

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Evaluación de ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* como bioindicadores
de resistencia antimicrobiana en ambientes marinos de la costa atlántica de
Uruguay**

“por”

Katherin Loreley FERREIRA DELBONO

**TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria**

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2024**

1. PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:


Dra. Carmen Leizagoyen

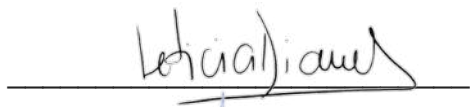
Segundo miembro (Tutor):


Dra. Natasha Eliopulos

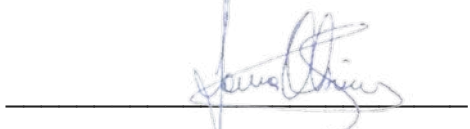
Tercer miembro:


Dra. Nadia Coppola

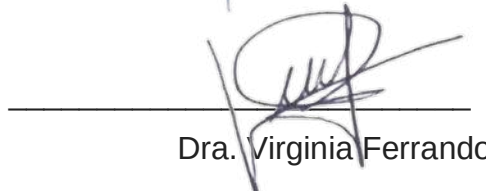
Cuarto miembro:


Dra. Leticia Diana

Quinto miembro:


Dra. Laura Alsina

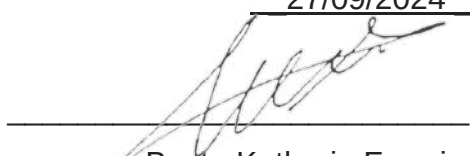
Sexto miembro:


Dra. Virginia Ferrando

Fecha:

27/09/2024

Autora:


Bach. Katherin Ferreira

2. AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar esta tesis a las personas que confiaron en mí durante este tiempo, quienes me apoyaron e impulsaron a poder lograrlo. Especialmente a mi familia y amigos por el apoyo incondicional y por darme fuerzas para nunca bajar los brazos y seguir adelante.

A mi tutora de tesis, la Doctora Natasha Eliopulos por siempre estar al firme y brindarme su amor, confianza, apoyo e impulsarme a ser mejor profesional cada día; y quienes colaboraron con este trabajo.

Al equipo del Laboratorio de Microbiología de Facultad de Veterinaria por su cálido recibimiento durante la parte práctica de esta tesis.

Al grupo humano y amigos que me brindó esta casa de estudio, en especial al grupo de la Policlínica de Fauna Silvestre y Mascotas No Tradicionales durante todos estos años compartidos.

A las personas que forman el espacio en Biblioteca de Facultad de Veterinaria por brindarnos el acceso a materiales de calidad al igual que ayuda y disposición para la búsqueda de información actualizada de difícil acceso.

3. TABLA DE CONTENIDOS

	Página.:
1. Página de aprobación	2
2. Agradecimientos	3
3. Tabla de contenidos	4
4. Lista de figuras y tablas	6
5. Resumen	7
6. Summary	8
7. Introducción	9
8. Hipótesis	11
9. Objetivos	11
1 OBJETIVO GENERAL	11
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
10. Materiales y métodos	12
1. DISEÑO DEL PROTOCOLO DE BÚSQUEDA	12
2. SELECCIÓN DE DOCUMENTOS:	13
3. LECTURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS DOCUMENTOS SELECCIONADOS	13
1. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS	14
2. OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS	14
3. OBTENCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	14
4. OBTENCIÓN DE LOS ENTEROBACTERIALES	14
5. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS EN LAS ENTEROBACTERIAS AISLADAS	15
11. Resultados	16
11.1 resultados para el objetivo específico 1:	16
EVOLUCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS	16
IMPORTANCIA DE LOS ANTIMICROBIANOS Y LA RESISTENCIA A LOS MISMOS	17
MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA Y EL IMPORTANTE ROL DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES	18
CONCEPTO DE RESISTOMA	19
RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS: ¿PROBLEMA CLÍNICO O TAMBIÉN ECOLÓGICO?	20
IMPORTANCIA DE LAS ENTEROBACTERIAS	21
CONCEPTO DE “UNA SALUD “	22
RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN MEDICINA VETERINARIA	23
EL ROL DE LOS ANIMALES SILVESTRES EN EL ESTUDIO DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	25
MEDIO SILVESTRE	26
MEDIO MARINO	27
CHELONIA MYDAS COMO BIOINDICADOR AMBIENTAL	27
11.2 resultados para el objetivo específico 2:	29
MUESTRAS	29

ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	30
12. Discusión	35
13. Conclusiones	41
14. Bibliografía	42

4. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Página.:

Fig. 1: Ciclo de los Antimicrobianos	21
Fig. 2: Sitios de anidación y distribución de <i>Chelonia mydas</i>	28
Fig. 3: Representación gráfica de los porcentajes obtenidos para RAM en los antimicrobianos testados.....	31
Fig. 4: Representación gráfica de la sensibilidad bacteriana por familia de los antimicrobianos testados	32
Figuras 5: Cultivos en placas de Agar TSA obtenidos de muestras de <i>Chelonia mydas</i> e incubados durante 24 horas a 37°C	33
Figuras 6 Ejemplos de crecimientos bacterianos obtenidos en medios agar TSA y Mac Conkey.	33
Figuras 7 Ejemplo de bacilos gran negativos en frotis con tinción de Gram.....	34
Tabla 1: descripción de aislamientos resistentes por cada antimicrobiano testeado.....	30

5. RESUMEN

Este trabajo consistió en realizar un estado del arte sobre el rol de la especie *Chelonia mydas* (tortuga verde) como bioindicador ambiental en el estudio de la Resistencia a Antimicrobianos (RAM) en ambientes marinos, así como en la realización de estudios microbiológicos y fenotípicos primarios sobre 47 hisopados cloacales de ejemplares juveniles de tortugas verdes de la costa atlántica de Uruguay. Los resultados obtenidos indican que tanto adultos de *Chelonia mydas*, como de otras especies de tortugas marinas, han sido considerados centinelas y bioindicadores de sus ambientes por diversos grupos de investigación durante más de una década. En este trabajo se encontraron hasta la fecha más de 10 estudios sobre RAM en aislamientos de tortugas adultas (incluyendo hisopados cloacales, de oviducto, de nido y orofaríngeos) en diversas regiones. Asimismo, otro resultado relevante de este estudio fue que una proporción significativa de los aislamientos, provenientes de hisopados cloacales de juveniles de tortugas verdes de Uruguay, mostraron resistencia fenotípica a los antimicrobianos evaluados, utilizando el test de disco difusión de Kirby-Bauer para determinar la sensibilidad antibiótica. Este es el primer reporte de resistencia a antimicrobianos en esta especie para Uruguay. La originalidad de este trabajo radica en el estudio de ejemplares juveniles, ya que estudios previos se centraron en otras etapas del ciclo de vida, como las etapas embrionarias, adultas y post mortem. El presente trabajo representó un ensayo piloto que permitió la profundización de otros estudios sobre la sensibilidad a antimicrobianos a partir de aislamientos provenientes de tortugas verdes juveniles de la costa atlántica de Uruguay, cuyos resultados están en proceso de redacción para su publicación.

6. SUMMARY

This work involved conducting a state-of-the-art review on the role of the species *Chelonia mydas* (green turtle) as an environmental bioindicator in studies of Antimicrobial Resistance (AMR) in marine environments. Additionally, primary microbiological and phenotypic studies were carried out on 47 cloacal swabs collected from juvenile green turtles along the Atlantic coast of Uruguay. The results indicate that both adult **Chelonia mydas** and other marine turtle species have been considered sentinels and bioindicators of their environments by various research groups for over a decade.

In this study, more than 10 research papers on AMR in isolates from adult turtles (including cloacal, oviduct, nest, and oropharyngeal swabs) across different regions were identified. Another significant finding of this study was that a substantial proportion of isolates from cloacal swabs of juvenile green turtles from Uruguay exhibited phenotypic resistance to the antimicrobials tested using the Kirby-Bauer disk diffusion method for antibiotic susceptibility determination. This is the first report of antimicrobial resistance in this species in Uruguay.

The originality of this work lies in the focus on juvenile specimens, as previous studies have concentrated on other life stages, such as embryonic, adult, and post-mortem stages. This work represents a pilot study that has paved the way for further research on antimicrobial susceptibility in isolates from juvenile green turtles along the Atlantic coast of Uruguay, with the results currently being prepared for publication.

7. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los antimicrobianos (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 et al., 2015; Hansen et al., 2015). No obstante, en los últimos 80 años, se ha evidenciado la pérdida de eficacia de estos compuestos frente a microorganismos antes sensibles, lo cual ha generado gran preocupación y distintos programas de acción a nivel mundial para mitigar el avance de la Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) (Hansen et al., 2015; Sengupta et al., 2013).

Evolutivamente, los microorganismos debido a factores como la presión de selección, mutaciones al azar, o adquisición de determinantes genéticos, han logrado evadir la acción de los antimicrobianos de origen natural en el ambiente. Por lo que se puede entender a la RAM como un proceso natural de adaptación con el que cuentan los distintos microorganismos (Larsson & Flach, 2022; Wright, 2010). No obstante, si bien la RAM ocurre naturalmente con el tiempo, existen varios trabajos que documentan que acciones antropogénicas, como el uso excesivo de ATM a nivel clínico y productivo, está acelerando este proceso determinando un rápido surgimiento de nuevas bacterias resistentes. Situación que amenaza así los beneficios para la salud que se consiguieron desde el comienzo de la era postantibiótica (Bartlett et al., 2013; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020).

En este contexto la RAM está declarada desde la década del ochenta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un tema prioritario para la conservación de la Salud Mundial y sin embargo en los últimos años el número de cepas multirresistentes identificadas ha ido en continuo aumento (Ahasana et al., 2017; Eliopulos et al., 2022). En este sentido, el estudio de las diferentes familias bacterianas resistentes en distintos ambientes, se vuelve imprescindible para elaborar estrategias de mitigación al avance de esta problemática. La familia *Enterobacteriaceae* se presenta como parte de la microbiota intestinal comensal en animales terrestres y humanos (Bonelli et al., 2014) así como en animales marinos entre los que se destacan reptiles (Ahasana et al., 2017), aves (Wu et al., 2018), mamíferos (Eliopulos et al., 2022; Wallace et al., 2013) y peces (Lee et al., 2018;). Esta familia bacteriana incluye especies que son intensamente estudiadas por su abundancia y capacidad de intercambiar material genético, incluidos los genes que codifican RAM. Distintos géneros de enterobacterias se han considerado un problema de salud pública a nivel mundial (Fariñas & Martínez, 2013), existiendo estudios que resaltan la existencia de 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 et al., 2014;). Ante esta situación, es importante resaltar que existe también una marcada relación entre los residuos de ATM en ecosistemas y el aumento de bacterias resistentes a ellos en el medio ambiente. No

obstante, la información difundida en distintos trabajos al respecto es insuficiente para llegar a una conclusión definitiva sobre la importancia y el impacto de la presencia de estos fármacos en el ambiente. No permitiendo realizar una adecuada valoración de los riesgos potenciales en los ecosistemas y en la salud en el contexto One Health (Eliopulos et al., 2022; Martinez & Villalobos, 2008).

En este contexto los ambientes acuáticos naturales pueden verse contaminados a partir de una gran variedad de fuentes entre las que se incluyen la filtración superficial urbana, las descargas de efluentes en las costas (Goñi-Urriza et al., 2000) y los desechos de la acuicultura (Al-Bahry et al., 2009; Gullberg et al., 2011; Huijbers et al., 2020), siendo las fuentes antropogénicas de contaminación la hipótesis principal de la causa de la RAM en la microbiota marina (Allen et al., 2010; Martinez & Villalobos, 2008). Por lo que distintos autores han señalado a los ATM como un tipo significativo de contaminante acuático (Al-Bahry et al., 2011; Bachmann, 2022; Foti et al., 2009; Huijbers et al., 2020; Pace et al., 2019; Prichula et al., 2016). Por otra parte, debido a que los residuos de ATM se diluyen en ambientes marinos (Al-Bahry et al., 2011) los mismos pueden ejercer una presión de selección sobre distintos microorganismos en estos ecosistemas, haciendo posible que bacterias portadoras de RAM contacten y proliferen en la fauna marina (Eliopulos et al., 2022). La identificación de bacterias portadoras de RAM provenientes de aislamientos en animales marinos podría utilizarse para estudiar y cuantificar la contaminación marina, existiendo actualmente estudios que involucran a varios mamíferos y reptiles marinos en esta situación (Ahasana et al., 2017; Eliopulos et al., 2022; Foti et al., 2009; Pace et al., 2019; Wallace et al., 2013).

Ejemplares adultos de la especie *Chelonia mydas* han sido utilizados desde hace algunos años por distintos grupos de investigación como una especie centinela ambiental en los ecosistemas marinos para países de Oceanía y Asia. Más recientemente grupos de nuestra región han realizado estudios validando también el uso de ejemplares adultos como bioindicadores marinos en las costas de Brasil (Ahasana et al., 2017; Al-Bahry et al., 2011; Domiciano et al., 2017; Drane et al., 2021; Short et al., 2023). Teniendo presente que los ejemplares de *Chelonia mydas* que se pueden encontrar en la costa atlántica de Uruguay corresponden a ejemplares juveniles y que solo existe un antecedente de estudio de RAM en fauna marina para Uruguay reportado previamente por nuestro grupo (Eliopulos et al., 2022). Este trabajo se centró en estudiar enterobacterias aisladas de muestras cloacales de juveniles capturados en costas de Uruguay con el objetivo de validar el uso de estos animales como bioindicadores de RAM para ambientes marinos en nuestro país.

8. HIPÓTESIS

Los ejemplares juveniles de la especie *Chelonia mydas* de la costa atlántica de Uruguay pueden ser utilizados como bioindicadores de resistencia antimicrobiana para los ambientes marinos de Uruguay.

9. OBJETIVOS

1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* pueden ser utilizados como bioindicadores de resistencia antimicrobiana en la costa Atlántica de Uruguay.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar un estado del arte detallado sobre el rol de *Chelonia mydas* como bioindicador ambiental en el ciclo de la resistencia a antimicrobianos.
2. Evidenciar la presencia de resistencia fenotípica a antimicrobianos en enterobacterias provenientes de hisopados cloacales de ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* del litoral atlántico de Uruguay.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. La metodología utilizada para cumplir con el objetivo específico número 1, consistió en los siguientes pasos:

1. Diseño del protocolo de búsqueda.
2. Selección de documentos.
3. Lectura y clasificación de los documentos seleccionados.

1. DISEÑO DEL PROTOCOLO DE BÚSQUEDA

Se utilizaron motores de búsqueda como Google Scholar y Scopus (accedido a través de Portal Timbó Foco) para publicaciones arbitradas, y también se utilizaron buscadores como PubMed y SciELO para cubrir otros artículos arbitrados y Google para otros documentos.

Para definir el protocolo de búsqueda, se realizó primero una revisión ‘piloto’ en cuatro buscadores preseleccionados: Google Scholar, Google, PubMed y SciELO (accedido a través del Portal Timbó Foco).

Plataformas de búsqueda:

- Google Scholar (<https://scholar.google.com>)
- Google (<https://www.google.com>)
- PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- SciELO (<https://www-scopus-com.proxy.timbo.org.uy>), accedido a través del Portal Timbó Foco (<https://foco.timbo.org.uy>)

Para contextualizar la búsqueda al objetivo del trabajo, se eligieron palabras clave agrupadas en categorías:

- Grupo biológico: *Chelonia mydas* (Tortugas Verdes)
- Problemática 1: Resistencia a antimicrobianos en ambiente y fauna silvestre
- Problemática 2: Bioindicadores centinelas

La búsqueda se realizó en tres idiomas: español, portugués e inglés. Se utilizaron las palabras clave de las tres categorías en los tres idiomas de la búsqueda.

Símbolos de truncamiento:

- En los buscadores académicos (Google Scholar, PubMed y SciELO), se utilizó el asterisco (“*”) como símbolo de truncamiento para incluir distintas terminaciones de las palabras usadas en la búsqueda.
- En Google, no fue necesario incluir símbolos de truncamiento ya que la herramienta busca de por sí las distintas terminaciones, por lo que se usaron los mismos términos, pero sin incluir el asterisco.

Conectores booleanos:

- En Google Scholar, PubMed y SciELO se utilizaron conectores booleanos (“AND” y “OR”).

- En Google, se armaron distintas frases.

Estas búsquedas se realizaron en los tres buscadores y se documentaron los resultados, contabilizando los artículos relevantes emergentes en las tres primeras páginas de resultados.

2. SELECCIÓN DE DOCUMENTOS:

Se revisaron los títulos y resúmenes (si hubiese) y se incluyeron aquellos documentos cuyos títulos y/o resúmenes incluyeran las temáticas mencionadas en las tres categorías (grupo biológico, problemática 1 y problemática 2).

Siempre que fue posible, se favoreció la selección de artículos científicos publicados en los últimos 10 años.

3. LECTURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS DOCUMENTOS SELECCIONADOS

Los documentos seleccionados se clasificaron según los siguientes temas:

- Evolución de los antimicrobianos
- Importancia de los antimicrobianos y la resistencia a los mismos
- Mecanismos de resistencia antimicrobiana y el importante rol de los elementos genéticos móviles
- Concepto de resistoma
- Resistencia a antimicrobianos: ¿problema clínico o ecológico?
- Importancia de las enterobacterias
- Concepto de “Una Salud”
- Resistencia antimicrobiana en medicina veterinaria
- El rol de los animales silvestres en el estudio de resistencia a antimicrobianos
- Medio silvestre
- Medio marino
- *Chelonia mydas* como bioindicador ambiental

10.2. La metodología utilizada para cumplir con el objetivo específico número 2 consistió en los siguientes puntos:

1. Selección de las muestras a procesar
2. Obtención de los cultivos primarios
3. Obtención de los aislamientos bacterianos
4. Selección de los enterobacteriales
5. Evaluación de la sensibilidad a antimicrobianos en las enterobacterias aisladas

1. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para realizar este trabajo se partió de las muestras provenientes del ensayo experimental de Maestría de la Dra. Natasha Eliopulos. Las mismas fueron obtenidas a través de la captura con redes de arrastre costero y captura manual de ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* de vida libre en el litoral atlántico de Uruguay durante los años 2019 y 2020. Contando para ese procedimiento con la colaboración de la Organización No Gubernamental Karumbé (Permiso de captura N.º 104/18 de la División de Fauna del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca para caza y colecta científica).

Se trabajó a partir de muestras provenientes de 45 ejemplares capturados por técnicos especializados de la organización Karumbé. A cada uno de los ejemplares se le realizó un hisopado cloacal siguiendo la metodología descrita por Ahsana et al., 2017. Cada uno de los hisopos con medio de transporte Eagle obtenidos durante el muestreo, fueron refrigerados hasta su arribo al laboratorio de Microbiología del Departamento de Patobiología (Fvet-UdelaR) donde se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su procesamiento dentro de las primeras 24 - 36 horas de extraídas las muestras.

2. OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS

Para obtener la mayor recuperación posible de bacterias mesófilas presentes en cada uno de los hisopos, los mismos fueron sembrados en Agar trípico de Soja (TSA) con el objetivo de tener una buena recuperación de las bacterias presentes. El TSA es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes siendo un medio recomendado para la detección y recuento de una amplia gama de microorganismos. Estas siembras fueron cultivadas durante 24 horas a 37°C.

Una vez obtenidos los crecimientos en las placas de TSA, los mismos fueron recolectados y congelados a -80°C, utilizando para esto Caldo Trípico de Soja (TSB) con 10% de glicerol como medio de criopreservación, hasta su posterior procesamiento.

3. OBTENCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

Para el descongelado, cultivo y aislamiento de colonias gram negativas a partir de las siembras primarias, se utilizó placas con TSA y a partir de las colonias aisladas se procedió a cultivar en agar Mac Conkey (McC) el cual contiene compuestos de sales biliares y cristal violeta que actúan como inhibidores de bacterias Gram positivas.

4. OBTENCIÓN DE LOS ENTEROBACTERIALES

De las siembras primarias se obtuvieron crecimientos de colonias con diversas morfologías en las placas de McC, las cuales fueron repicadas hasta obtener aislamientos puros a los que posteriormente se le realizaron frotis y tinción de Gram como método de confirmación para Gram negativos. Todas las siembras fueron

cultivadas a 37°C durante 18-24 horas siguiendo el protocolo descrito por Al-Bahry y colaboradores en 2009.

5. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS EN LAS ENTEROBACTERIAS AISLADAS

Se evaluó la sensibilidad antimicrobiana en agar Müller-Hinton utilizando el método de difusión en disco de agar Kirby-Bauer siguiendo criterios establecidos del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) y utilizando los cortes propuestos para enterobacterias en medicina veterinaria (Clinical & Laboratory Standards Institute [CLSI], 2020).

Los ATMs utilizados se seleccionaron teniendo en cuenta la frecuencia de uso de los mismos en medicina veterinaria. El objetivo de la selección fue contar con al menos un representante de cada una de las principales familias de antimicrobianos (Betalactámicos, Aminoglucósidos, Fluoroquinolonas, Cefalosporinas, Sulfonamidas y Tetraciclinas) cuyo espectro de acción incluyera microorganismo Gram negativos. En ese sentido se utilizaron: Amoxicilina/Clavulánico (AMC), Gentamicina (CN), Enrofloxacin (ENR), Cefoxitina (FOX), Cefovecin (CVN), Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT) y Tetraciclina (TE) respectivamente.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C y los diámetros de las zonas de inhibición alrededor de los discos se midieron con un calibre, clasificándose como sensible y resistentes de acuerdo con la tabla estándar para enterobacterias descrita en CLSI, (2020).

11. RESULTADOS

11.1 Resultados para el Objetivo específico 1:

“Realizar un estado del arte sobre el rol de *Chelonia mydas* como bioindicador ambiental en el ciclo ambiental de la Resistencia a Antimicrobianos”.

EVOLUCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

Desde tiempos muy remotos en la historia de la humanidad existen registros que documentan la necesidad de contar con sustancias capaces de controlar procesos infecciosos. Datos arqueológicos reportan que en el 2500 AC en China se usaba el moho de la soya para el tratamiento infecciones cutáneas, mientras que en Egipto se empleaba una sustancia proveniente de la corteza del árbol *Commiphora myrrha* (Mirra), hasta que en el 1500 AC se comenzó a utilizar también el mineral Malaquita (dihidróxido de carbonato de cobre $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$). Más recientemente desde el 400 AC con Hipócrates hasta el siglo II con Celsus, en la antigua Grecia y Roma, se siguió utilizando la Mirra como tratamiento de procesos infecciosos y heridas. Teniendo en común la mayoría de estos compuestos, que, si bien su aplicación tópica puede ser beneficiosa y en ocasiones poco riesgosa, la administración sistémica de los mismos puede ser tóxica con serias implicancias para la salud (Acuña, 2003).

No fue hasta en el año 1928 en que el microbiólogo Alexander Fleming junto con su equipo entre los que se encontraban Howard Florey, Ernst Chain y Norman Heatleyse descubren el primer antibiótico: La Penicilina (proveniente del hongo *Penicillium*) lo cual supuso un avance para la medicina moderna, permitiendo el desarrollo posterior de distintas clases de ATMs comenzando así el comienzo de la era Post Antibiótica (Ruiz de Galarreta, 2021).

Los ATMs así, surgen como un grupo de fármacos que tienen como objetivo suprimir o inhibir el crecimiento de distintos agentes infecciosos pudiendo clasificarse como bactericidas o bacteriostáticos y forman parte de un grupo de herramientas terapéuticas que incluye diferentes familias como las Penicilinas, Cefalosporinas, Tetraciclinas, Macrólidos, Lincosamidas, Aminoglucósidos, Fluoroquinolonas entre otros (Ramírez Murillo et al., 2021). Estos fármacos fueron y son actualmente, cruciales en el mantenimiento de la salud humana y animal por su capacidad para matar o inhibir el crecimiento de bacterias y otros agentes infecciosos (a excepción de agentes virales) sin dañar las células y los tejidos del huésped (Crofts et al., 2017).

IMPORTANCIA DE LOS ANTIMICROBIANOS Y LA RESISTENCIA A LOS MISMOS

El comienzo de la era Post Antibiótica se ha considerado desde el punto de vista sanitario uno de los avances más importantes en la historia de la humanidad, al salvar millones de personas, reducir la mortalidad infantil en muchas partes del mundo e incrementar la esperanza de vida (Blair et al., 2015; Hansen et al., 2015; Ventola, 2015). No obstante, como se mencionó anteriormente, en los últimos 80 años el consumo y uso desmesurado y/o indebido de estas herramientas farmacológicas ha originado una era de abusos que se ha visto reflejada en la reducción o pérdida de eficacia de los compuestos (CDC, 2013; Hansen et al., 2015; Michael et al., 2014; Read & Woods, 2014; Sengupta et al., 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, lo cual ha promovido la búsqueda incesante de nuevas sustancias capaces de controlar estos agentes infecciosos. De hecho, en la actualidad no existe ninguna familia de ATM que se encuentre libre del fenómeno de resistencia (Levy & Marshall, 2004; Sousa et al., 2014) y los estudios epidemiológicos indican que existe una relación directa entre el consumo de ATMs, la aparición de RAM y la diseminación de cepas resistentes al ambiente (CDC 2013; Ventola, 2015).

Ya en el año 1945 cuando Fleming, Florey y Chain, reciben el premio Nobel gracias al descubrimiento de la Penicilina como agente terapéutico antimicrobiano, en su discurso Fleming hizo una advertencia respecto a su uso, la cual textualmente es traducida de la siguiente manera:

" (...)... pero quiero dar una advertencia, la penicilina aparece como no-tóxica, de modo que no hay preocupación con sobredosis e intoxicar al paciente. Sin embargo, puede existir el peligro de sub-dosificación. No es difícil conseguir microorganismos resistentes a penicilina en el laboratorio exponiéndose a concentraciones no letales y lo mismo puede pasar en el organismo (...)" (Acuña, 2003).

En este contexto la OMS consideró por primera vez la aparición de resistencia antimicrobiana como una preocupación mundial en la década del 1980 y reconoce actualmente a la RAM como una crisis mundial de Salud Pública (Frieri et al., 2017).

MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA Y EL IMPORTANTE ROL DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES

El naturalista científico Charles Darwin en su teoría sobre la evolución describe la capacidad que tienen las bacterias, para la adaptación y la supervivencia. Entendiendo en este sentido a la resistencia antimicrobiana como un proceso natural conservado evolutivamente existiendo registro de RAM en bacterias presentes en cuevas subterráneas que han estado geológicamente aisladas de la superficie del planeta por más de 4 millones de años (Bhullar et al., 2012). Para poder comprender el comportamiento de las cepas bacterianas con RAM, es necesario conocer los mecanismos por los cuales estas bacterias pueden poseer estas características: resistencias intrínsecas y resistencias adquiridas (Blair et al., 2015).

La resistencia intrínseca se refiere a las características genéticas de ciertas especies bacterianas que les confieren una resistencia natural a determinados antibióticos debido a sus particularidades estructurales y/o funcionales. Un ejemplo de resistencia intrínseca son las bacterias Gram negativas (G-) que, debido a su membrana externa, son naturalmente resistentes a los antibióticos penicilinas y cefalosporinas de primera generación, que no pueden atravesar esta barrera. En contraste, las bacterias Gram positivas (G+), que carecen de esta membrana externa, son susceptibles a estos antibióticos, ya que la penicilina puede actuar directamente sobre su pared celular (Rosenblatt-Farrell, 2009).

Una vez que una bacteria que es sensible a un ATM es expuesta al mismo, pueden producirse dos eventos diferentes: la eliminación de la bacteria por acción del ATM o el desarrollo resistencia por parte del microorganismo. Esto último puede ocurrir debido a distintos factores, entre ellos la exposición a bajas concentraciones de ATM; y es lo que se describe como resistencia antimicrobiana adquirida (Blair et al., 2015; Drane, 2021). Existen dos 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 determinando modificaciones estructurales de proteínas diana del fármaco, creación de bombas de eflujo que expulsan el fármaco, etc. Mientras que el otro mecanismo involucra la adquisición de elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones e integrones. Estos elementos móviles son los que permitirán la rápida adaptación de las bacterias a los nuevos ATMs, así como la transferencia de los genes de resistencia, especialmente a dosis subterapéuticas, tal cual lo advirtió Fleming en su discurso de 1945. (Allen & Stanton, 2014; Blair et al., 2015; Drane, 2021; Larsson & Flach, 2022; Levy & Marshall, 2004; Read & Woods 2014). Asimismo, entre los elementos genéticos móviles, los genes de resistencia a ATMs asociados a plásmidos son los que poseen una mayor relevancia epidemiológica, médica y práctica, gracias a la habilidad para transferirse entre las comunidades microbianas (Dantas & Sommer, 2014; Ramírez et al., 2014; Sommer et al., 2009). Estos elementos se extienden de forma masiva a través de la diversidad de poblaciones bacterianas en distintos ambientes y la información contenida en ellos es utilizada para optimizar su

adaptación al ambiente que los rodea (Camou et al., 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 nos advierte sobre el uso abusivo e indebido de los ATMs lo cual ha propiciado el rápido surgimiento de plásmidos como los principales vectores de genes de resistencia (Sousa et al., 2014; Wright, 2010). Los genes de resistencia antimicrobiana adquiridos no son esenciales para la supervivencia de los microorganismos en condiciones fisiológicas, en cambio sí lo son cuando éstos tienen que sobrevivir bajo determinadas condiciones de supervivencia, como lo es, por ejemplo, la presencia de un agente antimicrobiano (Schwarz et al., 2015). Los plásmidos pueden portar genes de resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos y también pueden, de forma simultánea, incorporar factores de virulencia (Ramírez et al., 2014) y otros grupos de genes que le proporcionan resistencia a desinfectantes, biocidas e incluso a metales lo que le confiere al microorganismo una ventaja adaptativa evolutiva sobre el resto de la microbiota. (Baquero, 2023; Crofts et al., 2017; Levy & Marshall, 2004; Ramírez et al., 2014; Ruiz de Galarreta Beristain, 2021; Schwarz et al., 2014; Thompson et al., 2007).

CONCEPTO DE RESISTOMA

En el año 2006, a nivel internacional se empezó a utilizar el concepto de resistoma antibiótico como marco para comprender y estudiar los orígenes, la evolución y el desarrollo de la RAM a nivel global (D'Costa et al., 2006). Este término agrupa todos los genes que contribuyen de forma directa o indirecta a la RAM, incluyendo los genes de resistencia que son intrínsecos de los cromosomas bacterianos (resistoma intrínseco), los que se encuentran en los microorganismos patógenos (resistoma clínico) y los presentes en los microorganismos ambientales productores y no productores de antibióticos que se encuentran como formas de vida libre o comensales (resistoma ambiental) (Oller Ruiz, 2023).

Existen estudios en donde se compara el diagnóstico de resistencia antimicrobiana en el tiempo, como un ejemplo de ellos tenemos el estudio de Knapp et al., 2010 en el cual se plantea que existen indicios de que las actividades humanas están provocando cambios en el resistoma ambiental, el cual representa uno de los principales reservorios de genes de resistencia.

Actualmente se consideran a las estaciones depuradoras de aguas residuales como los puntos calientes de desarrollo y propagación de resistencia (con la implicancia que esto puede tener en los ambientes marinos por ser el destino final del producto de dichas estaciones) porque en ellas se concentran bacterias de origen animal, humano y ambiental, además de la mezcla de ATM o sus metabolitos activos previamente ingeridos por humanos o animales y el cual la excreción de los mismos, de acuerdo con la FAO, en un 75-90% es en forma no metabolizada (Kim & Cha, 2021; Kraemer et al., 2019; Torres-Castro & Rivero-Juárez, 2023); el resto llega al medio ambiente por eliminación y/o manipulación inadecuada de medicamentos, contaminación

directa en la agricultura y residuos de la producción de antimicrobianos (Larsson & Flach, 2022).

RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS: ¿PROBLEMA CLÍNICO O TAMBIÉN ECOLÓGICO?

Como se ha mencionado anteriormente, desde mediados de la década de 1980, la comunidad científica ha comenzado a concienciarse sobre la dimensión del problema de la resistencia a los ATMs. Preocupación que se ha traducido desde entonces, en distintos trabajos que evidencian a la RAM como una problemática que impacta no solo en las bacterias patógenas de interés clínico aisladas a partir de procesos infecciosos de humanos y animales, sino también en bacterias no patógenas que forman parte de la microbiota y en bacterias de otros ecosistemas (alimentos, aguas, suelo, etc), las cuales también se ven expuestas al uso masivo de ATMs. Sumado a esto, también se ha evidenciado que algunos mecanismos de resistencia altamente preocupantes podrían haber surgido en ecosistemas naturales y posteriormente haber pasado al ambiente hospitalario (Canton, 2009; Cattoir et al., 2008; Larsson & Flach, 2022; Martinez, 2009).

También se ha evidenciado la existencia de un continuo flujo e intercambio de bacterias resistentes y genes de resistencia (ARGs por sus siglas en inglés) entre diferentes ecosistemas (humano, animal, acuático, terrestre, etc) además de que cada vez es mayor la cantidad de personas y animales que se desplazan grandes distancias (viajes, migraciones, etc), aumentando la posibilidad de intercambio de bacterias resistentes y de ARGs. En este contexto surge la necesidad de pensar y estudiar la evolución de la RAM en forma global, lo cual abre la posibilidad de aproximarse al estudio de la RAM desde una dimensión ecológica y al uso de la fauna silvestre como bioindicador del ecosistema marino (Eliopulos et al, 2022).

En la Figura 1 se puede observar el ciclo de los antimicrobianos y las rutas de diseminación de los mismos (o sus metabolitos activos) hacia los ambientes naturales y conjuntamente también los caminos de diseminación de las bacterias portadoras de RAM y ARGs en los diferentes nichos ecológicos, y como los mismos llegan a las personas.

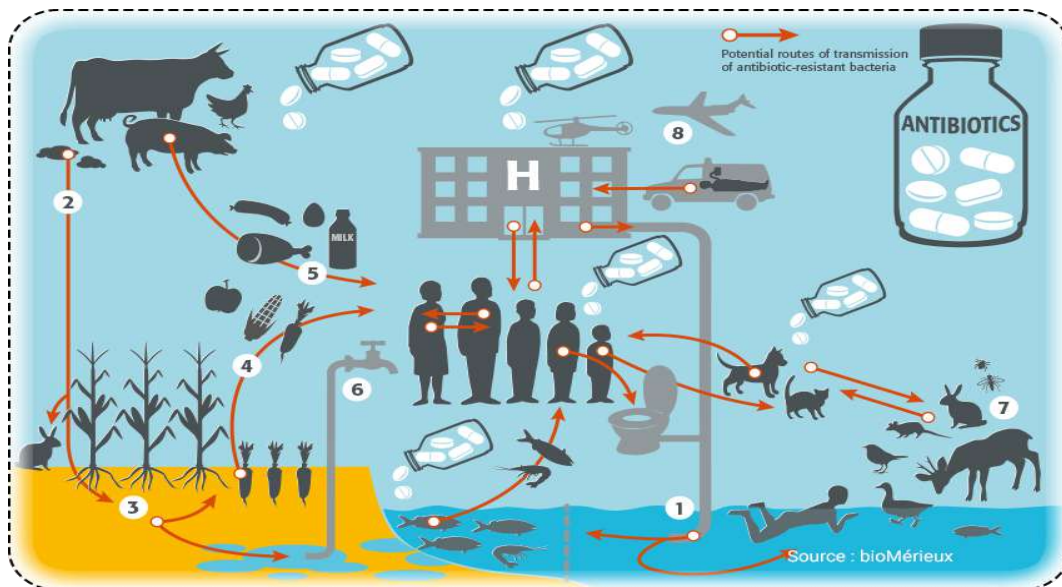


Figura 1: Ciclo de los Antimicrobianos (bioMérieux, 2016).

IMPORTANCIA DE LAS ENTEROBACTERIAS

Poco menos de una década atrás, la comunidad científica se centraba básicamente en el estudio y vigilancia de la RAM a partir de bacterias patógenas aisladas de procesos infecciosos de humanos o animales. Sin embargo, en la actualidad, la bibliografía evidencia que existe un amplio interés y esfuerzos por estudiar la evolución de la RAM en bacterias tanto patógenas como comensales de los más diversos ecosistemas. Siendo el objetivo de estos estudios, buscar estrategias para predecir la evolución y diseminación de los ARGs para establecer estrategias de control y vigilancia a nivel mundial. En este contexto adquiere amplia relevancia el estudio sobre aquellos microorganismos que se encuentran diseminados en muchos ecosistemas, tanto como comensales o patógenos, para de este modo analizar la presión selectiva de los ATM en los distintos ambientes. En este punto las enterobacterias cumplen los requisitos anteriormente mencionados por lo que esta familia bacteriana es considerada por varios autores como las candidatas para los estudios de vigilancia, considerándose como bacterias “centinelas de la resistencia” (Briñas, 2003; Camou et al., 2017; de Toro et al., 2011; Jouini et al., 2007; Ruiz et al., 2012).

La familia Enterobacteriaceae está conformada por bacterias que tienen como hábitat el suelo, cuerpos de agua y el intestino de una amplia variedad de animales terrestres y marinos (Brenner et al., 2004). Esta familia pertenece al orden XIII Enterobacterales conformada por 41 géneros y más de 100 especies, de las cuales menos de la mitad tienen interés clínico desde el punto de vista veterinario (Stanchi, 2007). Estos microorganismos comparten semejanzas en cuanto a su morfología y caracteres

tintoriales: bacilos pleomórficos, Gram negativos de un tamaño de entre 2 y 3 µm por 0,4 a 0,6 µm, catalasa positivos, oxidasa negativo y que carecen de citocromo c, lo cual es una propiedad bioquímica útil en el diagnóstico de la familia (Biberstein & Chung Zee, 1990; Stanchi, 2007).

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 (Al-Bahry et al., 2019; Martinez & Villalobos, 2008). La familia también 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 (Fouz et al., 2020).

CONCEPTO DE “UNA SALUD “

Una Salud es un término utilizado por primera vez en el año 2003-2004 el cual involucra el esfuerzo colaborativo de múltiples disciplinas trabajando a nivel local, nacional y global, con el objetivo de lograr una salud óptima para personas, animales y medio ambiente a través de políticas públicas, proyectos de investigación, estrategias de educación y estrategias prácticas (Kim & Cha, 2021, Mackenzie & Jeggo, 2019). En este contexto entonces, la RAM es considerada como uno de los focos de trabajo dentro del movimiento One Health, debido al rápido surgimiento y difusión de ARGs entre humanos, animales y ambiente a nivel mundial (Rousham et al., 2018).

En relación al estudio de la RAM desde la visión Una Salud , ya desde el año 2006 en EEUU se evidenciaba la presencia de residuos ATM en alimentos destinados al consumo humano y desde entonces además se han realizado múltiples estudios y búsquedas de RAM en diferentes especies animales y ambientes. De estos estudios se concluye que el reservorio más importante de bacilos Gram negativos multirresistentes, es el intestino del hombre y de los animales. Por esta razón, la contaminación de fuentes de agua, alimentos y medio ambiente a partir de bacilos gram negativos multirresistentes es una ruta importante para la propagación de RAM, ya sea a través del hombre o de los animales, y por tanto es un área importante a tener en cuenta para su control (Boxal, 2006; Wellington, 2013).

Asimismo, otros estudios sobre el manejo de aguas residuales sin tratar evidenciaron altas concentraciones de bacterias resistentes y residuos de ATMs en estas, situación

que genera una presión selectiva entre las poblaciones bacterianas de ambientes acuáticos, incrementando así la cantidad de bacterias con capacidad de generar resistencia de tipo adquirida (Martínez & Villalobos, 2008).

Es entonces que en el año 2008, se detecta e incorpora la importancia de los “ecosistemas” en el concepto de Una Salud, siendo este el año cuando la OMS junto a la OIE y la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) buscan trabajar conjuntamente para unir a los diferentes profesionales que abarcan tanto a la salud animal como a la salud humana y la salud del ecosistema y de esta forma poder afrontar la problemática de la RAM de forma global (Kim & Cha, 2021; OMS, 2017).

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN MEDICINA VETERINARIA

Como se mencionó anteriormente la RAM además de ser un problema en medicina veterinaria, también es un grave problema en la salud pública. Es bien conocido el amplio uso de los ATM en la sanidad animal ya sea en profilaxis, tratamiento de enfermedades o como promotores del crecimiento animal (PCA) (Allen & Stanton, 2014; García-Álvarez et al., 2012; Marshall & Levy, 2011). Estudios documentan que en Estados Unidos son administrados alrededor de unos 7×10^6 Kg de ATM como PCA en ganadería (Golkar et al., 2014; Levy, 2002), en cambio, 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, se suman a esta prohibición países como Dinamarca y Reino Unido (Cogliani et al., 2011). A pesar de los esfuerzos mundiales abocados al control del avance de la RAM y al correcto uso de los ATM en entornos veterinarios (clínicos y productivos) en distintos países, en 2018 se registra un uso masivo de ATMs en China con datos que registran 29.774, 09 toneladas de ATM destinadas para el uso en ganadería, de las cuales el 53,20% fueron usados como promotores de crecimiento (Oller Ruiz, 2023).

El grave problema de la RAM asociado al elevado uso de los ATM con distintos fines en la ganadería (Bachmann, 2022; García-Álvarez et al., 2012), tiene un doble impacto negativo. El primero está relacionado con la cadena alimenticia (Barton, 2014; Colobatiu et al., 2015; Levy & Marshall, 2004) 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 como cerdos, aves, ganado vacuno, etc. (Barton, 2014; Wichmann et al., 2014; Wright et al., 2010). Siendo este hecho el responsable del pasaje y la incorporación de estas resistencias a su microbiota intestinal (Van den Bogaard & Stobberingh, 2000), favoreciendo de esta forma el desarrollo de RAM incluso entre las bacterias comensales que habitualmente no son causa de infección (Golkary et al., 2014; Radhouani et al., 2014), pero que pueden actuar como un

potente reservorio de RAM (Allen & Stanton, 2014). El segundo impacto se relaciona con la potencial alteración que sufren los microorganismos del medio ambiente (Allen & Stanton, 2014; Bartlett et al., 2013). Hay estudios en donde se detalla que el 90% de los ATM empleados en la ganadería son diseminados al medio a través de la orina y las heces (Allen & 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 medio ambiente (Sayah et al., 2005; Wooldridge, 2012). 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 et al., 2013; Sousa et al., 2014).

En el ámbito local, en el año 2011 el gobierno uruguayo emitió un decreto presidencial (N.º 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 et al., 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 (Dirección General de Servicios Ganaderos [DGSG], 2015).

Desde el año 2006 Uruguay viene realizando diversos estudios sobre la RAM a nivel de monitoreo de la producción y comercialización de productos veterinarios, se crea en 2016 el Sistema de Farmacovigilancia en donde se registran las ventas y el destino de los productos en toda la cadena, hasta la venta al consumidor final. En el año 2018 Uruguay aprobó su Plan Nacional de contención de la RAM, con enfoque en salud animal y cadenas productivas, apuntando a lo que es vigilancia, medidas de prevención y control, investigación, formación y comunicación. Por lo que actualmente en Uruguay se aplica el 'Uso responsable y prudente de agentes antimicrobianos en medicina veterinaria' del Código Sanitario para los animales terrestres de la OIE (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca [MGAP], 2017). Desde el año 2015 se encuentran reguladas las condiciones de comercialización y uso de los ATM, de acuerdo con las normas y recomendaciones de los organismos internacionales de referencia. Por lo cual los ATM solo serán comercializados bajo prescripción del médico veterinario tratante, estableciéndose responsabilidades para el profesional veterinario y para el responsable de la explotación (DGSG, 2015; MGAP, 2017).

EL ROL DE LOS ANIMALES SILVESTRES EN EL ESTUDIO DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Históricamente la presencia y consecuencias de las resistencias a ATM fueron estudiadas poniendo foco en el ser humano y en los animales domésticos y productivos, dejando a principios de este siglo un evidente vacío de conocimiento acerca de los efectos de la RAM sobre el medio ambiente y muy especialmente sobre la fauna silvestre (Livermore et al., 2001). Sin embargo, a medida que el estudio de la RAM fue avanzando, también fueron surgiendo trabajos que visualizaron a los animales silvestres como piezas claves en el ciclo y el avance de la RAM. De estos últimos surge que la fauna silvestre se ve expuesta a concentraciones de ATMs o sus metabolitos activos, microorganismos resistentes y/o elementos génicos que les confieren la resistencia principalmente a través del alimento y el agua contaminada de los ambientes que habitan (Cole et al., 2005; Guenther et al., 2010; Kozak et al., 2009; Radhouani et al., 2014).

Asimismo, varios trabajos evidenciaron que con frecuencia los aislamientos de bacterias resistentes a partir de animales silvestres, fueron mayores en animales que habitan zonas próximas a centros poblados y zonas agrícolas, que en aquellos que viven en regiones más aisladas o vírgenes (Cole et al., 2005; Kozak et al., 2009). Con algunas excepciones como las cepas de *E. coli* resistentes aisladas en aves del Ártico y de la tundra siberiana (Sjölund et al., 2008). Sin embargo, a pesar de estos remotos hallazgos, los investigadores sostienen que el origen de las resistencias a ATM en fauna silvestre es principalmente antropogénico, existiendo una correlación directa entre los niveles de resistencias que éstos pueden presentar y el nivel de contacto que establecen con el hombre y sus actividades (Albrechtova et al., 2014; Radhouani et al., 2014; Sousa et al., 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) y especies silvestres (Dolejska et al., 2007; Radhouani et al., 2014; Sacristán et al., 2014; Sjölund et al., 2008; Skurnik et al., 2006; Sulzner et al., 2014).

A partir de esta evidencia, en la actualidad, se considera que la fauna silvestre cumple un rol importante en el ciclo de la RAM, sobre todo aquellas especies que tienen una estrecha relación con el hombre y los sistemas productivos ganaderos, ya que estos animales, al tomar contacto con cepas resistentes a ATM o con los elementos génicos móviles, pueden infectarse, convertirse en reservorios de genes de resistencia y en vectores de cepas resistentes y en este contexto varios autores los consideran en sus trabajos como organismos bioindicadores de contaminación microbiológica de origen antrópico (Bonnedahl & Järhult, 2014; Dolejska et al., 2007; Sousa et al., 2014).

De esta manera, especies silvestres pueden emplearse como indicadores del grado de antropización de los distintos ambientes. Por lo que disponer de un buen

conocimiento de la relación entre hombres, animales domésticos y fauna silvestre, es necesario y valioso, pues permite adquirir una mejor comprensión de la problemática existente, así como de la dinámica que siguen las cepas resistentes en el medio ambiente (Bonnedahl & Järhult, 2014; Darwich & López., 2022; Sacristán et al., 2014).

MEDIO SILVESTRE

Los estudios de la presencia y consecuencias de la resistencia antimicrobiana son muchos menos en el medio ambiente y en los animales silvestres que en los animales domésticos y de producción (Foti, 2017; Livermore et al., 2001).

Asimismo, hallazgos de bacterias resistentes a ATMs en animales, son mayores en los animales que se encuentran en estrecho contacto con el medio urbano que en los que se encuentran en zonas más agrestes y alejadas, lo que determina una participación de parte de la fauna en la transmisión de genes de resistencia antimicrobiana entre las bacterias de los humanos y animales (Kim & Cha, 2021).

En el 2017 Ahasana y colaboradores publicaron un estudio hecho en tortugas marinas, en donde el 37,7% de los aislamientos de Enterobacteriales fueron identificados como multirresistentes siendo el menos resistente la gentamicina y concuerda en ser el menos usado por sus efectos ototóxicos y nefrotóxicos.

Un estudio en aves rapaces del 2022 demuestra la prevalencia de *Campylobacter spp.* potencialmente patógenas para el ser humano, así como la marcada resistencia de los aislados a antibióticos frecuentemente utilizados en medicina humana y veterinaria, indican la importancia de las aves rapaces como reservorios de este microorganismo y subrayan su relevancia como portadoras y diseminadoras de cepas resistentes a antimicrobianos, con importantes repercusiones para la Sanidad Animal y la Salud Pública (Gutierrez, 2022).

Con respecto a la contaminación del medio acuático por mal manejo en aguas residuales afecta directamente a los animales e indirectamente a los humanos a través de su consumo. Como ejemplo de ello tenemos algunos brotes debidos al consumo de mariscos (principalmente moluscos) y también alimentos de origen vegetal debido al riego con agua contaminada, el uso de fertilizantes naturales o a través del suelo contaminado con excrementos de origen predominantemente aviar (Gutierrez, 2022). En este sentido esto refleja como marcadores centinelas a ciertas especies silvestres, las cuales pueden brindar información sobre la contaminación ambiental (Darwich & Molina-López, 2022).

MEDIO MARINO

Dado que un alto porcentaje de ATMs y sus metabolitos activos son expulsados del cuerpo humano o animal sin degradación, lo que significa que los mismos llegan a contaminar diferentes hábitats como el agua de los ríos, mares o los suelos (Martínez, 2017).

Un trabajo del 2018 realizado en Chile indica la presencia de residuos de ATM en el agua marina a 8 km alrededor de donde se practica acuicultura de salmón, lo cual contribuye a la selección de bacterias con genes de resistencia antimicrobiana en el medio marino, demostrando la gran diseminación que presentan los compuestos químicos en el medio acuático (Millanao et al., 2018).

Algunos investigadores han buscado alternativas para el tratamiento de aguas residuales como la fotólisis UV, siendo recomendada como un sustituto de aditivos químicos en el tratamiento de aguas residuales contra una amplia gama de contaminantes ambientales, especialmente para el control de la contaminación por antibióticos. Generalmente, la luz UV simulada, participa en la descomposición del antibiótico y en la eliminación de la actividad antibacteriana de aguas superficiales en el medio ambiente (Ding et al., 2020; Timm et al., 2019).

CHELONIA MYDAS COMO BIOINDICADOR AMBIENTAL

Para poder definir a una especie como un elemento bioindicador para el sistema ecológico que habita, primero se debe tener en cuenta el concepto de bioindicador, el cual define a un organismo o sistema biológico como una herramienta para evaluar variaciones en la calidad ambiental. En este sentido una especie puede poseer requerimientos y/o características particulares a través de las cuales presente respuestas biológicas observables frente a una perturbación ecológica, como lo es, por ejemplo, la llegada de diferentes contaminantes a las aguas marinas. Los bioindicadores por sí mismos son herramientas que proveen una mirada al futuro frente a un hecho puntual y aportan información que habilita a la comunidad científica a la toma de decisiones para disminuir impactos a nivel ambiental (Amoozadeh et al., 2014; Gamboa et al., 2008).

En este contexto, el estudio de la fauna marina, desde hace varios años, viene aportando información valiosa en lo que concierne al avance de la RAM a nivel ambiental y específicamente en ambientes costeros y marinos (Gutierrez, 2022; Kim & Cha, 2021). En el caso particular de las tortugas marinas como modelos de estudio, las mismas se pueden considerar como especies silvestres emblemáticas, tanto por su estatus de conservación, al tratarse de especies en peligro, como por su biología al ser animales que migran miles de kilómetros y tardan décadas en crecer y madurar (Frazier, 1999). En respuesta a la estacionalidad y la segregación espacial de los

recursos, estos animales emprenden grandes travesías entre sus sitios de anidación y zonas de alimentación, donde poblaciones que desovan en un país se alimentan en aguas territoriales de otros países (Chambault et al., 2015).

Estudiar a *Chelonia mydas* cobra especial importancia en la salud pública si tenemos en cuenta que una de las causas en la disminución de las poblaciones de esta especie es el consumo de sus huevos y sus nidos, siendo de relevancia los datos y registros de resistencia antimicrobiana realizados por otros equipos de estudio en estas especies. (Solano et al., 2004). Particularmente con respecto a RAM, existen más de 15 estudios realizados en tortugas marinas, donde se reportan hallazgos de ARGs en 170 familias bacterianas provenientes de tortugas adultas, con muestras extraídas de distintos lugares como cloaca, faringe, oviducto, huevos, y arena de nidos. Asimismo, en los trabajos encontrados las especies *Chelonia mydas* junto con *Caretta caretta* han protagonizado el foco de estudio de estos grupos de investigación (Ahasan et al., 2017; Al-Bahry et al., 2009; Candan & Candan, 2020; Chuen-Im et al., 2021; Drane et al., 2021; Short et al., 2023; Tsai et al., 2021; Zavala-Norzagaray et al., 2015).

Chelonia mydas o Tortuga Verde es una de las siete especies de tortugas marinas reconocidas hasta el momento en el planeta, la misma tiene hábitos migratorios de larga distancia a lo largo de su vida ocupando diferentes ecosistemas, tanto costeros como marinos y variando además su alimentación a lo largo de su ciclo biológico. (Chuen-Im et al., 2021; Drane et al., 2021; Plotkin, 2003; Short et al., 2023; Zavala-Norzagaray et al., 2015).

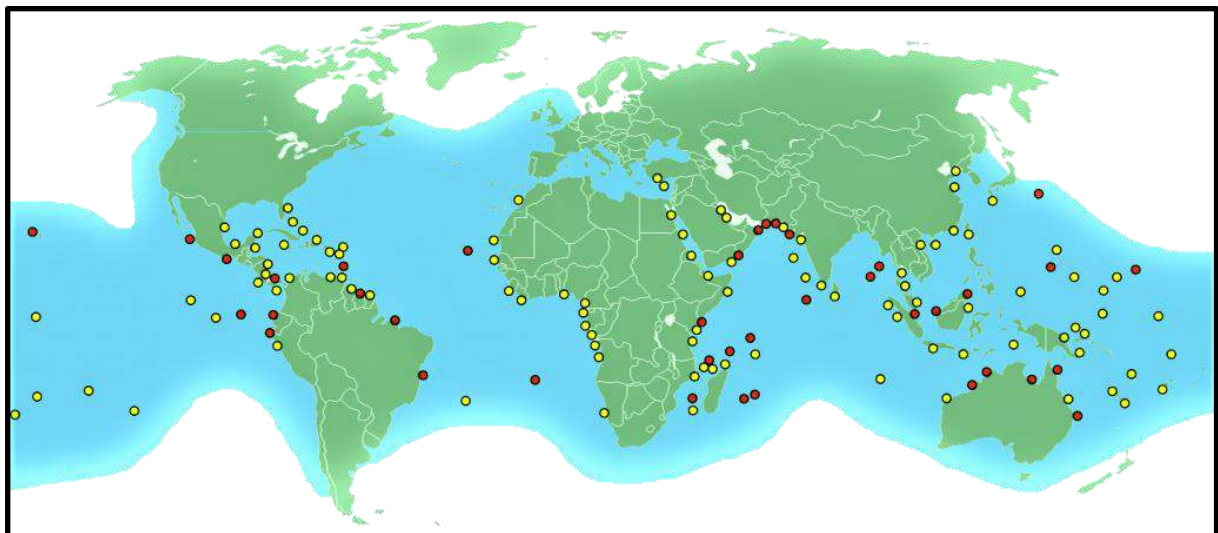


Figura 2: Sitios de anidación y distribución de *Chelonia mydas*.
Extraído de <https://tortugastenerife.com/tortuga-verde-chelonia-mydas/>

Es debido a su longevidad y sus amplios patrones migratorios, que ejemplares adultos de *Chelonia mydas* han sido catalogados como buenos bioindicadores de contaminación ambiental marina y salud general ecosistémica. Ya que a lo largo de

su vida se ven expuestas a distintos ambientes (costeros y marinos) y también a la posible contaminación de los mismos (Darwich & Molina-López, 2022; Short et al., 2023). Estas razones fundamentan que ejemplares adultos de esta especie hayan sido sujeto de estudio por investigadores para el diagnóstico de resistencia antimicrobiana como ya hemos mencionado.

En Uruguay desde el año 1979 existen registros de la especie realizados por Gambarotta y Gudynas, donde se reporta la llegada de *Chelonia mydas* en etapas juveniles (ejemplares alrededor de los 40 cm de diámetro y sin diferenciación sexual) no existiendo registros de playas de anidación, ni de ejemplares adultos en costas uruguayas. Existen también trabajos donde se destaca que estos ejemplares juveniles llegan a alimentarse de pastos, peces y algas marinas a lo largo de la costa atlántica de Uruguay. Durante estas etapas las tortugas juveniles generalmente residen en un área particular, alimentándose hasta que alcanzan la madurez sexual y migran a otras latitudes más cálidas, mientras que el resto de sus etapas de vida lo cumplen en otras regiones en donde además también modifican sus hábitos de alimentación (Drane et al., 2021; Hirth, 1979; López-Mendilaharsu et al., 2016).

Los estudios en fauna marina nos brindan información acerca del impacto que producen las acciones antropogénicas en los ecosistemas y las especies silvestres. Teniendo en cuenta que los ecosistemas costeros reciben los desechos urbanos y rurales a través de sus aguas y los hábitos de *Chelonia mydas* son costeros, hace a esta especie vulnerable a la polución ambiental de las costas marinas, viéndose necesario el esfuerzo por conservar a esta especie y minimizar el impacto al ecosistema así como también entender cómo interfieren estas amenazas en la supervivencia de estas especies (Deng et al., 2020; Drane et al., 2021 & Solano et al., 2004).

11.2 Resultados para el Objetivo específico 2:

“Evidenciar la presencia de resistencia fenotípica a antimicrobianos en enterobacterias provenientes de hisopados cloacales de ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* del Litoral atlántico de Uruguay”.

MUESTRAS

Se analizaron un total de 45 hisopados provenientes de ejemplares juveniles de tortugas verdes capturadas de la costa atlántica de Uruguay entre los meses de diciembre y febrero de los años 2019 y 2020 respectivamente.

Cada uno de los hisopos provenientes de animales muestreados, fue procesado según la metodología descrita en materiales y métodos para la obtención de los crecimientos . Se obtuvieron un total de 67 aislamientos puros de enterobacterias

sobre los cuales posteriormente se realizaron las pruebas de sensibilidad fenotípica a los ATMs. (Figura. 12).

Posteriormente al estudio de sensibilidad, cada uno de los aislamientos fue enriquecido en medio Caldo de Tripticasa de Soya (TSB) para ser criopreservado en TSB + 10% de glicerol, en freezer a -80°C para su posterior utilización en ensayos de este grupo de investigación.

PERFILES DE RESISTENCIA ENCONTRADOS

El estudio de la sensibilidad a antimicrobianos en los 67 aislamientos provenientes de 45 hisopados cloacales de ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* evidenciaron presencia de resistencia fenotípica a varios de los antimicrobianos testeados. (tabla 1).

Los antimicrobianos que presentaron mayores porcentajes de resistencia fenotípica fueron las Cefalosporinas de 2da° generación con 62,68%, seguidos de las Penicilinas con 50,7%, Tetraciclinas con un 17,91% y Aminoglucósidos con 5,97%. Los resultados obtenidos para la familia de las Fluoroquinolonas, Fenicoles y Cefalosporinas de 3ra° generación presentaron perfiles de resistencia de 2,98%. Asimismo, se evidenció ausencia de resistencia fenotípica para la familia de las Sulfonamidas. (Figura 3). En la Figura 4 se visualizan los resultados por familia de antimicrobianos.

Tabla 1. Descripción de aislamientos resistentes por cada antimicrobiano testado en 67 aislamientos provenientes de 45 hisopados cloacales de ejemplares juveniles de *Chelonia mydas*.

Antimicrobiano testado	Número de aislamientos resistentes
Cefoxitina (FOX)	42
Cefovecin (CVN)	2
Amoxicilina/Ác. Clavulánico (AMC)	34
Tetraciclina (TE)	12
Florfenicol (FFC)	2
Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT)	0
Enrofloxacin (ENR)	2
Gentamicina (CN)	4

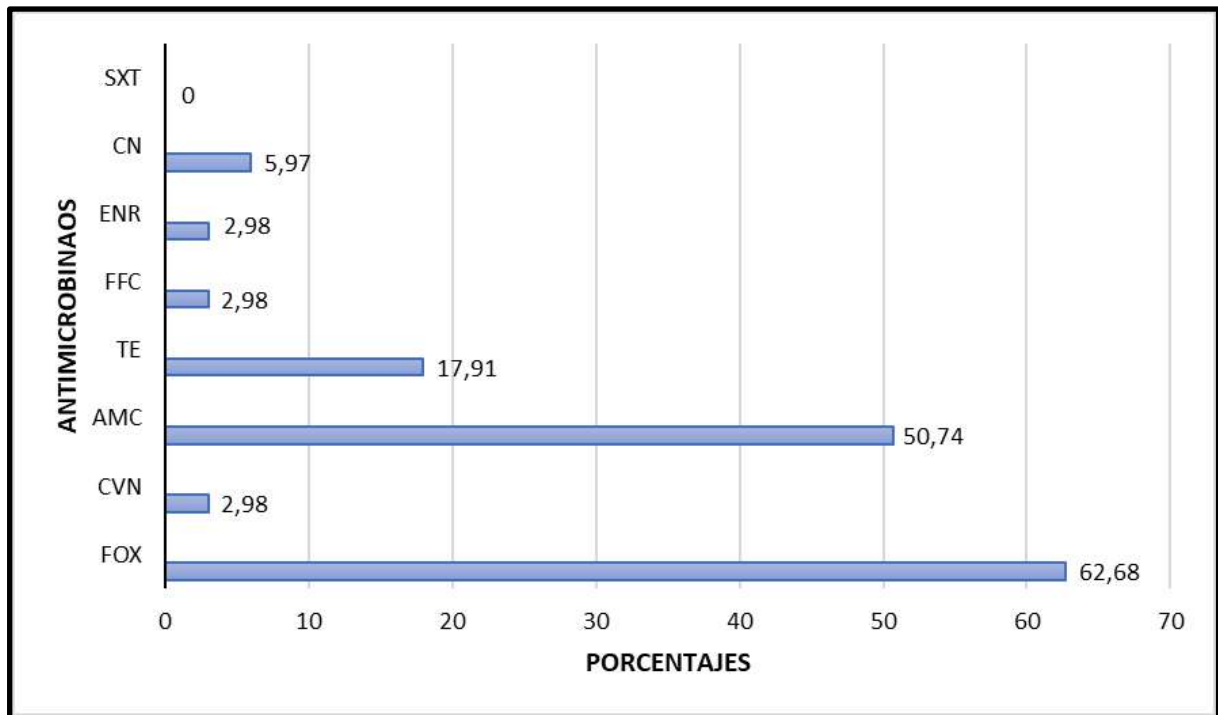


Figura 3: Representación gráfica de los porcentajes obtenidos para RAM en los antimicrobianos testados en los 67 aislamientos provenientes de 45 hisopados cloacales de ejemplares juveniles de *Chelonia mydas*. Cefoxitina (FOX), Cefovecin (CVN), Amoxicilina/Ác. Clavulánico (AMC), Tetraciclina (TE), Florfenicol (FFC), Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT), Enrofloxacin (ENR), Gentamicina (CN)

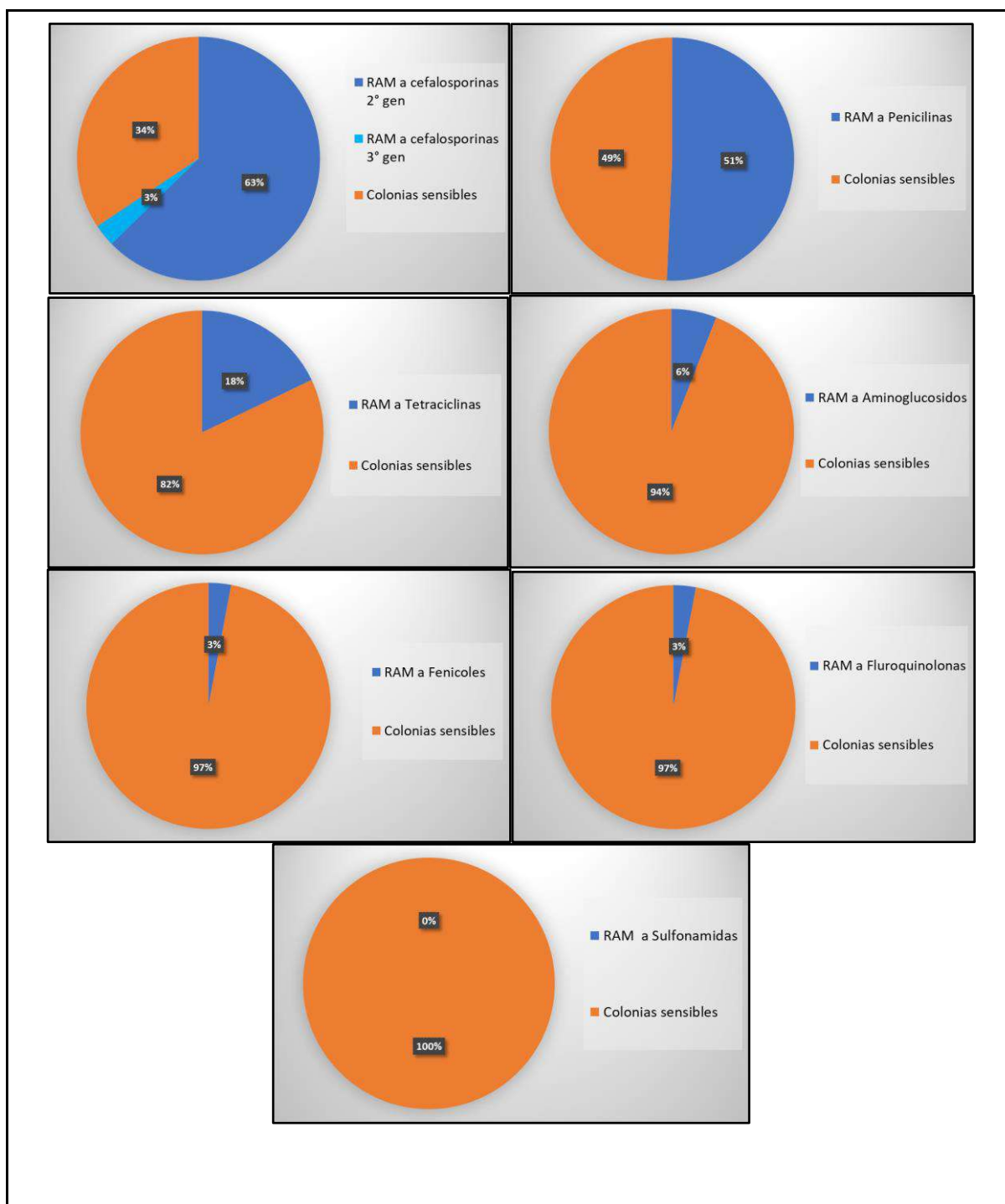


Figura 4: Representación gráfica de sensibilidad bacteriana en los 67 aislamientos provenientes de 45 hisopados cloacales de ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* por familia de los antimicrobianos testados Cefoxitina (FOX), Cefovecin (CVN), Amoxicilina/Ác. Clavulánico (AMC), Tetraciclina (TE), Florfenicol (FFC), Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT), Enrofloxacina (ENR), Gentamicina (CN)



a



b

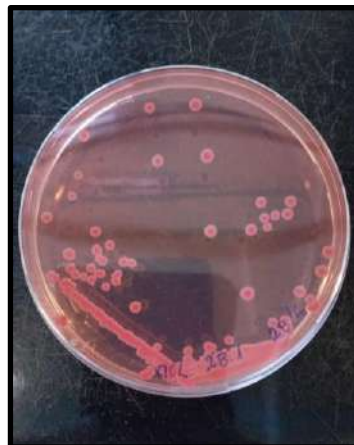


c

Figura 5, a) Cultivos en placas de Agar TSA obtenidos de muestras de *Chelonia mydas*, b) placas c) incubados durante 24 horas en estufa a 37°C.



a



b



c

Figura 6: Ejemplos de crecimientos bacterianos obtenidos en medios: a) agar TSA y b) y c) Mac Conkey.



a



b

Figura 7: Imagen de microscopía óptica (a) se observan bacilos gram negativos en frotis con tinción de Gram. En b) se observa el resultado de uno de los antibiogramas realizados en Agar Muller Hilton.

12. DISCUSIÓN

Esta tesis se centra en la problemática de la resistencia antimicrobiana (RAM) desde una perspectiva ambiental, explorando su impacto en una especie de la fauna silvestre marina y el posible rol que la misma puede tener en el ciclo y el estudio de la RAM. Se examina específicamente el papel de la tortuga verde (*Chelonia mydas*), destacando su relevancia como indicador clave en el estudio de este fenómeno a escala mundial y local.

Como surge del estado del arte realizado la problemática de la RAM es una preocupación extendida que afecta diversos ecosistemas y constituye una amenaza para la salud pública, la seguridad alimentaria, el desarrollo económico y la biodiversidad a escala global. En este contexto el avance de la RAM ha sido identificado como una de las principales preocupaciones por parte de la OMS quienes en el año 2015 lanzaron un plan de acción mundial con un enfoque integrado, el cual fue adoptado por Uruguay y otros varios países. Este enfoque integrado, busca mitigar los riesgos asociados a la problemática de la resistencia y promover prácticas sostenibles en el uso de antimicrobianos, basándose en que el uso de estos fármacos provoca una presión de selección sobre los microorganismos y esto favorece la aparición de cepas resistentes. En este sentido, y como fue mencionado en esta tesis, varias de las publicaciones coinciden con este planteamiento y sostienen que la utilización indiscriminada de ATMs en animales, seres humanos y agricultura ha incrementado la presión de selección sobre los microorganismos, facilitando la aparición y diseminación de cepas resistentes (Eliopulos et al., 2022; Pace et al., 2019; Vázquez-Cabrera et al., 2023). En Uruguay, por ejemplo, en el año 2017 Camou y colaboradores en su trabajo sobre RAM, ilustraron a través de una línea del tiempo, la correlación entre el descubrimiento y uso de ATMs y la aparición de resistencias, evidenciando así el rápido avance de los microorganismos portadores de genes de resistencia.

Comprender cómo esta problemática y su dinámica impactan en diferentes ambientes es fundamental para diseñar estrategias efectivas de mitigación y preservación de la salud en el contexto Una Salud. En este sentido la investigación de los ecosistemas y su relación con la RAM se presenta como un aspecto crucial para salvaguardar tanto la salud humana y animal como la ambiental, evitando un posible retroceso a la era pre-antibiótica, como ya han advertido varios expertos (Camou et al., 2017; Rousham et al., 2018; Wellington, 2013). Siguiendo con este razonamiento y con el enfoque multidisciplinario e integrado planteado por la OMS, el rol de los profesionales veterinarios adquiere amplia relevancia en la lucha contra la RAM. En este contexto, a nivel nacional desde el año 2017, el MGAP lleva adelante un plan de acción Nacional para hacer frente al avance de la RAM: "Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay" (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [MGAP], 2017) el cual se suma a otro programa formulado por el MSP

(Ministerio de Salud Pública [MSP], 2023). El objetivo de ambos, es la presentación de un plan de acción nacional y único, bajo la premisa «Una Salud» (MSP, 2023) enmarcando de esta forma el concepto de una sola salud sobre la problemática de la RAM a nivel Nacional. Además, también a nivel nacional, desde el año 2019, se encuentra conformado el Núcleo de Abordaje Interdisciplinario de la Resistencia Antimicrobiana en Medicina Veterinaria (Núcleo RAM) en el cual participan la Facultad de Veterinaria a través del laboratorio de Microbiología y la Unidad de Farmacología, la Facultad de Medicina a través del Instituto de Higiene y la Facultad de Química. Cabe resaltar que, a raíz de este esfuerzo multidisciplinario y los trabajos realizados por el Núcleo RAM a nivel nacional, existen diversas publicaciones sobre la problemática RAM en distintos sistemas de producción animal en Uruguay (Bado et al., 2023; Coppola et al., 2020; León-Félix & Vignoli, 2023; Moreira, 2022; Umpiérrez et al., 2022), así como también en medicina de pequeños animales (D'Agosto et al., 2021). Sin embargo, es importante señalar que, a pesar de los avances significativos logrados a nivel local, incluyendo la elaboración de documentos estratégicos y la generación de resultados de investigación valiosos, aún persisten desafíos importantes. Se requiere una mayor coordinación entre entidades públicas, la academia, el sector privado, los profesionales de la salud y la sociedad civil. Además, es necesario intensificar los esfuerzos de difusión de la problemática a nivel poblacional para aumentar la conciencia pública. La existencia de múltiples documentos y planes en un país relativamente pequeño como Uruguay, si bien demuestra un compromiso, también sugiere la necesidad de una mayor integración y simplificación de las estrategias en los próximos años para optimizar recursos y maximizar el impacto de las intervenciones contra la RAM.

En este orden de ideas, la realización de estudios de RAM en fauna silvestre también constituye un aporte valioso que contribuye al abordaje interdisciplinario del estudio y mitigación de la RAM principalmente a nivel ambiental. Como se menciona en este trabajo, existen varios antecedentes en las últimas décadas en los que grupos de investigación a nivel internacional han centrado sus estudios de RAM en la fauna silvestre, tanto marina como terrestre, de distintas regiones, existiendo además un antecedente de un trabajo realizado en fauna marina a nivel nacional. De estos trabajos surgen los hallazgos comunicados y destacados en esta tesis, donde se reportan la presencia de RAM en distintos ambientes silvestres (Ahasan, 2017; Eliopulos et al., 2022; Maravić et al., 2015). Como se mencionó anteriormente en esta discusión, los ecosistemas marinos que cubren el 75% de la superficie total de la Tierra y albergan más del 90% de la toda la vida del planeta, incluidas las bacterias (Drane et al., 2021), tampoco están libres del avance letal e implacable de la RAM. En este contexto el estudio sobre los mismos es urgente y prioritario para entender el ciclo de la RAM en el medio marino, el cual unas décadas atrás era considerado como el gran diluyente del problema. Al día de hoy existen diversas publicaciones que descartan la posibilidad de que el ambiente marino sirva como un agente de dilución que colabore con la lucha al avance de la RAM y en contraposición, los mismos, posicionan los ambientes acuáticos silvestres y su fauna residente como piezas

claves a estudiar (Ahasan et al., 2017; Al-Bahry et al., 2011; O'Leary et al., 2017). Coincidimos plenamente con esta perspectiva, ya que la evidencia acumulada en los últimos años respalda firmemente la idea de que los ecosistemas marinos, lejos de diluir el problema de la RAM, pueden actuar como reservorios y facilitadores de su propagación. Esta nueva comprensión subraya la importancia crítica de incluir los ambientes acuáticos y su biodiversidad en las estrategias integrales de vigilancia y control de la resistencia antimicrobiana.

En cuanto a la determinación del origen de las resistencias reportadas en los distintos trabajos publicados, varias investigaciones sugieren que múltiples factores antropogénicos podrían contribuir significativamente a este problema en los ecosistemas costeros y marinos. Los ambientes acuáticos están expuestos constantemente a una variedad de contaminantes provenientes de efluentes domésticos, nosocomiales, industriales y productivos, incluyendo antimicrobianos, desinfectantes, residuos químicos y metales pesados (Ahasan et al., 2017; Eliopulos et al., 2022; Zavala-Norzagaray et al., 2015). Si bien estos estudios proporcionan evidencia convincente sobre la presión selectiva que estos contaminantes ejercen sobre las comunidades bacterianas, es importante señalar que la relación causal directa entre estos factores y la aparición de resistencias específicas aún no está completamente establecida en todos los casos. Además, como se mencionó, es crucial considerar que los ecosistemas marinos y costeros son sistemas complejos con una gran capacidad de resiliencia. Por lo tanto, aunque la contaminación antropogénica sin duda juega un papel importante, no podemos descartar la posibilidad de que algunos mecanismos de resistencia observados sean el resultado de procesos evolutivos naturales o de adaptaciones preexistentes en estas comunidades microbianas. Esta complejidad subraya la necesidad de estudios más exhaustivos que integren análisis metagenómicos, estudios ecológicos a largo plazo y experimentos controlados para desentrañar la contribución relativa de los factores antropogénicos frente a los procesos naturales en la emergencia y propagación de resistencias antimicrobianas en estos ecosistemas.

Por otra parte, y considerando los resultados experimentales generales obtenidos en esta tesis, que indican la presencia de RAM en aislamientos de tortugas verdes de vida libre de Uruguay, se subraya la preocupación por la posible contaminación y dispersión de bacterias resistentes en ambientes marinos costeros habitados por esta especie. A nivel global, diversas publicaciones han documentado la presencia elevada de bacterias resistentes a antibióticos en tortugas marinas de vida libre, como las tortugas bobas (*Caretta caretta*), negras (*Chelonia mydas agassizii*), golfina (*Lepidochelys olivacea*) y verdes (*Chelonia mydas*) (Ahasan, 2017; Al-Bahry et al., 2012; Alduina et al., 2020; Foti et al., 2009; O'Leary et al., 2017; Pace et al., 2019; Zavala-Norzagaray et al., 2015). Sin embargo, la originalidad de esta tesis radica en que el estudio se centra en muestras de tortugas verdes juveniles de vida libre, quienes, debido a su corta edad, limitada participación en migraciones transoceánicas y nula exposición a tratamientos médicos, podrían tener una menor exposición a

ambientes contaminados con ATMs y una reducida oportunidad de intercambio genético o bacteriano con otras especies. Aunque la RAM en tortugas verdes juveniles aún es ampliamente desconocida, estudios recientes en *Sea Turtle Conservation Center of Thailand* durante los años 2015 al 2016, 2018 y 2019 han documentado altos niveles de resistencia (Chuen-Im et al., 2021). No obstante, es crucial destacar que estos estudios se basaron en muestras de tortugas en cautiverio, con condiciones y manejo que difieren significativamente del ambiente natural oceánico investigado en esta tesis. El entorno de cautiverio puede ejercer presiones únicas sobre la microbiota de las tortugas debido a posibles tratamientos con ATMs, cambios en la dieta, estrés, entre otros. Esta situación contrasta con la dinámica natural de exposición y dilución en los océanos, aspectos fundamentales para entender la resistencia antimicrobiana en este contexto. En ese marco, investigaciones recientes han destacado que, en etapas tempranas, las tortugas verdes juveniles pueden estar expuestas a fuentes de contaminación bacteriana, como las aguas residuales no tratadas y los desechos plásticos que afectan sus hábitats costeros (Lange et al., 2022; Santos et al., 2023). Análisis genéticos han revelado que estas bacterias resistentes pueden persistir y transmitirse a lo largo de las rutas de migración de las tortugas juveniles, lo que plantea preocupaciones adicionales sobre la propagación global de resistencia antimicrobiana (Smith et al., 2021). Esta comprensión es crucial para implementar estrategias de conservación efectivas que protejan tanto a las Tortugas Verdes como a la salud de los ecosistemas marinos en su conjunto.

Los resultados obtenidos en esta tesis, proporcionan una valiosa aproximación preliminar a la problemática de la RAM en estos animales en su hábitat natural. Nuestros hallazgos muestran patrones de resistencia preocupantes, con una alta prevalencia particularmente a las Cefalosporinas de 2da generación (62,68%), Penicilinas (50,7%), y Tetraciclinas (17,91%), seguidas por Aminoglucósidos (5,97%), y una baja resistencia a Fluoroquinolonas, Fenicoles y Cefalosporinas de 3ra generación (2,98% cada uno), con ausencia de resistencia a Sulfonamidas. Estos resultados sugieren una posible exposición significativa a ciertos antimicrobianos en el ambiente marino, posiblemente debido a la contaminación antropogénica. Al contrastar con otras publicaciones, se observan diferencias significativas: Chuen-Im et al. (2021) encontraron mayor resistencia a ampicilina (26,13%) en tortugas en cautiverio en Tailandia, mientras que Zavala-Norzagaray et al. (2015) reportaron altos niveles de resistencia a tetraciclina en tortugas de vida libre en México, alineándose con nuestros hallazgos. Es importante destacar que todos nuestros aislados fueron resistentes a al menos un antibiótico, consistente con Al-Bahry et al. (2011) pero contrastando con el 71,17% de Chuen-Im et al. (2021). La elevada resistencia a Cefalosporinas de 2da generación en nuestro estudio es particularmente llamativa y podría indicar una contaminación ambiental específica en las aguas costeras uruguayas, difiriendo de lo reportado por Foti et al. (2009) en tortugas bobas del Mediterráneo. Estos hallazgos destacan la importancia de considerar el contexto ambiental y geográfico al interpretar los patrones de resistencia antimicrobiana en

tortugas marinas, y resaltan la necesidad urgente de investigaciones más amplias y estandarizadas que comparen poblaciones en cautiverio y de vida libre en diferentes regiones del mundo para obtener una comprensión más completa de la situación global de la resistencia antimicrobiana en estas especies y sus implicaciones para la salud de los ecosistemas marinos.

Por otra parte, la complejidad de los hallazgos de RAM en ambientes marinos nos obliga a reconsiderar el papel de las especies migratorias, como las tortugas marinas, en la diseminación global de resistencias antimicrobianas. Si bien es intuitivo asumir que estas especies actúan como reservorios y vectores de RAM debido a sus extensas migraciones, debemos abordar esta hipótesis con cautela. Las tortugas verdes, por ejemplo, realizan viajes de gran escala entre sus áreas de alimentación y playas de anidación, exponiéndose a diversos ecosistemas marinos y comunidades microbianas. Sin embargo, la mera presencia de bacterias resistentes en estos animales no implica necesariamente que sean vectores efectivos de RAM. Es crucial considerar factores como la viabilidad de las bacterias resistentes durante las migraciones, la frecuencia de intercambio genético entre poblaciones bacterianas, y la capacidad de colonización en nuevos ambientes. Algunos estudios, como los de Al-Bahry et al. (2011) y Ahasan et al. (2017), sugieren un potencial papel de las tortugas en la diseminación de RAM, pero se requiere más investigación para establecer una relación causal directa. Además, debemos sopesar la contribución relativa de las tortugas marinas frente a otros factores como la contaminación antropogénica o las corrientes oceánicas en la propagación de RAM. Los hallazgos de esta tesis, aunque centrados en Uruguay, plantean interrogantes de alcance global, subrayando la necesidad de un enfoque holístico que considere las complejas interacciones ecológicas en la diseminación de resistencias antimicrobianas en ambientes marinos.

Finalmente, los hallazgos de este trabajo también consideran un potencial riesgo para la salud pública, dado que los microorganismos resistentes o sus genes podrían alcanzar a los humanos por diversas vías. Se plantea la hipótesis de una posible transmisión indirecta a través del contacto con agua costera o mediante el consumo de alimentos marinos, aunque estas teorías requieren más investigación para ser confirmadas (Gutiérrez, 2022; Hernández-Agreda et al., 2020; Millanao et al., 2018). La transmisión directa es una preocupación real en centros de rehabilitación que manejan diversas especies de fauna marina, incluyendo, pero no limitándose a tortugas marinas de diferentes especies y edades, así como otros animales marinos (Ahasan et al., 2017). Es importante señalar que los ensayos microbiológicos de esta tesis se realizaron con incubaciones a 37°C, una temperatura estándar para cultivos bacterianos que, si bien no refleja las condiciones naturales de estos animales ectotermos, sí se aproxima a la temperatura corporal de los mamíferos, incluidos los humanos. Esta elección metodológica permite evaluar el potencial de crecimiento y expresión de resistencia de estas bacterias en condiciones similares a las del cuerpo humano, lo cual es crucial para comprender los riesgos zoonóticos. Los resultados

obtenidos son, por tanto, particularmente relevantes en el contexto de la salud pública y la transmisión potencial a humanos. Futuros estudios que incluyan cultivos a temperaturas más bajas, representativas del hábitat marino, podrían proporcionar información complementaria valiosa sobre el comportamiento de estas bacterias en su entorno natural (Pace et al., 2019). La presencia de RAM en estas poblaciones plantea desafíos significativos para el manejo clínico en centros de rehabilitación, exigiendo la implementación de estrategias rigurosas que incluyan protocolos de prevención de infecciones, uso prudente de ATMS basado en cultivos y antibiogramas, y el desarrollo de tratamientos alternativos (Innis et al., 2017). El impacto de la RAM trasciende lo ecológico, con implicaciones económicas y sociales considerables que podrían amenazar tanto la salud animal como la humana (Barrantes et al., 2022). Estos resultados enfatizan la urgencia de adoptar un enfoque Una Salud , reconociendo la interconexión entre la salud de los ecosistemas marinos, la fauna y los seres humanos, y demandan una colaboración interdisciplinaria para desarrollar estrategias efectivas de mitigación y prevención de la resistencia antimicrobiana en el contexto marino (Aguirre et al., 2019).

13. CONCLUSIONES

Los ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* se confirman como bioindicadores efectivos de la resistencia antimicrobiana en el ambiente marino uruguayo. El estudio detectó una alta prevalencia de resistencia a ATMs de uso frecuente en medicina veterinaria en las enterobacterias aisladas de estas tortugas, especialmente a cefalosporinas de segunda generación (62.68%), penicilinas (50.7%) y tetraciclinas (17.91%). Estos hallazgos sugieren una potencial contaminación por ATMs en el ecosistema marino costero de Uruguay. Los patrones de resistencia observados difieren de los reportados en otros estudios globales, lo que resalta la importancia de considerar factores geográficos y ambientales específicos al evaluar la RAM en fauna marina. La presencia de resistencia en tortugas de vida libre plantea preocupaciones sobre la salud de los ecosistemas marinos y subraya la necesidad de adoptar un enfoque Una Salud que integre la salud humana, animal y ambiental a nivel local. Este estudio destaca la urgencia de implementar estrategias más rigurosas de conservación y manejo clínico en centros de rehabilitación de fauna marina. Los resultados obtenidos contribuyen significativamente al conocimiento sobre la resistencia antimicrobiana en la fauna marina de Uruguay y establecen una base sólida para futuras investigaciones en este campo, enfatizando la importancia de monitorear y abordar este problema de salud global.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, G. (2003). *Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será*. *Revista chilena de infectología*, 20, 7-10. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100001>
- Ahasan, M., Picarda, J., Elliott, L., Kinobe, R., Owens, L., & Ariela, E. (2017). Evidence of antibiotic resistance in Enterobacteriales isolated from green sea turtles, *Chelonia mydas* on the Great Barrier Reef. *Marine Pollution Bulletin*, 120(1-2), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.046>
- Al-Bahry, S.N., Mahmoud, I.Y., Al-Belushi, K.I.A., Elshafie, A.E., Al-Harthy, A.M., & Bakheit, C.K. (2009). Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chemosphere*, 77(11), 1534-1539. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.052>
- Al-Bahry, S., Mahmoud, I., Elshafie, A., Al-Harthy, A., Al-Ghafri, S., Al-Amri, I., & Alkindi, A. (2009). Bacterial flora and antibiotic resistance from eggs of green turtles *Chelonia mydas*: An indication of polluted effluents. *Marine Pollution Bulletin*, 58(5), 720-725. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.12.018>
- Al-Bahry, S.N., Mahmoud, I.Y., Al-Zadjali, M., Elshafie, A., Al-Harthy, A., & Al-Alawi, W. (2011). Antibiotic resistant bacteria as bio-indicator of polluted effluent in the green turtles, *Chelonia mydas* in Oman. *Marine Environmental Research*, 71(2), 139-144. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.12.005>
- Al-Bahry, S.N., Al-Zadjali, M.A., Mahmoud, I.Y., & Elshafie, A.E. (2012). Biomonitoring marine habitats in reference to antibiotic resistance bacteria and ampicillin resistance determinants from oviductal fluid of the nesting green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Chemosphere*, 87, 1308–1315.
- Albrechtová, K., Papoušek, I., De Nys, H., Pauly, M., Anoh, E., Mossoun, A., Dolejska, M., Masarikova, M., Metzger, S., Couacy-Hymann, E., Akoua-Koffi, C., Wittig, R.M., Klimes, J., Cizek, A., & Literak, I. (2014). Low rates of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae in wildlife in Taï National Park, Côte d'Ivoire, surrounded by villages with high prevalence of multiresistant ESBL-producing *Escherichia coli* in people and domestic animals. *PLoS One*, 9(12), e113548.
- Alduina, R., Gambino, D., Presentato, A., Gentile, A., Sucato, A., Savoca, D., Filippello, S., Visconti, G., Caracappa, G., & Vicari, D. et al. (2020). Is *Caretta caretta* a carrier of antibiotic resistance in the Mediterranean Sea? *Antibiotics*, 9, 116.

- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (4), 251-259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Allen, H. K., & Stanton, T. B. (2014). Altered egos: antibiotic effects on food animal microbiomes. *Annual Review of Microbiology*, 68, 297-315. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113052>
- Amoozadeh, E., Malek, M., Rashidinejad, R., Nabavi, S., Karbassi, M., Ghayoumi, R., Ghorbanzadeh-Zafarani, G., Salehi, H., & Sures, B. (2014). Marine organisms as heavy metal bioindicators in the Persian Gulf and the Gulf of Oman. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 2386-2395.
- Bachmann, V.M. (2022). *Microbial Composition, Pathogen Identification, and Antibiotic Resistance of Respiratory, Gut and Skin Microbial Community of the Loggerhead Caretta caretta and Green Sea Turtle Chelonia mydas Eastern Mediterranean Population* [Tesis doctoral, Universidad de Haifa]. ProQuest. <https://www.proquest.com/openview/df1893be3bd650e7ce94c05a87526a00/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026366&diss=y>
- Bado Vazquez, M. I., Coppola Fon, N. A., Cordeiro García, N., Ferreira Acosta, F., Iriarte Odini, A., Papa Ezdra, R., Varela Pensado, G., & Vignoli Cabrera, E. R. (2023). Informe final del proyecto: ¿Que estamos comiendo? Búsqueda de mecanismos de resistencia en alimentos congelados. https://redi.anii.org.uy/jspui/bitstream/20.500.12381/3455/1/Informe_final_publicable_FMV_3_2020_1_162024.pdf
- Baquero, M. I. (2023). *Determinación de Perfiles de Resistencia a los Antimicrobianos de Importancia Crítica en Cepas de Escherichia coli y Enterococcus spp. aislados de Pinzones Terrestres (Geospiza spp.) de la Isla Santa Cruz en Galápagos* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. Sedici. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/150849>
- Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L., & Arias Andrés, M. (2022). El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2), 305-329.
- Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 56(10). <https://doi.org/10.1093/cid/cit070>
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H.A., & Wright, G. D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS One*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>

- Bonelli, R.R., Moreira, B.M., & Picão, R.C. (2014). Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*, 17(1-2), 24-36. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.02.001>
- Bonnedahl, J., & Järhult, J. D. (2014). Antibiotic resistance in wild birds. *Uppsala journal of medical sciences*, 119(2), 113-116.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Boxall, A.B., Johnson, P., Smith, E.J., Sinclair, C.J., Stutt, E., & Levy, L.S. (2006). Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2288-2297.
- Briñas, L., Moreno, M. A., Zarazaga, M., Porrero, C., Sáenz, Y., García, M., Doménguez, L., & Torres, C. (2003). Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6), 2056-2058. <https://doi.org/10.1128/aac.47.6.2056-2058.2003>
- Camou, T., Zunino, P., & Hortal, M. (2017). Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Revista Médica del Uruguay*, 33(4), 104-127. <https://doi.org/10.29193/RMU.34.3.6>
- Candan, O., & Candan, E. D. (2020). Bacterial diversity of the green turtle (*Chelonia mydas*) nest environment. *Science of the Total Environment*, 720, 137717.
- Canton, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 20-25.
- Cantor, M., Barreto, A. S., Taufer, R. M., Giffoni, B., Castilho, P. V., Maranhão, A., Beatriz, C., Kolesnikovas, C., Godoy, D., Rogério, D.M., Dick, J.L., Groch, K.R., Rosa, L., Cremer, M.J., Cattani, P.A., Valle, R.R., & Domit, C. (2020). High incidence of sea turtle stranding in the southwestern Atlantic Ocean. *ICES Journal of Marine Science*, 77(5), 1864-1878.
- Cattoir, V., Poirel, L., Aubert, C., Soussy, C.J., & Nordmann, P. (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 231. <https://doi.org/10.3201%2F1402.070677>

Center for Disease Control and Prevention. (s.f.). <https://www.cdc.gov/index.html>

Chuen-Im, T., Sawetsuwannakun, K., Neesanant, P., & Kitkumthorn, N. (2021). Antibiotic-resistant bacteria in green turtle (*Chelonia mydas*) rearing seawater. *Animals*, 11(6), 1841.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020) *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals*. (5th ed.) CLSI supplement VET01S.

Cole, M. A., & Elliott, R. J. (2005). FDI and the capital intensity of “dirty” sectors: a missing piece of the pollution haven puzzle. *Review of Development Economics*, 9(4), 530-548.

Coppola, N., Freire, B., Umpiérrez, A., Cordeiro, N. F., Ávila, P., Trenchi, G., Castro, G., Casaux, M.L., Fraga, M., Zunino, P., Baldo, I., & Vignoli, R. (2020). Transferable resistance to highest priority critically important antibiotics for human health in *Escherichia coli* strains obtained from livestock feces in Uruguay. *Frontiers in veterinary science*, 7, 588919. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.588919>.

Crofts, T. S., Gasparrini, A. J., & Dantas, G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 422-434. <https://doi.org/10.1038%2Fnrmicro.2017.28>

Dantas, G., & Sommer, M.O.A. (2014). How to fight back against antibiotic resistance. *American Scientist*, 102, 42-51.

Darwich, L., & López, R. A. M. (2022). Vigilantes medioambientales. La fauna salvaje, centinela de la contaminación medioambiental por resistencia a los antimicrobianos en Cataluña. *Metode Science Studies Journal*, (114), 73-79. <https://doi.org/10.7203.metode.13.23653>

D'Agosto Laicovski, S. T., García Fulgueiras, V., Coppola, N., Vidal Curtinella, I., Puentes, R., & Vignoli, R. (2021, agosto). *Caracterización de los mecanismos de resistencia a oximino-cefalosporinas en aislamientos de Escherichia coli procedentes de hisopados rectales caninos en Uruguay* [Ponencia] I Congreso de Microbiología Veterinaria. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/view/1716/1695/5519-1>

D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311(5759), 374-377. <https://doi.org/10.1126/science.1120800>

- de Toro, M., Sáenz, Y., Cercenado, E., Rojo-Bezares, B., García-Campello, M., Undabeitia, E., & Torres, C. (2011). Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals. *International Microbiology*, 14(3), 173-81. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.146>
- Delgado, J. G., Ruiz, W. K., Fernández, N. G. N., Domínguez-Odio, A., & Cala-Delgado, D. L. (2024). Antimicrobianos en la salmonicultura global: Resistencia, efecto en la salud humana y medio ambiente, y perspectivas futuras. *Scientia Agropecuaria*, 15(1), 85-101.
- Dewulf, J., Sternberg-Lewerin, S., Ryan, M., & North, J. (2020). Tackling antimicrobial resistance in the food and livestock sector. En M. Anderson, M. Cecchini, & E. Mossialos (Eds.), *Challenges to tackling antimicrobial resistance: Economic and policy responses* (pp. 99-124). Cambridge.
- Deng, C., Liu, X., Li, L., Shi, J., Guo, W., & Xue, J. (2020). Temporal dynamics of antibiotic resistant genes and their association with the bacterial community in a water-sediment mesocosm under selection by 14 antibiotics. *Environment international*, 137, 105554.
- Ding, Y., Jiang, W., Liang, B., Han, J., Cheng, H., Haider, M. R., Wang, H., Liu, W., Liu, S., & Wang, A. (2020). UV photolysis as an efficient pretreatment method for antibiotics decomposition and their antibacterial activity elimination. *Journal of Hazardous Materials*, 392, 122321.
- Dirección General de Servicios Ganaderos. (2015). *Resolución N° 193/015 A de DGSG: Regulación de las condiciones de comercialización y uso de antibióticos y antimicrobianos para animales*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-n-193015-dgsg-regulacion-condiciones-comercializacion-uso>
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 11-19.
- Domiciano, I. G., Domit, C., Frederico, A.P., & Bracarense, R. L. (2017). The green turtle *Chelonia mydas* as a marine and coastal environmental sentinel: anthropogenic activities and diseases. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(5), 3417-3434.
- Drane, K., Huerlimann, R., Power, M., Whelan, A., Ariel, E., Sheehan, M., & Kinobe, R. (2021). Testudines as sentinels for monitoring the dissemination of antibiotic resistance in marine environments: an integrative review. *Antibiotics*, 10(7), 775.

- Duval, R. E., Grare, M., & Demoré, B. (2019). Fight against antimicrobial resistance: we always need new antibacterials but for right bacteria. *Molecules*, 24(17), 3152.
- Eliopulos, N., Alsina, L., Diana, L., & Brandl, S. (2022). Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolated from a Sea Lion (*Otaria flavescens*) specimen from Isla de Lobos, Uruguay: a case report. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(4). <https://doi.org/34188/bjaerv5n4-001>.
- Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- 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. *Marine Pollution Bulletin*, 58(9), 1363-1366. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.020>
- Foti, M., Mascetti, A., Fisichella, V., Fulco, E., Orlandella, B.M., & Lo Piccolo, F. (2017). Antibiotic resistance assessment in bacteria isolated in migratory Passeriformes transiting through the Metaponto territory (Basilicata, Italy). *Avian Research*, 8, 1-11.
- Fouz, N., Pangesti, K. N., Yasir, M., Al-Malki, A. L., Azhar, E. I., Hill-Cawthorne, G. A., & Abd El Ghany, M. (2020). The contribution of wastewater to the transmission of antimicrobial resistance in the environment: implications of mass gathering settings. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(1), 33.
- Frazier, J. (1999). Guest editorial: update on the Inter-American Convention for the Protection and Conservation of Sea Turtles. *Marine Turtle Newsletter*, 84(1).
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369-378.
- Gamboa, M., Reyes, R., & Arrivillaga, J. (2008). Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48(2), 109-120.
- García-Álvarez, L., Dawson, S., Cookson, B., & Hawkey, P. (2012). Working across the veterinary and human health sectors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(1). <https://doi.org/10.1093/jac/dks206>.

- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2), 129-136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 125-132. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.125-132.2000>
- Guenther, S., Grobbel, M., Heidemanns, K., Schlegel, M., Ulrich, R.G., Ewers, C., & Wieler, L.H. (2010). First insights into antimicrobial resistance among faecal Escherichia coli isolates from small wild mammals in rural áreas. *Science of the Total Environment*, 408(17), 3519-3522.
- Guerra, F. Q. S., Mendes, J. M., de Oliveira, W. A., de Sousa Rodrigues, L. A., Santos, B. H. C., & de Oliveira Lima, E. (2003). Atividade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre cepas de Acinetobacter spp. multidrogas-resistentes. *Revista de Biologia e Farmácia*, 7(1).
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D.I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *Pathogens Plos*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>.
- Gutierrez, A. M. (2022). *Epidemiología y resistencia a antimicrobianos de Campylobacter spp. procedentes de aves rapaces de un centro de recuperación de fauna silvestre* [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. Docta Complutense. <https://docta.ucm.es/entities/publication/3b2028f1-391a-4c17-acdd-66ba9f51655a>.
- Hansen, M. P., Hoffmann, T. C., McCullough, A. R., van Driel, M. L., & Del Mar, C. B. (2015). Antibiotic resistance: what are the opportunities for primary care in alleviating the crisis? *Frontiers in Public Health*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00035>
- Herrera García, M. (2020). *Implicaciones ambientales de la contaminación de sistemas acuáticos por productos farmacológicos: la amenaza de los antibióticos*. [Tesis de grado, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén]. UJA. <https://crea.ujaen.es/handle/10953.1/12287>.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guérin, P.J., & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176-187.

- Hirth, H. F. (1997). *Synopsis of the biological data on the green turtle Chelonia mydas (Linnaeus 1758)*. Fish and Wildlife Service.
- Huijbers, P.M., Larsson, D.J., & Flach, C.F. (2020). Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environmental Pollution*, 261, 114200. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114200>
- Jouini, A., Vinué, L., Slama, K. B., Saenz, Y., Klibi, N., Hammami, S., Boudabous, A., & Torres, C. (2007). Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5), 1137-1141. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm316>
- Juris, M. O. (2022). *Resistencia a los antibióticos en el medio marino* [Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la Laguna]. Riull. <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/30353>.
- Kim, D. W., & Cha, C. J. (2021). Antibiotic resistome from the One-Health perspective: Understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(3), 301-309.
- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A., & Graham, D. W. (2010). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science & Technology*, 44(2), 580-587.
- Kozak, G.K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R.J., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 559-566.
- Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, 7(6), 180.
- Larsson, D.G., & Flach, C.F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiología*, 20(5), 257-269.
- Lee, L.H., Ab Mutalib, N.S., Law, J.W.F., Wong, S.H., & Letchumanan, V. (2018). Discovery on antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in Selangor reveals carbapenemase producing *Vibrio parahaemolyticus* in marine and freshwater fish. *Frontiers in Microbiology*, 9, 407883. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02513>.

- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(Suppl 12), S122-S129.
- Livermore, D. M., Warner, M., Hall, L. M., Enne, V. I., Projan, S. J., Dunman, P. M., Dunman, P.M., Wooster, S.L., & Harrison, G. (2001). Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environmental Microbiology*, 3(10), 658-661.
- López-Mendilaharsu, M., Vélez-Rubio, G. M, Lezama, C., Aisenberg, A., Bauzá, A., Berrondo, L., Calvo, V., Caraccio, N., Estrades, A., Hernández, M., Laporta, M., Martinez-Sousa, G., Morales, M., Quirici, V., Rios, M., & Fallabrino, A. (2016). Datos demográficos y de prevalencia tumoral de juveniles de tortuga verde en el Área Marina Costera Protegida de Cerro Verde, Uruguay. *Marine Biology Research*, 12 (5), 541-550.
- Lupo, A., Papp-Wallace, K. M., Sendi, P., Bonomo, R. A., & Endimiani, A. (2013). Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 179-194.
- Mackenzie, J.S., & Jeggo, M. (2019). The one health approach—why is it so important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), 88.
- Maravić, A., Skočibušić, M., Cvjetan, S., Šamanić, I., Fredotović, Ž., & Puizina, J. (2015). Prevalence and diversity of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. *Marine Pollution Bulletin*, 90(1-2), 60-67.
- Maretti, C. C., Leão, A. R., Prates, A. P., Simões, E., Silva, R. B., Ribeiro, K. T., Geluda, L., Sampaio, M.S., Marques, F.F.C., Lobo, A.C., Lima, L.H. de, Pacheco, L.M., Manfrinato, W.A., Lezama, A.Q., Couto, M.T.P., & Subirá, R. J. (2019). Marine and coastal protected and conserved areas strategy in Brazil: Context, lessons, challenges, finance, participation, new management models, and first results. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29, 44-70.
- Martínez, J. L (2008). *Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments*. *Science*, 321 (5887), 365-367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>
- Martínez, J. L. (2017). Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. *F1000Research*, 6, 51. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9685.1>.

- Martínez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), 2521-2530. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0320>
- Martínez, R. E., & Villalobos, L. B. (2008). Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de alimentos y aguas residuales en Cumaná, Venezuela. *SABER*, 20(2), 172-176.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2017). *Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay*. https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/plan_nacional_de_contencion_de_la_resistencia_antimicrobiana_de_uruguay.pdf
- Moreira Olmos, C. (2022). *Resistencia antimicrobiana en los diferentes sistemas productivos bovinos del Uruguay: estimación de la prevalencia e identificación de factores asociados* [Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Colibrí. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/34657/1/TM%20Moreira%20Olmos%20Cyntia.pdf>
- Memar, M. Y., Yekani, M., Celenza, G., Poortahmasebi, V., Naghili, B., Bellio, P., & Baghi, H. B. (2020). The central role of the SOS DNA repair system in antibiotics resistance: A new target for a new infectious treatment strategy. *Life Sciences*, 262, 118562.
- Michael, C.A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in Public Health*, 2, 110657. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>
- Millanao, A. R., Barrientos-Schaffeld, C., Siegel-Tike, C. D., Tomova, A., Ivanova, L., Godfrey, H. P., Dölz, H.J., Buschmann, A.H., & Cabello, F. C. (2018). Antimicrobial resistance in Chile and The One Health paradigm: Dealing with threats to human and veterinary health resulting from antimicrobial use in salmon aquaculture and the clinic. *Revista Chilena de Infectología*, 35, 299-308.
- Ministerio de Salud Pública. (2023). *Plan Nacional de Acción contra la Resistencia Antimicrobiana*. <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/noticias/MSP%20PLAN%20NACIONAL%20ACCION%20CONTRA%20RESISTENCIA%20ANTIMICROBIANA.pdf>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. En I.T. Kudva, N.A. Cornick, P.J. Plummer, Q. Zhang, T.L. Nicholson, J.P. Bannantine, B. H.

Bellaire (Eds.), *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* (5^a ed., pp. 481-511). ASM.

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., C Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S.C., Browne, A.J., Givè Chipeta, M., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B.H., & Tasak, N. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.

O'Leary, J.K., Micheli, F., Airoidi, L., Boch, C., De Leo, G., Elahi, R., Ferretti, F., Graham, N.A.J., Litvin, S.Y., Low, N.H., Lummis, S., Nickols, K.J., & Wong, J. (2017). The resilience of marine ecosystems to climatic disturbances. *BioScience*, 67(3), 208–220. <https://doi.org/10.1093/biosci/biw161>.

Oller Ruiz, I. N. (2023). *Enfoque “One health” frente a la problemática de la resistencia a antibióticos* [Tesis de grado, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén.]. Crea UJA https://crea.ujaen.es/bitstream/10953.1/20131/1/TFG_Oller%20Ruiz_Irene%20Nea.pdf

Organización Mundial de la Salud. (2016). *Resistencia a los antibióticos*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>.

Organización Mundial de la Salud. (2017). *El enfoque multisectorial de la OMS: Una salud*. <https://www.who.int/features/qa/one-health/es/>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2024). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.fao.org/antimicrobial-resistance/es/>

Pace, A., Dipineto, L., Fioretti, A., & Hochscheid, S. (2019). Loggerhead sea turtles as sentinels in the western Mediterranean: antibiotic resistance and environment-related modifications of Gram-negative bacteria. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110575. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110575>

Prichula, J., Pereira, R.I., Wachholz, G.R., Cardoso, L.A., Tolfo, N.C.C., Santestevan, N.A., Medeiros, A.W., Tavares, M., Frazzon J., d'Azevedo, P.A., & Frazzon, A.P.G. (2016). Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1), 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.071>

Rabinowitz, P.M., Natterson-Horowitz, B.J., Kahn, L.H., Kock, R., & Pappaioanou, M. (2017). Incorporating one health into medical education. *BMC Medical Education*, 17, 1-7.

- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., & Igrejas, G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Frontiers in Microbiology*, 5, 66221.
- Ramirez Murillo, A. C., Alonso Osorio, J., & Bach Faig, A. (2021). Interacciones entre antibióticos y alimentos. Riesgo de resistencias antimicrobianas. *Revista Española Nutrición comunitaria*, 28(2), 1-12.
- Ramirez, M. S., Traglia, G. M., Lin, D. L., Tran, T., & Tolmasky, M. E. (2014). Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm. *Microbiology Spectrum*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0016-2013>.
- Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M., & Iqbal, H. M. (2019). Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environment International*, 122, 52-66.
- Read, A. F., & Woods, R. J. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2014(1), 147. <https://doi.org/10.1093/emph/eou024>
- Rosenblatt-Farrell, N. (2009). El paisaje de la resistencia a los antibióticos. *Salud Pública de México*, 51(5), 435-447.
- Rousham, E. K., Unicomb, L., & Islam, M. A. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioral, epidemiological and One Health approaches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1876). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0332>
- Ruiz de Galarreta Beristain, M. (2021). *La resistencia a los antibióticos, un problema de salud global: las infecciones por micobacterias multirresistentes* [Trabajo de fin de grado, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria]. UCREA. <http://hdl.handle.net/10902/23549>
- Ruiz, E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., & Torres, C. (2012). qnr, aac (6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 886-897. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr548>.
- Sacristán, C., Esperón, F., Herrera-León, S., Iglesias, I., Neves, E., Nogal, V., Muñoz, M.J., & De La Torre, A. (2014). Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain. *Avian pathology*, 43(2), 172-175.

- Schwarz, S., Shen, J., Wendlandt, S., Feßler, A. T., Wang, Y., Kadlec, K., & Wu, C. M. (2015). M. E. Tolmasky, & J. C. Alonso (Eds.), Plasmid-mediated antimicrobial resistance in staphylococci and other firmicutes. En *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery* (pp. 421-444). ASM. <https://doi.org/10.1128/9781555818982.ch22>
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4, 47. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>
- Short, F. S., Lôbo-Hajdu, G., Guimarães, S. M., Laport, M. S., & Silva, R. (2023). *Antimicrobial-Resistant Bacteria from Free-Living Green Turtles (Chelonia mydas)*. *Antibiotics*, 12(8), 1268. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081268>
- Sijbom, M., Büchner, F. L., Saadah, N. H., Numans, M. E., & de Boer, M. G. (2023). Determinants of inappropriate antibiotic prescription in primary care in developed countries with general practitioners as gatekeepers: a systematic review and construction of a framework. *BMJ Open*, 13(5), e065006.
- 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. *Emerging Infectious Diseases*, 14(1), 70-72.
- Solano, M., Troëng, S., Drews, C., & Dick, B. (2004). Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas (CIT): una introducción.
- Sommer, M. O., Dantas, G., & Church, G. M. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, 325(5944). <https://doi.org/10.1126/science.1176950>
- Sousa, A. M., & Pereira, M. O. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs—a review. *Pathogens*, 3(3), 680-703. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030680>
- Sousa, M., Gonçalves, A., Silva, N., Serra, R., Alcaide, E., Zorrilla, I., Torres, C., Ganiça, M., Igrejas, G., & Poeta, P. (2014). Acquired antibiotic resistance among wild animals: the case of Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Quarterly*, 34(2), 105-112. <https://doi.org/10.1080/01652176.2014.949391>
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., & Denamur, E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), 1215-1219.

- Spellberg, B., Bartlett, J. G., & Gilbert, D. N. (2013). The future of antibiotics and resistance. *New England Journal of Medicine*, 368(4), 299-302.
- Sulzner, K., Kelly, T., Smith, W., & Johnson, C. K. (2014). Enteric pathogens and antimicrobial resistance in turkey vultures (*Cathartes Aura*) feeding at the wildlife–livestock interface. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(4), 931-934.
- Timm, A., Borowska, E., Majewsky, M., Merel, S., Zwiener, C., Bräse, S., & Horn, H. (2019). Photolysis of four β -lactam antibiotics under simulated environmental conditions: Degradation, transformation products and antibacterial activity. *Science of the Total Environment*, 651, 1605-1612.
- Torres-Castro, M. A., & Rivero-Juárez, A. (2023). Antecedentes, definiciones y desafíos sobre el enfoque “Una Salud” en Medicina Veterinaria. *Bioagrobiencias*, 16(2), 16-28.
- Torres Navarrete, M. D. P. (2022). *Estado del Arte: Programas Nacionales de Infecciones y Resistencia Bacteriana en América Latina* [Trabajo de grado, Universidad Santo Tomas].
lusta.
<https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/43807/2022mariatorres.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Tsai, M.A., Chang, C.C., y Li, T.H. (2021). Antimicrobial-resistance profiles of gram-negative bacteria isolated from green turtles (*Chelonia mydas*) in Taiwan. *Environmental Pollution*, 277, 116870.
- Umpiérrez, A., Ernst, D., Cardozo, A., Torres, A., Fernández, M., Fraga, M., ... & Zunino, P. (2022). *Escherichia coli* productora de toxina Shiga no O157 con perfiles potencialmente nocivos para los humanos se aíslan de las heces de terneros en Uruguay. *Revista Austral de Ciencias Veterinarias*, 54 (2), 45-53.
- Van den Bogaard, A.E., y Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(4), 327-335.
- Vázquez-Cabrera, N., Espinosa-Márquez, A., & Cedillo-Ramírez, M.L. (2023). Evolución histórica de las directrices de la Organización Mundial de la Salud sobre la resistencia a los antimicrobianos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, e51-e51. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2023.51>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.

- Wallace, C.C., Yund, P.O., Ford, T.E., Matassa, K.A., & Bass, A.L. (2013). Aumento de la resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de mamíferos marinos varados del Atlántico Noroeste. *EcoEalth*, 10. <https://doi.org/201-21010.1007/s10393-013-0842-6>.
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.L., Otten, W., Thomas, C.M., & Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 155-165.
- World Health Organization. (2022). *One health joint plan of action, 2022–2026. Working together for the health of humans, animals, plants and the environment*; WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240059139>
- Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC Biology*, 8, 123.
- Wu, J., Huang, Y., Rao, D., Zhang, Y., & Yang, K. (2018). Evidence for environmental dissemination of antibiotic resistance mediated by wild birds. *Frontiers in Microbiology*, 9, 330126. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00745>
- Zavala-Norzagaray, A. A., Aguirre, A. A., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N., Ley-Quiñonez, C. P., Hernández-Díaz, L.D.J. & Canizalez-Roman, A. (2015). Isolation, characterization, and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. in sea turtles from Northwestern Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 6, 635.