

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN  
ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE UN EJEMPLAR DE LEÓN MARINO  
(*OTARIA BYRONIA*) PROVENIENTE DE ISLA DE LOBOS - URUGUAY”**

por:

**AMANDA NATASHA ELIOPULOS NAYA**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinaria  
Orientación: Inspección y tecnología  
de los alimentos de origen animal

MODALIDAD: Estudio de caso

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2018**

## **PÁGINA DE APROBACIÓN**

**Tesis de grado aprobada por:**

**Presidente de mesa:**

---

**DMTV. MSc.PhD. Alicia Dib**

**Segundo miembro (Tutor):**

---

**Lic. MSc. Leticia Diana**

**Tercer miembro:**

---

**DCV MSc Alejandro Perretta**

**Cuarto miembro:**

---

**DMTV MSc PhD Nadia Crosignani**

**Quinto miembro:**

---

**Dr. Martín Lima**

**Sexto miembro:**

---

**Lic. MSc. Enrique Páez**

**Fecha:**

---

**Autor:**

---

**Amanda Natasha Eliopulos Naya**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora Leticia Diana por su apoyo, generosidad y compromiso. Gracias Lety, sin vos esta tesis no hubiese sido posible, sos una gran docente y fue un placer trabajar contigo.

A mi cotutora Nadia Crosignani, por sus consejos, su compromiso hacia mi formación y por su tiempo.

A mis cotutores Enrique Paez y Martin Lima por brindarme la posibilidad de trabajar con estas especies a las que amo profundamente.

A todos los integrantes del departamento de microbiología, por hacerme sentir como una más del equipo, compartir sus conocimientos y ayudarme siempre que lo necesite. Son un grupo humano precioso.

A mi compañera y amiga Gimena Feijóo, quien dedicó de su tiempo para leer y aportar a la redacción de esta tesis. Gracias Gi!

A todos los compañeros docentes y funcionarios de Facultad de Veterinaria quienes de una manera de o de otra aportaron a mi formación.

A mi querida Facultad de Veterinaria que me brindó la posibilidad de crecer, trabajar y formarme. Tantos años, tanta vida entre estos muros y este bello parque, aprendiendo en lo académico, lo humano, lo gremial... Gracias por tanto.

A mi madre por ser mi compañera, ejemplo de lucha y superación, no te lo digo seguido mamá pero me siento muy orgullosa de ti. Gracias!

A Jacinto por ser el mejor Tata del mundo, gracias por tu apoyo y tu cariño Jas.

A mis queridos hermanos, en especial a Kimon, por siempre ser mi referente, mi guía, mi gran maestro, te adoro hermano.

A mi toda mi familia por su amor y contención, en especial a mis sobrinos amados Uli, Jordi, Mile, Miquel, Lari, Pipe y Emma; y a mi suegro Eduardo por su apoyo y consejos.

A mi hermosa familia de amigos, los de antes, los de siempre y los de ahora. Gracias por las risas y los buenos momentos compartidos y por la contención y el apoyo en los no tan buenos. Gracias por formar parte. Me siento muy afortunada de tenerlos.

A mis hermosas hijas Zoe y Noa, por mostrarme donde está lo verdaderamente importante en la vida. Por disculpar mis ausencias y esperarme siempre con alegría. Gracias hijitas por los eternos abrazos, los besos, los dibujos, las cartitas, las pulseritas y sobre todo gracias por esas miradas que llenan de amor el alma y te hacen querer ser mejor persona.

Y el agradecimiento más especial se lo quiero hacer al mejor docente e investigador que he conocido, del que me siento muy orgullosa y que siempre ha sido mi inspiración por su compromiso, generosidad y sencillez. Mi compañero y el amor de mi vida, Rodrigo. Gracias amor por tantos años, gracias por tu apoyo y por crecer juntos. Muchas cosas buenas tengo que agradecerle a nuestra facultad, pero sin duda la mejor de todas fue el haberte encontrado. Te amo y quiero dedicarte a ti y a nuestras hijas este trabajo.

“El mar es el gran unificador para el hombre. Todos estamos en el mismo barco”  
Jacques Costeau

## Tabla de contenido

1.	LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	8
1.1.	Figuras.....	8
1.2.	Tablas.....	9
2.	RESUMEN.....	10
3.	SUMMARY .....	11
4.	INTRODUCCIÓN.....	12
5.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	15
5.1	HISTORIA DE LAS RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS .....	15
5.2	RESISTENCIA A ANIMICROBIANOS EN MEDICINA VETERINARIA.....	15
5.3	MECANISMOS DE RESISTENCIA: EL ROL DE LOS PLÁSMIDOS .....	17
5.4	RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS EN EL MEDIO AMBIENTE .....	18
5.5	EL ROL DE LAS ESPECIES SILVESTRES EN LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	21
5.6	EL LEÓN MARINO SUDAMERICANO ( <i>Otaria byronia</i> ).....	22
5.6	FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE .....	23
5.7	EL CONCEPTO DE UNA SOLA SALUD EN LA RAM .....	24
6.	OBJETIVOS .....	25
6.1	OBJETIVO GENERAL .....	25
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1	TOMA DE MUESTRAS.....	26
7.2	CULTIVO Y AISLAMIENTO BACTERIANO.....	26
7.3	IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS 28	
7.4	EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO.....	29
7.5	IDENTIFICACIÓN POR PCR DEL ARNr 16S Y SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLICONES.....	29
7.6	IDENTIFICACIÓN DE CEPAS EN BASE DE DATOS.....	30
7.7	DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS .....	31
8.	RESULTADOS.....	32
8.1	MUESTREO Y COLONIAS BACTERIANAS AISLADAS .....	32

8.2 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADAS.....	34
8.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS POR SECUENCIACIÓN DEL ARNr 16S.....	36
8.4 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS .....	37
9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	40
10. BIBLIOGRAFÍA .....	43

## 1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

### 1.1. Figuras

Fig. 1. Ejemplo de aislamiento obtenido en las muestras del león marino sembrada en placas de Agar TSA y luego de incubarla durante 24hs a 37°C ..... Página 32

Fig. 2. Ejemplo de aislamientos obtenidos a partir de bacilos Gram negativos de las muestras del león marino sembradas en placas de Agar Mac Conkey (Fig. 2A) y XLD (Fig. 2B), luego de incubarlas durante 24hs a 37°C.....Página 34

Fig. 3. Ejemplo de pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos de cepas Gram negativas obtenidas a partir de la muestra del león marino.....Página 34

Fig. 4. Ejemplos de resultados de las distintas pruebas bioquímicas realizadas. A: Citrato; B: SIM; C: TSIA; D: IMViC y E: Azul de bromotimol..... Página 35

Fig. 5. Corrida electroforética de la PCR del ARNr 16S de cepas aisladas utilizando los primers 63F y 907R (amplicón = 844pb). Carril 1: PM (100 pb), Carril 2: muestra negativa, Carriles 3 a 6: muestras positivas L1, L2, L3 y L5 respectivamente, Carril 7: control negativo.....Página 36

Fig. 6. Secuenciación nucleotídica del fragmento de 844pb que permitió la identificación molecular de los aislamientos en las muestras del león marino. ....Página 37

Fig. 7. Resultados de los antibiogramas realizados a los aislamientos luego de 24hs de incubación a 37 °C.....Página 39



## 1.2. Tablas

Tabla 1. Muestras obtenidas y características de las colonias aisladas luego de la siembra en medio TSA durante 24hs a 37°C..... Página 33

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas sobre los cinco aislamientos..... Página 35

Tabla 3. Resultados de los antibiogramas realizados a los aislamientos.....Página 38

## 2. RESUMEN

Este trabajo consistió en el aislamiento, identificación y determinación de resistencia a antimicrobianos de cepas de Enterobacterias, que partieron de muestras de necropsia de un ejemplar juvenil de León marino (*Otaria byronia*) proveniente de Isla de Lobos, Uruguay. Se tomaron hisopados de laringe, esófago, tráquea, duodeno y vejiga. De un total de cinco cepas Gram negativas aisladas, se identificaron dos especies bacterianas correspondiendo a *Escherichia ferrusoni* y a *Proteus mirabilis*. Este es el primer reporte de *Escherichia ferrusoni* en *Otaria byronia* hasta la fecha. Todos los aislamientos expresaron fenotipo de resistencia a Amoxicilina/clavulámico, Sulfa-trimetoprim, Tetraciclina, Doxiciclina y Estreptomicina, tres de las cinco cepas aisladas mostraron resistencia contra Ciprofloxacina y dos contra Enrofloxacina y Cefovecina. Estos resultados brindan información básica sobre la presencia cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos en mamíferos marinos, siendo el primer reporte de este tipo para nuestro país.

### 3. SUMMARY

This work consisted in the isolation, identification and determination of antimicrobial resistance of strains of Enterobacteria, based on necropsy samples of a juvenile specimen of Sea Lion (*Otaria byronia*) from Isla de Lobos, Uruguay. Swabs of larynx, esophagus, trachea, duodenum and bladder were taken. From a total of five isolated Gram negative strains, two bacterial species corresponding to *Escherichia ferrusonii* and *Proteus mirabilis* were identified. This is the first report of *Escherichia ferrusonii* in *Otaria byronia* to date. All the isolates expressed resistance phenotype to Amoxicillin / clavulamic, Sulfa-trimethoprim, Tetracycline, Doxycycline and Streptomycin, three of the five strains isolated showed resistance against Ciprofloxacin and two against Enrofloxacin and Cefovecin. These results provide basic information on the presence of bacterial strains resistant to antimicrobials in marine mammals, this one being the first report of this type for our country.

#### 4. INTRODUCCIÓN

La creciente resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema apremiante que de no combatirse a tiempo puede comprometer la salud de las generaciones futuras, con un retorno a la era preantibiótica (Camou y col., 2017). En el año 1980 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la RAM como un tema prioritario a nivel mundial y desde entonces el número de cepas multirresistentes identificadas ha ido en continuo aumento (Ahasana y col., 2017). Esta situación es el resultado del uso excesivo de antimicrobianos (ATM) en entornos clínicos y es una preocupación para la salud de humanos y animales, ya que limita el tratamiento de enfermedades infecciosas y otras patologías (Courtney y col., 2013). En este contexto, el estudio de las diferentes familias bacterianas resistentes se vuelve imprescindible para elaborar estrategias de mitigación a la problemática ambiental de la resistencia. La familia *Enterobacteriaceae* incluye especies que han sido y son intensamente estudiadas por su abundancia y la capacidad de intercambiar material genético, incluidos los genes que codifican la RAM. Estas bacterias generalmente se presentan como flora intestinal comensal en animales terrestres y humanos (Bonelli y col., 2014) así como en animales marinos entre los que se destacan reptiles (Ahasan y col., 2017), aves, mamíferos (Wallece y col., 2013) y peces (Lee y col., 2018; Wu y col., 2018). Varios autores señalan el potencial patógeno de distintos géneros de enterobacterias, destacando de manera habitual la implicancia de las mismas en infecciones graves y potencialmente mortales para humanos y animales, como gastroenteritis aguda, infecciones urinarias e infecciones del tracto respiratorio (Kresken y col., 2016; Najjuka y col., 2016; Wright, 2010). Por lo antes mencionado actualmente distintos géneros de enterobacterias se consideran un problema de salud pública a nivel mundial (Fariñas y Martínez-Martínez, 2013), existiendo estudios que resaltan la incipiente resistencia a prácticamente todos los fármacos disponibles contra estas y otras bacterias Gram negativas, hecho que recuerda a la era pre-antibiótica (CDC 2013; Golkar y col., 2014). Existe una marcada relación entre los residuos de antibióticos en ecosistemas y el aumento de bacterias resistentes a ellos en el medio ambiente. Sin embargo en la actualidad la información es insuficiente para llegar a una conclusión definitiva sobre la importancia y el impacto de la presencia de estas bacterias, que

permita la evaluación de los riesgos potenciales en los ecosistemas y la salud humana.

Recientes investigaciones han detectado la presencia de genes de RAM en las aguas de las costas uruguayas como resultado de las actividades humanas (PhD Gregorio Iraola, Comunicación personal). Esto sugiere que animales acuáticos como peces, mamíferos y reptiles de nuestro país, tienen el potencial de albergar en su flora residente bacterias resistentes a antimicrobianos. A nivel internacional existen estudios que involucran a varios mamíferos y reptiles marinos en esta situación (Foti y col., 2009; Wallace y col., 2011; 2013). Los ambientes acuáticos pueden contaminarse a partir de una gran variedad de fuentes entre las que se incluyen la filtración superficial urbana y las descargas de efluentes en las costas (Goñi-Urriza y col., 2000), siendo las fuentes antropogénicas de contaminación la hipótesis principal de la causa de la RAM en la microbiota marina (Martinez, 2008; Allen y col., 2010). En este contexto la Isla de Lobos, que se encuentra situada a 8 km de la costa frente al balneario Punta del Este en el departamento de Maldonado, es un ecosistema susceptible si tenemos presente su cercanía a la costa y la densidad poblacional del balneario sobre todo en los meses cálidos. La Isla presenta un ecosistema en el que conviven diversas especies de animales marinos entre los que encontramos reptiles, aves y mamíferos, siendo más representativos de estos últimos dos especies de Pinnípedos: los leones marinos del sur (*Otaria byronia*) y los lobos finos sudamericanos (*Arctocephalus australis*). Estas dos especies cohabitan constituyendo la concentración focal más importante de Pinnípedos en América del Sur con una estimación de 400.000 ejemplares (Ponce de León y Pin, 2006).

De la información antes mencionada surge la necesidad de evaluar los niveles de contaminación y la posible evidencia de RAM en flora de animales silvestres y el papel potencial de la megafauna marina como reservorio de resistencia (Koenig y col., 2011), pudiendo estos estudios ampliar la comprensión de la salud ambiental de los océanos y su implicancia en la salud humana (Wallace y col., 2013). En este sentido los leones marinos poseen varias características que los hacen un buen indicador biológico para representar la salud ambiental, tanto por sus hábitos de alimentación costera, su período de vida extenso y la alta fidelidad por el sitio donde habitan, estando expuestos a factores antropogénicos costeros que los convierte en candidatos a reservorio de enterobacterias portadoras de RAM de origen antropógeno. En el mes de abril de 2010 la Organización de las Naciones

Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), publican conjuntamente una nota conceptual que describe su colaboración tripartita para la prevención y el control de los riesgos sanitarios en la interfaz hombre-animal-medio ambiente, en lo que se conoce como el concepto de “*Una Sola Salud*”. A raíz de ésta, y desde el año 2011, las tres organizaciones se han fijado tres campos de acción prioritarios, uno de los cuales es la lucha contra la RAM. En este contexto estudios referidos a la detección de RAM en animales silvestres son necesarios, ya que estos animales pueden participar tanto como reservorios de flora bacteriana multirresistente así como bioindicadores del *status* sanitario medioambiental (Sayah y col., 2005; Dolejska y col., 2007; Sousa y col., 2014; Bonnedahl y Järhult, 2014).

## **5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **5.1 HISTORIA DE LAS RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS**

El descubrimiento de los ATM se ha considerado desde el punto de vista sanitario uno de los avances más importantes en la historia de la humanidad, al reducir la mortalidad infantil en muchas partes del mundo, salvar a millones de personas e incrementar la esperanza de vida (Blair y col., 2015; Hansen y col., 2015). No obstante, en los últimos 70 años el consumo desmesurado y/o indebido de estas herramientas farmacológicas por parte de la población (Sengupta y col., 2013; Hansen y col., 2015) ha originado una era de abusos que se ha visto reflejada en la reducción o pérdida de eficacia de los compuestos (CDC 2013; Sengupta y col., 2013). De este modo, se ha favorecido el mantenimiento e incluso la aparición de enfermedades cuyos agentes causales han dejado de ser sensibles a la terapéutica convencional (Sengupta y col., 2013). Esto ha promovido la búsqueda incesante de nuevas sustancias, algo cada vez más complejo y preocupante (Sengupta y col., 2013). De hecho, en la actualidad no existe ninguna familia de ATM que se encuentre libre del fenómeno de resistencia (Levy y Marshall, 2004; Sousa y col., 2014). Los estudios epidemiológicos han demostrado que hay una relación directa entre el consumo de antimicrobianos, la aparición de RAM y la diseminación de cepas resistentes (CDC 2013).

### **5.2 RESISTENCIA A ANIMICROBIANOS EN MEDICINA VETERINARIA**

La RAM no es solo un problema asociado a la salud pública. En sanidad animal, es bien conocido el amplio uso de los ATM ya sea en profilaxis, tratamiento de enfermedades o como promotores del crecimiento animal (PCA) (Marshall y Levy, 2011; García-Álvarez y col., 2012; Allen y Stanton, 2014). Anualmente en Estados Unidos alrededor de  $7 \times 10^6$  Kg de ATM son administrados como PCA en ganadería (Golkar y col., 2014). En la Unión Europea el escenario es muy diferente siendo Suecia el primer país en prohibir el uso de estos fármacos como PCA. Años más tarde y debido a los continuos hallazgos de cepas multirresistentes no sólo en

personas, sino también en los productos de origen animal destinados para consumo humano, otros países como Dinamarca o Reino Unido le siguieron con la misma prohibición (Cogliani y col., 2011). El problema de las RAM asociadas al elevado uso de los ATM con distintos fines en ganadería (García-Álvarez y col., 2012), tiene un doble impacto negativo. El primero de estos está relacionado con la cadena alimenticia (Levy y Marshall, 2004; Barton, 2014; Colobatiu y col., 2015) y se fundamenta en que el ser humano es capaz de incorporar las bacterias y/o genes de resistencia presentes en los animales de granja que consume (cerdos, aves, ganado vacuno, etc) (Wright, 2010; Barton, 2014). Este hecho determina el pasaje y la incorporación de estas resistencias a su microbiota intestinal, favoreciendo de esta forma el desarrollo de RAM incluso entre las bacterias comensales que habitualmente no son causa de infección (Golkar y col., 2014; Radhouani y col., 2014), pero que pueden actuar como un potente reservorio de RAM (Allen y Stanton, 2014). El segundo impacto está relacionado con la potencial alteración que sufren las comunidades microbianas del medio ambiente (Bartlett y col., 2013; Allen y Stanton, 2014). Estudios detallan que el 90% de los ATM empleados en la ganadería son diseminados al medio ambiente a través de la orina y las heces (Allen y Stanton, 2014), por lo que la presencia de dichos compuestos o sus metabolitos en el ambiente pueden favorecer la presión selectiva de las cepas resistentes en el entorno (Sayah y col., 2005). Esta diseminación contamina el suelo y el agua (superficial y subterránea), que posteriormente es utilizada en el riego de frutas y verduras las cuales además, en algunos sistemas productivos, pueden ser abonadas con las mismas excretas (Bartlett y col., 2013; Sousa y col., 2014). En el ámbito local, en el año 2011 el gobierno uruguayo emitió un decreto presidencial (N° 98/011) que estableció la prohibición del uso de ATM en la alimentación como PCA tanto en ovinos como en bovinos, no existiendo hasta la fecha reglamentaciones para otros tipos de producciones animales como la porcina, avícola o piscícola. Un dato relevante que merece destacarse cuando se habla de RAM en Medicina Veterinaria es que la mayoría de los ATM que se emplean en la práctica veterinaria comparten su uso con la clínica médica humana y en particular, algunos de los ATM que se utilizan en salud animal son aquellos que se preservan para los casos más difíciles de la clínica humana por lo que la generación de resistencia contra estos, implica serios riesgos a la salud pública (Camou y col., 2017). La preocupación en cuanto a la generación de RAM se ha traducido también en otras resoluciones



relativamente recientes que procuran regular y controlar el mal uso de los antimicrobianos, responsabilizando a los profesionales veterinarios por su correcta prescripción (DGSG, N° 193A/015, 2015).

### **5.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA: EL ROL DE LOS PLÁSMIDOS**

Las bacterias, que fueron las primeras formas de vida en el planeta, poseen extraordinarios recursos de adaptación y supervivencia que han ido adaptando y modulando durante su proceso evolutivo tal como lo describió Darwin en su teoría sobre la evolución de las especies. En este sentido la resistencia es un proceso natural conservado evolutivamente habiéndose detectado RAM en bacterias presentes en cuevas subterráneas que han estado geológicamente aisladas de la superficie del planeta por más de 4 millones de años (BhullarK y col., 2012). Para comprender el comportamiento de las cepas bacterianas con RAM, resulta fundamental conocer los mecanismos por los cuales estas bacterias poseen estas características. En este sentido se diferencian resistencias intrínsecas y resistencias adquiridas (Blair y col., 2015). Distintas especies bacterianas pueden presentar en su genoma de forma inherente determinadas particularidades estructurales y/o funcionales que les confiere resistencia a antimicrobianos, esto se conoce como resistencia intrínseca. En otras especies estas particularidades no están presentes, lo que determina que dichas bacterias sean susceptibles a distintas familias de ATM pudiendo, una vez que son expuestas a los mismos, producirse dos eventos diferentes: la eliminación de la bacteria por acción del ATM o el desarrollo la resistencia por parte del microorganismo. A esto último se lo describe como resistencia adquirida (Blair y col., 2015). Dos son los mecanismos principales para la adquisición de resistencia adquirida, uno de ellos hace referencia a mutaciones espontáneas que originan modificaciones en la síntesis proteica y metabolismo bacteriano, lo cual determina modificaciones estructurales de proteínas diana del fármaco o creación de bombas de eflujo que expulsan el fármaco y el otro involucra la adquisición de elementos génicos móviles como plásmidos, transposones e integrones (Levy y Marshall, 2004; Allen y Stanton, 2014; Blair y col., 2015). Precisamente, son los elementos móviles los que permiten la rápida adaptación de las bacterias a los nuevos antimicrobianos, así como la transferencia de los genes

de resistencia, especialmente a dosis subinhibitorias o subterapéuticas (Allen y Stanton, 2014). De entre los elementos génicos móviles, los genes de resistencia a antimicrobianos asociados a plásmidos poseen una mayor relevancia epidemiológica, médica y práctica, gracias a la habilidad que poseen para transferirse entre las comunidades microbianas (Dantas y Sommer, 2014; Ramírez y col., 2014). Estos elementos se extienden sin fronteras a través de la diversidad de poblaciones bacterianas y en distintos ambientes (Argemi y col., 2005) y la información contenida en ellos es utilizada por los microorganismos para optimizar su adaptación al ambiente que los rodea (Camou y col., 2017). Se ha comprobado que los plásmidos hallados en especies bacterianas patógenas, previas a la era pre-antibiótica, no poseen genes de resistencia. Por lo que el uso abusivo e indebido de los mismos, ha propiciado su rápido surgimiento como principales vectores de genes de resistencia (Wright, 2010; Sousa y col., 2014). La presencia de dichos genes de resistencia no resulta esencial para la supervivencia de las bacterias en condiciones fisiológicas, pero sí lo son cuando éstas tienen que sobrevivir bajo determinadas condiciones adversas, como por ejemplo, ante la presencia de un ATM (Schwarz y col., 2014). Los plásmidos no sólo portan genes de resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos, sino que pueden incorporar de forma simultánea ciertos factores de virulencia (Ramírez y col., 2014) y otros grupos de genes que le proporcionan resistencia a desinfectantes, biocidas e incluso a metales (Ramírez y col., 2014; Schwarz y col., 2014; Levy y Marshall, 2004), lo que le confiere al microorganismo una ventaja adaptativa sobre el resto de la microbiota.

#### **5.4 RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS EN EL MEDIO AMBIENTE**

Desde el comienzo de la era antibiótica con Flemming en 1928, los ATM han sido considerados la familia más exitosa de fármacos desarrollados para la mejora de la salud humana y animal (Ayokunle y Ahmad, 2013), pero su mal uso en medicina humana y veterinaria, así como en la agricultura, ha dado lugar a fuertes presiones de selección sobre las comunidades de bacterias ambientales y a la difusión de RAM en diferentes ecosistemas (Acevedo y Severiche, 2015). Esta situación sin duda pone en riesgo la salud de los seres vivos, razón por la que en la actualidad son considerados contaminantes emergentes y amenazas potenciales

para ecosistemas naturales, aunque poco se conoce sobre los efectos globales de estos fármacos en la dinámica poblacional de las bacterias presentes en dichos ecosistemas (Mostafa y col., 2011). El desconocimiento actual en este sentido fue debido a que la mayoría de la información reportada referente a RAM estuvo hasta hace algunos años dirigida principalmente a entornos clínicos y productivos (Graham y col. 2011). Pero el aumento de infecciones adquiridas en la comunidad debido a bacterias resistentes está despertando una mayor atención en los reservorios de RAM en ambientes naturales (Martínez y col., 2008; Gibson y col., 2015) y ha llevado a la comunidad científica a interesarse por el estudio sobre el mal uso de ATM y a la identificación de cómo sus propiedades fisicoquímicas y toxicológicas pueden llegar a producir graves efectos en los ecosistemas (Ayokunle y Ahmad, 2013). En este contexto actualmente a nivel mundial se investiga intensamente sobre el rol de la contaminación ambiental y la selección de resistencia, encontrándose que la presencia de bacterias resistentes es directamente proporcional al grado de intervención antropogénica en cada nicho ecológico (Camou y col., 2017). Aparentemente, esta realidad no solo es debida al vertido de antibióticos y sus metabolitos al ambiente, lo cual podría ejercer presión selectiva para la proliferación de cepas resistentes, sino también se debe a la contaminación de los distintos ambientes con metales pesados (Baker-Austin y col., 2006). Muchas bacterias del suelo poseen bombas de eflujo, desarrolladas para excluir moléculas nocivas, que indistintamente pueden ser metales o antibióticos y se presume que las bacterias que poseen ese mecanismo tendrían ventajas para sobrevivir en esos ambientes fuertemente contaminados (Camou y col., 2017). A su vez, las bacterias del suelo constituyen un reservorio de genes de resistencia que fácilmente pueden transmitirse a otras especies, eventualmente patógenas para el hombre. Un ejemplo bien documentado de esto fue la transferencia de las betalactamasas tipo CTX-M desde una especie saprófita, *Kluyvera ascorbata*, a enterobacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, las que ulteriormente se diseminaron por centros hospitalarios de todo el mundo (Humeniuk y col., 2002).

Esta dispersión de ATM, metabolitos y metales pesados entre los ambientes ha llevado a alteraciones en la estructura de la comunidad microbiana, ya que estos resultan ser perjudiciales para pocas especies sensibles (Ferrer y col., 2017). Lo que también conduce a impactos a largo plazo como la evolución de los genes RAM y el

subsiguiente aumento en las especies de bacterias resistentes a múltiples fármacos (Laxminarayan y col., 2016).

Entre los variados nichos ecológicos, uno que había recibido muy escasa atención hasta la última década fueron los ambientes marinos, ya que los océanos fueron considerados dentro de la categoría de sistemas diluidos. Esta apreciación de los océanos predecía que los mismos no tendrían un papel trascendente dentro de la generación y difusión de la RAM, ya que los metabolitos y residuos de ATM en estos ambientes tienen la oportunidad de difundir rápidamente fuera del sitio donde se originan (An y col., 2002). Estudios posteriores demostraron que esta teoría no era correcta y por lo contrario se observó que los microbiomas oceánicos son potencialmente un recurso grande y versátil de RAM y de genes portadores de resistencia (Martínez y col., 2008). Los investigadores han propuesto que hay tres posibles mecanismos que juegan un papel clave en la aparición de genes de RAM en entornos marinos. El primero incluye microorganismos resistentes provenientes de fuentes terrestres durante los ciclos intermareales, el segundo mecanismo propone la adquisición de RAM por bacterias debido al efecto de escurrimiento de antimicrobianos antropogénicos, lo que supone una presión selectiva sobre las bacterias del núcleo en los sitios afectados para volverse resistente a los antibióticos; y el tercero incluye el proceso natural de resistencia y selección debido a la producción de antibióticos por especies bacterianas propias de ambientes marinos como medida de control hacia otros microorganismos (interacciones microbianas antagónicas) (Chacón y Harcombe, 2016). Los ATM se han extendido ampliamente en los ambientes, lo que impone un profundo estrés y presión de selección sobre los microorganismos residentes y en este contexto los microbiomas marinos son grandes reservorios bien establecidos de residuos de antibióticos y sus correspondientes genes de resistencia (Nathani y col., 2019). El aumento mundial de las bacterias resistentes a los antibióticos en el medio ambiente hace que sea imperativo la vigilancia de la presencia y distribución de las bacterias y de genes de resistencia; procedentes de la clínica al medio ambiente, problemática que no se limita a las aguas superficiales sino también a las aguas subterráneas, donde también se han aislado bacterias multirresistentes (Wright 2010; Graham y col., 2011). Por esta razón, se debe profundizar en el conocimiento sobre la ocurrencia de eventos, así como el destino y el transporte de ATM y sus metabolitos en los ecosistemas acuáticos, para comprender la relación existente entre los residuos de

ATM después de su excreción, sus metabolitos, las poblaciones de bacterias resistentes a ellos y su implicancia en la salud humana (Peng y col., 2013).

## **5.5 EL ROL DE LAS ESPECIES SILVESTRES EN LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

Si bien, la presencia y consecuencias de las resistencias a ATM están siendo ampliamente estudiadas en el ser humano y en los animales domésticos y productivos, en las últimas décadas ha existido un gran vacío de conocimiento de sus efectos sobre el medio ambiente y muy especialmente sobre la fauna silvestre (Livermore y col., 2001). Estos animales se ven expuestos a los microorganismos resistentes o a los elementos génicos que les confieren la resistencia, principalmente a través del alimento y el agua contaminada (Kozak y col., 2009; Guenther y col., 2010; Radhouani y col., 2014). Varios estudios demuestran que la frecuencia de aislamiento de bacterias resistentes a ATM son mayores en los animales que habitan en zonas próximas al hombre o en zonas agrícolas, que aquellos que viven en regiones más aisladas o vírgenes (Kozak y col., 2009). No obstante, también se han aislado cepas de *E. coli* resistentes en aves del Ártico y de la tundra siberiana (Sjölund y col., 2008). A pesar de estos hallazgos, los investigadores sostienen que el origen de las resistencias a ATM en fauna silvestre es principalmente antropogénico (Radhouani y col., 2014; Sousa y col., 2014), existiendo una correlación entre los niveles de resistencias que éstos pueden presentar y el nivel de contacto que establecen con el hombre (Guenther y col., 2010; Radhouani y col., 2014; Sousa y col., 2014). En este sentido, se han publicado estudios basados en el cultivo y aislamiento de cepas patógenas zoonóticas, como *Enterococcus sp.*, *Salmonella sp.* y *E. coli* compartidas entre humanos, animales de granja (cerdos, aves de corral y vacas) (Dolejska y col., 2007) y especies silvestres (Radhouani y col., 2014; Sjölund y col., 2008). Estas últimas, sobre todo aquellas que tienen una estrecha relación con el hombre y el ganado, cuando entran en contacto con cepas resistentes a ATM o con los elementos génicos, no sólo se infectan, sino que también pueden convertirse en reservorios de estas cepas resistentes y en vectores de las mismas e incluso pueden ser consideradas organismos bioindicadores de contaminación microbiológica de origen antrópico (Dolejska y col., 2007; Bonnedahl

y Järhult, 2014; Sousa y col., 2014). De esta manera, especies silvestres pueden emplearse como indicadores del grado de antropización de los distintos ambientes (Bonnedahl y Järhult, 2014). Por lo que disponer de un buen conocimiento de la relación entre hombres, animales domésticos y fauna silvestre, es necesario y valioso, pues nos permite adquirir una mejor comprensión de la problemática existente, así como de la dinámica que siguen las cepas resistentes en nuestro medio ambiente.

## **5.6 EL LEÓN MARINO SUDAMERICANO (*Otaria byronia*)**

El león marino sudamericano, *Otaria byronia* (de Blainville, 1820) es una de las 5 especies pertenecientes a la subfamilia Otariinae (familia Otariidae). Es un mamífero pinnípedo que se encuentra a lo largo de las costas e islas de América del Sur (Berta y Churchill 2012). La población uruguaya de leones marinos sudamericanos es de aproximadamente 12.000 animales. y está disminuyendo anualmente en un 2% (Páez, comunicación personal). En la costa uruguaya *Otaria byronia* convive con otro pinnípedo, el lobo marino del Sur o lobo fino (*Arctocephalus australis*). Ambas especies tienen un sistema reproductivo poligínico, donde los machos luchan para defender sus sitios y establecer harenes de varias hembras. Durante la temporada de reproducción los machos adultos de *O. byronia* comienzan a llegar a las colonias desplazando a los machos menos activos o inmaduros, luego las hembras grávidas llegan y establecen sus territorios en estas zonas reproductoras (Campagna, 1985). En lo que refiera a sus hábitos alimenticios, esta es una especie típicamente piscívora (Crespo y col., 1997; Vaz-Ferreira, 1982), que ocasionalmente incluye cangrejos, moluscos cefalópodos y gasterópodos a su dieta (Hückstädt y Antezana, 2006; Hückstädt y col., 2007; De la Torre y col., 2010). Una característica de esta especie son sus hábitos de alimentación oportunista de acuerdo a la disponibilidad de alimento en el área donde habita, la misma a hecho que el león marino haya aprendido a seguir los barcos de pesca y a interactuar frecuentemente con las pesquerías costeras por presa peces enredados en las artes de pesca (Szteren, 2002) por lo que existe interacción de esta especie con la pesca artesanal (Sterner, 2002), siendo frecuente también el avistamiento de ejemplares cercanos a las costas y centros poblados.

## 5.6 FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

La familia *Enterobacteriaceae* está conformada por bacilos Gram negativos que tienen como hábitat el suelo, cuerpos de agua y el intestino de una amplia variedad de animales terrestres y marinos (Brenner y col., 2004). Esta familia pertenece al orden XIII Enterobacteriales conformada por 41 géneros y más de 100 especies (Quinn y col, 2002), de las cuales menos de la mitad tienen interés desde el punto de vista veterinario (Stanchi, 2007). Estos microorganismos comparten semejanzas en cuanto a su morfología y caracteres tintoriales: son bacilos pleomórficos Gram negativos de un tamaño de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  por 0,4 a 0,6  $\mu\text{m}$ , catalasa positivos, oxidasa negativo y carecen de citocromo c, lo cual es una propiedad bioquímica útil en el diagnóstico de la familia (Biberstein y Chung Zee, 1990; Stanchi, 2007). Esta familia incluye géneros de gran importancia a nivel epidemiológico como son *Escherichia coli*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Serratia sp.*, *Proteus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Yersinia sp.*, *Morganella sp.*, y *Arizona sp.* entre otras (Jawetz y col., 2005). Dentro de las características de este grupo merece la pena resaltar su capacidad de sobrevivir en condiciones de anaerobiosis (anaerobios facultativos) durante las cuales su crecimiento depende de que en el medio existan carbohidratos como fuente de carbono; mientras que en aerobiosis, la gama de sustratos apropiados para el crecimiento de estos microorganismos incluye ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos (Biberstein y Chung Zee, 1990). Las Enterobacterias pueden comportarse como apatógenas, patógenas oportunistas y patógenas importantes. Las primeras, pueden encontrarse como contaminantes de muestras clínicas, siendo aisladas del ambiente y/o materia fecal, como es el caso de *Hafnia alvei*; las enterobacterias patógenas oportunistas ocasionalmente producen enfermedad a nivel del tracto digestivo, mientras que las patógenas importantes pueden causar daños entéricos y sistémicos, por poseer una estructura antigénica compleja y producir varias toxinas y otros factores de virulencia (Biberstein y Chung Zee, 1990).

## 5.7 EL CONCEPTO DE UNA SOLA SALUD EN LA RAM

El reconocimiento del vínculo entre la salud animal y humana ocurrió a principios del siglo XIX y ha sido promovido por profesionales médicos y veterinarios en los últimos 50 años (Kahn y col., 2008). En este contexto y debido a que los microorganismos resistentes han aumentado dramática y exponencialmente en las últimas décadas, como consecuencia del uso y abuso de ATM, la RAM dejó de ser solamente un dilema médico, para convertirse en una amenaza global que requiere para su control, la acción coordinada de muchos y diferentes actores e instituciones. Este aumento exponencial de la RAM no solo compromete el futuro de la salud mundial, sino que afecta también la salud ambiental, la seguridad alimentaria, el desarrollo y la economía de los países (OMS, 2016). Organismos sanitarios internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), entre otras, convocaron a todos los países con el fin de coordinar renovadas estrategias de lucha contra la RAM. Cada País, incluyendo Uruguay, se comprometió en este sentido, a elaborar un plan propio que contemple todos los aspectos de este complejo problema. Los planes nacionales deben ajustarse a lineamientos establecidos en un Plan de Acción Mundial, que con mancomunadas medidas persigue el objetivo de impedir una vuelta a la era pre antibiótica (OMS, 2016). Todas las acciones apuntan a la consideración de “una salud” (“*One health*”), nuevo enfoque que reconoce las interacciones entre la salud humana, animal y ambiental especialmente en relación a la RAM (Camou y col., 2017).



## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Identificar la presencia de enterobacterias resistentes a antimicrobianos de importancia en la salud pública y en medicina veterinaria en un cachorro de *Otaria byronia* proveniente de Isla de lobos - Uruguay.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cultivar, aislar e identificar enterobacterias provenientes de muestras de necropsia de un ejemplar de *Otaria byronia* proveniente de Isla de lobos - Uruguay.
2. Evaluar la presencia de resistencia a agentes antimicrobianos en los microorganismos aislados.
3. Crear un banco de cepas de enterobacterias caracterizadas obtenidas de pinnípedos del Uruguay.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 TOMA DE MUESTRAS**

La toma de muestras se realizó a partir de la necropsia del cadáver de una hembra de león Marino (*Otaria byronia*) de seis meses de edad con 18 horas post mortem. El procedimiento se realizó en el Área Anatomía del Departamento de Morfología y Desarrollo de la Facultad de Veterinaria (Fvet) de la Universidad de la República (UdelaR) y estuvo a cargo del mismo, el Dr. Martín Lima, docente efectivo del área. Durante la necropsia se tomaron muestras únicas de duodeno, vejiga, tráquea y laringe mediante la utilización de hisopos estériles, los cuales posteriormente fueron refrigerados y remitidos al laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias Microbiológicas (Fvet – UdelaR). Los mismos se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su procesamiento dentro de las primeras 24hs de extraídas las muestras.

### **7.2 CULTIVO Y AISLAMIENTO BACTERIANO**

Para realizar el aislamiento bacteriano, cada uno de los hisopos tomados en la necropsia fueron sembrados en Agar tríptico de Soja (TSA) con el objetivo de tener una buena recuperación de las bacterias presentes en los hisopados. El TSA es un medio de uso general ya que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes. Tiene por base una fuente proteica (digeridos trípticos, digeridos proteicos de soja) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales y cloruro sódico. Es un medio recomendado para la detección y recuento de una amplia gama de microorganismos. La aportación de caseína y peptonas de soja al TSA lo convierte en un medio muy nutritivo por el suministro de nitrógeno orgánico, particularmente aminoácidos y péptidos de cadena más larga. La presencia de estas peptonas en el medio permite el cultivo de una gran variedad de gérmenes aerobios y anaerobios que crecen rápidamente. También permite el crecimiento de algunos gérmenes exigentes como *Streptococos*, *Pneumococos*, *Brucella*, *Corinebacterias*, *Erysipelothrix* y *Pasteurella*. Todas las placas de TSA se incubaron a 37°C de 18-24 hs.

Una vez obtenidos los aislamientos en TSA se les realizó a todos ellos tinción de Gram para determinar si eran Gram negativos. Esto permitió posteriormente tomar la decisión en cuanto a la selección de los medios selectivos y diferenciales a utilizar y las pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica.

- Para el cultivo de todos los aislamientos se utilizaron dos medios, el medio Xilosa Lisina Desoxicolato Agar (XLD Agar) y el medio Mac Conkey (McC). Ambos medios son selectivos y diferenciales para bacterias del género *Enterobacterias*. Ambos contienen extracto de levadura como fuente de nutrientes y vitaminas. El XLD utiliza el desoxicolato de sodio como agente selectivo y por consiguiente, inhibe los microorganismos Gram positivos. La xilosa es un azúcar que se incorpora en el medio dado que la fermentan prácticamente todas las *enterobacterias*, excepto *Shigella*, y esta propiedad hace posible la diferenciación de dicha especie. La lisina se incluye para permitir la diferenciación del grupo *Salmonella* de los organismos no patógenos, dado que sin lisina, *Salmonella* fermentaría rápidamente la xilosa y no se distinguiría de las especies no patógenas. Cuando la *Salmonella* agota el suministro de xilosa, la lisina es atacada por la enzima lisina descarboxilasa, lo que genera un cambio a un pH alcalino que imita la reacción de *Shigella*. Para evitar el cambio similar en los organismos coliformes positivos a la lisina, se añaden lactosa y sacarosa para producir ácido en exceso. Para aumentar la capacidad de diferenciación de la fórmula, se incluye un sistema indicador de H<sub>2</sub>S, formado por tiosulfato sódico y citrato férrico amónico, para la visualización del ácido sulfhídrico producido, lo que origina la formación de colonias con centros de color negro. Los organismos no patógenos no productores de H<sub>2</sub>S no descarboxilan la lisina; por tanto, la reacción ácida producida por dichos organismos evita el oscurecimiento de las colonias, lo que sucede sólo con pH alcalino o neutro.
- El McC por su parte contiene sales biliares y cristal violeta que actúan como inhibidores de bacterias Gram positivas. Dentro de los microorganismos entéricos tenemos fermentadores de lactosa y no fermentadores. En este medio los microorganismos fermentadores de lactosa producen colonias rosadas a rojas con o sin precipitado biliar, mientras que los no fermentadores

aparecen como colonias transparentes. La selección de los productos que entran en su composición evitan el “swarming” del *Proteus spp.*

### **7.3 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Una vez obtenidos los aislamientos en los medios de cultivo selectivos y diferenciales se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes que incluyeron:

Triple Azúcar Hierro Agar (TSIA), Sulfhídrico Indol Motilidad (SIM) e Indol - Rojo Metilo – Voges Proskauer y Citrato (IMViC).

La siembra del TSIA se realizó mediante punción central hasta el fondo del tubo y estría en superficie. Este medio permite determinar la capacidad de las bacterias para atacar los hidratos de carbono presentes (glucosa, lactosa y/o sacarosa), con producción o no de gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ ), junto con la producción o no de ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ). La lectura se realizó después de 18 a 24 horas de incubación a  $37^\circ\text{C}$ .

La prueba de SIM permite la diferenciación de microorganismos sobre la base de la producción de sulfuro de hidrógeno, la producción de Indol y la motilidad (presencia de flagelos). Éstas son pruebas diagnósticas útiles en la identificación de *Enterobacteriaceae*, especialmente *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* La siembra se realizó con hilo, por picadura central hasta la mitad del tubo y la lectura se realizó entre las 18 a 24 horas de incubación a  $37^\circ\text{C}$ .

Finalmente la prueba IMViC permite la identificación de las bacterias aisladas según el comportamiento en los compuestos citados. El Indol consiste en conocer si la bacteria es poseedora de la enzima triptofanasa que degrada al triptófano, liberando Indol. Para detectar si una bacteria es capaz de degradar este aminoácido se utiliza un reactivo, el reactivo de Kovac, que reacciona con el Indol formando un compuesto de color rosa intenso. El rojo metilo es una prueba que se realiza para determinar la capacidad de una bacteria de fermentar la glucosa por la vía ácido-mixta, con producción de ácido. Para detectar si se ha producido o no, se utiliza un indicador de pH como el rojo de metilo. La prueba de Voges Proskauer se realiza

para determinar si la bacteria fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Para detectarlo, se utiliza  $\alpha$ -naftol, que es un compuesto que reacciona con un producto intermedio de la fermentación butanodiólica, la acetona, para formar un compuesto color rojizo. Por último, la prueba del Citrato consiste en valorar si la bacteria es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacaes como única fuente de nitrógeno en su metabolismo. Se realiza sembrando en agar citrato de Simons, que contiene citrato de sodio como única fuente de carbono y compuestos amoniacaes como fuente de nitrógeno. El azul de bromotimol es el indicador de pH virando al azul cuando la prueba es positiva.

#### **7.4 EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO**

La extracción del ADN genómico se realizó utilizando el protocolo de extracción de ADN genómico con PBS + Tween 20 al 0.05%. Se partió de 1 mL de un cultivo puro crecido en TSB overnight y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm para obtener un pellet celular. Posteriormente el pellet se lavó con 1 mL de PBS 1X (pH 7.4) y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ L de PBS 1X (pH 7.4) + Tween 20 0.05% y se llevó a ebullición (100°C) durante 10 minutos. Finalmente se centrifugó a 16.000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su utilización en la PCR. La pureza de los extractos se evaluó mediante espectrofotometría utilizando un equipo Nano Drop (Thermo Scientific™).

#### **7.5 IDENTIFICACIÓN POR PCR DEL ARNr 16S Y SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLICONES**

Para complementar la identificación de las bacterias por pruebas bioquímicas, se confirmó la identidad de todas la cepas aisladas mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S. Para la amplificación de este fragmento, se utilizó un par de *primers* cuyo fragmento de amplificación corresponde a un tamaño de 844 pb (Martínez-Rosales y col., 2011). La secuencia de los primers utilizados fueron: Primer 63F (5´

CAGGCCTAACACATGCAAGTC3') y *primer* 907R (5' CCGTCAATTCCTTTRAGTTT3').

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando *MangoMix*<sup>TM</sup> (Bioline®) y la mezcla para las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL: 12,5 µL de *MangoMix*<sup>TM</sup>, 1 µL de cada *primer* a una concentración de 10 µM, 9,5 µL de H<sub>2</sub>O mQ estéril y 1 µL de ADN (150 ng/µL aprox). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos seguida de 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 50 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C terminando con una extensión final de 1 minuto a 72°C.

Para confirmar la presencia del fragmento amplificado, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE usando 5 µL de marcador de peso molecular *GeneRuler* 100pb (Thermoscientific®). La corrida se realizó a 90V durante 1 hora y los amplicones se visualizaron por tinción con *SYBER*<sup>®</sup> *Safe DNA gel stain* (Invitrogen®) y exposición a luz UV.

Posteriormente, los productos de PCR fueron enviados para purificación y secuenciación por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur. Para obtener la secuencia, el cromatograma recibido desde el servicio de secuenciación fue editado en el programa Bioedit (Hall 1999). Mediante inspección visual se eliminaron errores detectados y las secuencias de los primers *forward* y *reverse* se empalmaron para conseguir una secuencia única. Posteriormente, las mismas se compararon mediante alineamiento con secuencias completas y parciales del mismo gen del mismo género bacteriano. Estas secuencias fueron descargadas de la base de datos del *Genbank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## 7.6 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS EN BASE DE DATOS

La identificación de las cepas se realizó utilizando el servidor online [www.ezbiocloud.net](http://www.ezbiocloud.net). La herramienta se utiliza generalmente en taxonomía, genómica, ecología, metagenómica de bacterias y archaeas. Ezbiocloud ha sido desarrollada recientemente y es mantenida por el laboratorio "ChunLab" (<http://chunlab.com>) (Anon, 2017). Uno de los servicios brindados por esta base de

datos es el “*EzBioCloud'sIdentifyService*” que brinda una forma simple de identificar cepas bacterianas utilizando las secuencias de ARNr 16S, estableciendo un grado de confianza para el resultado. Una vez realizada la identificación el resultado se muestra en columnas: el nombre de la cepa de interés (*Name*), qué porcentaje del gen completo cubre la secuencia (*Completeness %*), el nombre de la especie con mayor similitud (*Top-hit taxon*), el porcentaje de similitud (*Similarity %*) y la taxonomía de la especie más parecida (*Top-hit taxonomy*). Por otro lado esta herramienta permite, para cada una de las cepas a las cuales se le realizó la identificación, obtener la información de todos los nombres de las cepas bacterianas con las que tuvo alto porcentaje de identidad y un archivo en formato FASTA con todas las secuencias.

## **7.7 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS**

Los análisis de susceptibilidad se realizaron por medio de antibiogramas siguiendo el método de Disco difusión de Kirby – Bauer bajo las recomendaciones del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Los ATM se seleccionaron teniendo en cuenta la frecuencia de uso de los mismos en medicina veterinaria y humana así como también de acuerdo a la disponibilidad por parte del laboratorio de Ciencias Microbiológicas. El objetivo de la selección fue contar con por lo menos un representante de cada una de las principales familias de antimicrobianos (Betalactámicos, Aminoglucósidos, Macrólidos, Fluoroquinolonas, Tetraciclinas, Sulfonamidas y Diaminopirimidinas) cuyo espectro de acción incluyera las cepas aisladas. En ese sentido se utilizaron: Amoxicilina/Clavulánico, Cefovecin, Gentamicina, Estreptomina, Azitromicina, Enrofloxacina, Ciprofloxacina, Tetraciclina, Doxiciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 MUESTREO Y COLONIAS BACTERIANAS AISLADAS

Se obtuvieron un total de 5 hisopados del cadáver del león marino, cada uno de los cuales se correspondió a una de las zonas muestreadas. Los hisopos fueron identificados según la zona como L1, L2, L3, L4 y L5a y L5b (Tabla 1).

Los diferentes hisopos fueron sembrados en TSA para una recuperación primaria del mayor número de bacterias posibles presentes en las muestras. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37° C, obteniéndose crecimiento bacteriano en todas ellas (Fig. 1).

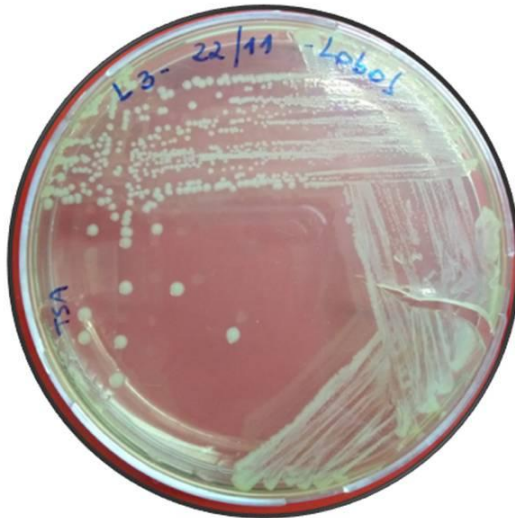


Fig. 1. Ejemplo de un aislamiento obtenido en las muestras del león marino sembrada en placas de Agar TSA luego de una incubación de 24hs a 37°C.

En cuanto a la morfología de las colonias en el medio TSA luego de 24 hs de incubación, fue muy variada y se detallan en la tabla 1. Algunos aislamientos presentaron colonias de pequeñas a medianas, algunas blancas y otras color manteca, todas ellas tenían una forma redondeada y bordes lisos. En la coloración de Gram de todos los aislamientos se pudieron observar bacilos pleomórficos pequeños Gram negativos, característicos de las enterobacterias. Solamente en una



muestra obtenida de la tráquea se observaron cocos Gram positivos muy pequeños por lo que ese aislamiento no se incluyó en el estudio.

Tabla 1. Muestras obtenidas del león marino y características de las colonias aisladas luego de la siembra en medio TSA durante 24hs a 37°C.

Identificación de la muestra	Tejido	Características de las colonias aisladas	Tinción de Gram
<b>L1</b>	Vejiga	Colonias medianas de color claro	Bacilos Gram negativos
<b>L2</b>	Esófago	Colonias medianas de color claro	Bacilos Gram negativos
<b>L3</b>	Laringe	Colonias medianas de color claro	Bacilos Gram negativos
<b>L4</b>	Tráquea	Pocas colonias pequeñas de color crema	Cocos Gram positivos pequeños
<b>L5 a</b>	Yeyuno	Colonias medianas de color claro	Bacilos Gram negativos
<b>L5b</b>	Yeyuno	Crecimiento con gran swarming	Bacilos Gram negativos

En la placa de la muestra L5, a diferencia de las demás, se observó el crecimiento de dos tipos de colonias. Una de tamaño mediano semejantes a las aisladas en las otras placas y otra con producción de *swarming* y olor profundo, características asociadas al género *Proteus sp.*.

Los bacilos Gram negativos obtenidos de las diferentes muestras de tejidos (L1, L2, L3, L5a y L5b), fueron aislados a continuación en los medios selectivos y diferenciales para bacterias del género *Enterobacterias* XLD y Mac Conkey, lográndose aislamiento en todos los casos (Fig 2).

Cuatro de los cinco aislamientos (L1, L2, L3 y L5A) fueron lactosa positivos en el McC y fermentaron la xilosa en el XLD. Mientras que el quinto aislamiento (L5B) resulto lactosa negativo en el McC y fermentó la xilosa con producción de sulfhídrico (colonias amarillas con centro negro) en el XLD.

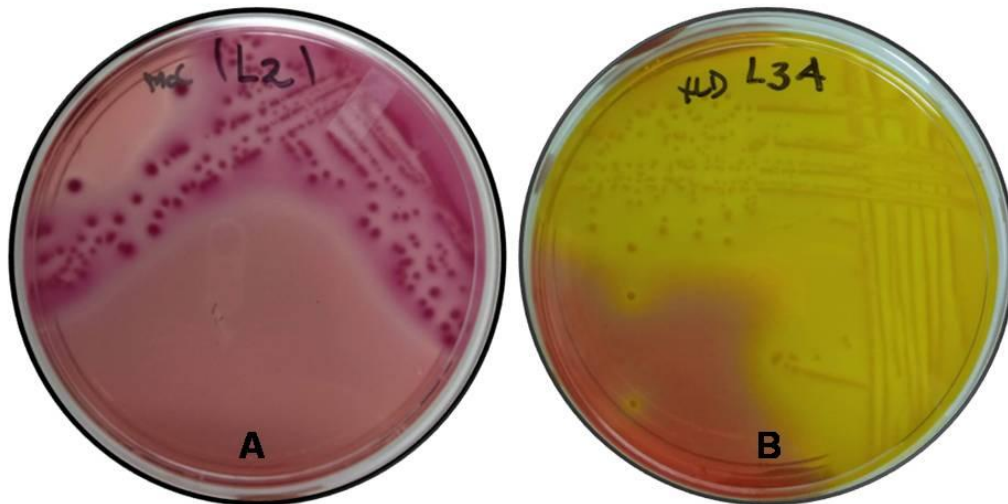


Fig. 2. Ejemplos de aislamientos obtenidos a partir de los bacilos Gram negativos aislados de las muestras del león marino, sembradas en placas de Agar Mac Conkey (Fig. 2A) y XLD (Fig. 2B) con una incubación de 24hs a 37°C.

## 8.2 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADAS

A todos los aislamientos se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas: Triple Azúcar Hierro Agar (TSIA), Sulfhídrico-Indol-Motilidad (SIM) e Indol-Rojo Metilo-Voges Proskauer y Citrato (IMViC), para determinar el metabolismo de los microorganismos y lograr la identificación bioquímica de los mismos (Fig. 3).



Fig. 3. Ejemplos de las pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos Gram negativos obtenidos a partir de la muestra del león marino.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas se resumen en la Tabla 2. Cuatro de los cinco aislamientos resultaron citrato negativos, TSIA ácido/ácido con producción de gas y sin producción de sulfhídrico, Rojo Metilo positivo, Voges Proskauer negativo, Indol positivo y SIM con movilidad positiva y sin sulfhídrico (Fig. 4 A). El aislamiento L5B resulto citrato positivo, TSIA ácido/ácido sin producción de gas y producción de sulfhídrico, Voges Proskauer negativo, Indol positivo y SIM con movilidad positiva y producción de sulfhídrico

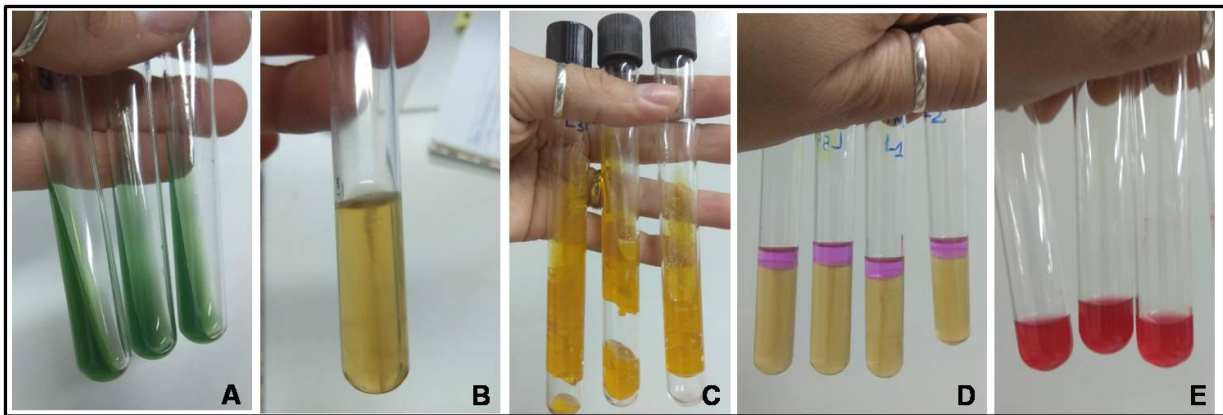


Fig 4. Ejemplos de los resultados de las distintas pruebas bioquímicas realizadas. A: Citrato; B: SIM; C: TSIA; D: Indol y E: Rojo Metilo.

Tabla 2: resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos Gram negativos obtenidos de las muestras de *Otaria byronia* (TSIA: Triple Azúcar Hierro Agar; RM: Rojo Metilo; SIM: Sulfhídrico-Indol-Motilidad; IF: Identificación fenotípica).

	<b>TSIA</b>	<b>Indol</b>	<b>RM</b>	<b>VP</b>	<b>Citrato</b>	<b>SIM</b>	<b>IF</b>
<b>L1</b>	A/A, H2S-, gas+	+	+	-	-	Mov+, H2S-, Indol+	<i>Escherichia coli</i>
<b>L2</b>	A/A, H2S-, gas+	+	+	-	-	Mov+, H2S-, Indol+	<i>Escherichia coli</i>
<b>L3</b>	A/A, H2S-, gas+	+	+	-	-	Mov+, H2S-, Indol+	<i>Escherichia coli</i>
<b>L5A</b>	A/A, H2S-, gas+	+	+	-	-	Mov+, H2S-, Indol+	<i>Escherichia coli</i>
<b>L5B</b>	A/A, H2S+, gas-	-	+	-	+	Mov+, H2S+, Indol+	<i>Proteus mirabilis</i>

### 8.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS POR SECUENCIACIÓN DEL ARNr 16S

En la amplificación del gen del ARNr 16S con el par de *primers* utilizado (63F y 907R), se obtuvieron bandas de aproximadamente 844pb en todas las cepas (L1, L2, L3 y L5a y L5b). En la figura 5 se muestran las bandas obtenidas en la PCR de cuatro de las cepas aisladas. El resultado del control negativo realizado con agua miliQ..

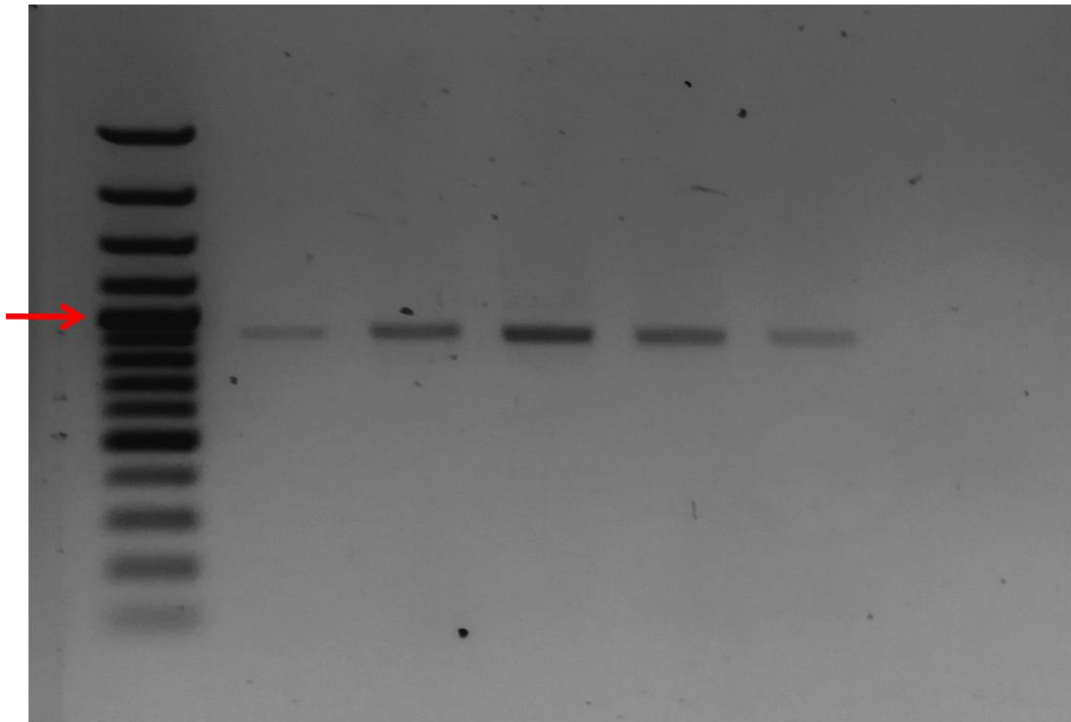


Fig. 5. Corrida electroforética de PCR del ARNr 16S de los aislamientos utilizando los *primers* 63F y 907R (amplicón = 844pb). Carril 1: PM (100 pb), Carriles 2 a 7: muestras positivas L1, L2, L3 y L5a y L5b respectivamente, Carril 7: control negativo. La flecha indica la banda del fragmento de 800 pb del PM.

La secuenciación del fragmento de 844pb permitió identificar el género y especie de todos los aislamientos (Fig.6). Los aislamientos L1 y L2 se correspondieron con un 99% de identidad a cepas de *Shigella flexneri* y *Escherichia fergusonii* por igual. Por otro lado los aislamientos L3 y L5a fueron confirmados como *Escherichia fergusonii* con un 100 % de identidad en todas las bases de datos

utilizadas. Y por último el aislamiento L5b se identificó como *Proteus mirabilis* con un 100% de identidad.

```
>L1.168-2018 (Shigella flexneri)
AATCGAAGCGTACAGGAGCGCTTCTGCTGCTGAGAGTGGCGAGCGGTTGAGTAACTGCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGATACTACTGGAAAAGGTAACCTGCAATACGTCGCAAGACAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATAGCTAGTGGGTA
ACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACACGCACTGGAACTGGACACAGGTCGAGACTCTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCAAAATGGGCGCAAGCTGATGCAAGCCTGCGCGGTGTATGAGAGAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAGGATAGGTTAATAC
TACCTTTCTCATTGAGCTTACCGCGAAGAGACCGGCTAATCCGTCGACAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGAGGTTAATCGGAATTAATCGGAATTAATCGGAGTAAAGCGCACAGCGGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAATGCACTGTGATGATGCAAGCTTGGATCTCTAGAGGGGG
GTAGAAATCCAGGTTAGCGGTGAAATGCTAGAGATCTGGAGAAATACCGGTTGGCGAAGCGCGCCCTTGGACGAAACTGACGCTCAGGTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTGGTATCCAGCGCTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGGGCTGGCTTCGGAGCTAACCGGTTAG
TCGACCGCTGGGAGTACGGCGCAGGTTAAACTCAAAGAAATTGAAC

>L2.168-2018 (Shigella flexneri)
CGAAGCGTACAGGATCAGCTTCTGCTGCTGAGAGTGGCGAGCGGTTGAGTAACTGCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGATACTACTGGAAACGTTAGTAAATACCGCAATACGTCGCAAGACAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATAGCTAGTGGGTAAGG
CTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACACGCACTGGAACTGGACACAGGTCGAGACTCTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCAAAATGGGCGCAAGCTGATGCAAGCCTGCGCGGTGTATGAGAGAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAGGATAGGTTAATAC
TTTCTCATTGAGCTTACCGCGAAGAGACCGGCTAATCCGTCGACAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGAGGTTAATCGGAATTAATCGGAATTAATCGGAGTAAAGCGCACAGCGGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAATGCACTGTGATGATGCAAGCTTGGATCTCTAGAGGGGG
AATTCAGGTTAGCGGTGAAATGCTAGAGATCTGGAGAAATACCGGTTGGCGAAGCGCGCCCTTGGACGAAACTGACGCTCAGGTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTGGTATCCAGCGCTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGGGCTGGCTTCGGAGCTAACCGGTTAG
CCGCTGGGAGTACGGCGC

>L3.168-2018 (Escherichia fergusonii)
CAATGAAAGCGTACAGGAGCGCTTCTGCTGCTGAGAGTGGCGAGCGGTTGAGTAACTGCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGATACTACTGGAAAAGGTAACCTGCAATACGTCGCAAGACAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATAGCTAGTGGGTA
ACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACACGCACTGGAACTGGACACAGGTCGAGACTCTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCAAAATGGGCGCAAGCTGATGCAAGCCTGCGCGGTGTATGAGAGAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAGGATAGGTTA
TACCTTTCTCATTGAGCTTACCGCGAAGAGACCGGCTAATCCGTCGACAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGAGGTTAATCGGAATTAATCGGAGTAAAGCGCACAGCGGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAATGCACTGTGATGATGCAAGCTTGGATCTCTAGAGGGGG
GTAGAAATCCAGGTTAGCGGTGAAATGCTAGAGATCTGGAGAAATACCGGTTGGCGAAGCGCGCCCTTGGACGAAACTGACGCTCAGGTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTGGTATCCAGCGCTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGGGCTGGCTTCGGAGCTAACCGGTTAG
TCGACCGCTGGGAGTACGGCGCAGGTTAA

>L4.168-2018 (Escherichia fergusonii)
CAATGAAAGCGTACAGGAGCGCTTCTGCTGCTGAGAGTGGCGAGCGGTTGAGTAACTGCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGATACTACTGGAAACGTTAGTAAATACCGCAATACGTCGCAAGACAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATAGCTAGTGGGTA
AAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACACGCACTGGAACTGGACACAGGTCGAGACTCTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCAAAATGGGCGCAAGCTGATGCAAGCCTGCGCGGTGTATGAGAGAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAGGATAGGTTA
ATACCTTTCTCATTGAGCTTACCGCGAAGAGACCGGCTAATCCGTCGACAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGAGGTTAATCGGAATTAATCGGAGTAAAGCGCACAGCGGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAATGCACTGTGATGATGCAAGCTTGGATCTCTAGAGGGGG
GGTAAATCCAGGTTAGCGGTGAAATGCTAGAGATCTGGAGAAATACCGGTTGGCGAAGCGCGCCCTTGGACGAAACTGACGCTCAGGTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTGGTATCCAGCGCTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGGGCTGGCTTCGGAGCTAACCGGTTAG
GTGACCGCTGGGAGTACGGCGCAGGTTAAACT

>L5.168-2018 (Proteus mirabilis)
ATCAGTGGAGCGTAAAGAGGAGGCTTCTGCTGCTGAGAGTGGCGAGCGGTTGAGTAACTGCTGGGAACTGCTGATGGAGGGGATACTACTGGAAAAGGTAACCTGCAATACGTCGCAAGACAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATAGCTAGTGGGTA
GTAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCTACTGGAACTGGACACAGGTCGAGACTCTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCAAAATGGGCGCAAGCTGATGCAAGCCTGCGCGGTGTATGAGAGAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAGGATAGGTTA
TAAATCCCTTCTCATTGAGCTTACCGCGAAGAGACCGGCTAATCCGTCGACAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGAGGTTAATCGGAATTAATCGGAGTAAAGCGCACAGCGGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAATGCACTGTGATGATGCAAGCTTGGATCTCTAGAGGGGG
GGGTTAGAAATCCAGGTTAGCGGTGAAATGCTAGAGATCTGGAGAAATACCGGTTGGCGAAGCGCGCCCTTGGACGAAACTGACGCTCAGGTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTGGTATCCAGCGCTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGGGCTGGCTTCGGAGCTAACCGGTTAG
AAATCAGCGCTGGGAGTACGGCGCAGGTTAAACTCA
```

Fig. 6. Secuencia nucleotídica del fragmento de 844 pb que permitió la identificación molecular de los aislamientos en la muestras de león marino.

### 8.4 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

En los resultados de los antibiogramas realizados a los aislamientos (Fig. 7) se evidenció que la resistencia frente a los diez antibióticos testados fue bastante significativa. Todas las cepas aisladas expresaron fenotipo de resistencia a Amoxicilina/clavulámico, sulfametoxazol/trimetoprim, Tetraciclina, Doxiciclina y Estreptomina. Sumado a esto las cepas L1, L2 y L3 mostraron resistencia contra Ciprofloxacina y por último los aislamientos L2 y L3 no mostraron sensibilidad contra Enrofloxacin ni contra Cefovecina. Los resultados con respecto a la resistencia y la sensibilidad hacia los antimicrobianos testados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de los antibiogramas realizados a los aislamientos provenientes de león marino.

	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L5 a</b>	<b>L5 b</b>
<b>AMC</b>	R	R	R	R	R
<b>CVN</b>	S	R	R	S	S
<b>CIP</b>	R	R	R	S	S
<b>ENR</b>	S	R	R	S	S
<b>TE</b>	R	R	R	R	R
<b>DO</b>	R	R	R	R	R
<b>AZM</b>	S	S	S	S	R
<b>EST</b>	R	R	R	R	R
<b>CN</b>	S	S	S	S	S
<b>SXT</b>	R	R	R	R	R

(AMC: Amoxicilina y ácido Clavulámico; CVN: Cefovecina; CIP: Ciprofloxacina; ENR: Enrofloxacin; TE: Tetraciclina; Do: Doxyciclina; AZM: Azitromicina; EST: Estreptomycin; CN: Gentamicina SXT: Sulfa-Trimetoprim; R: Resistente; S: Sensible).

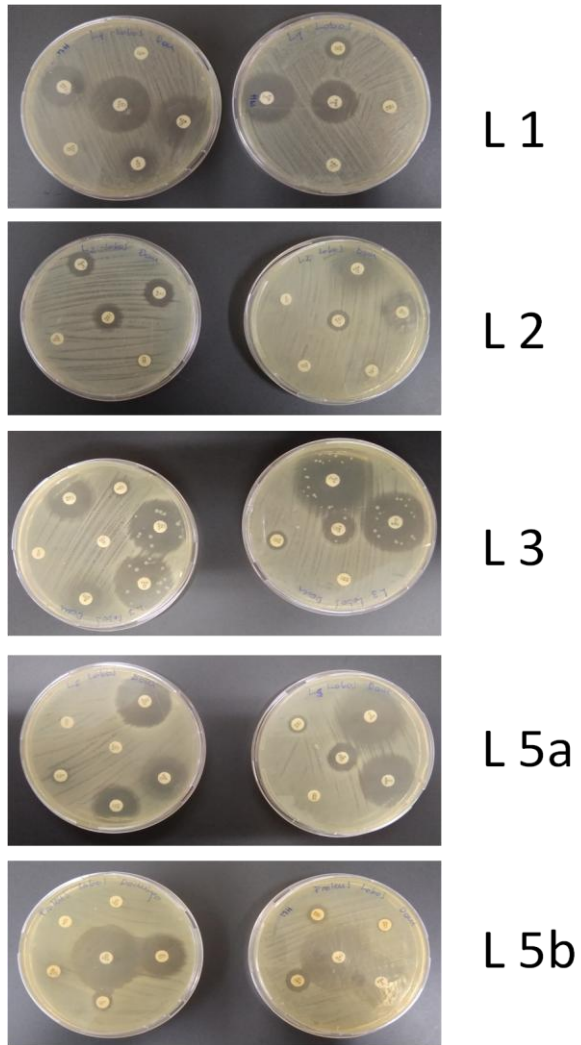


Fig. 7. Antibiogramas realizados a los aislamientos luego de 24hs de incubación a 37 °C.

## 9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo. La misma está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día aparecen y se propagan en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad para combatir las enfermedades infecciosas comunes. Por lo que, la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos (RAM), reviste alta prioridad para la OMS desde hace ya varios años (Camou y col., 2017). En este contexto la Asamblea Mundial de la Salud aprobó en mayo de 2015 un plan de acción mundial sobre la RAM cuya principal finalidad es asegurar que se puedan seguir previniendo y tratando enfermedades infecciosas por medio de fármacos eficaces y seguros. Como respuesta a este plan de acción trazado por la Asamblea Mundial de la Salud, la OMS plantea como primer objetivo que se debe mejorar la sensibilización y los conocimientos en materia de resistencia a antimicrobianos (OMS, 2018).

La liberación en el medio natural de antimicrobianos, desinfectantes y otros compuestos, como metales pesados, puede favorecer la evolución de las bacterias resistentes (Baker-AustinC y col., 2006). Estos compuestos se encuentran en las aguas y el suelo en concentraciones muy diversas, en función de la fuente y de su comportamiento en términos de tasa de degradación y adsorción a sólidos (Kümmerer, 2009). Las aguas residuales municipales contienen gran variedad de contaminantes, entre productos farmacéuticos y de higiene personal procedentes de los hogares; residuos hospitalarios con concentraciones elevadas de antimicrobianos y desinfectantes; y compuestos de la actividad industrial, entre los que se encuentran metales pesados. Estas aguas finalmente terminan su ciclo en los océanos, lo que conlleva a una problemática aún poco conocida e investigada principalmente en lo referente a los antimicrobianos y a cepas antibiótico-resistentes y como estos impactan en la salud a nivel mundial (Brahmi y col., 2018). En la actualidad en nuestro país esta realidad se encuentra subestimada y/o es prácticamente desconocida. Por lo que resulta prioritario generar información y conocer el estado de situación a estos niveles, insumos necesarios que servirán de asiento a la toma de acciones efectivas a corto, mediano y largo plazo. En este



marco entonces es que se propone la realización de esta tesis de grado, la cual tuvo como principal objetivo determinar la existencia de bacterias resistentes a antimicrobianos en ambientes naturales con los cuales el ser humano tiene estrecho contacto (en este caso se usó el ambiente marino), utilizando un ejemplar de la fauna silvestre (el león marino) como bioindicador de la misma.

En el contexto mundial de lucha contra la resistencia antimicrobiana Uruguay en el año 2017 elaboró y publicó un documento denominado “*Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay*” (MGAP, 2017). El mismo propone como principal objetivo prevenir las enfermedades e impedir las muertes de humanos y animales causadas por infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos, dentro del marco de “Una Salud” (concepto que incluye a la salud humana, animal y ambiental). Sin embargo el presente Plan Nacional propone el desarrollo de actividades con enfoque en Salud Animal y cadenas productoras de alimentos, englobando a los animales de interés productivo para el país, así como los de compañía y alimentos para animales, pero dejando por fuera u omitiendo, al menos en este plan o etapa, a la fauna silvestre y los ambientes naturales como posibles reservorios de RAM (MGAP, 2017). Teniendo presente la imposibilidad que sugiere, basados en la bibliografía actual existente, un plan de acción efectivo que no incluya estos puntos dentro del ciclo de la creación y diseminación de la RAM, esta tesis buscó exponer estos enfoques para comenzar a determinar el papel que cada uno de ellos juega a nivel país dentro de esta problemática. En este sentido con este trabajo se pretende la consolidación de un grupo de acción multidisciplinario dentro de la Facultad de Veterinaria y con el apoyo del Ministerio de ganadería agricultura y pesca, a través de la División Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA), dirigido a trabajar dentro del contexto de la RAM a nivel ambiental. Esta cooperación tendrá como objetivo principal profundizar los conocimientos existentes para colaborar en la búsqueda de acciones a nivel de Uruguay para el control y la reducción de la RAM.

Si bien este trabajo se basó en las muestras provenientes de un único ejemplar de *Otaria byronia*, lo que podría ser cuestionable en una primera instancia, el mismo es un punto de partida para futuras investigaciones, reflejando el estado de situación de la RAM a nivel ambiental en nuestro país. Dentro de los resultados

obtenidos se destacan que todas las cepas de enterobacterias aisladas manifestaron resistencia fenotípica a cinco de los diez antimicrobianos a los que fueron expuestas, algunos de cuales son de uso frecuente en medicina humana como las asociaciones Amoxicilina / Ácido clavulámico y Sulfametoxasol / Trimetoprim (Durand y col., 2018) y otros de amplio uso en medicina Veterinaria como los representantes de la familia de las tetraciclinas (Tetraciclina y Doxiciclina) y el aminoglucósido Estreptomina (Hao y col., 2016). Para otros antimicrobianos y la Cefalosporina de tercera generación, Cefovecina, también se evidenciaron resistencias, aunque no en el total de las cepas aisladas, siendo el macrólido Azitromicina, el único antimicrobiano contra el cual no se encontró resistencia en este ensayo. Estos reportes no tienen precedentes en Uruguay hasta la fecha y la trascendencia de los mismos o el impacto que revisten dentro de lo que es el control de la RAM a nivel nacional, deberá ser estudiada en profundidad en futuros ensayos para determinar los genes de resistencia predominantes a nivel ambiental y el origen de los mismos.

Además también se logró el aislamiento de cepas de *Proteus mirabilis* y *Escherichia fergusonii*, siendo para esta última el primer reporte de esta especie bacteriana en *Otaria byronia* hasta el momento. *Escherichia fergusonii*, presenta una ocurrencia poco frecuente pero emergente en humanos y animales, asociada mayormente a casos de infección del tracto urinario, bacteriemia, diarrea, carcinoma pancreático, endoftalmitis y pleuritis en humanos (Wragg y col., 2009). La revisión más reciente acerca de la presencia de *Escherichia fergusonii* en especies animales publicada en el año 2014, no reporta a *Otaria byronia* ni a otras especies de mamíferos marinos, como portadores de este microorganismo (Gaastra y col., 2014). La importancia de esta bacteria para *Otaria byronia* y el rol de los mamíferos marinos en la epidemiología de esta infección en humanos, debe ser estudiada en futuras investigaciones.

Así como la punta de un iceberg, con este trabajo se pretendió sacar a la luz una problemática cuyas magnitudes se desconocen, en la cual estamos estrechamente relacionados y cuyas consecuencias repercuten dentro del concepto “una sola salud”.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo R, Severiche C, Jaimes J. (2015) Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *P+L*; 10(2):160-172.
2. Ahasana M, Picarda J, Elliott L, Kinobe R, Owensa L, Ariela E. (2017) Evidence of antibiotic resistance in Enterobacteriales isolated from green sea turtles, *Cheloniemydas* on the Great Barrier Reef. *Mar Pollut Belle*; 120:18 – 27.
3. Allen H, Donato J, Wang H, Cloud-Hansen K, Davies J, Handelsman J. (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.*; 4:251-9
4. Allen H. and Stanton T. (2014) Altered egos: antibiotic effect on food animal microbiomes. *Annu. Rev. Microbiol.*; 68:297-315.
5. An Y, Kampbell D, Breidenbach G. (2002) *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. *Environ Pollut.*; 120(3):771-8.
6. Argemi F, Cianni N, Porta A. (2005) Disrupción endócrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Act. Bioq. Clin. Lat.*; 39:291-300.
7. Ayokunle C, Ahmad A. (2013) Speciation and antimicrobial resistance of Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. *Env. Mon. Ass.*, 185:1583-1599.
8. Baker-Austin C, Wright M, Stepanauskas R, McArthur J. (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.*; 14(4):176-82.
9. Bartlett J, Gilbert D, Spellberg B. (2013) Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis.*; 56(10):1445-50.
10. Barton M. (2014) Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol.*; 19:9-15.
11. Berta A, Churchill M. (2012) Pinniped taxonomy: review of currently recognized species and subspecies, and evidence used for their description. *Mam Rev*; 42: 207–234.
12. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks E, Johnston M, Barton H, Wright G. (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLos One*; 7(4):e34953.

13. Biberstein E, Chung Zee Y. (1990) Tratado de Microbiología Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, p.148-150.
14. Blair J, Webber M, Baylay A, Ogbolu D, Piddock L. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.*; 13(1):42-51.
15. Bonelli R, Moreira B, Picao R. (2014) Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: history, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resist. Updat.*; 17: 24-36.
16. Bonnedahl J, Järhult J. (2014) Antibiotic resistance in wild birds. *Ups J Med Sci.*; 119(2):113-6.
17. Brahmi S, Touati A, Dunyach-Remy C, Sotto A, Pantel A, Lavigne J. (2018) High Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Wild Fish from the Mediterranean Sea in Algeria. *Microb Drug Resist.*; 24(3):290-298.
18. Brenner D, Krieg N, Staley J, Garrity G. (2004) *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 2. The Proteobacteria: 1- 1256. Springer, Amsterdam.
19. Camou T, Zunino P, Hortal M. (2017) Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev Méd Urug.*; 33(4):277-284.
20. Campagna C. (1985) The breeding cycle of the Southern sea lion, *Otaria byronia*. *Mar Mam Sci*; 1(3):210–218.
21. Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2013) <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>. Último acceso: 19/11/2018.
22. Chacon J, and Harcombe W. (2016) Antimicrobials: Constraints on microbial warfare. *Nat Microbiol.*; 1:1622.
23. Cogliani C, Goossens H, Greko C. (2011) Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe banning nonessential antibiotic uses in food animals is intended to reduce pools of resistance genes. *Microbe*; 6(6):274-9.
24. Colobatiu L, Tabaran A, Flonta M, Oniga O, Mirel S, Mihaiu M. (2015) First description of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and  $\beta$ -lactamase encoding genes in non-typhoidal *Salmonella* isolated from humans, one companion animal and food in Romania. *Gut Pathog.*; 7:16.

25. Crespo E, Pedraza S, Dans S, Alonso M, Reyes L, García N, Coscarella M. (1997) Direct and Indirect Effects of the Highseas Fisheries on the Marine Mammal Populations in the Northern and Central Patagonian Coast. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 22:189-207.
26. Dantas G, Sommer M. (2014) How to Fight Back Against Antibiotic Resistance. *American Scientist*; 102(1):42.
27. de Blainville, 1820. (2018) *UiC; Encyclopedia of Marine Mammals (3ª edición)*:907-910.
28. De la Torriente A, Quiñones R, Miranda-Urbina D, Echevarría F. (2010) South American sea lion and spiny dogfish predation on artisanal catches of southern hake in fjords of Chilean Patagonia. *ICES J Mar Sci*; 67(2): 294-303.
29. Dolejska M, Cizek A, Literak I. (2007) High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *J. Appl. Microbiol.*; 103:11-19.
30. Durand G, Raoult D, Dubourg G. (2018) Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents.*; S0924-8579(18)30335-2.
31. Fariñas MC, Martínez-Martínez L. (2013) Multiresistant Gram-negative bacterial infections: *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and other non-fermenting Gram-negative bacilli. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 31(6):402-9.
32. Ferrer M, Méndez-García C, Rojo D, Barbas C, Moya A. (2017) Antibiotic use and microbiome function. *Biochem Pharmacol.*; 134:114-126.
33. Foti M, Giacobello C, Bottari T, Fisichella V, Rinaldo D, Mammina C. (2009) Antibiotic Resistance of Gram Negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull.*; 58(9):1363-6.
34. Gaastra W, Kusters JG, van Duijkeren E, Lipman LJ. (2014) *Escherichia fergusonii*. *Vet Microbiol.*; 172(1-2):7-12.
35. Garcia-Alvarez L, Dawson S, Cookson B, Hawkey P. (2012) Working across the veterinary and human health sectors. *J Antimicrob Chemother.*; 67 Suppl 1:37-49.

36. Gibson MK, Crofts TS, Dantas G. (2015) Antibiotics and the developing infant gut microbiota and resistome. *Curr Opin Microbiol.*; 27:51-6.
37. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. (2014) Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries.*; 8(2):129-36.
38. Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. (2000) Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol.*; 66(1):125-32.
39. Graham DW, Olivares-Rieumont S, Knapp CW, Lima L, Werner D, Bowen E. (2011) Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares River near Havana, Cuba. *Environ Sci Technol.*; 45(2):418-24.
40. Guenther S, Grobbel M, Heidemanns K, Schlegel M, Ulrich RG, Ewers C, Wieler LH. (2010) First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Sci Total Environ.*; 408(17):3519-22.
41. Hansen MP, Hoffmann TC, McCullough AR, van Driel ML, Del Mar CB. (2015) Antibiotic Resistance: What are the Opportunities for Primary Care in Alleviating the Crisis? *Front Public Health.*, 3:35.
42. Hao H, Sander P, Iqbal Z, Wang Y, Cheng G, Yuan Z. (2016) The Risk of Some Veterinary Antimicrobial Agents on Public Health Associated with Antimicrobial Resistance and their Molecular Basis. *Front Microbiol.*, 7:1626.
43. Hückstädt LA and Antezana T. (2006) The diet of *Otaria flavescens* in Chile: what do we know? En: Trites A, S Atkinson, D DeMaster, L Fritz, T Gelatt, L Rea, K Wynne (eds). *Sea lions of the world*. Fairbanks, University of Alaska p. 83-97.
44. Hückstädt LA, Rojas CP, Antezana T. (2007) Stable isotope analysis reveals pelagic foraging by the Southern sea lion in central Chile. *J Exp Mar Biol Ecol*; 347:123-133.
45. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. (2002) Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(9):3045-9.

46. Kahn L, Kaplan B, Monath T, Steele J. (2008) Teaching "one medicine, one health. *Am J M*; 121(3):169-70.
47. King LJ, Anderson LR, Blackmore CG, Blackwell MJ, Lautner EA, Marcus LC, Meyer TE, Monath TP, Nave JE, Ohle J, Pappaioanou M, Sobota J, Stokes WS, Davis RM, Glasser JH, Mahr RK. (2008) Executive summary of the AVMA One Health Initiative Task Force report. *J Am Vet Med Assoc.*, 233(2):259-61.
48. Koenig JE, Bourne DG, Curtis B, Dlutek M, Stokes HW, Doolittle WF, Boucher Y. (2011) Coral-mucus-associated *Vibrio* integrons in the Great Barrier Reef: genomic hotspots for environmental adaptation. *ISME J.* 5(6):962-72.
49. Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C. (2009) Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol.*, 75(3):559-66.
50. Kresken M, Körber-Irrgang B, Biedenbach DJ, Batista N, Besard V, Cantón R, García-Castillo M, Kalka-Moll W, Pascual A, Schwarz R, Van Meensel B, Wisplinghoff H, Seifert H. (2016) Comparative activity of oral antimicrobial agents against Enterobacteriaceae from patients with community-acquired urinary tract infections in three European countries. *Clin. Microbiol. Infect.*, 22:63.e61- 63.e65.
51. Kümmerer K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere*, 75(4):417-34.
52. Laxminarayan R, Sridhar D, Blaser M, Wang M, Woolhouse M. (2016) Achieving global targets for antimicrobial resistance. *Science.*, 353(6302):874-5.
53. Lee LH, Ab Mutalib NS, Law JW, Wong SH, Letchumanan V. (2018) Discovery on Antibiotic Resistance Patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in Selangor Reveals Carbapenemase Producing *Vibrio parahaemolyticus* in Marine and Freshwater Fish. *Front Microbiol.*, 9:2513.
54. Levy SB, Marshall B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.*, 10(Suppl 12):S122-129.
55. Liu Y, Cheng Y, Yang, Hu L, Cheng J, Ye Y, Li J. (2017) Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes of *Shigella flexneri* Isolates With

- Fosfomicin Resistance From Patients in China. *Ann Lab Med.*, 37(5):415-419.
56. Livermore D, Warner M, Hall L, Enne V, Projan S, Dunman P, Wooster S, Harrison G. (2001) Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environ Microbiol.*, 3(10):658-61.
57. Marshall B, Levy S. (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev.*, 24(4):718-33.
58. Martínez E, Villalobos B. (2008) Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de alimentos y aguas residuales en Cumaná, Venezuela. *SABER. Universidad de Oriente*, 20:172-176.
59. Martinez JL (2008) Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321:365–367.
60. Martínez-Rosales C, Cecilia MR, Susana CS. (2011). Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Research*; 30(1):1-8.
61. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA (MGAP). 2017. [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/plan\\_nacional\\_de\\_contencion\\_de\\_la\\_resistencia\\_antimicrobiana\\_de\\_uruguay.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/plan_nacional_de_contencion_de_la_resistencia_antimicrobiana_de_uruguay.pdf). fecha de consulta: 20 de noviembre de 2018.
62. Najjuka CF, Kateete DP, Kajumbula HM, Joloba ML, Essack SY. (2016) Antimicrobial susceptibility profiles of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from outpatients in urban and rural districts of Uganda. *BMC. Res. Notes*; 9:235.
63. Nathani N, Mootapally C, Dave B. (2019) Antibiotic resistance genes allied to the pelagic sediment microbiome in the Gulf of Khambhat and Arabian Sea *Sci Total Environ.* 653:446–454.
64. Nathani N, Mootapally C, Dave B. (2018) Antibiotic resistance genes allied to the pelagic sediment microbiome in the Gulf of Khambhat and Arabian Sea. *Sci Total Environ.*; 653:446-454.
65. Organización Mundial de la Salud (OMS). <http://www.who.int/es>. Fecha de consulta: 22 de noviembre de 2018.
66. Peng X, Yang P, Liu S, Li J, Zhang D, Liu Y, Liang H, Cui S, Wu S, Wang Q. (2013) The genetic features of drug resistance to group A streptococcus



- and macrolides antibiotics among pediatric patients in Beijing 2012. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, Chinese J Prev Med*; 47(11):1040-1044.
67. Ponce de León A, Pin OD. (2006) Distribución, reproducción y alimentación del lobo fino *Arctocephalus australis* y del león marino *Otaria flavescens* en Uruguay. En: *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre Uruguay*. Montevideo, Págs. 305–313.
68. Quinn P, Markey B, Carter M, Donnelly W, Leonard F. (2002) Enterobacteriaceae. En: *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. Zaragoza: Ed Acribia. Págs. 125-146.
69. Radhouani H, Silva N, Poeta P, Torres C, Correia S, Igrejas G. (2014) Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Front Microbiol.*, 5-5:23.
70. Ramirez M, Traglia G, Lin D, Tran T, Tolmasky M. (2014) Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiol Spectr.*; 2(5):1-15.
71. Sayah R, Kaneene J, Johnson Y, Miller R. (2005) Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol.*, 71(3):1394-404.
72. Schwarz S, Shen J, Wendlandt S, Feßler A, Wang Y, Kadlec K, Wu CM. (2014) Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Other Firmicutes. *Microbiol Spectr.*; 2(6).
73. Sengupta S, Chattopadhyay M, Grossart H. (2013) The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.*; 4:47.
74. Sjölund M, Bonnedahl J, Hernandez J, Bengtsson S, Cederbrant G, Pinhassi J, Kahlmeter G, Olsen B. (2008) Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria into the Arctic. *Emerg Infect Dis.*; 14(1): 70–72.
75. Sousa M, Gonçalves A, Silva N, Serra R, Alcaide E, Zorrilla I, Torres C, Caniça M, Igrejas G, Poeta P. (2014) Acquired antibiotic resistance among wild animals: the case of Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Vet Q.*; 34(2):105-12.
76. Stanchi N, Martino P, Gentilini E. (2007) *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires, Editorial: Intermedical. 572 p.

77. Szteren D. & Páez E. (2002) Predation by southern sea lions (*Otaria flavescens*) on artisanal fishing catches in Uruguay. *Mar Freshwater Res*; 53:1161-1167.
78. Vaz-Ferreira R. (1982) *Otaria flavescens* (Shaw), South American sea lion. In: *Mammals in the Seas: Small cetaceans, seals, sirenians and otters*. FAO Fisheries Series; 5(4):477-495.
79. Wallace C, Yund P, Ford T, Matassa K, Bass A. (2013) Increase in Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated from Stranded Marine Mammals of the Northwest Atlantic. *EcoHealth*; 10:201-210.
80. Wallace C, Yund PO, Ford TE, Matassa K, Bass AL (2013). Increase in Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated from Stranded Marine Mammals of the Northwest Atlantic. *EcoHealth*; 10:201-210.
81. Wang XY, Tao F, Xiao D, Lee H, Deen J, Gong J, Zhao Y, Zhou W, Li W, Shen B, Song Y, Ma J, Li ZM, Wang Z, Su PY, Chang N, Xu JH, Ouyang PY, von Seidlein L, Xu ZY, Clemens JD. (2006) Trend and disease burden of bacillary dysentery in China (1991-2000). *Bull World Health Organ.*; 84(7):561-8.
82. Wragg P, La Ragione R, Best A, Reichel R, Anjum M, Mafura M, Woodward M. (2009) Characterisation of *Escherichia fergusonii* isolates from farm animals using an *Escherichia coli* virulence gene array and tissue culture adherence assays. *Res Vet Sci.*; 86(1):27-35.
83. Wright GD. (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.*; 13:589 – 594.
84. Wu J, Su Y, Deng Y, Guo Z, Mao C, Liu G, Xu L, Cheng C, Bei L, Feng J. (2018) Prevalence and distribution of antibiotic resistance in marine fish farming areas in Hainan, China. *Sci Total Environ.*; 653:605-611.