

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE
BETALACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO EN HECES DE LOBO MARINO
COMÚN (*Otaria flavescens* SHAW 1800) DE UNA COLONIA URBANA DE LA
REGIÓN DE LOS RÍOS, CHILE**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO

ANA CECILIA JARA ASTORGA

VALDIVIA – CHILE

2017

PROFESOR PATROCINANTE



María José Navarrete Talloni

PROFESOR INFORMANTES



Carla Rosenfeld Miranda



Paulo Corti González

FECHA DE APROBACIÓN: 20 de diciembre de 2016

ÍNDICE

Capítulos	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	8
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSIÓN	17
7. REFERENCIAS	21
8. ANEXOS	23

1. RESUMEN

La aparición de resistencia a antimicrobianos por parte de las bacterias resulta un problema para la salud pública a nivel mundial, debido a que las infecciones o problemas de salud producidas por estas traen como consecuencia hospitalizaciones, ausencia laboral y terapias más costosas y prolongadas. Dentro de los fármacos más utilizados y comunes para el tratamiento de infecciones bacterianas se encuentran los antibióticos betalactámicos y en consecuencia la producción de enzimas betalactamasas son el mecanismo más común de resistencia especialmente en enterobacterias.

Las proximidades con las actividades humanas y la interacción humano-animal silvestre facilita el movimiento de microorganismos desde cursos terrestres a ecosistemas marinos y viceversa, en particular de bacterias potencialmente resistentes a antibióticos, afectando directamente la salud pública. En función de esto se utilizó como modelo de estudio al Lobo Marino común (*Otaria flavescens* Shaw 1800) provenientes de una colonia urbana de la ciudad de Valdivia - Chile, para caracterizar enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL).

Se recolectaron un total de 30 muestras de material fecal de lobo marino obtenidas de una plataforma y sus alrededores de la costanera de Valdivia. Las muestras se colectaron en frascos plásticos estériles de 100 ml y procesadas en el Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile. Se realizó aislamiento de colonias bacterianas en un agar ESBL, para posteriormente identificar las cepas bacterianas, realizar extracción de ADN y caracterizar los principales genes que codifican para betalactamasas de espectro extendido, como son TEM, OXA, SHV y CTX-M, mediante técnica de PCR Simplex.

Del total de muestras, un 73% fue positivo al crecimiento de colonias en agar ESBL, aislándose principalmente colonias de *Escherichia coli*. De las 22 muestras positivas al cultivo bacteriano, un 68% mostraron presencia de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos, siendo SHV la enzima más comúnmente identificada con un 46%, seguida por CTX-M (32%) y OXA (23%).

Se pudo determinar la presencia de bacterias ESBL en la mayoría de las muestras de heces recolectadas de esta colonia urbana de lobo marino común, la que está en constante contacto con la población. Además, se identificaron las enzimas que les confieren resistencia a estas bacterias con esto. Se reconocen también posibles fuentes que aumentan el riesgo de adquirir estas bacterias resistentes a antibióticos por parte de la población humana y complicar infecciones y tratamientos debido a esta problemática. Esta información resulta crucial para futuros estudios de resistencia en otros organismos marinos del sector, así como también detectar este tipo de bacterias en el agua de los ríos y sus afluentes, donde las actividades recreacionales son comunes en esta ciudad.

Palabras clave: Lobo marino común, *Otaria flavescens*, ESBL, resistencia antibiótica.

2. SUMMARY

CHARACTERIZATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE PRODUCING ENTEROBACTERIA IN FECES OF SOUTH AMERICAN SEA LION (*Otaria flavescens*) IN AN URBAN COLONY FROM THE LOS RÍOS REGION, CHILE

The bacterial antibiotic resistance is a public health problem in the world, mostly due to the infections and health issues that leads to consequences such as hospitalizations, work absences, and expensive and longer therapies. From the most commonly used drugs for the treatment of infections beta lactam antibiotics are the choice, and subsequently, the production of beta lactamase enzymes are the most common resistance mechanism, specially used by enterobacterias.

The interaction between wild animals and humans facilitates the microorganism transfer from terrestrial environments to marine ecosystems and vice versa, particularly from bacteria with potential antibiotic resistance, directly affecting public health. The actual project used the South American sea lion (*Otaria flavescens* Shaw 1800) from an urban colony from Valdivia – Chile as an animal model to characterize extended spectrum betalactamase enterobacterias (ESBL).

Thirty fecal samples from South American sea lions were collected from a platform and its surroundings in Valdivia. Samples were obtained in sterile 100 ml plastic collection flasks to be processed at the Animal Pathology Institute from the Universidad Austral de Chile. The bacteria isolation was made in an ESBL agar (Oxoid Brilliance ESBL Agar) to later identify bacterial colonies, DNA extraction and to characterize the main genes that encode for extended spectrum betalactamases such as TEM, OXA, SHV and CTX-M through a PCR Simplex.

As a result, from the total of samples, 73% were positive to the bacterial colonies growth in ESBL agar, isolating mostly *Escherichia coli*. From the 22 samples that were positive to the isolation, 68% showed presence of betalactamase genes, being SHV the most common isolated enzyme with 46%, followed by CTX-M (32%) and OXA (23%).

The present study confirms the presence of ESBL bacteria in most of the fecal samples collected from this South American sea lion colony. In addition, enzymes that give resistance to these bacteria were identified in this project. Furthermore, potential contamination sources were also recognized, increasing the risk of acquiring these antibiotic resistant bacteria by the human population and complicate infections and treatments due to this mechanism. This information is crucial for future antibiotic resistance studies in other marine species from this area, as well as to detect this kind of bacteria in the water from the rivers and its tributaries, where nautical sports are common in this city.

Key words: South American sea lion, *Otaria flavescens*, ESBL, antibiotic resistance.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. RESISTENCIA BACTERIANA COMO UN TEMA DE SALUD PÚBLICA

La aparición de resistencia a antimicrobianos por parte de las bacterias zoonóticas es un problema para la salud pública a nivel mundial, que involucra un componente médico, social, económico y ético, dado a que las infecciones producidas por estas bacterias traen como consecuencia prolongadas hospitalizaciones, ausencia laboral y terapias con antibióticos más costosos, lo cual afecta a toda la sociedad (Cabello 2004). Gran parte de la resistencia bacteriana observada en medicina humana se atribuye a distintos factores, entre los cuales destacan la excesiva prescripción de medicamentos por médicos humanos, el gran consumo de antibióticos por parte de la población humana, y el uso inadecuado de antimicrobianos en animales, pudiendo este último seleccionar patógenos resistentes con el potencial de ser transmitidos a las personas a través de los alimentos (Lillo 2014). Por lo tanto, la aparición de resistencia a antibióticos en bacterias, además de ser un problema biológico, es sin lugar a dudas un problema de salud pública, dado que las infecciones producidas por estas bacterias resistentes a los antibióticos causan enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad (Cabello 2004).

Las proyecciones económicas por días de trabajo perdidos por estas infecciones, debido a su alta morbilidad y mortalidad, por sus prolongadas hospitalizaciones, y porque su tratamiento generalmente requiere del uso de antibióticos más costosos, afectan a toda la sociedad. Según cifras provenientes de EEUU, las infecciones por Enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación se acompañan de un aumento de 30% en los días de hospitalización, el tratamiento cuesta 30.000 dólares más, y duplican su mortalidad de 13% a 26% (Cabello 2004).

En cuanto al uso veterinario de fármacos, se sugiere que se genera una selección de bacterias resistentes posiblemente por la utilización de antibióticos profilácticos en lo que comúnmente consumen los animales, vale decir, en su alimento y en el agua (Allen 2010). Considerando también que los animales que viven con los humanos, incluyendo a los domésticos como gatos y perros, son reservorios de bacterias resistentes debido al uso de fármacos para enfermedades y al mismo contacto con bacterias portadas por humanos. Los antibióticos de ambas fuentes, tanto urbana como agrícola, persisten en ambientes terrestres y acuáticos; y esta presión de selección aplicada por los antibióticos que se utilizan, ha promovido la evolución y la propagación de los genes que confieren resistencia, independientemente de su origen (Allen 2010).

El uso prudente de los antibióticos en los seres humanos exige que los médicos establezcan que una infección bacteriana es responsable de los síntomas del paciente antes de que se dé una prescripción de antibióticos por escrita (Allen 2010). Se debe considerar el modo de empleo de un determinado agente antimicrobiano, la dosis utilizada, la vía de administración y la duración de la terapia. También se debe considerar el espectro de antibióticos que se está utilizando (amplio reducido). Todas estas variables inciden en el desarrollo o selección de resistencia (García 2003).

3.2. RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana a los productos antimicrobianos responde a un fenómeno natural resultado de la evolución y se define como aquella que es capaz de multiplicarse en presencia de concentraciones mayores que las alcanzadas con dosis terapéuticas (García 2003). Su principal consecuencia se debe a que conduce a la falla terapéutica y se hace aún mayor cuando un microorganismo es multiresistente o cuando tiene la facultad de transmitir la resistencia a bacterias de especies distintas (Lillo 2014). Los antibióticos y los genes de resistencia han sido ampliamente distribuidos en el medio ambiente desde antes de la introducción de las quimioterapias antibióticas, pero las actividades humanas han aumentado la prevalencia de bacterias resistentes en el aire y agua (Allen 2010).

Existen múltiples mecanismos de resistencia a antimicrobianos, dentro de los cuales se encuentran: disminución de la permeabilidad de la membrana externa o interna, a través de la expresión de proteínas de membrana llamadas porinas o presencia de bombas de eflujo, enzimas que inactivan a los antimicrobianos, hidrolizando o modificando su estructura, alterando la molécula blanco o mediante vías metabólicas alternativas (Davies & Davies 2010).

La resistencia a los antimicrobianos no sólo implica a bacterias patógenas, sino también a bacterias comensales que pueden actuar como un gran reservorio de genes de resistencia. Esta puede transferirse a través de distintos elementos genéticos, siendo uno de ellos los plásmidos, elementos extracromosómicos no esenciales para la bacteria que a menudo portan genes que confieren ciertas características como son resistencia, virulencia, persistencia a condiciones extremas, etc. Lo que facilita una rápida propagación en el entorno y en los ecosistemas naturales (Beceiro y col 2012). Existe evidencia de la transmisión de elementos de resistencia a las bacterias de humanos, tanto comensales como patógenas, y la transferencia de genes en la microbiota intestinal humana es extensa (Allen 2010).

En general, todos los mecanismos de resistencia pre-existen o se modifican en la naturaleza, ya sea por transferencia de genes de resistencia o por mutaciones, que pueden localizarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos. Por eso se puede suponer que los antibióticos tendrán actividad por un tiempo limitado, según la presión selectiva que este antibiótico ejerza sobre la población bacteriana. La presión selectiva resulta de la administración de un antibiótico que inhibe el crecimiento de microorganismos susceptibles, pero selecciona cepas resistentes (naturales o adquiridas) al antibiótico (García 2003; Allen 2010).

3.3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

Dentro de los fármacos más utilizados y comunes para el tratamiento de infecciones bacterianas se encuentran los Antibióticos Betalactámicos. Es por esto mismo que su excesivo uso es causa de una destacada resistencia para bacterias Gram Negativas en todo el mundo (Shaick y col 2015).

La resistencia a antibióticos betalactámicos es un problema en aumento y la producción de betalactamasa es el mecanismo más común de resistencia a los medicamentos especialmente en bacilos Gram negativos (Dallenne 2009). Entre ellos, las Enzimas Betalactamasas de Espectro Extendido (ESBL) son de gran preocupación por su marcada diversidad debido a su continua mutación. Es así como estas enzimas se han reportado en todo el mundo y más frecuentemente en la familia enterobacteriaceae (Dallenne 2009). Las ESBL se definen como enzimas capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación haciéndoles perder su efectividad, pero que pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico. Estos genes de resistencia ESBL se codifican en elementos genéticos libremente transmisibles, lo que además aumenta en gran medida el riesgo de propagación a otros organismos¹.

En cuanto a la familia Enterobacteriaceae, se ha convertido en una de las causas más importantes de infecciones adquiridas en la comunidad. Las principales opciones terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones son los antibióticos betalactámicos (principalmente penicilinas de amplio espectro y cefalosporinas). La falta de opciones de tratamiento combinado con el carácter transmisible de los mecanismos de resistencia de ESBL y la alarmante tasa a la que se han propagado, resultan en una amenaza significativa para la salud pública mundial. Entre las enterobacterias más comunes que presentan resistencia se encuentra *Escherichia coli*, que corresponde a un bacilo Gram negativo, oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que forma parte de la flora normal del sistema digestivo de los mamíferos, siendo la mayoría de las cepas de carácter comensal (Vidal y col 2005) y es capaz de colonizar vegetales, suelo y agua, lo que potencia la diseminación a sus diversos hospederos. Posee cepas igualmente patógenas para los mamíferos, incluyendo al humano (Rodríguez-Ángeles 2002; Chávez y col 2007; González y col 2010).

3.4. PRINCIPALES BETALACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO

Las ESBL son enzimas que hidrolizan todos los betalactámicos incluyendo aztreonam, por lo cual una cepa productora de estas enzimas, se debe considerar resistente a todos los betalactámicos. Éstas enzimas betalactamasas de amplio espectro poseen mutaciones puntuales que ocasionan cambio en un aminoácido, produciendo una modificación en el punto isoelectrico de la enzima y con ello la capacidad de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación y aztreonam; sin embargo la expansión del sitio activo de la enzima también le confiere aumento en la susceptibilidad a los inhibidores de betalactamasas (García 2003). ESBL se clasifican en varios grupos de acuerdo con su homología de secuencia de aminoácidos: SHV, TEM, CTX y OXA (Shaikh y col 2015).

Dentro de las principales variantes genéticas de betalactamasas producida por enterobacterias se encuentra la familia SHV. A la fecha se han descrito más de 25 ESBL derivadas de la familia SHV, la cual se encuentra universalmente en *Klebsiella pneumoniae*. SHV-1 siendo la principal, confiere resistencia a las penicilinas de amplio espectro como la ampicilina, piperacilina y tigeciclina. Ésta

¹ Brilliance™ ESBL; Thermo Scientific

enzima es responsable de hasta el 20% de la resistencia a la ampicilina mediada por plásmidos en las especies de *K. pneumoniae* (Shaikh y col 2015).

La familia TEM fue t5 primeramente en *E. coli*, teniendo perfiles de sustrato e inhibición similares a SHV-1. TEM-1 es capaz de hidrolizar las penicilinas y cefalosporinas de primera generación. TEM-3 fue la primera variante reportada de TEM, que presentaba aumento de actividad frente a cefalosporinas de espectro extendido, siendo esta variante la primera del tipo TEM que muestra el fenotipo ESBL (Shaikh y col 2015).

El grupo CTX, corresponde a una nueva familia de beta-lactamasa que surgió, se ha encontrado principalmente en cepas de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* y *E. coli* principalmente. Esta enzima, no está relacionada con las enzimas anteriormente nombradas. Posee una rápida hidrólisis de cefotaxima que la caracteriza, y son inhibidas eficientemente por tazobactam beta-lactamasa. Se cree que se originó en los genes cromosómicos ESBL encontrados en *Kluyvera spp.*, patógeno oportunista perteneciente a la familia de las enterobacterias encontrado en el medio ambiente. Basándose en la secuencia de aminoácidos se dividen en cinco grupos (Grupo CTX-M 1, 2, 8, 9 y 25). Confieren resistencia a cefalotina o cefaloridina mejor que bencilpenicilina, e hidroliza la cefotaxima mejor que ceftazidima (Shaikh y col 2015)

La familia OXA, es producida principalmente en *Pasteurella aeruginosa*, pero se han detectado en otras enterobacterias, como es el caso de la variante genética OXA-1, siendo la OXA betalactamasa más común, se ha encontrado en 1-10% en *E. coli*. Se caracterizan por sus capacidades de hidrolizar oxacilina. Poseen velocidades de hidrólisis para oxacilina y cloxacilina, 50% más que bencilpenicilina (Shaikh y col 2015).

El método molecular usado comúnmente es la amplificación por PCR de los genes blaTEM y blaSHV con partidores de oligonucleótidos, seguido por secuenciación (Shaikh y col 2015).

3.5. TRANSMISIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES EN ANIMALES

Los animales salvajes proporcionan un mecanismo biológico para la propagación de genes de resistencia a antibióticos. Las proximidades a las actividades humanas influyen en los perfiles de resistencia antibiótica de las bacterias del intestino de los mamíferos salvajes, que viven en hábitats microbianos densamente poblados (Allen 2010). Por lo que la identificación de este tipo de resistencia en la microbiota de animales silvestres provee crucial información para el manejo de enfermedades (Delpont y col 2015). De modo que resulta de suma importancia el estudio de la existencia de resistencia bacteriana en cualquier reservorio de vida silvestre, y más aún si poseen un estrecho contacto con la población humana (Allen 2010).

De este modo, se propuso como modelo de estudio al Lobo Marino común (*Otaria flavescens*, Shaw 1800), para poder observar la presencia/ausencia de bacterias resistentes a betalactámicos en un medio silvestre/natural. Debido a que es considerado un bioindicador u organismo centinela por su vida prolongada, su posición en lo alto de la cadena alimentaria y abundante tejido adiposo, que alertan de manera temprana potenciales amenazas contaminantes o por el hallazgo microscópico

de agentes entero-patógenos bacterianos o parasitarios, que estén afectando al medio ambiente acuático en donde estos se encuentran (Pedraza 2011).

Otaria flavescens corresponde a uno de los cinco otáridos presentes en Chile. Está ampliamente distribuido en la costa del pacífico desde el norte de Perú al sur, hasta el cabo de hornos, y desde allí por la costa del atlántico hasta el sur de Brasil, casi de forma continua. También se encuentran en las Islas Malvinas. En el lado Pacífico, la distribución más al norte es hasta Isla Lobos, cercana al continente (6°26'S, Perú), mientras que en el lado Atlántico es la Isla de Lobos, en la costa Uruguay (Campagna 2014).

La dieta del lobo marino común incluye peces, crustáceos y moluscos, y está determinada por la oferta ambiental, siendo en consecuencia, variable de un sector a otro. Las áreas de alimentación de los adultos de esta especie son fundamentalmente costeras, siendo poco frecuente su avistamiento más allá de 50 millas desde la costa. Ello explica la fuerte interacción competitiva que ciertos ejemplares de la especie ejercen sobre la actividad humana en la franja costera. Por esta razón los pinnípedos, y en especial los otáridos, son los más sensibles a las actividades humanas, debido a su prolongada vinculación a tierra por sus largos períodos de lactancia incrementa la vulnerabilidad a los depredadores, incluido el hombre (Bowen y col 2009).

Este estudio se realizó en una colonia urbana específica de lobo marino común, ubicada en la zona costera de la ciudad de Valdivia, cuya llegada se ha documentado desde 1976, comportamiento que obedecería a la búsqueda de alimento (Schlatter 1976). Los integrantes de esta colonia de lobos marinos situada en el río Valdivia se han adaptado a este ecosistema aprovechando las actividades humanas que ahí se desarrollan (venta de productos del mar), permitiéndoles obtener alimentos de una manera fácil, lo que explicaría la permanencia de los animales en el lugar, la cercanía con los alimentos que se comercian, y personas que frecuentan la zona.

3.6. OBJETIVOS GENERALES

Caracterizar enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) en heces de lobo marino común (*Otaria flavescens*) en una colonia urbana costera de la ciudad de Valdivia, Región de los Ríos, Chile.

3.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar enterobacterias productoras de ESBL de muestras de heces de lobo marino común (*O. flavescens*).
- Identificar genes de resistencia a antimicrobianos en las cepas de enterobacterias productoras de ESBL.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material biológico y toma de muestras

Las muestras de heces frescas fueron recolectadas de una colonia de lobo marino común (*Otaria flavescens*) de aproximadamente 38 individuos, de los cuales la mayoría corresponden a ejemplares machos. Se encuentran en la comuna de Valdivia, en una plataforma ubicada en el río Valdivia (39°48'S, 73°14'W), acoplada a la costanera de la ciudad donde están en contacto directo con las actividades humanas debido al constante tránsito de personas, así como también la cercanía de la feria fluvial donde se comercializan productos del mar. Además, esta zona es de suma importancia turística para la región y en ella se realizan actividades de diferente índole como deporte náutico, pesca deportiva, entre otros, destacándose además su uso como fuente de provisión de agua potable.

La población urbana posee a su vez servicios de alcantarillado y de tratamiento de aguas servidas, de las cuales su cuerpo receptor corresponde al río Valdivia y sus afluentes. Cabe mencionar que este río pasa en su trayecto por las localidades de San José de la Mariquina, Punucapa y Valdivia y se une finalmente al río Valdivia que desemboca en el mar. El río Valdivia, por su parte, nace en la ciudad de Valdivia donde confluyen los ríos Calle-Calle y Cau-Cau, en el sureste de la Isla Teja. Luego fluye al sur de la isla y recibe las aguas del río Cruces para terminar en la Bahía de Corral, donde desemboca. En sus afluentes se encuentran en actividad cuatro salmoneras, siendo: Punta Chungungo, Morro Bonifacio, Punta Cárcamo y Punta Loncoyén (Informe País 2016).

Se recolectaron un total de 30 muestras de heces frescas (de 5 a 7 g cada una), directamente desde la plataforma y sus alrededores entre septiembre y octubre del año 2015. Fueron recolectadas en frascos de toma de muestra estériles redondeados, de boca ancha y de 100 ml, utilizando guantes y rotulando cada frasco con el número de muestra respectivo. Para ser trasladadas posteriormente al laboratorio de Inmunohistoquímica y Patología Molecular del Instituto de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

4.1.2. Preparación y análisis de muestras

Para la determinación de bacterias resistentes a antibióticos betalactámicos, se sembró en agar Brilliance ESB, para la detección de microorganismos productores de betalactamasa de amplio espectro (ESBL). Este medio proporciona la identificación presuntiva de grupos productores de ESB, como *E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, entre otros. Posee enzimas capaces de hidrolizar

cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Su composición corresponde a: Peptona, Cloruro de sodio, Tampones de Fosfato, Mix cromogénico, Mix de antibióticos y Agar².

La diferenciación de los microorganismos productores de ESBL de mayor prevalencia sembrados en estas placas ESBL Brilliance agar es de fácil determinación, basada en la discriminación por color de las colonias bacterianas. Esto se consigue ya que este agar posee dos cromógenos que son sustratos específicos de dos enzimas: galactosidasa y glucuronidasa, por lo que de acuerdo a la enzima o combinación de enzimas que exprese la bacteria, será el color que tendrá la colonia (cuadro 1). En cuanto a *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* no utilizan ningún cromógeno, pero pueden desaminar el triptófano pudiendo también diferenciarse fácilmente.

Cuadro 1: Caracterización de colonias bacterianas crecidas en placas de agar ESBL Brilliance de acuerdo a su color, dependiendo de las enzimas que presente.

Bacterias	Enzimas expresadas	Color de colonia
<i>Escherichia coli</i>	Galactosidasa + glucuronidasa	Azul
	Galactosidasa negativo	Rosado
KESC (<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> y <i>Citrobacter</i>)	Galactosidasa positivo	Verde
<i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> y <i>Providencia</i>	-----	Halo marrón

4.1.3. Partidores

Siguiendo el protocolo de PCR propuesto y desarrollado por Dallene y col (2010), fueron utilizados 7 pares de partidores (Cuadro 2), correspondiente a los genes de resistencia que codifican betalactamasas más comúnmente encontradas, los cuales se presentan en el siguiente cuadro:

² BrillianceTM ESBL; Thermo Scientific

Cuadro 2: Grupos específicos de partidores propuestos y desarrollados por Dallene y col (2010) para detectar mediante PCR Simplex, genes betalactamasas de amplio espectro más frecuentes, su secuenciación y tamaño (pb) del producto amplificado.

Nombre PCR	Genes de betalactamasas	Secuencia	Tamaño (pb)
Grupo 1	Partidor 1	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC (for)	800
	Variantes de TEM incluyendo TEM-1 y TEM-2	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC (rev)	
	Partidor 2	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC (for)	713
	Variantes de SHV incluyendo SHV-1	ATCCCGCAGATAAATCACCAC (rev)	
	Partidor 3	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG (for)	564
	OXA-1, OXA-4 y OXA-30	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG (rev)	
Grupo 2	Partidor 4	TTAGGAARTGTGCCGCTGYAb (for)	688
	Variantes de CTX-M grupo 1 incluyendo CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-15	CGATATCGTTGGTGGTRCCATb (rev)	
	Partidor 5	CGTTAACGGCACGATGAC (for)	404
	Variantes de CTX-M grupo 2 incluyendo CTX-M-2	CGATATCGTTGGTGGTRCCATb (rev)	
	Partidor 6	TCAAGCCTGCCGATCTGGT (for)	561
	Variantes de CTX-M grupo 9 incluyendo CTX-M-9 y CTX-M-14, CTX-M-9 y CTX-M-14	TGATTCTCGCCGCTGAAG (rev)	
Grupo 3	Partidor 7	AACRCRCAGACGCTCTACb (for)	326
	CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26 y CTX-M-39 a CTX-M-41	TCGAGCCGGAASGTGTYATb (rev)	

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Aislamiento de Enterobacterias ESBL

Luego de recolectada la muestra, se dispone la muestra fecal en un tubo Falcon con medio enriquecido Brain Heart Infusion (BHI) en proporción de 10:1 (10 ml del medio por 1 g de la muestra), todo esto realizado en la campana de flujo laminar en condiciones estériles. Se dejaron incubar a 37°C por 24 horas.

Posteriormente se sembró la muestra enriquecida en la placa con agar ESBL Brilliance Agar, dividiéndose ésta en cuatro, y sembrando en cada cuarto. Se dejó en incubación 24 - 48 hrs a 37°C y se procedió a caracterizar las colonias crecidas de acuerdo a su color.

Bajo mechero, se procedió a retirar con un asa estéril una colonia en particular, y se depositó en un eppendorf con medio enriquecedor BHI + 20% glicerol en donde se favorece el crecimiento bacteriano 24 hrs. a 37°C. Posterior a este periodo se almacena a -80°C, quedando como respaldo biológico.

4.2.2. Identificación de genes de resistencia a antimicrobianos

4.2.2.1. Extracción de ADN. Este procedimiento se realizó bajo las indicaciones del fabricante, utilizando el protocolo de extracción de ADN bacteriano (E.Z.N.A #D3396-02, OMEGA). Se deja creciendo el stock guardado en glicerol a -80°C, 250 µl en 5 ml de caldo durante 1 día y medio. Una vez obtenido un sedimento bacteriano robusto, se prosigue con el protocolo sugerido por el distribuidor del kit de extracción de ADN bacteriano. Se comienza centrifugando los tubos de 15 ml a 4000 g x 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó dos veces con PBS1X estéril. Luego se le adiciona 25 µl de solución proteasa OB y 220 µl de buffer BL al pellet obtenido anteriormente. Se dejó incubando a 85°C por 1 h y se mezcla en el vortex. Posteriormente, se agregaron 220 µl de etanol 100% y se mezcló con el vortex.

Se inserta una columna de ADN en un tubo de filtro y colección de 2 ml donde se dispuso la mezcla hecha anteriormente y se centrifuga a velocidad máxima (> 10000 x g) por 1.30 min. Se descartó el filtrado, y se reutilizó el tubo de colección, agregando 500 µl de buffer HBC. Posterior a esto, se centrifugó el filtrado a máxima velocidad por 1 min, se descartó el filtrado y el tubo de colección. Se insertó la columna dentro de un nuevo tubo de colección, adicionando 700 µl de buffer de lavado de ADN, se centrifugó a máxima velocidad por 1 min. Se volvió a descartar el filtrado y se reutilizó el tubo de colección. Se reinsertó la columna dentro de un nuevo tubo de colección, adicionándole 700 µl de buffer de lavado de ADN, y se repite la centrifugación a máxima velocidad por 1 min.

Se centrifugó la columna a máxima velocidad por 2 min para secar la columna. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo libre de nucleasa de 1,5 ml y se agregaron 30 µl de buffer de elución precalentado a 70°C, se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se

centrifugó a máxima velocidad por 1 min y se le agregó nuevamente 30 μ l de buffer de elución precalentado a 70°C, se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min. Se procedió a cuantificar ADN y guardar a -20°C.

4.2.2.2. Protocolo de PCR. El ADN obtenido a partir del protocolo de extracción y purificación, fueron utilizados para la detección de genes de resistencia a antimicrobianos mediante PCR convencional. La mezcla utilizada para la ampliación se estandarizó en base a la literatura según Dallene y col (2010).

Se realizó un PCR convencional probando cada par de partidores de forma individual para la identificación de los genes de resistencia bacteriana más comunes expuestos anteriormente en la tabla 1. La reacción fue realizada utilizando el DNA polimerasa GoTaq Green 2x Master Mix (Reacción buffer (pH 8.5), 400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP y 3 mM MgCl₂). El ensayo de PCR se realizó con un volumen final de 25 μ l conteniendo: 12,5 μ l de este buffer, 0,5 μ l de cada partidador y 9,5 μ l de agua libre de nucleasas, haciendo un volumen final de 23 μ l, a los cuales se le adiciona 2 μ l de cada DNA bacteriano anteriormente extraído.

La amplificación realizada en el termociclador se desencadenó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos; 30 ciclos de 94°C por 40s, 60°C por 40s y 72°C por 1 minuto; y una etapa de elongación final a 72°C por 7 minutos.

Una vez terminado el PCR los productos fueron procesados mediante electroforesis, separados en geles de agarosa al 2% teñidos con Gel Red. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 1h 30min. Terminado este procedimiento se visualizaron los resultados mediante un trans-iluminador.

4.3. ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de los datos recopilados durante el estudio, fue utilizada como base de datos el programa Microsoft Office Excel®, donde se construyó una planilla electrónica. En esta base de datos se almacenó información del crecimiento de cultivos (Considerando cantidad, características y porcentaje de colonias crecidas), así como también una tabla donde se almacenaba información sobre los resultados del PCR realizado para cada muestra, y los genes de resistencia para los que reaccionaron.

Luego de almacenar los datos en estas planillas, se procedió a realizar análisis descriptivo, donde se calcularon porcentajes y frecuencias para cada ítem, representando los resultados en tablas y gráficos.

5. RESULTADOS

5.1. AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS ESBL

5.1.1. Resultados de cultivos

En 22 de las 30 muestras (73%) mostraron resultados positivos, con la formación de una o más colonias de bacterias. Lo que respecta a las 8 muestras restantes (27%) no presentaron crecimiento de colonias.

De las 22 muestras que presentaron crecimiento de colonias, 5 de ellas presentaron crecimiento de dos tipos de colonias, diferenciándose por el color de éstas (Figura 1). Entre los resultados obtenidos de las colonias crecidas, se obtuvieron colonias azules, rosadas y verdes, correspondiendo al 86%, 18% y 5% de los casos, respectivamente (Figura 2)

Cabe mencionar, que hubo placas de cultivo en las que el crecimiento no se logró definir como colonias, sino que hubo un manchado difuso de un color azulado en 5 de las muestras (M8, M13, M14, M15 y M16), las cuales fueron igualmente consideradas dentro del estudio (Figura 1-D).

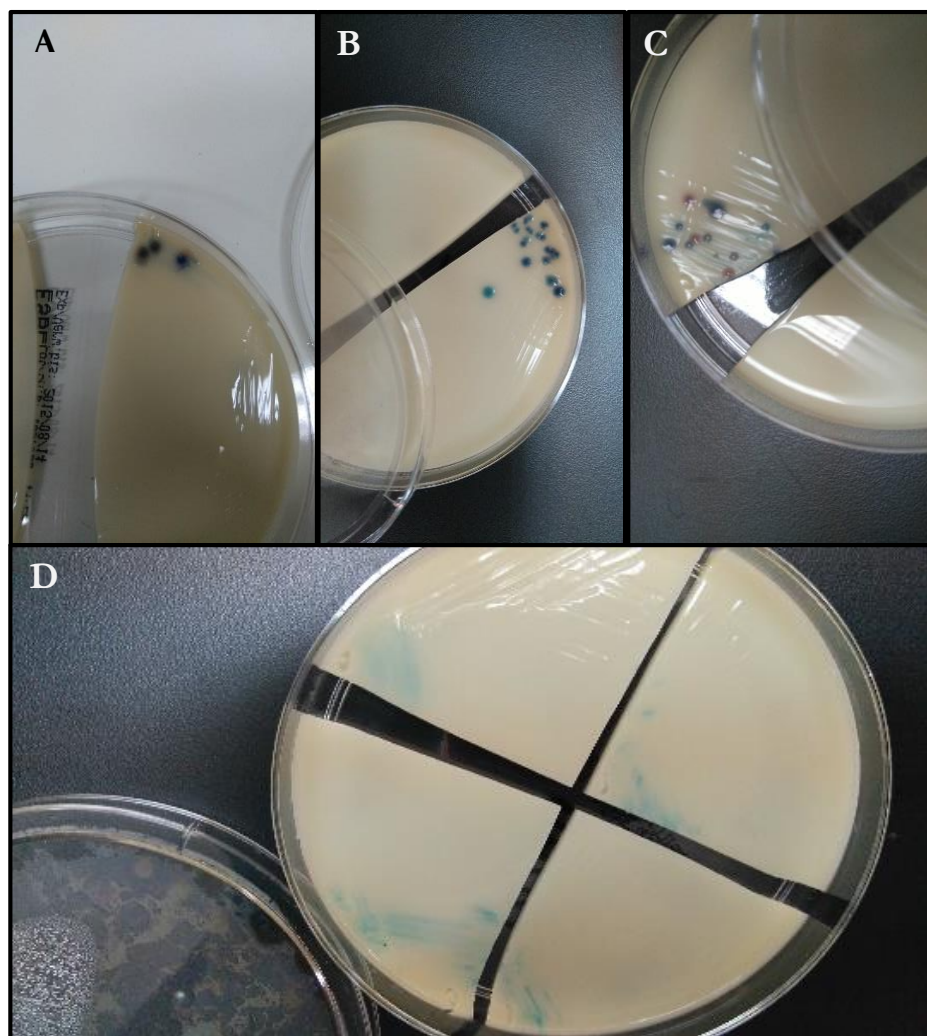


Figura 1. Resultados siembra en geles Agar ESLB Brilliance, específicos para el crecimiento de colonias de bacterias ESBL, de muestras de heces de lobo marino común de la ciudad de Valdivia. A) Colonias bacterianas crecidas en muestra 2, de un color marrón, correspondiendo presuntivamente a *Proteus*, *Morganella* y/o *Providencia*. B) Colonias bacterianas crecidas en Muestra 12, presentando colores azul y rosado, pudiendo ser *E. coli*. C) Colonias bacterianas crecidas en Muestra 19, presentado colores azules, y una colonia verde, pudiendo ser presuntivamente colonias de *E. coli*, y una de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y/o *Citrobacter*. D) Manchado de colonias bacterianas crecidas en muestras 13, 14, 15 y 16, las cuales presentan un color azulado, pudiendo corresponder presuntivamente a colonias de *E. coli*.

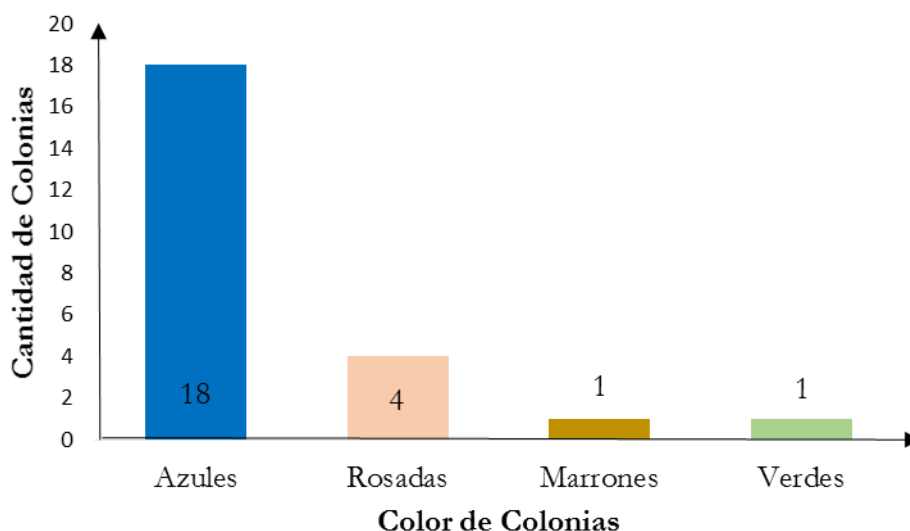


Figura 2. Gráfico que indica la cantidad de muestras diferenciándose por el tipo de color de colonias, aisladas mediante la siembra en agar ESBL Brilliance, correspondiendo las colonias azules y rosadas presuntivamente a *E. coli*, colonias marrones a *Proteus*, *Morganella* o *Providencia* y las colonias verdes a *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y/o *Citrobacter*. Estas muestras fueron aisladas de heces de lobo marino común ubicados en río Valdivia y sus afluentes, en el periodo entre septiembre y octubre de 2015.

5.2. IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPALES GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

5.2.1. Resultados de PCR

Luego de extraído el DNA, mediante el procedimiento antes mencionado, se realizó PCR a las 22 muestras con los 7 partidores, viéndose los resultados posteriormente por medio de electroforesis (Anexo 1). 15 de las muestras fueron reaccionantes a genes de resistencia bacteriana, correspondiendo al 68% del total de las muestras, siendo las muestras M4, M8, M12(ROS), M12 (AZU), M15, M17 (AZU), M19 (VER), M20, M21, M22, M23, M25, M26 (ROS), M26(AZU) y M29. De las cuales, el 46% reaccionó al partidor 2, correspondiendo a los genes SHV, seguido por el 23% de las muestras que reaccionaron para el partidor 3 (gen OXA), luego el 23% para el partidor 4 (correspondiente al gen CTX-M del grupo 1: CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-15) seguido por el 9% que reaccionaron al partidor 5 (Gen CTX-M del grupo 2: CTX-M-2), como se visualiza en la Figura 3.

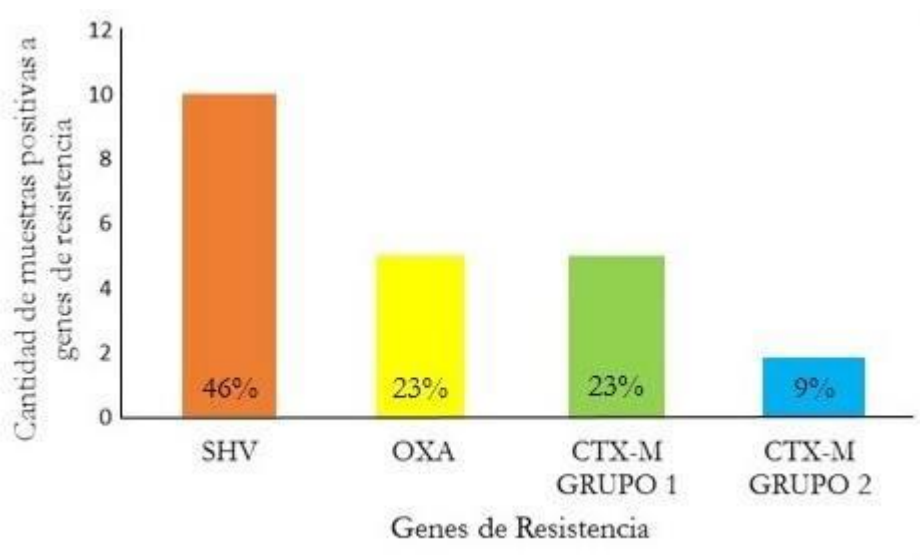


Figura 3. Porcentaje de muestras reaccionantes para genes de resistencia que codifican betalactamasas ESB de amplio espectro más comunes, en relación al total de muestras reaccionantes para genes de resistencia bacteriana, como son SHV, OXA, CTX-M-Grupo 1 (CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-15) y CTX-M-Grupo 2 (CTX-M-2). Identificadas de colonias bacterianas aisladas de heces de lobo marino común ubicados en los afluentes del río Valdivia, Chile.

Lo que respecta a los partidores 1 (gen TEM), partidor 6 (CTX-M grupo 9) y partidor 7 (Genes CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39 a CTX-M-41), no reaccionaron con ninguna de las muestras (Los resultados de los PCR se encuentran en el Anexo 2).

Cabe mencionar también, que 6 muestras presentaron reacción para más de un partidor, correspondiendo al 27% de las muestras reaccionantes, las cuales fueron M19 (VER), M20, M21, M23, M26 (AZU) y M29. De las cuales M19 (VER) mostró resultados reaccionantes para partidor 3 y 4 (OXA y CTX-M del grupo 1), M20 para partidor 2 y 5 (SHV y CTX-M del grupo 2), M21, M23 y M26 mostraron resultados reaccionantes para partidor 2 y 3 (SHV y OXA) y para el caso exclusivo de la muestra 29 presentó reacción para 3 partidores, partidor 2, 3 y 5 (SHV, OXA y CTX-M del grupo 2).

6. DISCUSIÓN

La microbiota intestinal de los animales silvestres rara vez se ha examinado para el transporte de genes de resistencia a antibióticos (Chomel y col 2007). En el presente estudio se caracterizaron bacterias que poseen resistencia a antibióticos betalactámicos, considerando tanto patógenas como comensales.

A partir del cultivo y siembra de heces de lobo marino se obtuvieron principalmente colonias de *E. coli*, mientras que en el estudio de González-Fuentes y col (2010) fue *Edwardsiella tarda* la bacteria más abundante, seguida posteriormente por *E. coli*, a partir de la misma población de lobos marinos. La presencia de *E. coli* podría asociarse más a animales en cautiverio o en directo contacto con las poblaciones humanas, como se mencionó en el estudio de Delport y col (2014), donde se encontró mayor prevalencia de *E. coli* en leones marinos australianos, *Neophoca cinerea*, en cautiverio, lo que sugiere que esta bacteria no es dominante en la microbiota intestinal natural de especies silvestres, debido a: 1) la presencia del ser humano va de la mano con la contaminación de los cuerpos de agua adyacentes, al ser estos el receptor de las aguas residuales cargadas de enterobacterias (Salinas y col. 2010). 2) *E. coli* se caracteriza por ser un microorganismo versátil en lo que respecta a su supervivencia, debido a que podemos encontrarla en la microbiota de los mamíferos como en el medio ambiente, solo que en este último logra sobrevivir periodos cortos hasta encontrar un nuevo hospedero. (Rodríguez-Angeles 2002; Chávez y col 2007).

El impacto de *E. coli* en la salud se genera por cepas patógenas capaces de producir cuadros diarreicos agudos y graves, tanto en humanos como en el resto de los mamíferos, estos adquiridos por el contacto con aguas y alimentos contaminados. Se pueden reconocer al menos 6 cepas de *E. coli* de carácter patógeno, teniendo la particularidad de ser bacterias oportunistas (Rodríguez-Angeles 2002; Salinas y col. 2010). Es importante considerar también que pueden actuar como reservorios, incluyendo así la transmisión y diseminación de genes de resistencia a antibióticos en el medio, como puede ser en este caso.

El lobo marino, *Otaria flavescens* tiene por hábitat natural las aguas superficiales, las que podrían ser una fuente importante de obtención de microorganismos resistentes y patógenos, ya que están en constante exposición a cuerpos de agua potencialmente contaminados (o al menos intervenidos). Según el estudio de Delport y col (2014), quien trabajó con dos poblaciones de *N. cinerea* (una en cautiverio y otra de vida silvestre) solo encontró *E. coli* con genes de resistencia en aquella que tenía mayor contacto con humanos, vale decir, la que estaba en cautiverio. Esto es una evidencia importante que expone que las poblaciones humanas alteran el medio ambiente a favor de la resistencia bacteriana. Si bien en el presente estudio los animales no fueron criados en cautiverio, estos se ven sometidos a una fuerte presión antrópica, dado a que se ubican en la misma ciudad. Estos son alimentados diariamente con restos de productos marinos provenientes de la feria fluvial característica del lugar, habitando también en un río alterado biológicamente al ser el receptor de las aguas residuales proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de Aguas Décimas.

Además de eso, habría que sumarle la cercanía que presentan a la propia actividad de los transeúntes y perros que frecuentan la zona.

El río Valdivia y sus afluentes es categorizada como zona de protección litoral en relación a su calidad sanitaria, debido al uso recreacional que poseen sus aguas, así como a la ayuda para la conservación de los cientos de especies que componen su fauna acuática. De este modo, al servir este río como cuerpo receptor de la Planta de Tratamiento de aguas residuales, cuenta con un tratamiento primario con desinfección que posee parámetros que el efluente debe cumplir, donde para el cálculo del indicador utilizado se contempla *E. coli* (como coliformes totales y fecales), cuya norma de emisión es de 1.000 coliformes por 100 ml, estando esta planta dentro de los parámetros establecidos. Dentro de la cual la Empresa Aguas Décima se califica con un 99,20% como indicador anual de calidad de Tratamiento de aguas servidas para el año 2015 (Baraño 2004; SISS 2016). Contrastando esta información con el estudio efectuado por Salinas y col (2010), donde se encontraron altos índices de contaminación de coliformes fecales y coliformes totales en Bahía Iquique y sus alrededores, asociado a la actividad antropogénica del lugar y debido a que su planta de tratamientos descarga sus aguas residuales mediante emisarios submarinos, los cuales no están forzados a desinfectar, porque la norma de emisión fuera de la zona de protección litoral no establece un máximo de coliformes fecales (SISS 2016). Es así como, en los afluentes del río Valdivia se vierte una cantidad constante de *E. coli* (tanto patógenas como comensales) que a pesar del tratamiento efectuado en la planta de tratamiento de aguas servidas para nivelar la carga bacteriana, no se regula la presencia de bacterias que posean genes de resistencia a antibióticos. Por lo que se puede considerar como una fuente de obtención y diseminación al ambiente de Enterobacterias resistente a antibióticos, o específicamente bacterias productoras de betalactamasas de amplio espectro, a la que la población de lobo marino en estudio estaría constantemente expuesta.

Cabe mencionar también, que existen otras fuentes de obtención de bacterias resistentes a antibióticos en poblaciones animales, como lo es la acuicultura, debido a que en este sistema de producción el empleo de antibióticos como profilácticos es probablemente lo que comanda su consumo y uso en la industria. Las deficiencias sanitarias respecto de la calidad del agua de bebida y la disposición de excretas en este tipo de producciones, facilitan el tráfico de bacterias entre diversos nichos ecológicos y el flujo de información genética entre ellas, incluyendo la de los genes para la resistencia a antibióticos. Esto genera también cambios drásticos en el plancton de estos ambientes, y estos cambios pueden potencialmente favorecer el flujo de información genética entre diversas especies bacterianas presentes en ellos, facilitando la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos (Cabello 2004).

En cuanto a la industria acuícola chilena del salmón, para producir una tonelada de salmón, usa aproximadamente 75 veces más antibióticos, que la industria acuícola noruega. Con esto se ha demostrado que el uso industrial de antibióticos por este tipo de producciones, y no su uso en medicina humana, es el factor que probablemente más influencia y modula la evolución de la resistencia bacteriana a los antibióticos en Chile (Cabello 2004). Dicho esto, en esta ciudad existen por lo menos cuatro centros de cultivo de salmón, considerándose una fuente importante de genes de resistencia en los afluentes del río Valdivia, debido a que los antibióticos pueden estar presentes a cientos de metros de los centros de cultivo, permanecer en el ambiente por más de dos semanas, luego ser suministrados, y encontrarse en organismos que consumieron restos de alimentos con residuos de antibióticos, lo que podrían ser potencialmente depredados por individuos de la colonia en estudio (Buschmann 2001). También, se pueden diseminar a ambientes lejanos por medio de

aves silvestres migratorias, como lo dice Allen (2010), por lo que siempre el uso de antibióticos y sus consecuencias, como la resistencia, tendrán a lo largo del tiempo repercusiones en otros ambientes aparentemente lejanos. Sumándole a esto, está la capacidad que tiene *E. coli* de encontrarse en distintos ambientes y superficies, por lo que puede diseminarse fácilmente, aún más si afecta a especies migratorias.

En las bacterias aisladas en este estudio, aunque no se sabe si corresponden a bacterias comensales o no, se identificaron genes que codifican para enzimas betalactamasa de espectro extendido (ESBL). Estos genes, dominantes en la década de 1990, codificaban para ESBL tipo TEM y ESBL tipo SHV, pero durante la pasada década, una rápida y masiva propagación de ESBL tipo CTX-M fue descrita, siendo estas enzimas las ESBL más prevalentes en enterobacterias en Europa y en otras partes del mundo (Dallene y col 2009). En este caso, los principales genes detectados fueron para las enzimas SHV con un 46%, sugiriendo que este grupo de bacterias podrían conferir mayor resistencia a las penicilinas de amplio espectro como la ampicilina, piperacilina y tigeciclina (Shaikh y col 2015). En segundo lugar, en este estudio se identificó enzimas ESBL de tipo OXA, identificada con un 23 % del total de positivos, las bacterias que poseen estas enzimas son más resistentes a fármacos como cloxacilina y oxacilina (Shaikh y col 2015). También se encontraron genes ESBL de tipo CTX-M con un 28% que hidrolizan preferentemente cefotaxima, frecuente entre las especies de Enterobacteriaceae, encontrándose principalmente en *E. coli* (Shaikh y col 2015).

Esta presentación variada de los genes de resistencia que codificarían para betalactamasas de espectro extendido caracterizados en este estudio, indica la exposición directa a la que se encuentran estas Enterobacterias a un ambiente aparentemente contaminado, qué junto con los factores propios de la bacteria, aumentaría su capacidad de mutar y transferirse por medio de plásmidos a otras bacterias, facilitando su diseminación. Todo esto aumenta el riesgo de transmitir estas bacterias a la población humana, incrementando el porcentaje de fracasos en los tratamientos frente a infecciones comunes e intrahospitalarias, generando con ello pérdidas económicas considerables debido al difícil acceso al diagnóstico y porque el tratamiento exclusivo para este tipo de bacterias es de un elevado costo económico. En la década de los 90', solo en Estados Unidos se estimó que el gasto anual como consecuencia de la resistencia bacteriana era de 4 billones de dólares aproximadamente (File 1999).

Finalmente, estos resultados abren la puerta para futuros estudios que planteen el impacto sobre otras especies del entorno en la adquisición de genes de resistencia a antimicrobianos, incluyendo estudios más detallados hacia los productos marinos comercializados en la feria fluvial, el grado de contaminación que poseen y el traspaso de esta resistencia a otras especies del área. Adicionando también estudios comparativos con otras poblaciones de lobo marino situadas en zonas costeras alejadas de las actividades humanas, para determinar si existe transmisión de enterobacterias ESBL y en qué grado. Considerando también una posterior secuenciación de los productos de PCR obtenidos en este estudio, para la determinación del tipo de cepa de *E. coli*, si corresponde a cepas patógenas o no.

6.1. CONCLUSIONES

- 6.1.1.** Se aislaron enterobacterias ESBL de muestras de heces de lobo marino común (*Otaria flavescens*) mediante cultivo en placas, provenientes de una colonia urbana ubicada en la ciudad de Valdivia, Chile.
- 6.1.2.** Se identificaron genes de resistencia a antimicrobianos en las cepas de enterobacterias ESBL aisladas.

7. REFERENCIAS

- Allen HK, J Donato, HH Wang, KA Cloud-Hansen, J Davies, J Handelsman. 2010. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8, 251-259.
- Baraño P, Tapia L. 2004. Tratamiento de las Aguas Servidas: Situación de Chile. *Cienc Trab*. 13.
- Beceiro A, M Tomás, G Bou. 2012. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿Una asociación beneficiosa para el mundo antimicrobiano?. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30, 492-499.
- Bowen WD, CA Beck, DA Austin. 2009. Pinniped Ecology. En: Perrin WF, Würsing B, Thewissen JGM (eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. 2ª ed. Academic Press is an imprint of Elsevier, San Diego, California, USA, Pp 852-861.
- Cabello FC. 2004. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Rev Med Chile* 132, 1001-1006.
- Campagna, C. 2014. *Otaria byronia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T41665A61943000.
- Cappozzo HL, WP Perrin. 2009. South American Sea Lion (*Otaria flavescens*). En: Perrin WF, Würsing B, Thewissen JGM (eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. 2ª ed. Academic Press is an imprint of Elsevier, San Diego, California, USA, Pp 1076-1079.
- Chávez E, Martínez L, Cedillo M, Gil C, Avelino F y Castañeda E. 2007. Identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas en diferentes ambientes. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. Vol 27: n° 3.
- Chomel BB, A Belotto, FX Meslin. 2007. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg Infect Dis* 13, 6-11.
- Dallene C, A Da Costa, D Decré, C Favier, G Arlet. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemoth*, 490-495.
- Davies J, D Davies. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol R*. 74, 417-433.
- Delpont TC, RG Harcourt, LJ Beaumont, KN Webster, ML Power. 2015. Molecular detection of antibiotic-resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from the endangered australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *J Wildlife Dis* 51, 555-563.
- File T M. 1999. Overview of resistance in the 1990s. *Chest*, 115: S3-8.

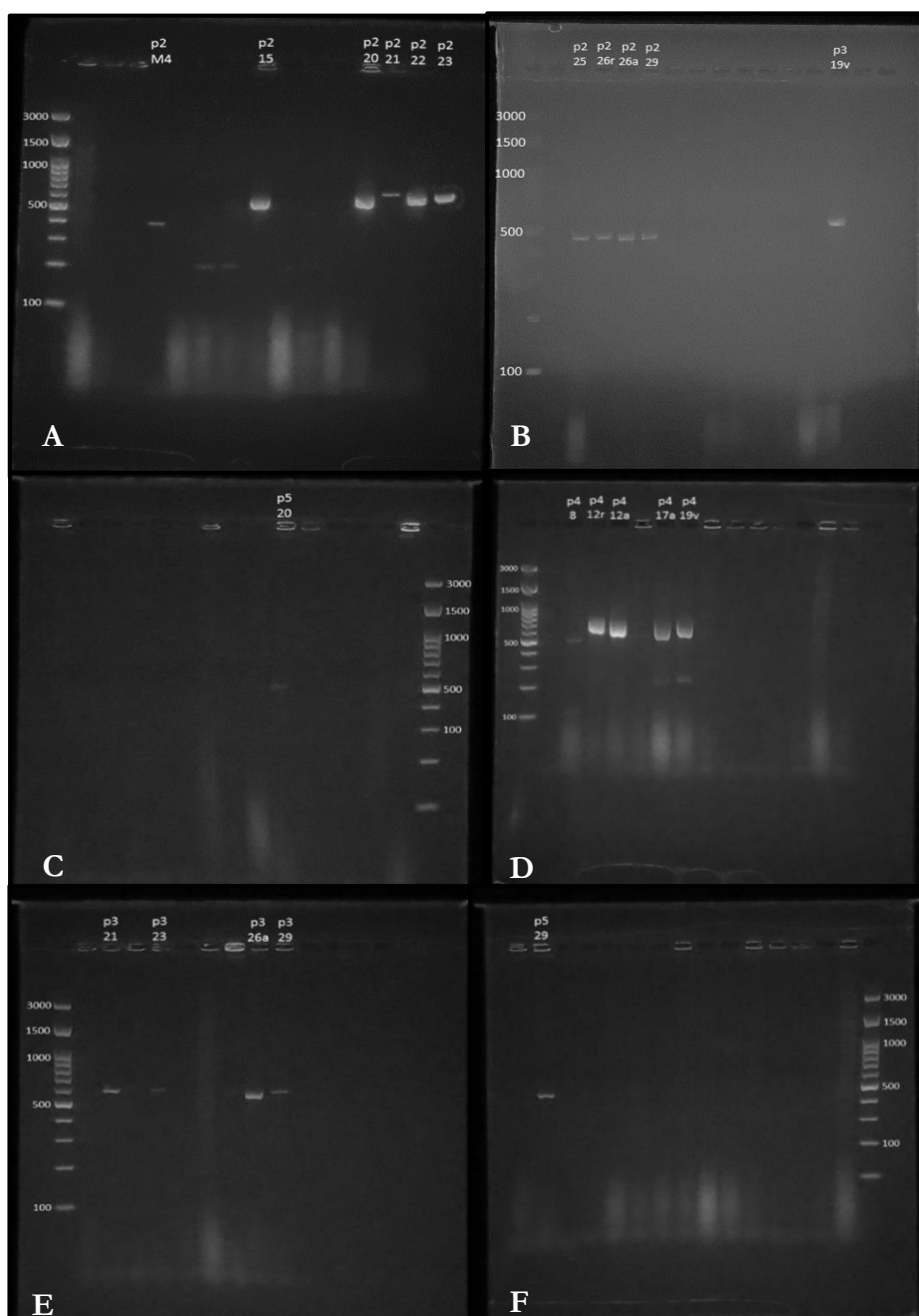
- García P. 2003. Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Rev Chilena Infectol.* Vol. 20 Suplemento 1.
- González CE. 2013. Detección de *Escherichia coli* diarreogénica en pinnípedos de Chile. *Memoria de título.* Escuela de Ciencias Veterinaria, Universidad de Chile, Chile.
- González M., F Latif, F Fernández, M Villanueva, J Ulloa, H Fernández. 2010. Especies de la familia Enterobacteriaceae en heces de lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en el Río Valdivia. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 45, 331-334.
- Informe País. 2016. Estado del Medio Ambiente en Chile. *Universidad de Chile, Instituto de Asuntos Públicos.*
- Lillo P. 2014. Resistencia a antibióticos en cepas de *Salmonella enterica* y su asociación con distintos hospederos en Chile. *Memoria de Título.* Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, Chile.
- Pedraza S. 2011. Impacto de las actividades humanas en el estado sanitario de focidos y otarios en la Península Antártica. *Ecosistemas* 20, 87-93.
- Rodriguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex.* vol.44, n° 3.
- Salinas Paula, Moraga R. Santander E, Sielfiel W. 2010 Presencia de cepas diarreogénicas en *Escherichia coli* y estudio de genes de virulencia en aislados desde fecas de dos poblaciones de lobo marino común., *Otaria flavescens* en el norte de Chile. *Revista de Rev Biol Mar Oceanogr.* 45(1): 153-158.
- Shaikh S, J Fatima, S Shakil, S Rizvi, M Kamal. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Bio Sci.* 22, 90-101.
- Schlatter R. 1976. Penetración del lobo marino común, *Otaria flavescens* Shaw 1800, en el río Valdivia y afluentes. *Medio Ambiente* 2, 86-90.
- Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS). 2016. Informe de Gestión del Sector Sanitario. Gobierno de Chile.
- Vidal M, E Kruger, C Duran, R Lagos, M Levine, V Prado, C Toro, R Vidal. 2005. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. *J Clin Microbiol.* 43, 5362-5365.

8. ANEXOS

- 8.1. ANEXO 1.** Muestras de heces de una colonia de lobo marino común ubicada en la ciudad de Valdivia, reaccionantes a través de PCR para la detección de genes de betalactamasas de amplio espectro. Se identificó con el signo (+) aquellas que presentaron reacción para la presencia de genes de resistencia que codifican betalactamasas de amplio espectro para cada una de las muestras positivas

N° muestra	Partidor 1	Partidor 2	Partidor 3	Partidor 4	Partidor 5	Partidor 6	Partidor 7	TOTAL positivos	Genes de betalactamasa
2 (azu)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	-
4 (azu)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	SHV
8 (azu)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	1	CTX-M-Grupo 1
12 (ros)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	1	CTX-M-Grupo 1
12 (azu)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	1	CTX-M-Grupo 1
13 (azu)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	-
14 (azu)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	-
15 (azu)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	SHV
16 (azu)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	-
17 (azu)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	1	CTX-M-Grupo 1
19 (azu)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	-
19 (ver)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	1	OXA Y CTX-M-Grupo 1
20 (azu)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	1	SHV Y CTX-M-Grupo 2
21 (azu)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	SHV Y OXA
22 (azu)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	SHV
23 (azu)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	SHV Y OXA
24 (ros)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	-
24 (azu)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	-
25 (azu)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	SHV
26 (ros)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	SHV
26 (azu)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	SHV Y OXA
29 (azu)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	1	SHV, OXA Y CTX-M-Grupo 2
TOTAL	22	0	10	5	5	2	0	15	

- 8.2. ANEXO 2.** Electroforesis de productos de PCR de genes betalactamasa ESBL identificados de colonias bacterianas aisladas de heces de lobo marino común, ubicados en los afluentes del río Valdivia. A) Bandas del gen 16S ARNr de enterobacterias reaccionantes al partidor 2 (enzimas SHV). B) Las primeras bandas son reaccionantes al partidor 2 (enzimas SHV) y la banda final indicaría la presencia de genes que codifican para las enzimas OXA. C) Única banda que indica presencia de genes de resistencia para enzimas CTX-M. D), E) y F) Bandas que indicarían la presencia de genes de resistencia para enzimas CTX-M.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi papá Robinson Jara, a mi mamá Ana Astorga y a mi hermano Pablo Jara que me dieron la oportunidad de poder cumplir mi sueño que tengo desde niña, que pusieron toda su confianza en mí desde el primer momento que tomé la decisión de venirme a Valdivia, que me hicieron sentir enormemente apoyada y acompañada a lo largo de estos años de carrera a pesar de la distancia, siempre fueron la clave para salir a flote en todo momento y me dieron el empuje día a día para lograr todo lo que he alcanzado hasta el momento. Quiero decirles que las palabras se me hacen cortas, para lograr plasmar acá lo agradecida que estoy por todo lo que me entregan día a día, por el amor que me brindan en todo momento. Les amo y los extraño siempre, muchas gracias por todo y más.

A mi gran familia de tíos y primos, que siempre estuvieron presente directa o indirectamente, dándome palabras de apoyo y ánimo cada vez que cruzábamos camino, a todos ellos mis más sinceras gracias por sentirme enormemente apoyada en el transcurso de esta carrera.

A mis grandes amigos, Pamela, Roberto, Fernando, Renato. Son únicos e inigualables, gracias por todo el apoyo y cariño que me entregaron desde que nos conocimos, que fueron parte importante en este proceso, todos pusieron su granito de arena a esta tesis con palabras de ánimo, de apoyo, ayudas, etc. Son lo mejor y espero nuestra amistad de ya años, perdure eternamente. Muchas gracias por estar siempre ahí, los adoro.

Quiero agradecer a la Dra. María José Navarrete por su disposición y guía a lo largo de este proceso de memoria de título, por sus palabras de ánimo y acogida que siempre estuvo presente. Muchas gracias Doctora.

A mi compañero de camino, compañero de llantos y risas. Gracias Robert por aparecer y apoyarme en todo este proceso, por levantarme cada vez que caía, y por creer en mí sin dudar ni un minuto. Gracias por compartir lo que han sido mis mejores momentos este último tiempo junto a ti, y regalarme una sonrisa cada día. Eternas gracias.

Y muchas gracias finalmente, a todos aquellos que formaron parte de una u otra forma en este proceso, profesores, amigos y conocidos. Inmensas gracias.