una característica de toda la especie bacteriana lo que se denomina resistencia natural o intrínseca, por ejemplo las diferencias de membrana entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, hacen que antibióticos como la vancomicina no traspasen la membrana externa de las últimas impidiendo su efecto.

Por otro lado, se llama resistencia adquirida a aquella que puede presentarse entre cepas de especies que por lo general son sensibles, pero desarrollan resistencia por mutación o transferencia genética. La resistencia adquirida puede tener su origen a nivel cromosómico como resultante de una mutación espontánea en un *locus* que controla la susceptibilidad a un antimicrobiano determinado. Las mutaciones son cambios, en general, graduales, errores raros, que se producen en el proceso de replicación del ADN. La mutación espontánea ocurre en una muy baja frecuencia, por lo tanto, es una causa rara de aparición de resistencia (Errecalde, 2004).

La resistencia adquirida puede ser de origen extracromosómico debido a elementos genéticos ajenos al cromosoma bacteriano: plasmidios, transposones e integrones, los cuales pueden transferirse de una bacteria a otra con relativa frecuencia (Madigan *et al.*, 2004).

Mecanismos de Resistencia a Antimicrobianos.

1.- Inactivación del Antimicrobiano:

La inactivación del antimicrobiano puede ser por hidrólisis enzimática, donde por acción de enzimas producidas por bacterias se modifica químicamente la molécula del antimicrobiano y éste pierde sus propiedades antibacterianas (Fuchs *et al.*, 1994).

2.- Alteración del Blanco de Acción del Antibiótico.

Existen varios ejemplos para evidenciar esta forma de resistencia, uno de ellos es la modificación que sufre la pared celular de las bacterias resistentes a β -lactámicos, donde las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPS) sufren una mutación en su codificación genética que se traduce en la disminución de la afinidad por el antimicrobiano (Fuchs *et al.*, 1994). Otro ejemplo es la alteración que sufren los ribosomas que causa una disminución en la afinidad de los antibióticos a sus blancos en el ribosoma (Martín y Liras, 1989).

3.-Alteraciones en Permeabilidad o Transporte.

La modificación de la membrana externa es un mecanismo de resistencia, las bacterias modifican sus porinas en número, tamaño, carga y naturaleza hidrofóbica de manera de alterar el paso de los antibióticos, donde al menos es necesaria una mayor concentración de éste para lograr el mismo efecto.

En el caso de aminoglucósidos se altera el transporte de la molécula debido a potenciales de membrana, algo similar sucede con las tetraciclinas ya que deben alcanzar una concentración crítica dentro de la bacteria y así inhibir la síntesis de proteínas. Para evitar esto existen bacterias que contienen determinantes génicos que codifican para aumentar el eflujo del antibiótico impidiendo alcanzar el punto crítico de concentración. En el caso de la resistencia a quinolonas también se podría deber a una proteína denominada *NorA*. Esta proteína está involucrada en funciones de transporte y actúa como una bomba de eflujo dependiente de energía, específica para quinolonas hidrofílicas (Yoshida *et al.*, 1990)

Transferencia de la Resistencia a los Antimicrobianos

El hallazgo de determinantes de resistencia con propiedades similares en organismos y ecosistemas notoriamente distantes sugiere la ocurrencia de un flujo genético entre células de diferentes comunidades microbianas. Existen tres mecanismos básicos de transferencia genética horizontal:

- La transformación, donde el ADN libre es insertado directamente en una célula receptora competente.
- La transducción, donde el ADN es transferido a otra célula por medio de un bacteriófago.
- La conjugación, donde el ADN es transferido gracias a un contacto físico entre bacterias, este último mecanismo sería el más importante en la diseminación de genes de resistencia (Gebreyes y Thankur, 2005)

Se han identificado varios elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia, de los cuales los más conocidos son los plasmidios autotransferibles o movilizables. También se incluyen los transposones conjugativos y no conjugativos, el ADN de bacteriófagos y, más recientemente, los integrones y cassettes genéticos de resistencia (González *et al.*, 2004).

Los integrones son piezas genéticas descubiertas en la década de 1980 (Sabaté y Prats, 2002), el término integrón o elemento de integración fue propuesto por Stokes y Hall en 1989, pero la actual definición fue introducida en 1995 por Hall y Collis (González *et al.*, 2004; Hall y Collis, 1995).

Los integrones funcionan como estructuras que captan genes y dada su capacidad de intercambio horizontal constituyen una fuente muy importante de transmisión y diseminación de la multiresistencia. Los integrones no pueden realizar autotransposición pero se asocian frecuentemente a secuencias de inserción o bien, a transposones y plásmidos conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión inter e intra especie (González *et al.*, 2004).

Los componentes esenciales de los integrones son el gen de la integrasa (*intl*), un lugar de recombinación sitio - específico llamado *attI* y un promotor de los genes integrados (Carattoli, 2001). Por lo tanto, la estructura más sencilla de un integrón está formada por estos tres elementos encargados de la captura y expresión de los genes exógenos (Sabaté y Prats, 2002)

El gen de la integrasa, codifica una enzima que cataliza la escisión e integración de unidades de ADN, permitiendo de esta forma la integración de un “cassette” génico al integrón. El sitio específico de recombinación *attI* está formado por una secuencia conservada de 59 pares de bases (Sabaté y Prats, 2002). Los “cassettes” génicos tienen tamaños variables debido a que están formados por diferentes genes que comúnmente se relacionan con resistencia a antimicrobianos y a desinfectantes (Carattoli, 2001; Carattoli *et al.*, 2000).

Hasta la fecha se han descrito varias familias de integrones de acuerdo a la secuencia nucleotídica del gen *intl*, al menos tres de ellas están relacionadas con la expresión de genes de resistencia. Sus integrasas presentan entre 45% y 58% de identidad, sugiriendo una divergencia evolutiva por un período superior a 50 años, lo que corresponde, aproximadamente, a la era antibiótica (Bennett, 1999).

Actualmente, se conocen nueve clases de integrones. Los miembros de la clase 1, 2 y 3, contienen cassettes de resistencia a los antibióticos; los integrones de las clases 4, 5, 6 y 7 contienen cassettes que no codifican la resistencia a antibióticos, el de la clase 9 contiene un cassette de resistencia a antibióticos y otros cassette de función desconocida y el integrón de la clase 8 no presenta ningún cassette (Sabaté y Prats, 2002).

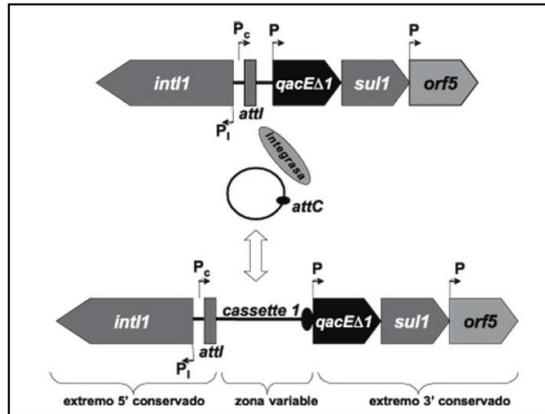
Las clases de integrones relacionadas con la transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos son:

- Integrón clase 1 asociado a genes derivados de los transposones Tn21 y Tn5090. Hasta la fecha se han identificado más de 60 diferentes genes asociados a esta clase de integrones (González *et al.*, 2004; Carattoli, 2001);
- Integrón clase 2 asociado a la presencia del transposón de la familia Tn7.
- Integrón clase 3 que se ha descrito en raras ocasiones asociado a plásmidos y al gen bla_{imp} , gen que confiere resistencia a β -lactámicos. (González *et al.*, 2004; Fluit *et al.*, 2001; Carattoli, 2001).

Integrón Clase 1

Formando parte de la estructura básica del integrón Clase 1 (Figura 1) se encuentra el gen *intl1* que codifica la integrasa, proteína con actividad de recombinasa sitio específica. Adyacente a *intl1* se encuentra el sitio de recombinación sitio específico, *attI*, en el que se integra el cassette genético de resistencia. Entre *intl1* y *attI* se encuentran dos promotores divergentes, PI para la expresión de *intl1* y PC, para la expresión de los cassettes genéticos insertos río abajo, puesto que la mayoría de éstos no tiene promotor. La enzima *intl1* permite la interacción entre *attI* y el sitio *attC* (o elemento de 59 pb) de los cassettes genéticos, uniendo ambos sitios y facilitando la integración o escisión del cassette de resistencia en la zona variable del integrón (Figura 1).

En la mayoría de los integrones clase 1 descritos hasta ahora existe un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes *qacE Δ 1*, *sul1* y *orf5* que codifican resistencia, a compuestos de amonio cuaternario y a bromuro de etidio, a sulfonamidas y a una proteína con función desconocida, respectivamente (Bennett, 1999). Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una zona variable con presencia o ausencia de cassettes genéticos de resistencia (Fig. 1).



González et al. Rev. Méd. Chile., 2004

Figura 1. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón clase 1 y de la adquisición de cassettes genéticos de resistencia. *int1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los *cassettes* son integrados; *PI*: promotor que transcribe la integrasa; *PC*: promotor que dirige la transcripción de los *cassettes* integrados. *attC*: sitio de recombinación del *cassette* genético (esquema no a escala).

Integrón Clase 2

A diferencia del integrón clase 1, el integrón clase 2 y las otras clases de integrones relacionadas con resistencia a antibióticos no poseen extremos 3' altamente conservados, ya que sus secuencias pueden variar por inserción o delección de algunos genes o secuencias de inserción (González et al., 2004).

Los integrones clase 2 se encuentran en la estructura del transposón Tn7 y en derivados de éste. La estructura básica es la misma que todos los integrones, en particular el integrón clase 2 tiene en el extremo 5' una secuencia que codifica la integrasa característica de esta clase (*Int12*) que presenta un 40% de identidad con la integrasa de la clase 1. Adyacente a esta región se encuentran normalmente los cassettes que codifican resistencia a trimetoprim (*dhfrIa*; *dhfrIb*), estreptotricina (*sat*) y estreptomycin-espectinomicina (*aadA1*) (Sabaté y Prats, 2002).

Situación en el Mundo

Variados son los esfuerzos por poner control al grave problema de la resistencia bacteriana, para ello diferentes países y organizaciones a nivel mundial coordinan políticas que se enfocan en el establecimiento de programas de vigilancia de la resistencia a antibióticos.

Son variadas las publicaciones que entregan información respecto a la presencia de integrones y la distribución que ellos tienen. Estudios epidemiológicos, muestran que los integrones se encuentran casi exclusivamente en bacterias Gram negativas especialmente en familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* y que los más frecuentes son los integrones clase 1 e integrones clase 2 (Fluit *et al.*, 2001), siendo los integrones clase 1 los que se encuentran con mayor frecuencia en las cepas aisladas de casos clínicos (Sabaté y Prats, 2002). Sin embargo, también existen publicaciones donde se ha descrito un integrón funcional en bacterias Gram positivas, en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* (Nesvera *et al.*, 1998).

La mayor parte de los estudios realizados en diferentes lugares del mundo han demostrado que normalmente bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae* presentan altos niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos y que la forma de adquirir esta resistencia se relaciona estrechamente con la presencia de integrones en su estructura genética (Kang *et al.*, 2005; Fluit y Schmitz, 2004; Sunde y Sorum, 1999). Al mismo tiempo las diferentes publicaciones demuestran que en bacterias resistentes es común encontrar integrones y dentro de ellos el integrón clase 1 es el más habitual con respecto al integrón clase 2 (Reyes *et al.*, 2003; Golstein *et al.*, 2001)

Situación en Chile

Se han realizado investigaciones respecto a niveles de resistencia en diferentes especies de animales de producción. En bacterias aisladas desde bovinos de producción de carne y de leche de distintas regiones de Chile se determinó que

presentan niveles variables de resistencia a diferentes antimicrobianos. También se ha trabajado en la determinación de la resistencia a antimicrobianos en bacterias aisladas desde aves y cerdos, donde los resultados obtenidos indican que estas bacterias presentan altos niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos (San Martín *et al.*, 2005; San Martín *et al.*, 2002).

En Chile existe muy poca información respecto a los mecanismos involucrados en la adquisición de estas resistencias. Puntualmente con respecto a la presencia de integrones en bacterias aisladas desde animales sólo se ha informado la ausencia de estos en *Salmonella enterica* serovar Enteritidis aisladas desde aves de postura (González *et al.*, 2000).

En relación a programas gubernamentales orientados al uso adecuado de estos fármacos, es importante destacar que desde 1994 las exigencias para el Registro Farmacéutico han aumentado por parte del Servicio Agrícola y Ganadero del Ministerio de Agricultura de Chile haciéndose obligatorio el registro de todos los fármacos utilizados en medicina veterinaria, puntualmente respecto a los antimicrobianos el registro permite la incorporación de este tipo de fármacos destinados solamente a fines profilácticos o terapéuticos.

Además, se implementó a partir de 1999, un Plan Nacional de Control de Residuos de Medicamentos de productos de origen animal. De esta manera, se evalúan e identifican los sectores pecuarios donde se detectan problemas de residuos y de acuerdo a esto donde es necesario implementar acciones correctivas.

Por otro lado, el Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile desarrolló el proyecto PRONARES (Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia), que funcionó desde el año 1998 al 2001 y en el cual se analizaron las susceptibilidades de cepas referidas por síndromes clínicos en

un acotado número de centros de salud y que dio la posibilidad de contar con información de bacterias patógenas que afectan a la población humana.

En medicina veterinaria no existen programas oficiales de vigilancia de la resistencia bacteriana en aislados de animales, como tampoco en aislados de bacterias involucradas en la inocuidad alimentaria de origen animal. El Servicio Agrícola y Ganadero dependiente del Ministerio de Agricultura tiene un Sistema de Aseguramiento de Calidad en carnes faenadas de matadero de exportación, donde se tiene considerado una "vigilancia microbiológica oficial" que contempla el aislamiento de *E. coli* como indicadora de higiene y *Salmonella* spp como indicador del control de patógenos, pero que no considera estudios de sensibilidad de estos microorganismos a los antimicrobianos.

Pese a estos esfuerzos, hasta la fecha no existe ningún registro que determine la cantidad de las drogas utilizadas y la finalidad con que se utilizan en el área pecuaria. Hoy, gracias al trabajo realizado por el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, se conocen niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos en cepas aisladas desde bovinos, aves y cerdos en producción.

Con los antecedentes que actualmente están disponibles, y considerando que las cepas utilizadas en este estudio **presentan** altos niveles de resistencia frente a diferentes antimicrobianos, el **presente** estudio desea determinar la **presencia** de integrones clase 1 y clase 2 mediante estudio genético molecular.

Este trabajo se enmarca en la necesidad de contar con información referente a uno de los mecanismos involucrados en la transferencia de genes **que** resistencia a antimicrobianos, y aportar conocimiento actualizado para el establecimiento de políticas integrales orientadas al monitoreo de la resistencia a antimicrobianos que posibilite abordar este gran problema tanto en la sanidad animal como en salud pública.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia de integrones y su asociación con la resistencia a tetraciclina, trimetoprim y estreptomocina en cepas de *Salmonella* spp y *E. coli* aisladas de cerdos y aves comerciales faenados en la Región Metropolitana, Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar la presencia de integrones clase 1 y 2 en cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp aisladas desde cerdos y aves de producción.
2. Identificar presencia de los genes de resistencia a tetraciclina, trimetoprim y estreptomocina en las cepas que presenten integrones clase 1 y/o 2.
3. Determinar asociación estructural entre los genes de las integrasas y los genes de resistencia en cepas de *Salmonella* spp y *E. coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño:

Se estableció un estudio descriptivo para determinar la presencia de integrones y su asociación con el fenotipo y genotipo de resistencia en cepas bacterianas de *Salmonella* spp y *E. coli* resistentes a los antibióticos trimetoprim, tetraciclina y estreptomicina, aisladas desde cerdos y aves comerciales aparentemente sanos. El estudio se realizó en los laboratorios del Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Cepas:

Se analizó un total de 73 cepas de *Salmonella* spp y 177 cepas de *E. coli* cedidas por el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile. Las cepas fueron aisladas y caracterizadas donde se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de diferentes antimicrobianos durante el desarrollo del proyecto FONDECYT n° 1030857 realizado en ese mismo laboratorio.

Cada cepa bacteriana representa un animal, se analizaron 35 cepas de *Salmonella* spp aisladas de cerdos y 38 cepas aisladas desde aves; en el caso de *E. coli* 90 cepas aisladas desde cerdos y 87 cepas aisladas desde aves. Las cepas fueron mantenidas en congelación a -76° C en solución de TSB (tryptic soy broth) y glicerol al 15%. Previo al uso de ellas se les realizó pruebas bioquímicas que permitieron confirmar la identificación.

I. Determinación de regiones específicas de genes de integrones clase 1 y 2, usando técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

I.1. Obtención del ADN bacteriano para PCR:

Las cepas se descongelaron, y fueron sembradas en agar M^C Conkey, en el caso de *E. coli* y agar XLD en el caso de *Salmonella* spp, incubadas en estufa de

cultivo durante 18 horas a temperatura constante de 37°C, se traspasó una colonia con asa de cultivo a 2 ml de caldo Luria y se dejó durante 18 horas a temperatura constante de 37°C, posteriormente se tomaron 50 µl del cultivo y se diluyeron en 150 µl de agua estéril contenida en un tubo Eppendorf^R, los 200 µl se sometieron durante 10 minutos a 99°C en un termociclador Eppendorf^R (Wieler *et al.*,1997). El lisado bacteriano obtenido se almacenó a -20°C.

I.2. PCR Múltiplex:

Para la detección de los genes de integrasas se utilizó el protocolo descrito para cepas de *Shigella* spp por Toro *et al.* en el año 2005. El lisado bacteriano se utilizó como “molde” para realizar la amplificación simultánea de los genes de las integrasas *Int1* e *Int2*. Se utilizaron los partidores descritos en la Tabla 1 y sintetizados por Invitrogen^R. Como control negativo se utilizó agua estéril filtrada y como control positivo para los genes de ambas integrasas se usaron: cepa de *E. coli* UC-7 como control de *int1* y *E. coli* UC-4 como control de *int2*, cedidas por el Dr. Gerardo González del Grupo de Investigación en Resistencia a Antibióticos (G.I.R.A.), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los partidores específicos

Partidor	Tamaño de amplificado	Secuencia nucleotídica (5'- 3')
<i>int1</i>	280pb	CCT CCC GCA CGA TGA TC TCC ACG CAT CGT CAG GC
<i>int2</i>	232pb	TTA TTG CTG GGA TTA GGC ACG GCT ACC CTC TGT TATC

Goldstein *et al.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001

El volumen final de reacción fue de 25 µl, preparado según indica la Tabla 2. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf^R. La reacción contempla la desnaturación del material genético por 2 minutos a 95°C y continúa con 30 ciclos térmicos de amplificación (1 minuto a 92°C, 30 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C), finalizando con una incubación de 10 minutos a 72°C.

Tabla 2: Componentes utilizados en PCR

Componentes	Volumen
Buffer para PCR 10X (Invitrogen ^R)	2.5 µl
Cloruro de Magnesio 50mM (Invitrogen ^R)	0.75 µl
Partidor "F" <i>intl 1</i> (5 µM)	0.8 µl
Partidor "R" <i>intl 1</i> (5 µM)	0.8 µl
Partidor "F" <i>intl 2</i> (5 µM)	0.8 µl
Partidor "R" <i>intl 2</i> (5 µM)	0.8 µl
Deoxinucleótido trifosfato (DNTP) 200 µM (Invitrogen ^R)	0.75 µl
Agua estéril desionizada	16.7 µl
Muestra (lisado de cada cepa)	1 µl
Taq Polimerasa (Invitrogen ^R , 5 U/ µl)	0.1 µl
Volumen total	25 µl

I. 3. Electroforesis y Visualización de productos de amplificación:

Utilizando 10 µl del amplificado fueron resueltos mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2% en buffer Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 0.5X) corridos a 80 volts por 60 minutos, utilizando como control de tamaño molecular un marcador de 100 pb (Invitrogen^R). El resultado se observó después de la tinción con Bromuro de etidio 0.5µg/ml por 20 minutos. La tinción se evidenció a la exposición de luz ultra violeta (UV) y la imagen fue captada usando el software DigiDoc (Kodak).

La visualización y análisis de la imagen permitieron discriminar, de acuerdo al tamaño molecular, las cepas que resultaron positivas y negativas a la presencia de las integrasas tipo 1 y/o 2.

II. Determinación de genes específicos de resistencia a tetraciclina, trimetoprim y estreptomicina.

Mediante la técnica de PCR simple se determinó la presencia de los genes de resistencia de antimicrobianos. El lisado bacteriano fue utilizado como "molde" para realizar la amplificación de los genes de resistencia a antimicrobianos estreptomicina (*aad1a*), tetraciclina (*tetA(A)*; *tetA(B)*) y trimetoprim (*dhfrIa*). Se utilizaron los partidores descritos en la Tabla 3 y sintetizados por Invitrogen^R. Como control negativo se utilizó agua estéril filtrada y como control positivo se

usaron cepas de *Shigella* spp previamente caracterizadas por Toro *et al.* en el año 2005.

Tabla 3. Partidores y secuencias nucleotídicas utilizadas en este estudio.

Resistencia	Gen	Producto de PCR (pb)	Secuencia Nucleotídica (5' a 3')
tetraciclina	<i>tetA(B)</i>	751	CTG GAT TAC TTA TTG CTG GCT TTT T CAC CTT GCT GAT GAC TCT TTG TTT G
tetraciclina	<i>tetA(A)</i>	577	ACT GTC GCA TCT CCA TTA TTT GA ATC GCA TTT TTC TTG GCT TTT AT
trimetoprim	<i>dhfrIa</i>	367	GGA GTG CCA AAG GTG AAC AGC GAG GCG AAG TCT TGG GTA AAA AC
estreptomicina	<i>aad1a</i>	447	TAT CCA GCT AAG CGC GAA CT ATT TGC CGA CTA CCT TGG TG
sales de amonio cuaternario	<i>qacEΔ1</i>	226	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT CAA GCT TTT GCC CAT GAA GC

Toro *et al.* Epidemiol. Infect. 2005

III. Asociación estructural de genes de integrones con genes de resistencia a antibióticos.

Se determinó la asociación estructural de los genes de resistencia con los integrones mediante PCR, combinando los partidores específicos de una estructura presente en el integrón y otro partidor de un gen que posiblemente se encuentra en el cassette de resistencia. Esta asociación permite amplificar un segmento solo si los genes se encuentran en la misma estructura genética ya que es posible una amplificación de ADN continuo, así se puede demostrar que los genes se encuentran adyacentes. Por el contrario, si los genes se encuentran en secciones diferentes, por ejemplo, que el gen de la integrasa que se encuentra en el integrón y el gen de resistencia se encuentre en otra localización diferente al integrón es imposible que ocurra una amplificación de ADN.

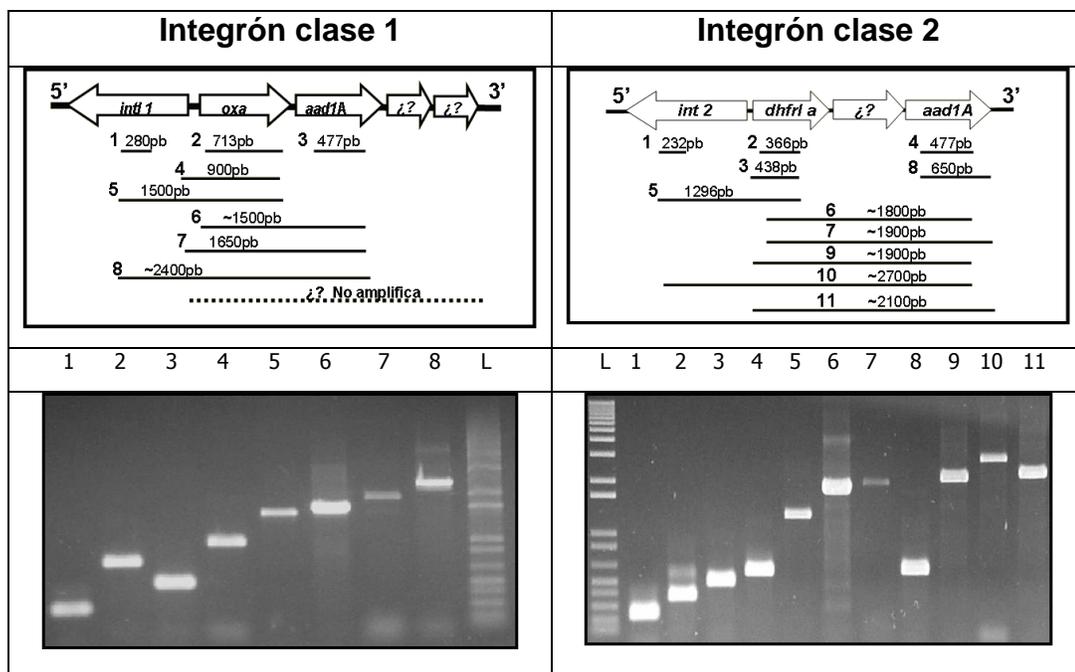


Figura 2: Esquema estructural e imagen de geles de electroforesis para integrón clase 1 y clase 2 de *Shigella*. Fuente: Archivo Dra. Cecilia Toro U.

Existen diseñados partidores específicos de la zona 5' y 3' conservada para el integrón clase 1 y otros específicos para las mismas zonas del integrón clase 2 (Tabla 4), lo que permite amplificar la región variable de cada integrón, vale decir, sólo el cassette de resistencia inserto en el integrón, permitiendo estimar la cantidad y tamaño molecular de los genes presentes en el integrón.

Tabla 4. Partidores de la zona variable del integrón clase 1 y clase 2

	Partidor	Secuencia nucleotídica
Integrón Clase 1	5' cs	GGC ATC CAA GCA GCA AG
	3' cs	AAG CAG ACT TGA CCT GA
Integrón Clase 2	5' cs	GAC GGC ATG CAC GAT TTG TA
	3' cs	GAT GCC ATC GCA AGT ACG AG

Toro et al. *Epidemiol. Infect.* 2005.

Para realizar los PCR de las asociaciones se realizaron varios ensayos que permitieron determinar el mejor protocolo de ciclos térmicos para usar con las diferentes combinaciones de partidores (Tabla 5).

Tabla 5. Programa de ciclos térmicos usado en PCR de asociaciones de partidores

Nº de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95°	2 minutos
30	92°	1 minuto
	56°	30 segundos
	72°	4 minutos
1	72°	10 minutos

Tabla 6. Asociaciones de partidores realizadas

Cepas con <i>intl 1</i>	Cepas con <i>intl 2</i>
5'cs – 3'cs	5'cs – 3'cs
<i>int1</i> - 3'cs	<i>int2</i> - 3'cs
5'cs – <i>aad 1a</i>	5'cs – <i>aad 1a</i>
5'cs – <i>dhfr 1a</i>	5'cs – <i>dhfr 1a</i>
<i>dhfr 1a</i> – <i>aad 1a</i>	<i>dhfr 1a</i> – <i>aad 1a</i>
<i>int 1</i> – <i>dhfr 1a</i>	<i>int 2</i> – <i>dhfr 1a</i>
5' cs - <i>qacEΔ1</i>	

Electroforesis y Visualización de amplificadores de la asociación de partidores

Para la visualización y análisis del producto de PCR se tomaron 10 µl del amplificado que se sometieron a electroforesis horizontal simple en gel de Agarosa al 1% en buffer Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 0.5X) a 80 volts por 35 minutos, utilizando un ADN “ladder” de 1kb (Invitrogen^R) como marcador de tamaño molecular. Los productos de amplificación se observaron gracias a la tinción del gel con Bromuro de etidio 0.5µg/ml por 20 minutos. La tinción se evidenció a la exposición de luz ultra violeta (UV) y la imagen fue captada usando el software DigiDoc (Kodak). La visualización y análisis de la imagen, de acuerdo a la presencia o ausencia de bandas de amplificación permitieron discriminar las cepas que presentan en sus estructuras genéticas la asociación de los genes de las integrasas con los genes de resistencia a los antimicrobianos.

Bioseguridad:

El trabajo práctico se realizó con las medidas que corresponden a un laboratorio básico con nivel de bioseguridad 2 (OMS, 2005), es importante mencionar que el bromuro de etidio, debido al poder cancerígeno que posee, se manejó de manera tal de asegurar su inactivación con carbón activado, posteriormente se separa el líquido del carbón que ha adsorbido el bromuro de etidio para ser incinerado. Con respecto al manejo de *Salmonella* es importante destacar que debido a que posee características de bacteria zoonótica, el trabajo se realizó bajo normas mínimas que consideraban utilización de guantes de látex, delantal de uso exclusivo en laboratorio, esterilización en autoclave del material contaminado, desinfección de equipos e instalaciones utilizadas.

RESULTADOS

I. Determinación de la presencia de integrones clase 1 y/o 2.

Para la detección de los integrones clase 1 y clase 2 se utilizó la técnica de PCR, amplificando el gen específico de la integrasa que diferencia a cada uno de los integrones estudiados. Para el caso de la integrasa tipo 1 el amplificado esperado es de 280 pb y en el caso de integrasa tipo 2 el amplificado esperado es de 232 pb (fig. 3).

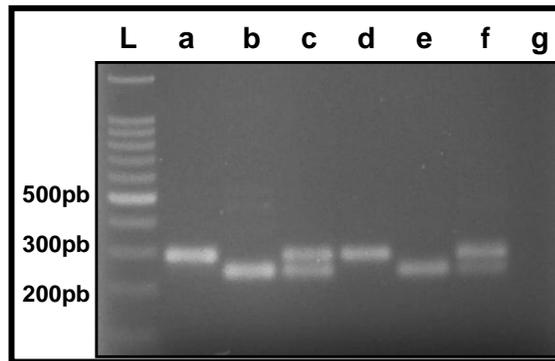


Figura 3. Gel de agarosa al 2% con diferentes tamaños de integrones

L: Marcador de tamaño molecular; **a:** Control (+) de gen *intI1*; **b:** Control (+) gen *intI2*; **c:** Control para gen *intI1* y gen *intI2*; **d:** Muestra positiva a *intI1*; **e:** Muestra positiva a *intI2*; **f:** Muestra positiva a *intI1* y *intI2*; **g:** Control negativo

1.- Estudio de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde cerdos y aves.

En el caso de las *E. coli* aisladas desde muestras fecales de cerdos y aves, se estudiaron un total de 177 cepas. El primer análisis estudió la presencia de genes específicos para identificar los integrones clase 1 y clase 2, en el cual se obtuvo que 55 cepas (31,1%) presentaron integrón clase 1; 26 cepas (14,7%) presentaron integrón clase 2; 10 cepas (5,6%) presentaron ambas clases de integrones; y 86 cepas (48,6%) no presentaron las clases de integrones estudiados (figura 4).

***E. coli* aisladas desde Cerdos.**

En las *E. coli* aisladas desde esta especie animal se obtuvo como resultado que 40 cepas (44,4%) presentaron integrón clase 1; 21 cepas (23,3%) presentaron el

integrón clase 2; 5 cepas (5.5%) presentaron ambas clases de integrones; 24 cepas (26,6%) no presentaron las clases de integrones estudiados (figura 4).

***E. coli* aisladas desde Aves.**

En las *E. coli* aisladas desde esta especie animal el resultado obtenido de la búsqueda de integrones es el siguiente: 15 cepas (17.2%) presentaron integrón clase 1; 5 cepas (5.7%) presentaron el integrón clase 2; 5 cepas (5.7%) presentaron ambas clases de integrones; 62 cepas (71.3%) no presentaron las clases de integrones estudiados (figura 4).

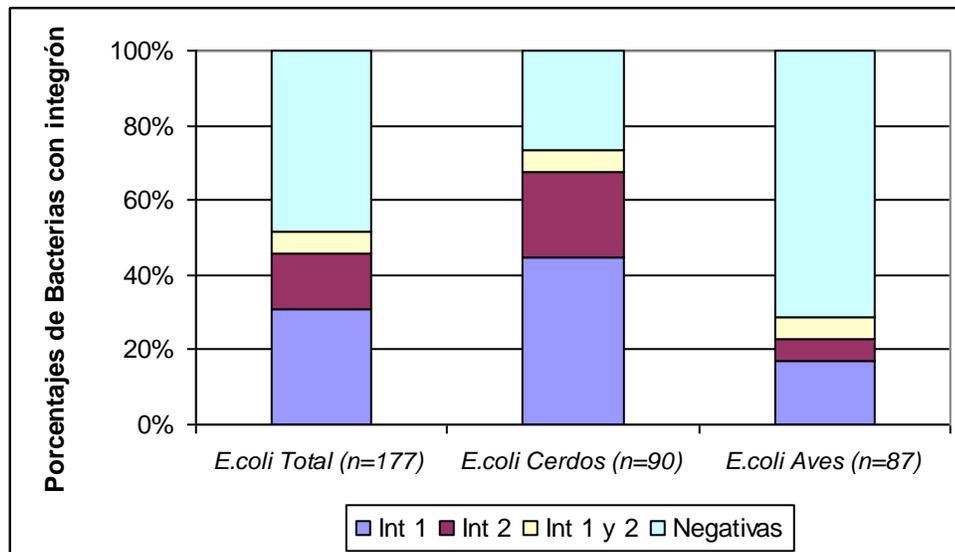


Figura 4: Distribución de los integrones clase 1 y clase 2 en las cepas de *Escherichia coli* aisladas desde aves y cerdos.

2.- Estudio de *Salmonella* spp aisladas desde cerdos y aves.

Se dispuso de un total de 73 cepas de *Salmonella* spp aisladas desde aves y cerdos comerciales. Al realizar la búsqueda de genes específicos para la identificación de integrones clase 1 y 2 los resultados obtenidos fueron los siguientes: 11 cepas (15,1%) presentaron el integrón clase 1; 6 cepas (8,2%) presentaron integrón clase 2; no hubo cepas que presentaran ambas clases de

integrones y 56 cepas (76,7%) no presentaron las clases de integrones estudiados (figura 5).

Salmonella spp aisladas desde Cerdos.

En las cepas de *Salmonella* spp aisladas desde cerdos se encontraron 10 cepas (28,5%) con el integrón clase 1; 6 cepas (17,1%) con el integrón clase 2; no hubo cepas que presentaran ambos tipos de integrones y 19 cepas (54,3%) no presentaron las clases de integrones estudiados (figura 5).

Salmonella spp aisladas desde Aves.

En las cepas de *Salmonella* spp aisladas desde aves no se encontró existencia de cepas con integrones clase 1 o 2 (figura 5).

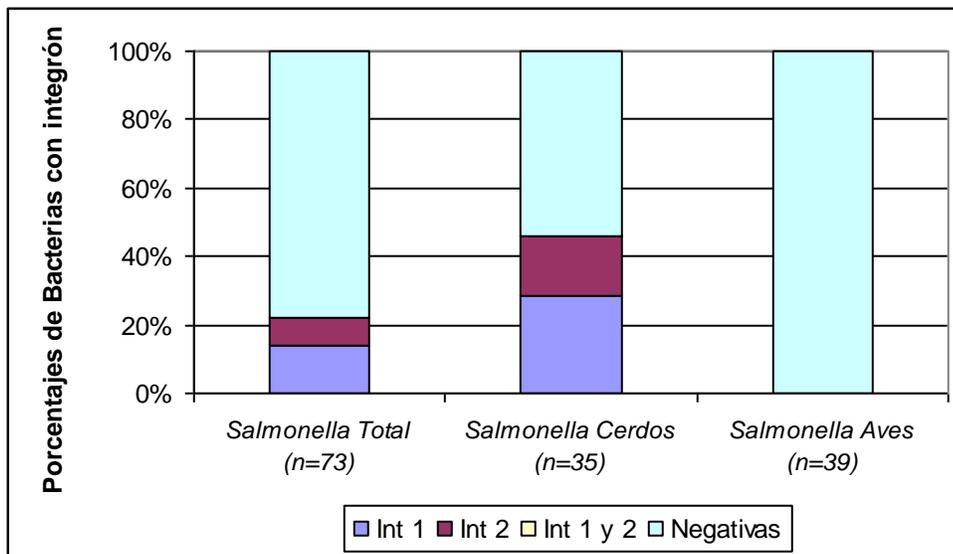


Figura 5: Distribución de las cepas con integrón en *Salmonella* spp aisladas desde aves y cerdos.

II. Identificación de genes de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* y *Salmonella*

Se realizó la identificación de genes de resistencia a antibióticos en el total de las cepas que resultaron positivas a integrón clase 1 y/o 2, utilizando la técnica de PCR simple para amplificar los siguientes genes:

- gen *dhfrIa* que codifica resistencia a trimetoprim.
- gen *aad1a* que codifica resistencia a estreptomicina.
- genes *tetA(A)* y *tetA(B)* que codifican resistencia a tetraciclina.

En total se analizaron 66 cepas de *E. coli* aisladas de cerdos que presentaron el gen de una de las dos integrasas estudiadas (40 con el gen *intl1*; 21 con el gen *intl2* y 5 con ambos genes). De ellas, solo una cepa presentó el gen *tetA(A)*, 44 presentaron el gen *tetA(B)*, 58 presentaron el gen *aad1a* y 20 cepas el gen *dhfrIa* (figura 6).

En el caso de las cepas de *E. coli* aisladas de aves se analizaron un total de 25 cepas que presentaron el gen de una de las integrasas estudiadas (15 con el gen *intl1*; 5 con el gen *intl2* y 5 con ambos genes). De ellas se obtuvo que 13 cepas presentaron el gen *tetA(A)*, 11 el gen *tetA(B)*, 18 el gen *aad1a* y 8 cepas el gen *dhfrIa* (figura 6).

En las 16 cepas de *Salmonella* aisladas desde muestras de cerdos que presentaron el gen de una de las integrasas estudiadas (10 con el gen *intl1* y 6 con el gen *intl2*), se obtuvo que ninguna cepa presentó el gen *tetA(A)*, 4 cepas presentaron el *tetA(B)*, 11 cepas el gen *aad1a* y 8 cepas presentaron el gen *dhfrIa* (figura 6).

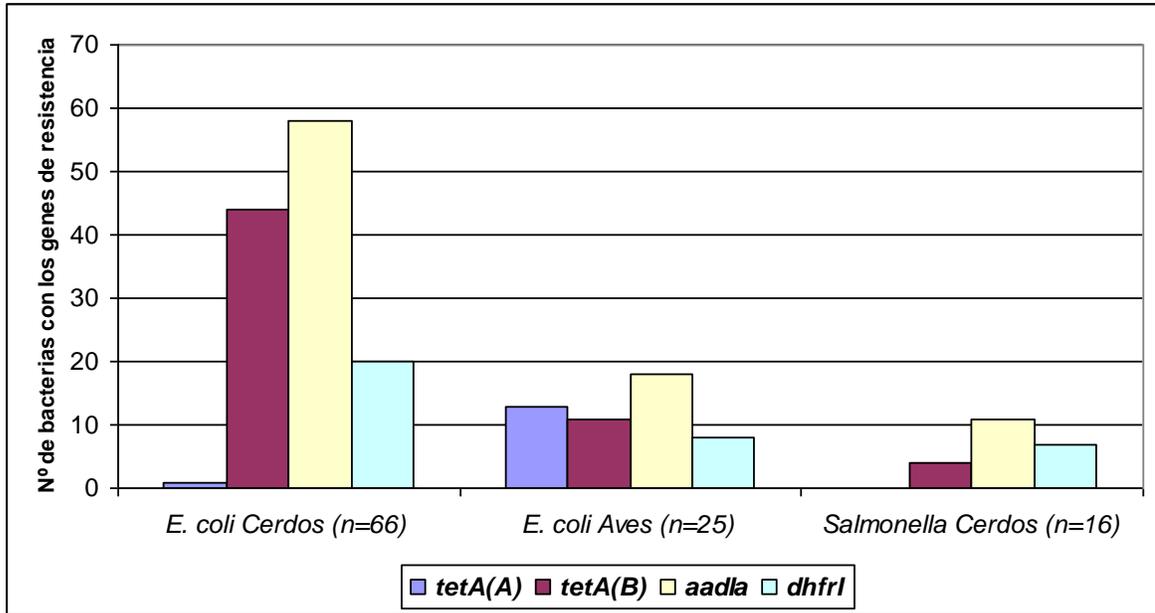


Figura 6. Genes de resistencia a antimicrobianos en cepas con Integrones aisladas desde cerdos y aves.

III. Asociación estructural de genes de integrasas con genes de resistencia a antibióticos:

1.- Determinación del Tamaño Molecular de la Zona Variable

Para orientar la búsqueda de las diferentes asociaciones de partidores lo primero que se realizó fue determinar el tamaño de la zona variable de cada integrón en todas las cepas que presentaron integrón clase 1 y/o 2 utilizando partidores para la zona variable denominados 5' cs y 3' cs específicos de cada clase de integrón. Los resultados de estas reacciones nos permitieron estimar la cantidad de cassettes presentes en cada cepa que presentó integrón.

En el caso de las cepas que presentaron integrón clase 1 se logró determinar tres tamaños diferentes en el amplificado que resultó de las reacciones donde se utilizaron los partidores 5' cs y 3' cs correspondientes al integrón clase 1 (Tabla 7 y tabla 9). En el caso de las cepas que contenían el integrón clase 2 se encontraron

cuatro diferentes tamaños del amplificado que resultaron al utilizar los partidores específicos de la zona variable (Tabla 8 y tabla 10).

Tabla 7. Tamaños de amplificado 5' – 3' conservado de integrón clase 1

Especie	Cepas con integrón clase 1	Tamaño			
		1000 pb	1600 pb	2000 pb	No amplifica
<i>E. coli</i> cerdos	45	27	4	2	12
<i>E. coli</i> aves	20	6	5	2	7
<i>Salmonella</i> cerdos	10	10	0	0	0

Tabla 8. Tamaños de amplificado 5' – 3' conservado de integrón clase 2

Especie	Cepas con integrón clase 2	Tamaño				
		1600 pb	2100 pb	2500 pb	3500 pb	No amplifica
<i>E. coli</i> cerdos	26	6	11	2	2	5
<i>E. coli</i> aves	10	0	5	2	0	3
<i>Salmonella</i> cerdos	6	0	6	0	0	0

Asociación de genes de resistencia en cepas con integrón clase 1

Al existir la posibilidad de hacer la combinación de partidores entre los diferentes genes se pudo determinar si los genes se encontraban adyacentes al gen de la integrasa, lo que permite identificar si son parte de los cassettes de resistencia que forman el integrón.

Se realizaron diferentes combinaciones con los distintos partidores de los genes de resistencia para establecer el orden en el que se encontraban los genes en el integrón.

Para corroborar los amplificados de la asociación entre 5' cs y 3' cs del integrón clase 1, se amplificó la combinación de *int11* (F) con el partidor 3' cs del integrón clase 1, donde se encontró concordancia con los resultados obtenidos anteriormente.

Posteriormente se usó el partidor 5' cs específico del integrón clase 1, con el partidor *aad1a*(R). En el caso de las cepas de *E. coli* aisladas de cerdos el tamaño que mayormente se encontró para esta asociación fue de 850 pb y en menor

cantidad el de 1500 pb. En aves se encontró en muy similar cantidad dos tamaños comunes de 850 pb y 1500 pb.

En el caso de las cepas *Salmonella* spp aisladas de cerdos se encontró solo en una cepa un tamaño correspondiente a 850 pb y el resto de cepas con el integrón no amplificó esta asociación, sin embargo al realizar la asociación del partidor *aad1a(F)* con el partidor *qacEΔ1(R)* se encontró que todas estas cepas con integrón 1 amplificaron un tamaño de 900 pb para esta asociación.

Utilizando los partidores 5' cs y *dhfrla(R)* en *E. coli* aisladas de cerdos se encontraron dos tamaños de 500 pb y de 2300 pb. En las cepas de *E. coli* aisladas de aves se encontró solo un tamaño de 750 pb, sin embargo, la gran mayoría no amplificó para esta asociación. En *Salmonella* spp no amplificó ninguna cepa para esta asociación.

De acuerdo a los tamaños obtenidos en las primeras asociaciones realizadas se determinaron las cepas en las que se realizarían otras asociaciones que permitieran dilucidar la organización de los diferentes cassettes encontrados. Así otras asociaciones realizadas en algunas de las cepas fueron *int11(F)* con *dhfrla (R)*; *dhfrla (F)* con *aad1a (R)*; *Int11(F)* con *qacEΔ1(R)*; y 5' con *qacEΔ1(R)*. Todas las combinaciones realizadas nos permitieron describir cuatro estructuras encontradas en las cepas con integrón clase 1 (Tabla nº 9).

Tabla N° 9. Estructura y número de cepas con diferentes cassettes de resistencia en integrón clase 1

Esquemas de estructura de Integrones clase 1	Cepas con integrón clase 1		
	<i>E. coli</i> de cerdos	<i>E. coli</i> de aves	<i>Salmonella</i> de cerdos
	29	6	10
	4	7	0
	2	0	0
	6	0	0
No determinado	4	7	0
Total de cepas con integrón 1	45	20	10

Asociación de Genes de resistencia en cepas con integrón clase 2

La estructura de los integrones clase 2 es menos estable que la de los integrones clase 1, no existiendo un segmento 3'cs tan conservado, por lo tanto fueron menos las combinaciones que se realizaron y por la misma razón fue menos específica la definición estructural que se logró establecer. Sin embargo, a pesar de no contar con un extremo 3'cs conservado se logró determinar algunos patrones en las cepas que presentaron el gen *intI2*.

Con la misma intención que en las cepas con integrón clase 1, en las cepas con integrón 2 se realizó la asociación entre el partidor *intI2* (*F*) y el partidor 3'cs de esta clase de integrón, obteniendo amplificadores concordantes a los obtenidos con la asociación 5'cs-3'cs hecha anteriormente.

Posteriormente se realizó la asociación entre los partidores 5'cs y *aad1a(R)* donde los tamaños de los amplificadores encontrados en las cepas de *E. coli* de cerdos fueron de 1000 pb, 1500 pb y 2000 pb. En el caso de las cepas de *E. coli* de aves se encontraron dos tamaños, de 2000 pb y 2500 pb. Finalmente, en el grupo de cepas de *Salmonella* de cerdos con integrón clase 2 se encontró solo un tamaño de amplificado de 2000 pb.

Al realizar la asociación de los partidores *intI2 (F)* con *dhfrIa (R)* se encontró en las cepas de *E. coli* de cerdos y aves un tamaño predominante de 1300 pb y alto número de cepas que no amplificaron esta asociación. En el caso de *Salmonella* de cerdos, todas las cepas que presentaron el integrón clase 2 amplificaron 1300 pb para esta asociación.

Para definir la organización de los cassettes presentes en los integrones clase 2 se realizaron asociaciones según correspondía a las cepas estudiadas. Estas asociaciones incluyeron las siguientes combinaciones de partidores: 5'cs con *dhfrIa(R)*; *dhfrIa(F)* con *aad1a(R)*; y *aad1a (F)* con 3'cs del integrón clase 2.

Después del análisis de los resultados obtenidos en las diferentes asociaciones realizadas se estableció la organización de los cassettes de resistencia presentes en las cepas con integrón clase 2 (Tabla nº 10).

Tabla N° 10. Estructura y número de cepas con diferentes cassettes de resistencia en integrón clase 2

Esquemas de estructura de Integrones clase 2	Cepas con integrón clase 2		
	<i>E. coli</i> de cerdos	<i>E. coli</i> de aves	<i>Salmonella</i> de cerdos
<p style="text-align: center;">~2100 pb</p>	11	5	6
<p style="text-align: center;">~1600 pb</p>	6	0	0
<p style="text-align: center;">~2500 pb</p>	0	2	0
<p style="text-align: center;">~2500 pb</p>	2	0	0
<p style="text-align: center;">~3500 pb</p>	2	0	0
No determinado	5	3	0
Total de cepas con integrón 2	26	10	6

DISCUSIÓN

Para que las bacterias presenten resistencia frente a diferentes antibióticos intervienen numerosos factores, dentro de ellos el consumo indiscriminado de antibióticos es uno de los más importantes (Alós, 1994). Se ha estimado que el 70% de la producción mundial de antibióticos se usa en animales de consumo (Lapeña, 1999), lo que evidencia que a nivel mundial los sistemas de producción animal consideran el uso de antibióticos como fármacos fundamentales en el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

La utilización de antimicrobianos en producción animal genera problemas que pueden afectar a nivel de salud pública, debido a la posibilidad existente que cepas resistentes de animales puedan pasar a la población humana a través de la cadena alimentaria, o bien transferir genes de resistencia a bacterias comensales u oportunistas del humano y posteriormente causar una infección para la cual estarían disminuidas las alternativas de tratamiento. En esta probable situación se produce un impacto económico al aumentar el costo de hospitalizaciones o provocar ausencia laboral por la enfermedad no controlada en las personas afectadas (Torres y Zarazaga, 2002).

A nivel mundial, existen países donde el uso de estos fármacos no se restringe solo al fin terapéutico y es habitual utilizarlos en el manejo profiláctico y aditivos de alimentos como promotores de crecimiento, una conducta que desencadena un aumento de la aparición de resistencia a antibióticos (Aarestrup, 2004; Torres y Zarazaga, 2002). A pesar de las numerosas publicaciones que demuestran el aumento de la resistencia a antibióticos usados como promotores de crecimiento, aún existen grupos que aseguran que no existe certeza absoluta de la relación entre esta finalidad de uso y el aumento de la resistencia en cepas patógenas de humanos (Bezoen *et al.*, 1998; FEDESA, 2006; F.D.A, 2003).

La utilización de dosis subterapéuticas, vale decir, pequeñas cantidades del fármaco dosificadas por largos períodos de la vida del animal produce inevitablemente un aumento de la presión selectiva de bacterias resistentes a antimicrobianos. Definiendo la presión selectiva en términos de mg/kg/año, la presión de selección en el caso de los pollos podría ser de casi 10 veces la ejercida por los antibióticos usados en humanos (Van den Bogaard, 1997). Este análisis evidencia que el aumento de la resistencia a los antibióticos es un problema grave no solo en medicina humana sino también en veterinaria. Por ello, numerosas organizaciones en el mundo, entre las que destaca la Organización Mundial de la Salud (OMS), han tomado acciones relativas a controlar los niveles de bacterias con esta característica. El problema ha sido cada vez más estudiado debido a que gran cantidad de bacterias patógenas y comensales presentan resistencia a diferentes antimicrobianos, generando problemas que afectan la salud pública y la economía (Golstein *et al.*, 2001).

A nivel mundial se han establecido programas de vigilancia de la resistencia a antibióticos. Uno de los primeros países en implementar un programa de monitoreo fue Dinamarca (en el año 1995) denominado “*The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme*” (DANMAP). Por su antigüedad ha sido para muchos un modelo a seguir. La mayoría de estos programas, al igual que DANMAP considera el estudio de bacterias zoonóticas, patógenas e indicadoras. Ubicamos dentro de estos grupos a *Salmonella* spp como representante de bacterias zoonóticas y a *Escherichia coli* como representante de bacterias indicadoras (Aarestrup, 2004).

Los diferentes estudios realizados respecto al surgimiento y diseminación de la resistencia bacteriana han determinado que ésta aumenta considerablemente cuando los genes que codifican los diferentes mecanismos de resistencia forman parte de cassettes genéticos móviles (White *et al.*, 2001). El hecho de estar en cassettes génicos y formar parte de integrones los habilita para ser transferidos horizontalmente, ya que, aunque los integrones no son autotransferibles, éstos

normalmente forman parte de transposones y pueden a su vez estar en plasmidios conjugativos, lo que bajo condiciones particulares tiene el potencial de ser movilizado a una bacteria de la misma o de diferente especie (González *et al.*, 2004).

Es importante recalcar que la adquisición del gen que codifica la resistencia a un determinado antimicrobiano no es suficiente para convertir a esa bacteria en resistente, el gen debe expresarse en forma suficiente para que clínicamente tenga la condición de resistente (Alós y Carnicero, 1996). En el caso de los integrones los cassettes tienen un promotor común para todos los genes presentes en el integrón, a medida que un gen se encuentra más alejado del promotor se hace más difícil la posibilidad de que este gen se exprese, sin embargo, la bacteria mantiene el potencial de ser multirresistente.

En Chile se han realizado una serie de trabajos en torno a materias de seguridad alimentaria, en la actualidad existe control en el residuo de antimicrobianos y otros fármacos en productos de origen animal, también existe un registro del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) que establece los antimicrobianos autorizados en producción animal, sin embargo, la información respecto a tipo, cantidad y finalidad del uso de éstos es una incógnita.

Al igual que en otros países, en Chile no se puede desconocer la utilización de este tipo de fármacos con finalidades profilácticas tanto en producción aviar como porcina, práctica que está ejerciendo una enorme presión de selección en los ecosistemas bacterianos, contribuyendo a la aparición de cepas resistentes (Anadón *et al.*, 1999). Si bien, las últimas investigaciones han demostrado que los niveles de resistencia son altos, poco es lo que se conoce de los mecanismos de resistencia y de los mecanismos que utilizan las bacterias para diseminar los genes que codifican estas resistencias.

Considerando que este estudio se realizó con las especies de producción animal de mayor consumo a nivel nacional, los resultados obtenidos constituyen antecedentes fundamentales que permiten evaluar el impacto epidemiológico que eventualmente pueden tener los integrones en la transferencia de genes de resistencia entre bacterias a lo largo de la cadena alimentaria.

Este estudio determinó la presencia de integrones clase 1 y/o 2 en cepas aisladas desde aves y cerdos de producción. Al analizar los resultados de acuerdo a la especie animal de origen, se puede apreciar que las bacterias aisladas desde cerdos presentan frecuencias más altas de integrones que las bacterias aisladas desde aves. El 73,3% de las cepas de *E. coli* aisladas desde cerdos presentaron al menos una clase de integrón, a diferencia de lo obtenido en las cepas de *E. coli* aisladas desde aves donde el 28,7% presentó integrón. En el caso de las cepas de *Salmonella* spp aisladas desde cerdos se encontró que el 45,7% presentó integrones, en cambio en las cepas de *Salmonella* spp aisladas desde aves no se obtuvo ninguna cepa que presentara integrón en su genoma. Estos resultados corroboran lo descrito por González *et al.* en el año 2000, donde tampoco se encontraron integrones en 50 cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis aisladas desde aves de postura.

Si el análisis se realiza comparando la clase de integrón, el integrón clase 1 presenta una frecuencia más alta que el integrón clase 2, siendo alrededor de un 60% en los grupos que presentaron esta clase de integrón. Esto coincide con lo descrito en la literatura, que señala al integrón clase 1 como el más común tanto en bacterias aisladas de animales como de humanos (Toro *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2003; Golstein *et al.*, 2001). En cambio, el integrón clase 2 se presentó en proporciones menores y diferentes entre los grupos bacterianos analizados.

Datos importantes de mencionar son los obtenidos en dos estudios realizados con técnicas muy similares a las utilizadas en el presente estudio, uno de ellos realizado en Estados Unidos donde se trabajó con bacterias aisladas desde

animales y obtuvo como resultado que el integrón clase 1 era el más frecuente; el 73% de *E. coli* aisladas desde aves y bovinos y el 61% de *Salmonella* aisladas desde aves y reptiles presentaron esta clase de integrón. El mismo estudio obtuvo que 14% de las bacterias estudiadas tenían integrón clase 2, destacando que este integrón fue encontrado solo en *E. coli* y *Salmonella* spp (Golstein *et al.*, 2001). El otro estudio fue realizado en Noruega y los resultados obtenidos a partir de bacterias resistentes aisladas desde productos de origen animal demuestran niveles mucho más bajos de integrones, 12% con integrón clase 1 y 6% con integrón clase 2 (Sunde, 2005).

Es evidente la diferencia entre los resultados de estas dos experiencias, que reflejan las políticas establecidas en Europa y Estados Unidos, donde la tendencia en el país norteamericano es mostrarse mucho más permisivo al uso de antibióticos como aditivos alimenticios. Se puede apreciar que los resultados en el presente estudio son mucho más parecidos a los obtenidos en EE.UU., país en el que se ha estimado que el 50% del consumo total de antibióticos en animales es ocupado como promotores de crecimiento (Summer, 2006; Torres y Zarazaga, 1998). Si bien en Chile no existe registro de antimicrobianos como promotores de crecimiento, no existe mayor control en el uso como terapéuticos o profilácticos y posiblemente una conducta de uso indiscriminado estaría generando una alta presión de selección a bacterias resistentes.

Son claros los beneficios de contar con reglamentos y limitaciones para el uso de antibióticos, esto sucede en la gran mayoría de los países Europeos, los beneficios quedan expuestos al ver los resultados obtenidos en el estudio realizado en Noruega, donde existen limitaciones de uso de antibióticos, programas de control y monitoreo de la resistencia bacteriana. Lo mismo ha sucedido en Dinamarca, donde existe vigilancia de las resistencias a antibióticos en bacterias comensales de animales y la prohibición del uso de antibióticos como promotores de crecimiento en animales. Estas medidas han mostrado un efecto positivo sobre la disminución de la resistencia, en el caso puntual de la producción

porcina la resistencia a eritromicina ha disminuido en 50%, probablemente debido a la prohibición del uso de tilosina como promotor de crecimiento (Monnet *et al.*, 2000).

Respecto la búsqueda de genes de resistencia a antimicrobianos, no fue extraño encontrar altos porcentajes de genes que codifican resistencia bacteriana debido a que se conocía de la existencia de altos niveles de resistencia expresada fenotípicamente en las bacterias incluidas en el presente estudio. Sin embargo, este hecho no se había asociado a la presencia de integrones, cuestión importante si se considera el potencial que tienen estos elementos para facilitar la transferencia horizontal de genes de resistencia (Carattoli, 2001).

Con respecto a la búsqueda de los genes que codifican la resistencia a tetraciclinas (*tetA(A)* y *tetA(B)*), se observa que estos genes no se relacionan directamente con la presencia de integrones, situación que es más notoria en el caso de las cepas de *E. coli* aisladas desde aves, donde ambos genes están en mayor cantidad precisamente en las cepas que no presentan integrón (anexo nº 1). Existen antecedentes que demuestran que los diferentes genes *tet* pueden estar en plasmidios, transposones e integrones (Chopra y Roberts, 2001). En el presente trabajo se pudo determinar que los genes *tetA(A)* y *tetA(B)* no forman parte de la estructura de los integrones de las clases estudiadas. Estos resultados coinciden con el estudio realizado en el sur de Taiwán, donde no se encuentra el gen dentro de la estructura del integrón clase 1, aún cuando el 100% de las cepas de *E. coli* aisladas desde cerdos presentó resistencia a tetraciclina (Hsu *et al.*, 2006).

En el caso del gen *dhfrI*, que determina la resistencia a trimetoprim, se aprecia que este gen está presente con menor frecuencia en las bacterias resistentes de este estudio y se asocia a la presencia de integrones en alto porcentaje, particularmente al integrón clase 2.

En relación al gen *aad1a*, que determina la resistencia a estreptomycin, los resultados obtenidos indican que es el gen más frecuente en las bacterias estudiadas. En el grupo de *E. coli* de cerdos el 50% de las cepas con integrón tienen el gen, sin embargo, en los otros grupos se presenta en frecuencias menores, lo que indica que la presencia del gen no se asocia exclusivamente a estos elementos genéticos. Es importante señalar que tanto en los integrones clase 1 como en los de clase 2, el gen *aad1a* se encontró formando parte de la región variable de estos elementos, en distintas posiciones. Lo mismo se obtuvo en un estudio realizado en Korea, donde en 104 aislados de *E. coli* desde cerdos con diarrea, se obtuvo 8 diferentes estructuras de la zona variable del integrón clase 1 de los cuales 6 de ellos incluían el gen *aad1a* (Kang *et al.*, 2005).

La búsqueda de los genes asociados a la estructura del integrón permitió encontrar diferentes organizaciones genéticas. Resultados obtenidos previamente en este laboratorio trabajando con cepas de *Shigella* spp aisladas desde niños con síndrome de diarrea aguda, determinaron dos estructuras asociadas a los integrones, un patrón de asociación en el integrón clase 1 y otro en el integrón clase 2 (Figura 2) (Toro *et al.*, 2005). Los resultados del presente estudio permitieron determinar mayor variabilidad en la estructura de los integrones presentes en las bacterias aisladas desde animales: cuatro formas de organización asociadas al integrón clase 1 y cinco que están asociadas al integrón clase 2.

El análisis de los resultados permite apreciar que existe una organización estructural predominante en cada clase de integrón, aún cuando se pudo determinar con mayor certeza la organización de los genes presentes en el integrón clase 1, dado que la estructura del extremo 3' cs es mucho más conservada en este integrón que en el integrón clase 2 (Tabla 9 y 10). Esto permite sospechar que la utilización de ciertos antimicrobianos provoca una presión de selección que se traduce en una mayor diseminación de determinadas organizaciones de genes. Apoya esta idea el hecho que la organización genética

más frecuente del integrón clase 1 y del integrón clase 2 fue la misma tanto en las cepas de *E. coli* como de *Salmonella* spp aisladas desde cerdos.

El uso de antibióticos responde a razones principalmente económicas y medioambientales, ya que muchas de las producciones animales necesitan trabajar con grandes cantidades de animales en espacios muy reducidos de terreno. En esta situación de alta densidad poblacional, tanto las infecciones subclínicas como las clínicas pueden dañar seriamente la productividad del plantel. Esto hace casi imposible el tratamiento en forma individual a cada animal, por ello la administración de fármacos para prevenir o tratar enfermedades normalmente se hace por vía oral en el alimento o el agua.

Se estima que de todos los antimicrobianos producidos en el mundo, 30% se utilizan en la industria de producción porcina y 26% en la industria avícola (Díez y Calderón, 1997). Esto responde a las ventajas que genera el uso de antibióticos en producción animal, que se traducen en facilitación de las condiciones de crianza y mejoramiento de los indicadores de producción, además de su uso terapéutico para controlar enfermedades bacterianas. De hecho, la producción de carne de ave y de cerdo en Chile ha aumentado durante las últimas décadas y esto se debe, dentro de otros factores, a manejos productivos que consideran el uso de antimicrobianos en profilaxis y terapia.

De acuerdo al manejo intensivo, las producciones de aves y de cerdos presentan características comunes, sin embargo, el uso de antibióticos en cada uno de las especies animales es diferente, ya que considera objetivos distintos.

Para el caso de aves, los fármacos que normalmente están presentes en las mezclas de alimentos son los coccidiostatos, varios de cuales son antimicrobianos de amplio espectro (ej. Compuestos ionóforos y sulfonamidas). La bacitracina es usada para controlar la enteritis necrótica causada por *Clostridium perfringens*. Drogas más nuevas como las fluoroquinolonas son utilizadas para el control de *E.*

coli y *Salmonella* spp que causan las principales enfermedades en la producción de aves. La gentamicina se usa en etapas de incubación y primeros días de vida para el control de onfalitis y absesos (McEwen y Fedorka-Cray, 2002). A nivel nacional, el rubro avícola utiliza frecuentemente enrofloxacino, oxitetraciclina, clortetraciclina, tilosina, ceftiofur y sulfas.

En cerdos, al igual que en aves, la mayoría de los antimicrobianos con finalidades profilácticas son administrados por vía del alimento, principalmente en edades tempranas debido a que son más vulnerables. En general, los antimicrobianos más utilizados en cerdos son tetraciclina, tilosina y sulfas, para tratar y prevenir enfermedades respiratorias, que son muy frecuentes en cerdos. Gentamicina y neomicina son usadas para tratar la diarrea bacterial, otro problema importante, causado por organismos como *E. coli* y *Clostridium perfringens*. La disentería del cerdo (*Serpulina hyodysenteriae*) y la ileitis (*Lawsonia intracellularis*) son otras enfermedades importantes que pueden ser tratadas con lincomicina, tiamulina, o macrólidos.

Los resultados de este trabajo demuestran que la frecuencia de los integrones presentes en las cepas de *Salmonella* spp aisladas desde aves y cerdos fue significativamente distinta. Esta diferencia podría ser consecuencia en parte del uso de distintos tipos de antimicrobianos en los dos sistemas de producción animal.

Toda esta información permite reflexionar sobre la situación de la resistencia bacteriana en Chile y el cómo se está enfrentando este tema. Sin duda, existe un déficit de información al respecto, que tiene como consecuencia que los profesionales relacionados con la salud pública y salud animal no han interiorizado la importancia de hacer un buen manejo de los antimicrobianos. Por ello, es necesario fomentar, sobre todo entre los médicos veterinarios, que la administración de un determinado antibiótico se base en antibiogramas y estudios

epidemiológicos actualizados y así generar beneficio tanto en lo productivo como beneficio en aspectos sanitario de largo plazo.

Finalmente, el análisis de los resultados permite evidenciar que la resistencia bacteriana a ciertos antimicrobianos está asociada a la presencia de integrones, elementos genéticos que favorecen la diseminación de este fenómeno de resistencia. De ello se desprende la urgente necesidad de contar con un organismo específico y multidisciplinario, de carácter nacional, que implemente programas de monitoreo y vigilancia sistemáticos, para generar y divulgar información actualizada acerca de la situación nacional de resistencia bacteriana. De esta forma, se podrá contar con más herramientas que permitan enfrentar correctamente aspectos relacionados con la inocuidad alimentaria, sobre todo cuando las empresas de producción animal y las políticas nacionales tienen como objetivo posicionar a Chile como una potencia agropecuaria capaz de mejorar la calidad y aumentar la cantidad de los alimentos producidos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio de las bacterias incluidas en este trabajo permiten concluir:

- Las cepas de *Salmonella* spp aisladas desde cerdos y *Escherichia coli* aisladas desde aves y cerdos presentan integrón clase 1 y/o 2.
- Las cepas de *Salmonella* spp aisladas desde aves no presentan integrón clase 1 y/o 2.
- Es posible apreciar diferencias en la proporción de cepas con integrón clase 1 y/o 2 según la población animal de origen y el tipo de bacteria analizada.
- El integrón clase 1 es más frecuente que el integrón clase 2, tanto en *Salmonella* spp aisladas desde cerdos como en *Escherichia coli* aisladas desde aves y cerdos.
- Los genes *tetA(A)* y *tetA(B)* que codifican resistencia a tetraciclina no están asociados estructuralmente a los integrones encontrados.
- El gen *aad1a* que codifica resistencia a estreptomicina y el gen *dhfr1a* que codifica resistencia a trimetoprim forman parte de integrones aunque su hallazgo no fue exclusivo en bacterias con integrón.
- La estructura genética del integrón clase 1 presenta cuatro diferentes formas de asociaciones de cassettes de resistencia.
- La estructura genética del integrón clase 2 presenta cinco diferentes formas de asociaciones de cassettes de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

- **AARESTRUP, F.M. 2004.** Monitoring of Antimicrobial Resistance Among Food Animals: Principles and Limitations. *J. Vet. Med.* B.51: 380-388.
- **ALÓS, J.I. 1994.** Resistencia bacteriana a los antibióticos “The never ending story”. *Med. clin. (Barc.)* 103: 94-96.
- **ALÓS, J.I. 2003.** Quinolonas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21: 261-268.
- **ALÓS, J.I.; CARNICERO, M. 1996.** Consumo de antibióticos y resistencia bacteriana a los antibióticos: “algo que te concierne”. *Med. clin. (Barc.)* 109: 264-270.
- **ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; FREJO, M.T. 1999.** Problemática actual de los antibióticos como promotores del crecimiento. *Anaporc* 188: 5-52.
- **BENNETT, PM. 1999.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 43: 1-4.
- **BEZOEN, A.; VAN HAREN, W.; HANEKAMP, JC. 1998.** Emergence of a debate: antibiotic growth promoters (AGPs) and public health. Amsterdam: HAN (Heidelberg Appeal Nederland) Foundation. [en línea]. <<http://www.stichting-han.nl/english/studies.html>> [consulta: 20-04-2007].
- **CABELLO, F. 2004.** Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Rev. Méd. Chile* 132: 1001-1006.
- **CARATTOLI, A. 2001.** Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* 32: 243-259.
- **CARATTOLI, A.; VILLA, L.; PEZZELLA C.; BORDI, E.; VISCA, P. 2000.** Expanding Drug Resistance through Integron Acquisition by IncFI Plasmids of *Salmonella enterica Typhimurium*. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 444 – 447.
- **CHOPRA, I.; ROBERTS, M. 2001.** Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 232–260.
- **DÍEZ, P.; CALDERÓN, V. 1997.** Empleo de antibióticos en veterinaria. *Rev. Esp. Quimioterap.* [en línea]. <http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0497/rev1.html> [consulta: 24-03-2007].

- **ERRECALDE, J. 2004.** “Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo” Incidencia del Desarrollo de Resistencias en la Salud Pública. Título de la serie: Estudios FAO: Producción y sanidad animal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. ISBN: 9253051507. [en línea]. < <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm#Contents> > [consulta: 13-03-2006].

- **F.D.A. (U.S. Food and Drugs Administration) 2003** Relating Food Animal and Human Antimicrobial Use. [en línea]. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/slides/3919S2_04_Apley.ppt> [consulta: 24-04-2007].

- **FEDESA. 2006** (European Federation of Animal Health). [en línea] <http://www.fedesa.be/priorities/antibio/kit4.htm> [consulta: 24-04-2007].

- **FLUIT, AC.; SCHMITZ, F.J. 2004.** Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. 10: 272-288.

- **FLUIT, AC.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. 2001.** Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 14: 836-871.

- **FUCHS, L.; CHIHU, L.; CONDE, C.; GONZÁLEZ, V.; NOGUEZ, A.; CALDERON, E.; AVONCE, N.; OVANDO, C. 1994.** Mecanismos Moleculares de la Resistencia Bacteriana. [en línea]. Salud pública Méx.; 36. < <http://www.insp.mx/salud/36/364-7s.html>. > [consulta: 30-03-2006].

- **GEBREYES, W.; THANKUR, S. 2005.** Multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 49:503-511.

- **GOLSTEIN, C.; LEE, M.; SANCHEZ, S.; HUDSON, CH.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B.; GRADY, M.; LIEBERT, C.; SUMMERS, A.; WHITE, D.; MAURER, J. 2001.** Incidence of class 1 and class 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 723-726.

- **GONZÁLEZ, G.; FLORES, C.; BORIE, C.; SÁNCHEZ, M.L.; ACEVEDO, I.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R. 2000.** Pesquisa de integrones en cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Aisladas de Aves de Postura. **In:** XXII Congreso Chileno de Microbiología “Dr. Manuel Rodríguez L.”. Punta de Tralca, 5, 6 y 7 de Diciembre 2000. Chile.

- **GONZÁLEZ, G.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R. 2004.** Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. Rev. Méd. Chile 132: 619-626.

- **GONZÁLEZ, J.; BARRETO, J.; RODRÍGUEZ, M.; PINO, P.; LIM, N. 1998.** Macrólidos. [en línea]. Acta Médica; 8: 71-74.
< http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/actsu198.htm > [consulta: 10-09-2006].
- **GONZÁLEZ, J.; CALVO, A. 2005.** El Despertar de la Era Antibiótica. Rev. Esp. Quimioterap. 18: 247-251.
- **HALL, RM.; COLLIS, CM. 1995.** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. Mol. Microbiol. 15: 593-600.
- **HSU, SC.; CHIU, TH.; PANG JC.; HSUAN-YUAN CH.; CHANG GN.; TSEN HY. 2006.** Characterization of antimicrobial resistance patterns and class 1 integrons among *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis strains isolated from humans and swine in Taiwan. Int. J. Antimicrob. Agents 27: 383–391.
- **KANG, SG.; LEE, DY.; SHIN, SJ.; AHN, JM.; YOO, HS. 2005.** Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. J. Vet. Sci. 6: 201–205.
- **LAPEÑA LÓPEZ DE ARMENDIA S. 1999.** Resistencias a antibióticos en nuestro medio. Visión global del problema. Bol. Pediatr. 39: 243-247.
- **MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 2004.** Microbial Genetics (Cap. N°9) In: Brok: Biology of Microorganisms. 10a ed. Prentice-Hall. Madrid.(ISBN 8420536792).
- **MARÍN, M.; GUDIOL, F. 2003.** Antibióticos β -lactámicos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21: 42-55.
- **MARTIN, F.J.; LIRAS, P. 1989.** Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol. 43:181-226.
- **MATEOS, P. 2006.** Agentes Antimicrobianos y Microorganismos. [en línea]. <<http://coli.usal.es/Web/educativo/micro2/tema20.html>> [consulta: 24-04-2007] .
- **McEWEN, S.; FEDORKA-CRAY, P. 2002.** Antimicrobial Use and Resistance in Animals. Clin. Infect. Dis. 34: 93-106.
- **MONNET, D.L.; EMBORG, H.D.; ANDERSEN, S.R.; SCHÖLLER, C.; SORENSEN, T.L.; BAGER, F. 2000.** Vigilancia de las resistencias bacterianas a los agentes antimicrobianos en Dinamarca [en línea]. Eurosurveillance 5: 129-132<<http://www.eurosurveillance.org/em/v05n12/v05n12.pdf>>[consulta: 28-05-07].

- **NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).** 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard M31-A2, vol. 22, nº 6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- **NESVERA, J.; HOCHMANNOVA, J.; PATEK, M.** 1998. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiology Letters 169: 391-395.
- **OMS (ORGANIZACION MUNDIAL DE SALUD).** 2005. Capítulo 3: Laboratorios básicos – niveles de bioseguridad 1 y 2. **In:** Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3ª edición. [en línea].
<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf> [consulta: 23-02-2007].
- **PALOMINO, J.; PACHÓN, J.** 2003. Aminoglucósidos. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 21:105-15.
- **PIGRAU, C.** 2003. Oxazolidinonas y glucopéptidos. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 21:157-165.
- **REYES, A.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R.; GONZÁLEZ, G.** 2003. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae from several Chilean hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 51: 317-321.
- **RODRÍGUEZ, M.A.; GONZÁLEZ, J.; BARRETO, J.; LIM, N.; AREU, A.; PARDO, A.** 1998. TETRACICLINAS. [en línea]. Acta Médica 8: 75-79.
< http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/actsu198.htm > [consulta: 10-09-2006].
- **SABATÉ, M.; PRATS, G.** 2002. Estructura y Función de los Integrones. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 20 (7) 341-345.
- **SAN MARTÍN, B.; CAÑÓN, H.** 1999. Antimicrobianos en medicina veterinaria: ¿Cómo se puede evitar la resistencia bacteriana?. TECNO VET. 5
<http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9692%2526ISID%253D460,00.html> [consulta: 15-04-2006].
- **SAN MARTIN, B.; KRUIZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO H.; LEON B.; ESPINOZA S.; IRAGÜEN D.; PUGA J.; BORIE C.** 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X Región, Chile. Arch. med. vet. 34: 221-234.
- **SAN MARTIN, B.; BRAVO, V.; BORIE, C.** 2005. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. Arch. med. vet.; 37:117-123.

- **SUMMER, A. 2006.** Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Antibiotic Multi-resistance Problem. *Anim. Biotechnol.* 17: 125–135.
- **SUNDE, M., 2005.** Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 1019-1024.
- **SUNDE, M.; SORUM, H. 1999.** Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb. Drug Resist.* 5: 279-287.
- **TORO, C.; FARFÁN, M.; CONTRERAS, I.; FLORES, O.; NAVARRO, N.; MORA, G.; PRADO, V. 2005.** Genetic Analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. *Epidemiol. Infect.* 133: 81-86.
- **TORRES, C.; ZARAZAGA, M.1998.** Repercusiones en el hombre del consumo de antibióticos por animales. [en línea]. *Rev. Esp. Quimioterap.* <http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0198/rev1.html> [consulta: 24-04-2007].
- **TORRES, C.; ZARAZAGA, M. 2002** Antibióticos como promotores del crecimiento en animales ¿Vamos por el buen camino?. *Gac. Sanit.* 16:109-112.
- **VAN DEN BOGAARD, E. 1997.** Antimicrobial Resistance. Relation to human and animal exposure to antibiotic. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 453-461.
- **WHITE, D G.; ACAR, J.; ANTHONY, F.; FRANKLIN, A.; GUPTA, R.; NICHOLLS, T.; TOMURU, Y.; THOMPSON, S.; THRELFALL, EJ .; VOSE, D.; VAN VUUREN, M.; WEGENER, HC.; CASTARRIC, ML. 2001.** Antimicrobial resistance: standardization and harmonization of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 20: 849-858.
- **WHITE, PA.; Mc IVER, CJ.; RAWLINSON, WD. 2001.** Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2658-2661.
- **WIELER, LH.; MCDANIEL, TK.; WHITTMAN, TS.; KAPER, JB. 1997.** Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of strains. *FEMS Microbiology Letters* 156:49-53.
- **WOLF, M. 2004.** Uso y abuso de antibióticos. Momento de su evaluación, más allá del ser humano. *Rev Méd Chile;* 132: 909-911.

- **YOSHIDA, H.; BOGAKY, M.; NAKAMURA, S.; UBUKATA, K.; KONNO, M. 1990.** Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, confers resistance to quinolones. J. Bacteriol. 172: 6942-6949.

ANEXO 1

Presencia de genes que codifican resistencia a antimicrobianos en cepas estudiadas.

***Escherichia coli* aisladas de cerdos.**

	Nº muestras	<i>tetA(A)</i>	<i>tetA(B)</i>	<i>aad1a</i>	<i>dhfrla</i>
intl 1 (+)	40	0	27	35	6
intl 1 y 2 (+)	5	0	5	4	2
intl 2 (+)	21	1	12	19	12
Sin Integrón	24	0	16	12	4

***Escherichia coli* aisladas desde aves.**

	Nº muestras	<i>tetA(A)</i>	<i>tetA(B)</i>	<i>aad1a</i>	<i>dhfrla</i>
intl 1 (+)	15	6	5	10	2
intl 1 y 2 (+)	5	5	3	3	2
intl 2 (+)	5	2	3	5	4
Sin Integrón	62	25	14	18	1

***Salmonella* spp aisladas desde cerdos.**

	Nº muestras	<i>tetA(A)</i>	<i>tetA(B)</i>	<i>aad1a</i>	<i>dhfrla</i>
intl 1 (+)	10	0	2	6	2
intl 1 y 2 (+)	0	0	0	0	0
intl 2 (+)	6	0	2	5	5
Sin Integrón	19	2	4	7	1

***Salmonella* spp aisladas desde aves.** no se encontraron cepas positivas a ninguna de las dos clases de integrones estudiadas en el presente trabajo.