

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

**EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN EN CANINOS
CON ESPERMATOZOIDES FRESCOS Y CRIOPRESERVADOS
EN OVOCITOS DE PERRA MADURADOS *IN VITRO***

JAIME ALFREDO PALOMINO MACKENNEY

Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, Universidad de Chile, 2006

En espermatozoides caninos existen pocos antecedentes respecto a los efectos del procedimiento de congelación sobre la estructura espermática, así como la capacidad de estos espermatozoides de tener una fecundación exitosa. El análisis ultraestructural, mediante microscopía electrónica de barrido permitió identificar alteraciones en la estructura espermática, tales como deformación de la cabeza y vesiculaciones en la membrana. Estas alteraciones se encontraron en un 8, 20 y 33 % de los espermatozoides provenientes de semen fresco, diluido con solución crioprotectante y criopreservado, respectivamente.

La unión y penetración de espermatozoides caninos frescos, a la zona pelúcida de ovocitos de perra madurados *in vitro*, fue dependiente del tiempo de coincubación gamética. A través del microscopio electrónico, se observó una disminución en los porcentajes de unión (61, 57 y 53 % a las 1, 2 y 3 horas de coincubación), mientras que la tasa de penetración aumentó de 9 a 25 y 34 %. Con microscopía de epifluorescencia, se observó la misma tendencia, pero la evaluación se realizó desde 1 hasta 7 horas de incubación.

La interacción gamética de ovocitos madurados *in vitro* con espermatozoides criopreservados no presentó ninguna tendencia significativa a través de los diferentes tiempos de coincubación. Sin embargo, los porcentajes de penetración a la primera hora de incubación fueron superiores a los obtenidos con espermatozoides frescos.

Sobre la base de los resultados obtenidos se puede concluir que en caninos el procedimiento de criopreservación altera de manera significativa la estructura espermática y la habilidad de estos espermatozoides de unirse y penetrar la zona pelúcida de ovocitos de perra madurados *in vitro*.

**ANÁLISIS DE RIESGO EN LA TOMA DE DECISIÓN DE IMPORTACIONES
DE PORCINOS Y SUS PRODUCTOS**

RUBÉN DARÍO MOREIRA ZÚÑIGA

Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, Universidad de Chile, 2006

El actual escenario comercial hace que los países deben redoblar sus esfuerzos para mantener y mejorar su estatus sanitario y, por otra parte, se obligan a manejar el riesgo que implica el ingreso de animales y productos de origen animal a través de las importaciones, sin tener que aplicar medidas para-arancelarias.

El objetivo de este estudio apuntó a desarrollar una matriz básica de eventos a considerar en un análisis de riesgo de introducción de enfermedades, a través de la importación de animales y productos de la especie porcina, como apoyo a la toma de decisiones en comercio pecuario internacional, en el ámbito de los servicios oficiales de salud animal.

Se definió la hipótesis de trabajo, con el establecimiento del problema, determinándose el alcance del análisis de riesgo. Se identificaron los peligros específicos, se listaron los principales eventos o variables que pueden ocurrir en una importación de porcinos y sus productos.

Se desarrolló un árbol de eventos involucrados en un proceso de importación de animales o sus productos, analizándose la documentación disponible, evidencias y supuestos, que fueron utilizados en la construcción de una matriz para las principales enfermedades porcinas de notificación obligatoria ante la Organización

Mundial de Sanidad Animal (OIE) y en el modelo simulado de introducción de Peste Porcina Clásica (PPC) a través de importaciones de jamón serrano, en el periodo 1997-2002.

Seguidamente se estimó la probabilidad de entrada, exposición y opciones de mitigación del agente de la PPC, en un escenario de ingreso a pequeñas explotaciones y en cerdos de traspatio, las cuales se consideraron despreciables y sus consecuencias se estimaron en moderadas, para los escenarios planteados.

La metodología desarrollada se plantea como una alternativa viable, que apoya la toma de decisión de importaciones de animales y productos en el ámbito del servicio veterinario oficial.

CARACTERIZACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR EN CAPAS GERMINAL Y ADVENTICIA DE QUISTES HIDATÍDICOS FÉRTILES E INFÉRTILES DE *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*

ANDREA MARTA AYALA PLAZA

Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, Universidad de Chile, 2007

La hidatidosis es una enfermedad zoonótica parasitaria distribuida en todo el mundo, cuyos efectos constituyen un serio problema tanto para la salud humana como en el ámbito ganadero. El agente causal es el cestodo *Echinococcus granulosus*. Este posee un ciclo de vida indirecto, en el cual, el estado adulto vive y se desarrolla en el intestino delgado de cánidos (principalmente el perro). Morfológicamente, el gusano está formado por una cabeza o escolex, un cuello y una estróbila, que generalmente posee tres proglótidas; la última de ellas es grávida y contiene los huevos infectantes para los hospederos intermediarios, que incluyen herbívoros y omnívoros. La proglótida grávida se desprende del gusano y se elimina al medio externo junto a las heces del perro, liberando los huevos que contiene en su interior. Cuando los hospederos intermediarios ingieren estos huevos, en su tubo digestivo se libera un embrión que atraviesa la mucosa intestinal llegando a un vaso sanguíneo o linfático desde donde se distribuye a algún tejido, donde se forma posteriormente un quiste hidatídico. A partir de la capa interna de los quistes hidatídicos, llamada germinal, se forman estructuras denominadas protoescólices, que constituyen la forma infectiva para el hospedero definitivo. El ciclo del parásito se cierra cuando los perros consumen vísceras parasitadas con quistes hidatídicos provenientes de animales infectados.

Existen quistes hidatídicos que por razones no conocidas no forman protoescólices y, por lo tanto, no pueden completar el ciclo de vida del parásito; ellos son llamados quistes hidatídicos infértiles. Conocer los mecanismos que determinan la fertilidad de un quiste hidatídico brindaría una herramienta importante para desarrollar estrategias de control específicas en el ciclo de vida del parásito.

Durante esta Tesis se investigó el rol de la hiperplasia y de la hipertrofia en la determinación del crecimiento y de la fertilidad del quiste hidatídico. Estudios previos demostraron que en la capa germinal de los quistes fértiles, los protoescólices se forman a partir de grupos celulares que poseen actividad proliferativa e hipertrófica, y con distribución en forma de parches.

En consecuencia, la infertilidad de un quiste hidatídico podría deberse a la disminución o interrupción de procesos metabólicos relacionados con la proliferación y/o el crecimiento del protoescólice, en la capa germinal. Por este motivo, en el presente estudio se caracterizó por la proliferación y el crecimiento celular en la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles de *E. granulosus* en bovinos. Como medida de crecimiento hiperplásico se analizó la incorporación de [H^3]-Timidina por técnicas bioquímicas y autorradiográficas. Por su parte, la hipertrofia se determinó por incorporación de [H^3]-Uridina en el RNA y de [H^3]-Leucina en las proteínas, también medida en función del tiempo por técnicas bioquímicas y autorradiográficas.

Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas en la actividad proliferativa y de crecimiento por hipertrofia en la capa germinal de quistes hidatídicos fértiles e infértiles de *E. granulosus*. En consecuencia, la infertilidad de los quistes hidatídicos y su crecimiento no estaría determinada por una falla en el mecanismo metabólico de proliferación e hipertrofia en la capa germinal, sino que obedecería a mecanismos más específicos, probablemente relacionados con la respuesta inmune del hospedero.

DISTRIBUCIÓN EPIDEMIOLÓGICA, PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y CLONALIDAD DE CEPAS DE *SHIGELLA* SPP., ASOCIADAS A INFECCIONES ENTÉRICAS EN NIÑOS DE LA REGIÓN METROPOLITANA, EN EL PERÍODO DE VERANO 2004-2005

CHRISTOPHER HAMILTON - WEST MIRANDA

Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, Universidad de Chile, 2007

Shigella spp. es una importante causa de diarrea en niños a nivel mundial. Siendo una de las pocas patologías entéricas en que su curso clínico se beneficia a través de terapia antimicrobiana, lamentablemente se ha descrito un aumento en la resistencia a estos fármacos tanto en el extranjero como en Chile.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la distribución de los serotipos de *Shigella* spp. circulantes en la Región Metropolitana, en el verano 2004-2005, asociándolos a la severidad de los cuadros que provocan y el nivel de atención que éstos demandan. Además, evaluar la resistencia a antibióticos de las cepas de *Shigella* spp. aisladas de niños atendidos en distintos centros y caracterizar a las cepas que presenten patrones de multiresistencia, desde el punto de vista de su epidemiología molecular.

Se observó que *S. sonnei* y *S. flexneri* 2a fueron las responsables del 95% de los casos de shigelosis en este período, aislándose principalmente en niños entre 4-6 años, que consultaron a nivel ambulatorio (77%) diagnosticándose mayoritariamente como diarrea aguda. Existieron elevados niveles de resistencia frente a ampicilina, cotrimoxazol, amoxicilina - ácido clavulánico y cloramfenicol (66,9%, 59,7%, 56,1% y 45,3%, respectivamente). Se encontraron 11 patrones de resistencia, con un 61,2% de cepas multiresistentes, las cuales presentaron un estrecho vínculo genético.

Las infecciones por *Shigella* en la Región Metropolitana están asociadas a un reducido número de serotipos, que se han mantenido estables en los últimos años, lo que representa un panorama favorable para el desarrollo de vacunas. Además, en su mayoría correspondieron a expansiones clonales, lo que se ve reflejado en la presentación de patrones de resistencia bastante similares dentro de cada especie de *Shigella*.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *SALMONELLA* SPP., *E. COLI* Y *ENTEROCOCCUS* SPP., AISLADAS DE AVES Y CERDOS

LISETTE LAPIERRE

Dra. en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias, Universidad de Chile, 2007

La resistencia en las cepas bacterianas aparece junto con el uso de los antimicrobianos. Hoy en día el uso masivo de estos fármacos en el hombre, los animales y la agricultura ha transformado este fenómeno en un problema creciente, que involucra cada día mayor número de cepas, nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos. En este mismo sentido, las bacterias además son particularmente eficientes en aumentar los efectos de la resistencia, no sólo por su habilidad de multiplicarse rápidamente sino también por su capacidad de transferir genes en forma horizontal.

El objetivo de este estudio fue caracterizar fenotípicamente y genotípicamente la resistencia a antimicrobianos en cepas indicadoras *E. coli*, *Enterococcus* spp. y en cepas zoonóticas *Salmonella* spp. aisladas desde animales sanos de importancia económica, como son las aves y los cerdos. Se determinaron los porcentajes de resistencia frente a distintos antimicrobianos mediante el método de dilución en placa y posteriormente se definieron los mecanismos genéticos asociados a la resistencia en las distintas cepas bacterianas, para finalmente comparar los perfiles de resistencia entre aves y cerdos.

En general las cepas bacterianas obtenidas tanto de aves como de cerdos mostraron altos niveles de resistencia frente a la mayoría de antimicrobianos analizados, siendo las drogas que presentaron menor actividad *in vitro* tetraciclina, estreptomina, quinolonas, fluoroquinolonas, eritromicina, sulfametoxazol+trimetoprim y penicilina. Las cepas aisladas de aves presentaron mayores porcentajes de resistencia frente

a la familia de las quinolonas, mientras que las cepas aisladas de cerdos presentaron mayores porcentajes de multirresistencia.

Con respecto a los genes de resistencia, en las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de aves resistentes a tetraciclina se observó un 13% de cepas positivas al gen *tetA* y un 9% a *tetB*, mientras que en los aislados obtenidos desde cerdos un 27% amplificaron el gen *tetA* y un 60% al gen *tetB*. En las cepas de *E. coli* resistentes a éste fármaco, aisladas de aves, un 33% presentó el gen *tetA* y un 38% el gen *tetB*; en los aislados de cerdos el 86% presentó el gen *tetB*. En relación a las cepas resistentes a estreptomycinina nosotros identificamos el gen *aadI* en el 33% de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de aves y en el 100% de los aislados de cerdos como también en el 100% de las cepas de *E. coli* aisladas de aves, mientras que el 95% de los aislados de cerdos presentaron este gen. Para el caso de las cepas resistentes a sulfametoxazol+trimetoprim nosotros identificamos sólo cepas positivas al gen *dhfrI*; en el 100% de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de cerdos y en las cepas de *E. coli* aisladas de aves y de cerdos. Para la caracterización molecular de la resistencia a eritromicina, el gen más prevalente fue *ermB*, ya que más del 80% de las cepas de *Enterococcus* spp. resistentes aisladas tanto de aves como de cerdos presentaron este gen. Con respecto a los determinantes de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas, en nuestras cepas tanto los aislados de *Salmonella* spp. como los de *E. coli* de ambas poblaciones animales, la resistencia se asoció principalmente a la presencia de mutaciones en los codones 81, 83 y 87 de la región QRDR del gen *gyrA* que codifica para la girasa.

Los integrones se han asociado a multirresistencia y a transferencia de genes de resistencia en forma horizontal en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Al respecto, se identificaron en los aislados la presencia de los genes de integrasas *intI1* e *intI2*. Ninguna cepa de *Salmonella* spp. aislada de aves fue positiva a los genes de integrasas, mientras que en los aislados de cerdos el 39% fue positivo a alguno de estos genes. En las cepas de *E. coli* aisladas de aves un 25% amplificaron *intI1* o *intI2*, los aislados obtenidos de cerdos presentaron una mayor portación de genes de integrasas con un 69% de cepas positivas. Por otro lado, se realizaron ensayos de conjugación para observar si los determinantes de resistencia podrían ser transferidos a cepas receptoras *E. coli* J53Az^r, encontrando que 5 cepas fueron capaces de transferir sus determinantes de resistencia por conjugación.

Los resultados de este estudio entregan información actualizada de la situación de la resistencia bacteriana en cepas indicadoras y zoonóticas aisladas de dos especies animales productoras de alimento de alto consumo en nuestro país. El uso de antimicrobianos en las distintas producciones podría establecer las diferencias observadas en los patrones de resistencia encontrados. Finalmente se puede señalar que los datos presentados en este trabajo podrían servir de base para promover el desarrollo de un programa de monitoreo de la resistencia en medicina veterinaria.