Grupo de Especialistas en Cocodrilianos IUCN-SSC Formato para Aplicación de Apoyo a Investigación de Estudiantes en Ciencias Veterinarias Fritz Huchzermeyer (Español)

INFORME FINAL

Análisis de los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli*, obtenidas a partir de cloacas de Cocodrilo Americano (*Crocodylus acutus*) de animales capturados en estanques de producción de tilapia en Cañas Guanacaste, Costa Rica

Verónica Arias Pérez[1], Ivan Sandoval Hernández[2], Elías Barquero Calvo[3] and Jenny L. Stynoski[4]

[1] Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica (veroap0109@gmail.com);
[2] Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica (ivan.sandoval.hernandez@una.cr)
3 Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica (elias.barquero.calvo@una.cr)
4 Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica (stynoski@gmail.com)

Metas y Objetivos planteados

La investigación tiene como objetivo general: Analizar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidas a partir de las cloacas del Cocodrilo Americano (Crocodylus acutus), para la identificación del grado de resistencia a antibióticos utilizados en el tratamiento de bacterias Gram negativas en seres humanos y acuicultura.

En los específicos:

- Determinar el perfil de sensibilidad a antibióticos de aislamientos de E. coli contra las principales clases de antibióticos utilizados para el tratamiento de bacterias Gram negativas.
- Evaluar el grado de resistencia de los principales antibióticos utilizados en el la acuicultura.
- Determinar la asociación entre los perfiles de sensibilidad a antibióticos con el sexo, tamaño, tiempo permanencia y lugar de procedencia de cocodrilos en fincas de producción de tilapia en Cañas, Guanacaste.

Metas: Obtener los perfiles de sensibilidad de los aislamientos de *E.coli* de la cloaca de cada cocodrilo muestreado y verificar si existe un patrón en común. Así mismo la comparación con cada una de las variables y su significancia.

Resumen del proyecto

En los últimos años las bacterias han adquirido genes de resistencia provocando una nueva problemática la "resistencia antimicrobiana". Las industrias agrícolas, producción animal y acuícola son una de las principales causantes, por el uso desmedido de antibióticos que se liberan en medios acuáticos generando cambios. El cocodrilo americano al encontrases en este tipo de ecosistemas se convierte en una especie clave e bioindicadora de tal situación. El objetivo de la investigación es analizar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de la cloaca del cocodrilo americano, para identificar el grado de resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento de bacterias gramnegativas y acuicultura. El estudio se realizó en la empresa AquaCorporación en Cañas, Guanacaste Costa Rica. Se tomaron muestras de cocodrilos capturados en los estanques de tilapia. Posteriormente se

realizó un hisopado de la cloaca de cada animal y se transportaron al laboratorio. Los hisopados se inocularon en dos medios de agar selectivo y se incubaron a 35º C. Luego se realizó un perfil de sensibilidad de antibióticos con el equipo Vitek 2 a los aislamientos. Los de uso veterinario fueron evaluados por la técnica de difusión de disco Kirby Bauer y la concentración mínima inhibitoria (MIC). Los resultados más relevantes fueron alta prevalencia a tetraciclina (75%), con una MIC 50 de 32 µg/ml y MIC 90 de 128 µg/ml. Este trabajo concluye que la información obtenida en esta investigación es importante, debido a que se detectó resistencia en animales silvestres que se asocia con un sistema de producción y que en el futuro puede convertirse en un riesgo para la salud pública y el ambiente. Además, es importante evaluar en el futuro el papel de la dispersión de los mecanismos de resistencia detectados y los posibles cambios que pueden ocurrir en la estructura natural de los ecosistemas acuáticos.

Introducción

El Cocodrilo Americano es una especie que ha sufrido una pérdida de su hábitat por presiones del desarrollo urbano, turístico, actividad agrícola e industrias de acuicultura (Bolaños, 2012) y lo ha llevado a traslaparse con actividades humanas (Jiménez, 2005; Sandoval, Durán & Quirós, 2017), ser este reptil una especie silvestre puede convertirse en reservorio de patógenos importantes que pueden compartirse con el ser humano por una "zoonosis", lo cual es un aspecto importante de considerar (Magaña, 2005).

Esta dinámica puede variar dependiendo de diferentes factores, no obstante en los últimos años las zoonosis no es la única problemática alarmante, sino actualmente es "resistencia a antimicrobianos" (Karesh et al., 2012). El extenso uso de estos componentes en la industria de acuicultura, agrícola y pecuaria han promovido dicha situación. Así mismo, el uso descontrolado de antibióticos genera que estos fármacos se liberen y permanezcan en la superficie del suelo o en su defecto, se dirijan hacia ambientes acuáticos, ocurriendo una transferencia horizontal de genes en las bacterias del medio ambiente, generando de esta forma la aparición de bacterias resistentes (Cabello, 2006; Segura, François, Gagnon & Sauvé, 2009).

En este sentido, se menciona que la severidad de las infecciones por resistencia bacteriana es mayor, provocando fuertes problemas en la salud humana como animal (Silva et al., 2011). Las investigaciones sobre resistencia bacteriana en el país se han desarrollado principalmente en producción animal, animales domésticos y especies de vida silvestre (palomas y felinos) (Blanco-Peña et al., 2017) pero poco se ha encontrado en reptiles, según las bases de datos consultadas.

De esta manera, estudiar los perfiles de resistencia a los antibióticos en cocodrilos permitiría empezar a entender si estas poblaciones están siendo afectadas directa o indirectamente por esta problemática, conduciendo a que sean especies bioindicadoras de la salud ambiental y de la salud pública.

Metodología

El enfoque de la investigación es cuantitativo y con la finalidad de conocer más sobre la especie en temas de importancia biológica y conservación.

El estudio se realizará en la localidad de Cañas, Costa Rica. Las muestras se tomarán de 50 ejemplares de cocodrilo (Crocodylus acutus), provenientes del Gran Humedal Tempisque, que llegan y son capturados en los estanques de producción de tilapia y del recinto de mantenimiento. Se realizó un muestreo de la cloaca de cada animal con la técnica de hisopado y se transportaron en un recipiente a temperatura fría al laboratorio. Posteriormente se inocularon en placas de Agar Levine y MacConkey sin antibiótico y con antibiótico, para obtener aislamientos de *E.coli* y se incuban a 37°C por 24 h. En caso de crecimiento de colonias típicas de *E. coli* (colonias rosadas), se cultivaron en agar tripticasa de soya a 37°C por 24 h (Cushing, Pinborough & Stanford, 2011; Foti et al., 2013) y se identificaron con la tarjeta GN en el equipo VITEK 2. Los aislamientos confirmados bioquímicamente se suspenderán en leche descremada estéril (10%) con glicerol estéril

(20%) y se criopreservarán a -80°C. A todos ellos se les realizó un perfil de sensibilidad a los antibióticos con el equipo Vitek 2 y la tarjeta AST-279, permitiendo también la confirmación de un fenotipo tipo BLEE (β-etalactamasas de Espectro Extendido) que son de un valor indispensable en salud pública. Para la ejecución de los ensayos y la interpretación de los resultados, se utilizarán las guías de interpretación del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016).

Adicionalmente se analizará el perfil de sensibilidad a florfenicol y tetraciclina (antibióticos de uso veterinario) mediante la técnica de difusión de disco Kirby Bauer. Para evaluar el grado de resistencia, se determinará la concentración mínima inhibitoria (MIC).Por medio de los perfiles se relacionarán las diferencias entre los dos lugares de procedencia y un análisis exploratorio de componentes principales para determinar correlaciones entre las variables (el tiempo de estadía en el recinto, lugar de procedencia, el tamaño del animal y el sexo).

Resultados obtenidos durante la investigación

- En cuanto los resultados obtenidos durante la investigación se pueden mencionar distintos avances logrados conforme los objetivos planteados:
- La obtención de 63 muestras de cloaca de cocodrilo americano las cuales se logró aislar un total de 53 aislamientos de *E.coli*, ya procesados para determinar el perfil de resistencia en antibióticos de uso humano
- Se obtuvo resistencia a cuatro tipos de antibióticos de uso humano con un porcentaje de prevalencia de 4 a 17%
- La obtención de 27 aislamientos de *E.coli*, ya procesados para evaluar el grado de resistencia en antibióticos de uso en acuacultura
- Se obtuvieron un 75% de prevalencia a tetraciclina, antibiótico de uso en acuicultura, dato relevante y de alerta ya que prácticamente todos los aislamientos lo presentaban
- Se determinó el grado de concentración mínima inhibitoria (MIC), de los aislamientos positivos a tetraciclina, donde la MIC 50 fue de 32 µg/ml y MIC 90 de 128 µg/ml.
- En la determinación de la asociación entre los perfiles de sensibilidad a antibióticos con el sexo, tamaño, tiempo permanencia y lugar de procedencia de cocodrilos no se evidenció ninguna asociación significativa entre las características evaluadas.

Obstáculos encontrados durante el proyecto

- Entre los obstáculos fue el retraso con el muestreo, debido a cambios climáticos que se presentaron en la zona de muestreo. Lo cual nos complicó cumplir con las fechas establecidas.
- Al principio la metodología usada para la obtención de aislamientos de *E.coli* no funcionaba como esperábamos, lo cual a lo largo tuvimos que realizar algunos cambios a la hora de la toma de muestra. Esta situación igualmente nos atrasó algún tiempo
- La compra de los reactivos (antibióticos), tomaba mucho tiempo para la entrega, esto igualmente nos hizo esperar algún tiempo para comenzar a procesar las muestras.

Cumplimiento de los criterios del proyecto

La investigación sobre "Análisis de los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli*, obtenidas a partir de cloacas de Cocodrilo Americano (*Crocodylus acutus*) de animales capturados en estanques de producción de tilapia en Cañas Guanacaste, Costa Rica". En los objetivos y las metas planteadas del proyecto se completaron en su totalidad. Además el proyecto brinda información importante sobre la detección de resistencia en animales silvestres que se asocia con un sistema de producción y que en el futuro puede convertirse en un riesgo para la salud pública y el ambiente.

Así mismo, es importante evaluar en el futuro el papel de la dispersión de los mecanismos de resistencia detectados y los posibles cambios que pueden ocurrir en la estructura natural de los ecosistemas acuáticos. Además observar el papel tan importante que tienen los cocodrilos como bioindicadores ambientales, esto contribuye de igual forma en proyectos futuros de conservación de esta especie.

Producto obtenido al final del periodo de apoyo

Con respecto al producto final de proyecto nos encontramos en la parte de redacción de los últimos detalles del trabajo, para que sea evaluada por el personal de la Universidad. Por lo tanto esperamos culminar en los primeros meses de este próximo año con el 100% del trabajo.

Valoración cómo contribuyo el fondo al TFG

El apoyo obtenido por parte del Grupo de Especialistas en Cocodrilianos (CSG), contribuyo de una forma sumamente positiva en el proceso de mi TGF, ya que con esta ayuda logre realizar parte de muestreo y contrarrestar los gastos de viáticos, alimentación, transporte de las visitas a campo, así mismo la compra de distintos materiales de laboratorio y oficina que son necesarios durante este proceso de investigación.

De ese modo agradezco el apoyo incondicional de las ayudas proporcionadas por las becas del grupo de especialistas a estudiantes de pre-post grado, que nos facilita el desarrollo de nuestras investigaciones en pro a la medicina y conservación de los cocodrilos. En donde sabemos el trabajo tan ardo que es encontrar subsidios para el desarrollo de las mismas y este tipo de fondo nos reduce tal trabajo.

Bibliografía

Blanco-Peña, K., Esperón, F., Torres-Mejía, A. M., Torre, A., Cruz, E., & Jiménez-Soto, M. (2017). Antimicrobial resistance genes in pigeons from public parks in Costa Rica. *Zoonoses and public health*, 64(7)

Bolaños, J. R. (2012). Manejo de cocodrilos (Crocodylus acutus) en estanques de cultivo de tilapia en Cañas, Guanacaste. *Revista de Ciencias Ambientales*, 43(1), 63-72.

Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.

Cushing, A., Pinborough, M. & Stanford, M. (2011). Review of bacterial and fungal culture and sensitivity results from reptilian samples submitted to a UK laboratory. *Veterinary Record*, 169(15), 390.

Foti, M., Giacopello, C., Fisichella, V., & Latella, G. (2013). Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from captive reptiles. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 22(3), 270-274.

Jiménez, J.A. (2005). *Conceptualización del caudal ambiental en Costa Rica: Determinación Inicial para el Río Tempisque*. San José, Costa Rica: UICIN.

Karesh, W. B., Dodson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, M.,... & Machalaba, C. C. (2012). Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *The Lancet*, 380(9857), 1936-1945

Magaña, C. (2005). La mordida del cocodrilo americano (Crocodylus acutus), ¿es potencialmente séptica?. *Revista Biomedica*, 16, 65-67.

Sandoval-Hernández, I., Duran-Apuy, A., & Quirós-Valerio, J. (2017). Activities That May Influence the Risk of Crocodile (Crocodylus acutus: Reptilia: Crocodilidae) Attack to Humans in the Tempisque River Area, Guanacaste, Costa Rica. *Uniciencia*, 31(1), 13-22.

Segura, P. A., François, M., Gagnon, C., & Sauvé, S. (2009). Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environmental health perspectives*, 117(5), 675.

Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Rodrigues, T., Gonçalves, A., Felgar, A. C., & Poeta, P. (2011). Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum β-lactamase-containing Escherichia coli isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathology*, 40(5), 473-479.