



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

**ROL DE GENES *sul* Y *dfr* EN LA RESISTENCIA A
SULFONAMIDAS Y TRIMETOPRIM EN CEPAS DE BACILOS
GRAM NEGATIVOS ASOCIADAS A CULTIVOS DE
SALMONES EN CHILE.**

Profesor Guía: Mariana Domínguez Yévenes

Dpto. de Microbiología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Tesis para ser presentada a la Dirección de Postgrado de la Universidad de
Concepción

OLIVER HERNÁN FUENTES RETAMAL

CONCEPCIÓN-CHILE

2010

RESUMEN

La industria de la salmonicultura en Chile ha utilizado en forma intensiva antibacterianos, entre los que se encuentra trimetoprim y sulfisoxazol, durante el proceso de cultivo. Existe evidencia que estos agentes antimicrobianos se acumulan en estos ambientes durante los tratamientos, llegando a cambiar la composición bacteriana autóctona y, por lo tanto, es esperable la selección de bacterias resistentes a estos antibacterianos. Estos microorganismos serán portadores de diferentes determinantes genéticos de resistencia, y que debido a su posible codificación extracromosomal, pueden ser diseminados a otras bacterias susceptibles en diversos ambientes.

En consecuencia, esta práctica estaría creando reservorios ambientales de genes de resistencia a antibióticos transferible en los sistemas de cultivo en Chile, con importantes efectos ambientales y riesgos potenciales para la salud humana y animal. Esto hace necesario evaluar el rol de estos sistemas como reservorios y medio de diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos.

Debido a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la participación de los genes *sul* y *dfr*, en la resistencia a sulfonamidas y trimetoprim, en cepas de bacilos Gram negativos aislados desde pisciculturas y centros de cultivo de salmones y su relación con integrones.

En este estudio se incluyeron 99 cepas bacterianas resistentes a sulfonamidas y/o trimetoprim obtenidas de muestras de agua superficial, sedimento, contenido intestinal, mucus de salmones en cultivo y alimento extruido. De las 99 cepas, 22 provenían en pisciculturas (P) y 77 de centros de cultivos (CC) de la VIII Región y X Región de Chile.

Se determinó el nivel de resistencia a sulfisoxazol y trimetoprim y se investigó la presencia y variedad de genes *sul* y *dfr*. También se pesquisaron integrones de la clase 1, 2, y los *cassettes* genéticos de resistencia asociados a estas estructuras genéticas para relacionar su presencia con la resistencia a sulfonamidas y trimetoprim en las cepas seleccionadas.

Los resultados indicaron que las cepas estudiadas presentaban elevados niveles de resistencia a ambos antibacterianos en estudio; para trimetoprim los valores de CMI fluctuaron entre 4 y $> 2.048 \mu\text{g/mL}$, siendo la CMI_{50} $2.048 \mu\text{g/mL}$ y la $\text{CMI}_{90} > 2.048$

µg/mL. La CMI de sulfisoxazol varió entre <8 y >4.096 µg/mL, con una CMI₅₀ de 2.048 µg/mL y CMI₉₀ >4.096 µg/mL.

Al analizar los mecanismos de resistencia, se encontró una mayor presencia de genes *dfr* y *sul* en cepas inhibidas con elevadas concentraciones de los antibióticos en estudio. Sólo se detectaron los genes *dfrA1*, *dfrA12* y *dfrA14*, distribuidos en un total de 12 de las 99 cepas, siendo el gen *dfrA12* el más frecuente (8/12 cepas). La distribución de los genes *dfr* fue similar en cepas provenientes de pisciculturas (13,6%) y de centros de cultivo (11,7%). Con respecto a genes *sul*, el gen *sul1* se encontró en 25 de las 99 cepas ensayadas (8/22 (36,4%) de pisciculturas (P) y 17/77 (22,1%) de centros de cultivo (CC)), *sul2* en 4 cepas (una cepa de P y 3 cepas de CC) y los genes *sul1* y *sul2*, simultáneamente, en 3 cepas, una de ella aislada en P y 2 en CC. No se encontró el gen *sul3*.

Por otra parte, se detectó 21 cepas con integrones clase 1, y una cepa con integrón clase 1 y 2, simultáneamente. Esta estructura genética se presentó tanto en cepas aisladas en pisciculturas (6/22; 27,3%) como en centros de cultivo (19/77; 20,8%). De las cepas con integrón clase 1, en 4 de ellas no se logró amplificar de extremo 3'CS y 17 presentaron el extremo 3'CS con el gen *sul1* adyacente al gen *qacΔE*, de las cuales 4 portaban un gen *qacΔE* alterado. Al igual que los genes *dfr* y *sul*, se observó que los integrones clase 1 y 2 se concentraban en cepas con elevado nivel de resistencia a trimetoprim y sulfisoxazol.

En integrones clase 1 se reveló 7 zonas variables distintas, conteniendo 1 a 3 *cassettes* genéticos. Las zonas variables con un sólo *cassette* contenían los genes *aadA1* (5 cepas), *aadA2* (1 cepa) y *aadA9* (1 cepa). En cepas con 2 *cassettes* insertos en su zona variable, éstos correspondieron a los genes *bla_{OXA-101} - aac(6')-Ib* (1 cepa) y *aadA2-cmLA* (4 cepas). Por último, 3 cepas presentaron una zona variable compuesta de 3 *cassettes*, 2 cepas con los *cassettes* *dfrA12-orf-aadA2* y 1 cepa con los *cassettes* *dfrA12-orf-aadA2a*. La zona variable del integrón clase 2 contenía los genes *dfrA1*, *sat* y *aadA1*, ubicados correlativamente.

Para los genes *dfr* se apreciaron dos situaciones: mayor presencia de genes *dfr* en cepas con integrones, pero no asociados a estas estructuras, y presencia de más de un gen *dfr* por cepa (asociado y no asociado a integrón). En el caso de los genes *sul*, éstos

se encontraron, principalmente, asociados a integrones clase 1, con el gen *sul1* como parte estructural de esta clase de integrón, y el gen *sul 2* no vinculado a integrones como *cassette*, sino más bien a otras estructuras. Al igual que los genes *dfr*, los genes *sul* se presentaron simultáneamente en algunas cepas.

En resumen, esta investigación pone de manifiesto la presencia de genes *dfr* y *sul* en cepas resistentes a trimetoprim y/o sulfisoxazol, vinculados a los mayores niveles de resistencia, aunque claramente no como único mecanismo de resistencia. Además, evidencia la presencia más frecuente de integrones en estas mismas cepas; sin embargo la relación de genes *dfr* como *cassette* genético en estas estructuras fue baja, en comparación con otros *cassettes* genéticos, como *aadA* y *cmLA*. La relación de genes *sul* con integrones clase 1 fue la esperada, con *sul1* asociado al extremo 3'CS, en la mayoría de los casos, y *sul2* no asociado a integrones, sino a un contexto genético diferente.

Es importante destacar la presencia de cepas con más de un gen *dfr* y *sul*, lo que estaría indicando la tendencia a la conservación estos genes, ya sea por otorgar un bajo costo de *fitness* y/o por coselección de resistencia, al estar involucrados con otros genes de resistencia a antibióticos. Esto es de gran trascendencia debido a que la interrupción del uso de trimetoprim y sulfonamidas en el cultivo de salmón no implica, necesariamente, la pérdida de los genes de resistencia a estos compuestos, los que, además, pueden estar seleccionando estructuras genéticas que porten genes de resistencia a antibióticos de uso habitual en salmonicultura.

Estudios como el realizado permiten ampliar el conocimiento y comprensión de la resistencia a antimicrobianos y los mecanismos que utilizan las bacterias para adaptarse y sobrevivir en medios hostiles generados por la presión selectiva ejercida por los agentes antibacterianos.