

**Universidad Nacional  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Escuela de Ciencias Biológicas  
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales**

**Informe Escrito Final**

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

**Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales**

**Verónica Arias Pérez (115120217)**

**Campus Omar Dengo  
Heredia, 2024**

Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Manejo de Recursos Naturales.

JORENGETH ABAD  
RODRIGUEZ  
RODRIGUEZ (FIRMA)

Firmado digitalmente por  
JORENGETH ABAD RODRIGUEZ  
RODRIGUEZ (FIRMA)  
Fecha: 2024.02.20 11:04:13 -06'00'

---

MPM & MBA. Abad Rodríguez Rodríguez

Representante, Decano, quién preside

SILVIA MARGOT MAU  
INCHAUSTEGUI  
(FIRMA)

Firmado digitalmente por SILVIA  
MARGOT MAU INCHAUSTEGUI  
(FIRMA)  
Fecha: 2024.02.20 11:05:09 -06'00'

---

Dra. Silvia Mau Incháustegui

Representante de la Dirección de la (ECB)

IVAN SANDOVAL HERNANDEZ (FIRMA)  
PERSONA FISICA, CPF-01-0991-0045.  
Fecha declarada: 20/02/2024 11:41:59 AM  
Esta es una representación gráfica únicamente,  
verifique la validez de la firma.

---

Dr. Iván Sandoval Hernández

Tutor

---

Dr. Elías Barquero Calvo

Asesor

---

Dra. Jennifer L. Stynoski

Asesora

---

Dra. Carolina Marín Vindas

Invitada especial

## Resumen

El objetivo de la investigación es analizar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de la cloaca del cocodrilo americano, para identificar el grado de resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento de bacterias gramnegativas y acuicultura. El estudio se realizó en la empresa AquaCorporación en Cañas, Guanacaste, Costa Rica. Se tomaron muestras de cocodrilos capturados en los estanques de tilapia. Posteriormente se realizó un hisopado de la cloaca de cada animal y se transportaron al laboratorio. Los hisopados se inocularon en dos medios de agar selectivos, se incubaron a 35° C. Luego se realizó un perfil de sensibilidad de antibióticos con el equipo Vitek 2 a los aislamientos. Los de uso veterinario fueron evaluados por la técnica de difusión de disco Kirby Bauer y la concentración mínima inhibitoria (MIC). Los resultados obtenidos fueron alta prevalencia de tetraciclina (75%), con una MIC 50 de 32 µg/ml y una MIC 90 de 128 µg/ml. Las correlaciones entre las variables de los animales y la presencia de la resistencia fueron de un 68% entre los sexos de los animales y presencia de ampicilina, 72% entre el lugar de procedencia con el ácido nalidíxico y un 92 % de correlación entre el tamaño del animal y la presencia de tetraciclina. Se concluye que la información obtenida en esta investigación es relevante, debido a que se detectó la presencia de resistencia en animales silvestres asociados a un sistema de producción y a futuro puede convertirse en un riesgo para la salud pública y el ambiente. Además, es importante evaluar en el futuro el papel de la dispersión de los mecanismos de resistencia detectados y los posibles cambios que pueden ocurrir en la estructura natural de los ecosistemas acuáticos.

## **Agradecimiento**

Los agradecimientos se quedan cortos, ya que durante todo este proceso debo de agradecer a tantas personas que influyeron en mi formación profesional y personal durante el transcurso de toda mi carrera. Primeramente, mi dedicación del trabajo a mi familia que sin su apoyo y paciencia durante todo este tiempo no lo hubiera logrado, siempre confiaron y aunque realmente no tenían con claridad que cual era objetivo del trabajo y el trabajar con cocodrilos siempre confiaron en mis capacidades y creyeron en mis ideas.

Mi eterno agradecimiento a mi grupo asesor, donde no tengo palabras de expresar lo agradecida de haberlos tenido en este proceso, donde primero está el Dr. Iván el cual me dio la oportunidad de trabajar con estos increíbles e inigualables animales como son los cocodrilos, donde claramente nunca dejare de aprender de ellos, además de su apoyo, regaños, paciencia, enseñanza, tiempo, dedicación, consejos y acompañamiento durante toda la investigación.

Al igual que el Dr. Elías que me introdujo en el mundo maravilloso de las bacterias y que espero seguir aprendiendo cada vez más como lo que es la resistencia a los antimicrobianos, por sus regaños, consejos, tiempo, dedicación, mucha paciencia y acompañamiento durante todo este tiempo de la investigación y del laboratorio.

A la Dra. Jenny por creer en mi idea y tener la paciencia de aceptar estar en el equipo, por todo el aprendizaje que me dan sus retroalimentaciones, el pensamiento crítico en la investigación, el tiempo, paciencia y acompañamiento. Les agradezco de corazón por hacerme mejor profesional y persona en el área de la investigación científica.

A todo el personal del Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Nacional, especialmente a Dylcia Madrigal, Xindy Víquez, Dioneys Quesada, Dra. Aida, a los estudiantes de rotación, en especial a la que nos colaboró como asistente a la ya Dra. Valeria Valenciano, que sin sus colaboraciones, comprensión y motivación a las largas horas de análisis de muestras no se habrían logrado. Un agradecimiento especial personal académico y administrativo de la Escuela de Ciencias Biológicas por ser parte de lo que soy hoy como profesional y persona.

También, agradezco profundamente a los colaboradores de la Empresa de Aqua Corporación por su ayuda en los muestreos, a los Bomberos que también fueron colaboradores, al Dr. Fabian y Dr. Mahmood que por mucho tiempo nos ayudaron con los muestreos de los animales, mi agradecimiento profundo. A mis compañeros y amigos de la Universidad, con los que he compartido grandes momentos, que me han tolerado en los momentos difíciles y me han apoyado con sus consejos para seguir adelante.

### **Dedicatoria**

Con todo mi amor y cariño a mi familia, a mi mamá Teresa Pérez, mi papa Oscar Arias, mis hermanos Jonathan y Oscar Arias, al Personal del Laboratorio de Bacteriología, a mis amigos de Escuela de Ciencias Biológicas y Medicina Veterinaria por siempre creer en mis capacidades, y apoyarme en cada paso durante mi carrera y mi Trabajo final de Graduación.

## Índice

Resumen .....	II
Agradecimiento .....	III
Dedicatoria .....	IV
Índice.....	V
Índice de Cuadros .....	VI
Índice de Figuras .....	VI
Abreviaturas.....	VII
1. Introducción .....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	9
1.3 Planteamiento del problema .....	11
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1 Objetivo General.....	12
1.4.2 Objetivo Específicos.....	12
2. Marco Metodológico.....	12
Área de estudio.....	13
Población de muestreo.....	14
Toma de Muestra.....	14
Aislamiento de <i>E. coli</i> .....	14
Determinación del perfil de sensibilidad a los antibióticos.....	17
3. Resultados.....	18
4. Discusión.....	22
5. Conclusiones.....	26
6. Recomendaciones.....	26
Sin conflicto de intereses .....	27
7. Bibliografía.....	28

## Índice de Cuadros

**Cuadro 1.** Crecimiento de las cepas control en la elaboración de la calidad y uso de los medios de cultivo con y sin antibiótico durante la investigación.16

## Índice de Figuras

**Figura 1.** Ubicación del sitio de muestreo en las tres fincas de la empresa de ACISA, Cañas, Guanacaste, Costa Rica.13

**Figura 2 .** Metodología utilizada del procesamiento de colonias típicas de *E. coli* y detección de aislamientos resistentes a antibióticos *C. acutus* . A. placas con cefotaxima, B. placas tetraciclina, C. placas florfenicol y D. placas sin antibióticos.15

**Figura 3.** Prevalencia de los diferentes perfiles de susceptibilidad antibióticos expresados por porcentaje de resistencia en los aislamientos analizados de *E.coli* obtenidos de la cloaca de los cocodrilos capturados en Cañas, Guanacaste, Costa Rica.20

**Figura 4.** Determinación de los porcentajes de resistencia y multirresistencia en los aislamientos de *E. coli* obtenidos de la cloaca de los cocodrilos capturados en Cañas, Guanacaste, Costa Rica.20

**Figura 5.** Concentraciones de tetraciclina (MIC 50 Y MIC 90) en aislamientos de *E. coli* resistentes, por medio de la prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) con el uso de tiras ETEST (bioMérieux) donde se marca el halo de susceptibilidad de color negro.21

## Abreviaturas

ACAT	Área de Conservación Arenal Tempisque
BLEE	B-Lactamasas Espectro extendido
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
ECB	Caldo Infusión corazón cerebro
EMA	Agencia de Medicina Europea
FAO	Organización para Alimentación y Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial Salud
RAM	Resistencia Antimicrobianos
SENASA	Servicio Nacional de Salud Animal
SINAC	Sistema Nacional de Áreas de Conservación
UE	Unión Europea



# 1. Introducción

## 1.1 Antecedentes

Los antibióticos son medicamentos que combaten infecciones causadas por bacterias en los seres humanos y los animales, ya sea eliminando las bacterias o dificultando su crecimiento y multiplicación (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2023). Sin embargo, a través del tiempo los microorganismos han desarrollado mecanismos que contrarrestan el efecto de estos fármacos llevando a la resistencia de la bacteria por el antibiótico, ocasionando que los microbios no se eliminan y continúan multiplicándose (CDC, 2023).

El tema de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) se ha estudiado desde hace poco más de 50 años. El incremento de la RAM ha causado aumentos en la morbilidad y mortalidad en humanos, y así mismo un aumento en los costos de atención hospitalaria. Esta situación se ha agravado al pasar de los años (Ang, et al., 2004).

En los Estados Unidos, se gasta alrededor de \$405 millones de dólares al año para el control de infecciones por la prevalencia y aparición de bacterias resistentes a antibióticos. Además, cabe destacar, que muchas de las bacterias que desarrollan resistencia tienen un origen animal y se consideran zoonóticas (Khan et al., 2016).

Por ejemplo, en la investigación de los autores Allen et al. (2010), mostraron que aquellas aves acuáticas migratorias, que viajan largas distancias y habitan en una amplia variedad de ambientes (desde lagunas agrícolas hasta pasos de montaña), son especies potencialmente vulnerables en adquirir bacterias con genes de resistencia. Esto se asocia a la exposición de los animales con las actividades humanas a lo largo de la ruta migratoria. Específicamente se encontró que el 8% de los aislamientos de *Escherichia coli* (*E. coli*) encontrados en aves, fueron resistentes al menos a 1 de los 17 antibióticos que se probaron en los animales (Allen et al., 2010).

Otro ejemplo de RAM es lo ocurrido en la India, en donde se ha comprobado que alrededor del 87% de los turistas adquieren una infección bacteriana por el contacto directo con primates en su estancia en el país (Hessain et al., 2015). Estas infecciones se dan típicamente

por bacterias como *E. coli* que provocan casos clínicos de consideración para salud humana, entre la sintomatología incluyen, cólicos abdominales intensos, diarrea con sangre y vómitos, entre otros síntomas (Levy y O'Brien, 2005). La bacteria *E. coli*, además tiene la particularidad de que en ocasiones presenta un fenotipo de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), el cual es altamente multirresistente a antibióticos y por lo tanto los fármacos existentes son poco efectivos en su tratamiento, lo cual dificulta el tratamiento (Hessain et al., 2015).

El costo del tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes es actualmente mucho más alto debido a la disminución en la disponibilidad de moléculas de antibióticos para el tratamiento de estas, por lo tanto, es necesario aumentar la investigación con el fin de la creación de nuevos fármacos que sean efectivos (Smith y Coast , 2013; Pesapane et al., 2013; Cabrera et al., 2013).

Allen et al. (2010), mencionan que, el noventa por ciento de los aislamientos bacterianos obtenidos de ratas y los ratones de campo capturados en las zonas rurales de Inglaterra, que tenían contacto con actividades humanas, eran resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Por el contrario, las enterobacterias fecales encontradas en alces, ciervos y topillos salvajes de Finlandia sin ninguna interacción con poblaciones humanas presentaban resistencia nula, y eran altamente sensibles a los antibióticos.

En el estudio de Vargas-Abella et al. (2023), mostraron que aislamientos de *Salmonella* obtenidos a partir de las especies cocodrilianas *Crocodylus fuscus* y *Crocodylus acutus*, eran resistentes a ampicilina, cefotaxima, sulfa-trimetropim y tetraciclina. En la investigación del *Caiman crocodylus* (caimán blanco) detectaron aislamientos de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis* y *Shigella sonnei* con una resistencia marcada al cloranfenicol y asociada a su intervención en ambientes urbanos (Carlos-Eraza, 2016).

De la misma manera, se debe resaltar que Segura et al. (2009), mencionan que, antibióticos como la amoxicilina y eritromicina, son de uso extendido, no solo son para uso humano, sino que además son antibióticos que se aplican en la industria agrícola y pecuaria para el control de plagas, fertilización de cosechas y promotor alimenticio en animales. Los autores evidencian que alrededor del 95% de los antibióticos administrados a animales de producción antrópica, producen metabolitos que pueden ser más tóxicos que el compuesto original y pueden llegar a acumularse en cuerpos de agua tanto superficiales como subterráneas, suelos y

sedimentos, de esa forma propagarse y modificar el ecosistema bacteriano (Acevedo y Severiche, 2013).

En este mismo sentido, otros estudios han demostrado que la industria acuícola, del cultivo extensivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) hace uso en grandes cantidades de diferentes antibióticos para el control de enfermedades relacionadas a la competencia y altas densidades de siembra y mantenimiento de estos individuos (Phalitakul et al., 2006; Plascencia y Almada, 2012). Lo que concuerda con lo mencionado por Cabello (2006), quien cita que el uso de diferentes antibióticos aumenta las probabilidades de encontrar bacterias resistentes en estas condiciones.

Sabemos que los 15 productores acuícolas globales más grandes aplican hasta 67 compuestos de antibióticos y que el 73% corresponde a oxitetraciclina, sulfamidas y florfenicol (Lulijwa et al., 2019). También se aplican otras familias de antibióticos de primera y segunda generación, como las penicilinas, tetraciclinas y macrólidos (Liu et al., 2017), lo que demuestra que, el uso de este tipo fármacos en la acuicultura es constante.

En el caso de Costa Rica, se ha descrito presencia de resistencia a antibióticos en animales, especialmente en animales silvestres. Baldi et al. (2019), evidenciaron la presencia de aislamientos de *Salmonella* resistentes a antibióticos como la ciprofloxacina y ácido nalidíxico en mapaches. También en palomas que visitan zonas urbanas, se han encontrado la presencia de genes resistentes a 4 tipos de antibióticos: cloranfenicol, fluoroquinolonas, sulfonamidas y  $\beta$ -lactamasas (Blanco-Peña et al., 2017).

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un tema de vital importancia para la población mundial (Cabrera et al., 2013), ya que no solamente afecta a los humanos como se ha descrito, sino también a los animales domésticos y la fauna silvestre, con diseminación de genes de resistencia en humanos, animales y el ambiente (Gorla, 2016). Bajo el concepto de "UNA SALUD" la resistencia a los antibióticos se considera una problemática de Salud pública y ambiental (OMS, 2011).

## **Resistencia a antibióticos**

Los antibióticos son un tipo de fármaco que han contribuido de una forma fundamental en la medicina, debido a que han salvado innumerables vidas, provocando un evento

trascendental en la historia humana. No obstante, el uso de estos increíbles medicamentos ha venido acompañado por la rápida aparición de cepas resistentes y de esa forma a desarrollar la era pre-antibiótica (Davies y Davies, 2010). La resistencia a los antibióticos se define como aquella capacidad que adquiere las bacterias por diferentes mecanismos de selección natural para evadir el efecto disruptivo de estos fármacos (Ang et al., 2004; Landecker, 2016).

La resistencia a los antibióticos puede estar presente en las bacterias de forma natural (no adquirida) y se le llama intrínseca. Se dice que esta resistencia es natural de todas las especies de bacterias y se asocia a características estructurales y bioquímicas propias del microorganismo (Baquero et al., 2009; Davies y Davies, 2010; Fernández y Hancock, 2012).

También, se puede dar por condiciones y presiones externas a la bacteria, como el uso desmedido de antibióticos, y se conoce como resistencia adquirida. La resistencia adquirida, se da por incorporar a la genética bacteriana diferentes mecanismos de resistencia antibacteriana.

En el caso de bacterias Gram negativas como *E. coli*, se conocen mecanismos como: (i) las barreras impermeables, (ii) bombas de eflujo, (iii) mutaciones del sitio blanco y (iv) la inactivación del antibiótico por enzimas. Claramente la resistencia se puede presentar entre especies de bacterias similares o se puede transferir por los elementos móviles (plásmidos, conjugación, mutaciones) a otras especies bacterianas (Allen et al., 2010).

Las enzimas  $\beta$ -lactamasas, son un importante agente de resistencia antimicrobiana en los humanos y los animales (Radhouani et al., 2014). Los  $\beta$ -lactámicos presentan en su estructura molecular un anillo  $\beta$ -lactámico que se responsabiliza de la acción antimicrobiana (Paterson y Bonomo, 2005). Las  $\beta$ -lactamasas, muy comunes entre las bacterias Gram negativas, tienen la facilidad de romper este anillo y de esa forma inactivar el antibiótico. Los genes de estas enzimas llegan a codificarse en el cromosoma, lo que permite una transferencia entre distintas bacterias más fácilmente, lo que conlleva un reto para el control de infecciones (Tafur et al., 2011).

Por otra parte, las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas detectadas también en bacterias Gram negativas que presentan resistencia a un alto número de antibióticos de uso común, por ejemplo, la penicilina, la ampicilina, las cefalosporinas y a veces a antibióticos de otras clases como las tetraciclinas (Paterson y Bonomo, 2005). La multiresistencia conlleva a una dificultad terapéutica, asociada a casos de mortalidad por no encontrar nuevas sustancias que contrarrestan tal efecto (García-Hernández et al., 2011). Los estudios epidemiológicos van en aumento, con el fin de lograr realizar una base de datos para

comparar los acontecimientos en la salud de los distintos países alrededor del mundo, esto con el objetivo de conocer los efectos que genera la multirresistencia bacteriana (Magiorakos et al., 2012).

En este sentido, se requieren acciones decisivas por parte de los profesionales en las áreas de producción que muestren un compromiso en el cumplimiento de la normativa que evite el uso desmedido de los fármacos y con ello minimizar la multirresistencia (Davies y Davies, 2010). Hoy en día, la multirresistencia, donde muchas de las bacterias poco a poco generan distintos mecanismos de resistencia, deja muchas pérdidas no solamente a nivel de salud pública sino económica (Magiorakos et al., 2012).

Esto ha llevado a un aumento en la investigación por parte de la industria farmacéutica y científicos para detectar mecanismos que contra-resten este efecto, por ejemplo, las investigaciones del genoma asociados al estudio de inhibidores de las funciones de los genes e igualmente el uso de nuevas tecnologías para evitar volver a la era pre-antibiótica (Payne et al., 2007; Gruen, 2009).

Las actividades humanas como la agricultura, sistemas pecuarios y producción animal usan antibióticos de una forma desmedida (Segura et al., 2009). Según los autores Sarmah et al. (2006), los mismos antibióticos que se utilizan para tratar enfermedades humanas (amoxicilina y eritromicina), también se emplean en el campo, para contrarrestar el efecto de enfermedades en las plantaciones, promover el crecimiento y mejorar el desarrollo de los animales. En el estudio desarrollado por Karesh et al. (2012), encontraron que entre un 30-90% de los antibióticos de origen veterinario se excretan después de su administración al ganado en forma no metabolizada, lo cual puede generar una ruta directa de contaminación para el ambiente, y de esa forma modificaciones en los ecosistemas aledaños.

## **Resistencia en acuicultura**

En el sistema de producción acuícola, la incidencia en la resistencia antimicrobiana es muy frecuente debido al uso intensivo de antibióticos y a su liberación descontrolada al ambiente (Cabello, 2006). Dicho uso descontrolado puede ocasionar impactos ecológicos importantes como la contaminación de aguas superficiales, subterráneas y sedimentos, y además la adquisición de genes de resistencia en los animales que se encuentran en contacto con estas

sustancias. Así, puede convertirse en una futura amenaza para enfermedades emergentes o zoonosis en la salud humana y animal (Redshaw et al., 2013).

Por lo tanto, según Sørum (2006), el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos entre las bacterias de un entorno de acuicultura y bacterias del ambiente terrestre no es inesperado. Por otra parte, se ha demostrado que las cepas bacterianas de *Aeromonas* que son patógenos de los peces pueden transmitir y compartir genes con patógenos de *E. coli* aislado de humanos, aumentando de esta forma el traslape horizontal de genes (Grenni et al., 2018).

La contaminación y la persistencia de los antibióticos en ambientes acuáticos y terrestres pueden afectar la biodiversidad y la evolución de las comunidades bacterianas naturales de los ambientes circundantes y, por ende, la funcionalidad de los procesos biológicos en dichos ecosistemas. Finalmente, representa un problema en poblaciones de animales silvestres y humana (Grenni et al., 2018).

Los antibióticos administrados en peces producen metabolitos que pueden ser más tóxicos que el compuesto original y acumularse en cuerpos de agua (Barrios y Sierra 2013; Cabrera et al., 2013). Este acumulo de trazas activas son liberados hacia los ríos, afluente de agua sin ningún tratamiento, cambiando el ecosistema bacteriano, afectando la estructura genética bacteriana de estos sitios, conduciendo de esa forma a una transferencia horizontal de genes entre los ambientes acuáticos y terrestres aledaños y con ello a aparición de genes resistentes (Millanao et al., 2011).

No obstante, desde el enfoque de "Una salud", desarrollado por la Organización Mundial de Salud (OMS), el desarrollo de resistencia a los antibióticos plantea un riesgo importante para los seres humanos, animales y el ambiente (OMS 2011). Por lo que las principales organizaciones de salud, incluida la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Unión Europea (UE), establecieron niveles máximos de residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal, incluido el pescado, con la finalidad de crear una mayor conciencia en la problemática de la resistencia antibiótica y lograr una seguridad alimentaria como ecológica (Lulijwa et al., 2019).

## **Indicadores de resistencia bacteriana**

La bacteria *E. coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y de la familia Enterobacteriaceae (Mellata, 2013). Esta bacteria es uno de los agentes más comunes en la generación de enfermedades tanto en humanos como en animales, que coloniza el intestino en pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal (Rodríguez-Angeles, 2002).

Algunas cepas de *E. coli* pueden ser patógenas y causar daño, produciendo diferentes cuadros clínicos como infecciones del tracto urinario, sepsis abdominal, meningitis, septicemia, síndrome hemolítico-urémico y diarrea (Mellata, 2013). Además, esta bacteria puede adquirir genes de resistencia con facilidad, lo cual dificulta la respuesta de los antibióticos que se utilizan para tratamiento de las diversas enfermedades que causa (Khan et al., 2016)

Una de las primeras bacterias de origen animal en adquirir mecanismos de resistencia fue *E. coli*. Esta bacteria puede contener co-resistencia a muchas familias de antibióticos, y además puede propagarse de un ecosistema a otro simplemente por el traslape horizontal de genes (Kheiri et al., 2016).

Además, esta bacteria presenta la característica de tener distintas mutaciones, modificando su estructura y de este modo multiplicarse en distintos ambientes más fácilmente, lo que favorece la resistencia, provocando de esa forma ser una bacteria de importancia en la investigación de la resistencia a los antibióticos (Gonçalves et al., 2016).

## **Indicadores biológicos**

En este sentido, se ha encontrado que la diversidad de bacterias en cocodrilos es muy amplia, identificándose entre las más abundantes *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp. (Magaña, 2005). Muchos de estos grupos se consideran patógenos porque tienen la capacidad de provocar infecciones peligrosas como la neumonía, enteritis, septicemia o infecciones intestinales (Charruau et al., 2012). Con estas infecciones en ocasiones puede ocurrir una zoonosis o en algunos casos se presenten resistencia antimicrobiana (Taylor et al., 2001; Manno et al., 2004; Mermin et al., 2004; Gruen, 2009; Magnino et al., 2009).

De esta manera, el programa “Una Salud” de la Organización Mundial para Salud (OMS) cita que las enfermedades infecciosas y emergentes son capaces de afectar seres humanos, animales y ecosistemas sin distinción, inclusive pueden evolucionar en epidemias eventualmente (Karesh et al., 2012).

En los últimos años esta situación se ha agravado, ya que se ha constado que, en las infecciones bacterianas, muchas cepas ya han expresado resistencia a los antimicrobianos y provienen de origen animal (Marcos, 2013).

En el caso del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*), cabe mencionar que se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de Florida, las costas Atlántica y Pacífica del sur de México, América Central y Sudamérica hasta la costa Atlántica de Venezuela, Perú (Alonso-Tabet, 2009). En Costa Rica existen dos especies de crocodílidos de las 23 especies registradas a nivel mundial: el caimán o guajipal (*Caiman crocodilus*) y el cocodrilo o lagarto (*Crocodylus acutus*) (Hernández, 2007). El cocodrilo americano en el país se ubica principalmente en las zonas costeras y ríos de por debajo de los 600 msnm, además de aguas dulces poco profundas, así como diversos ecosistemas acuáticos (Jiménez, 2005).

Esta especie es generalista y su dieta alimentaria es muy amplia, abarcando presas como los artrópodos, caracoles, crustáceos, tortugas y mamíferos, aunque sus presas favoritas son los peces (Cupul-Magaña et al., 2008). El cocodrilo es considerado como una “especie clave” por el efecto positivo que cumple en la ecología del lugar (Sánchez, 2001). Estos organismos logran mantener la estructura y función del ecosistema por medio de la depredación selectiva de sus presas peces, reciclaje de nutrientes y mantenimiento de humedad en las zonas de distribución gracias a los refugios que construyen durante las épocas secas (Thorbjarnarson et al., 2006).

Los cocodrilos en Costa Rica pueden alcanzar una talla máxima de 6 metros y su peso superaría los 800 kg. A nivel general, lo más común es encontrar animales que rondan entre los 2 y 4 metros, con pesos que pueden alcanzar los 250-300 kilos. Sus crías rondan entre los 25 a 30 cm con un peso de 40 a 70 gramos (Sánchez, 2001).

Anidan en fosas excavadas en la arena de los playones de los ríos o hacen montículos de arena (Sánchez, 2001). Este comportamiento favorece a la incubación de los huevos por medio de las diferencias en las temperaturas (Huchzermeyer, 2003). La ubicación de los nidos por parte de las hembras evita su destrucción por inundaciones durante las crecidas de los ríos en temporadas de lluvias (Hurtado, 2012). Asimismo se debe mencionar que las hembras presentan



un alto cuidado parental desde la selección del sitio de anidación, construcción y defensa del nido, apertura de los huevos, transporte de crías al agua, la defensa y vigilancia de las crías (Charruau y Hénaut, 2012). Por estas razones, se ha catalogado a sus individuos como altamente territoriales (Alonso-Tabet, 2009).

Así mismo, al ser una especie con una dinámica tan variable y adaptable en los ecosistemas, lo hace un candidato esencial en proporcionar información de la salud de los ecosistemas. En este caso puede generar información sobre la resistencia antimicrobiana y su comportamiento en la vida silvestre, asociado con aspectos naturales o hechos causados por el hombre como la contaminación, desarrollo urbano, agrícola y pecuario (Karesh et al., 2012).

## 1.2 Justificación

La resistencia a los antibióticos es una problemática multifactorial y su control propone grandes desafíos por su complejidad, debido a que la resistencia a los antibióticos no se limita a áreas geográficas específicas o especies de animales (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2017). Por lo tanto, en las investigaciones con animales silvestres, se demuestra que algunas cepas bacterianas propias llegan a evolucionar y crear mecanismos de resistencia, asociados a causas externas (muchas veces antrópicas) que no se pueden controlar, como por ejemplo la alimentación, el lugar que habitan, el contacto con actividades humanas como sistemas de producción agrícola, pecuario o de acuicultura (Torres y Zarazaga, 2007; Kheiri et al., 2016; Gonçalves et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, en el sistema de acuicultura, en el cultivo de tilapia, se aplican diferentes antibióticos directamente al agua de los estanques de los peces, con el fin de controlar las enfermedades bacterianas (Rhodes et al., 2000). El uso de diferentes y grandes cantidades de antibióticos genera una presión de selección entre las bacterias, desencadenando el desarrollo de mecanismos que contrarrestan el efecto del antibiótico y con ello a la aparición de genes bacterianos resistentes a antibióticos (Alanis, 2005; Cabello, 2006).

La bacteria *E. coli*, es considerada como indicador idóneo de la prevalencia de resistencia a antibióticos, debido a que puede contener co-resistencia a muchas familias de

antibióticos (Kheiri et al., 2016). Además, forma parte de la flora normal del tracto gastrointestinal en múltiples animales. También, esta bacteria presenta la característica de poder adquirir fácilmente diferentes mecanismos de resistencia, ya sea por mutaciones puntuales a nivel cromosómico o por transferencia horizontal de genes, ya sea dentro de la misma especie o en especies diferentes (Mosquito et al., 2011).

La diseminación de los genes resistentes puede darse por diferentes formas. Por ejemplo, cuando se administran antibióticos a animales, se estima que cerca de un 30% a un 90% de ellos son excretados de forma no metabolizada, lo cual permite una ruta directa de contaminación para el ambiente, y por ende una diseminación de genes de resistencia (Karesh et al., 2012; Millanao et al., 2011). A pesar de los riesgos asociados a la administración inadecuada de antibióticos, se ha comprobado que existen muy pocos países que monitorean la cantidad de estos que son utilizados en los diferentes sistemas de producción y específicamente en el caso de acuicultura no es la excepción (Defoirdt et al., 2011).

La contaminación y la persistencia intrínseca de los antibióticos en ambientes acuáticos y terrestres, puede tener un efecto en el resistoma bacteriano (colección de genes que contribuyen a la resistencia de las bacterias), ya sea de manera directa o indirecta. Asimismo, dicha contaminación afecta la biodiversidad y la evolución de las comunidades bacterianas naturales de los ambientes circundantes y, por lo tanto, puede afectar la funcionalidad de los procesos biológicos en los ecosistemas acuáticos y otros. Además, representa un problema en poblaciones silvestres, domesticadas y en humanos (Grenni et al., 2018).

Las investigaciones sobre resistencia bacteriana en Costa Rica se han desarrollado principalmente en las áreas de la producción animal, animales domésticos y especies de vida silvestre como palomas y felinos (Blanco-Peña et al., 2017; Angulo, 2017). Pero, de acuerdo con las bases consultadas, no se encontraron estudios de resistencia a los antibióticos en especies de cocodrilianos reptiles en Costa Rica.

Por lo tanto, estudiar los perfiles de resistencia a los antibióticos en cocodrilos que visitan áreas de producción de tilapia, permitiría obtener información sobre si estas poblaciones están siendo afectadas directa o indirectamente en la aparición de bacterias resistentes, así como evaluar si los cocodrilos, pueden considerarse como bioindicador de la salud ambiental (Kozak et al., 2009).

El *Crocodylus acutus* ha sufrido una fuerte pérdida de su hábitat a lo largo del tiempo (Bolaños, 2012). Esta pérdida lo ha llevado a ser una especie vulnerable, aumentando su contacto con los humanos y con las actividades humanas (Jiménez, 2005; Hernández et al., 2022). Sumado a ello, la amplia distribución que tienen estos animales y su capacidad de habitar zonas contaminadas, los convierten en un reservorio considerable de agentes bacterianos importantes en la salud humana y para el ecosistema (Magaña, 2005; Peñuela et al., 2011).

En este sentido, el estudio pretende analizar los perfiles de sensibilidad de *E. coli* aisladas de cloacas del cocodrilo americano para la identificación del grado de resistencia a antibióticos utilizados en el tratamiento de bacterias Gram negativas en seres humanos y de acuicultura.

### **1.3 Planteamiento del problema**

En los últimos años, un factor que ha generado una fuerte preocupación en la sociedad a nivel mundial es la resistencia de antibióticos. Esta problemática puede estar afectando tanto a los animales domésticos como los de vida silvestre. Un caso en particular son las poblaciones de cocodrilos que, al estar en contacto con humanos, zonas de producción agrícola y acuicultura, se encuentran expuesta a múltiples sustancias como los antibióticos y, por lo tanto, puede convertirse en un reservorio de bacterias resistentes a antibióticos (Hernández et al., 2022). Debido a esto, al ser estos reptiles animales altamente tolerantes al disturbio humano, al tener una amplia distribución, podría convertirse en una especie importante en el estudio de traslape horizontal de genes y aparición de bacterias resistentes. Por este motivo, nos planteamos la siguiente pregunta:

¿Cuál es el perfil de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *E. coli* obtenidas a partir de la cloaca de cocodrilos capturados en estanques de producción de tilapia?

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Analizar los perfiles de sensibilidad a los antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidas a partir de las cloacas del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*), para la identificación del grado de resistencia a antibióticos utilizados en el tratamiento de bacterias Gram negativas en seres humanos y acuicultura.

### **1.4.2 Objetivo Específicos**

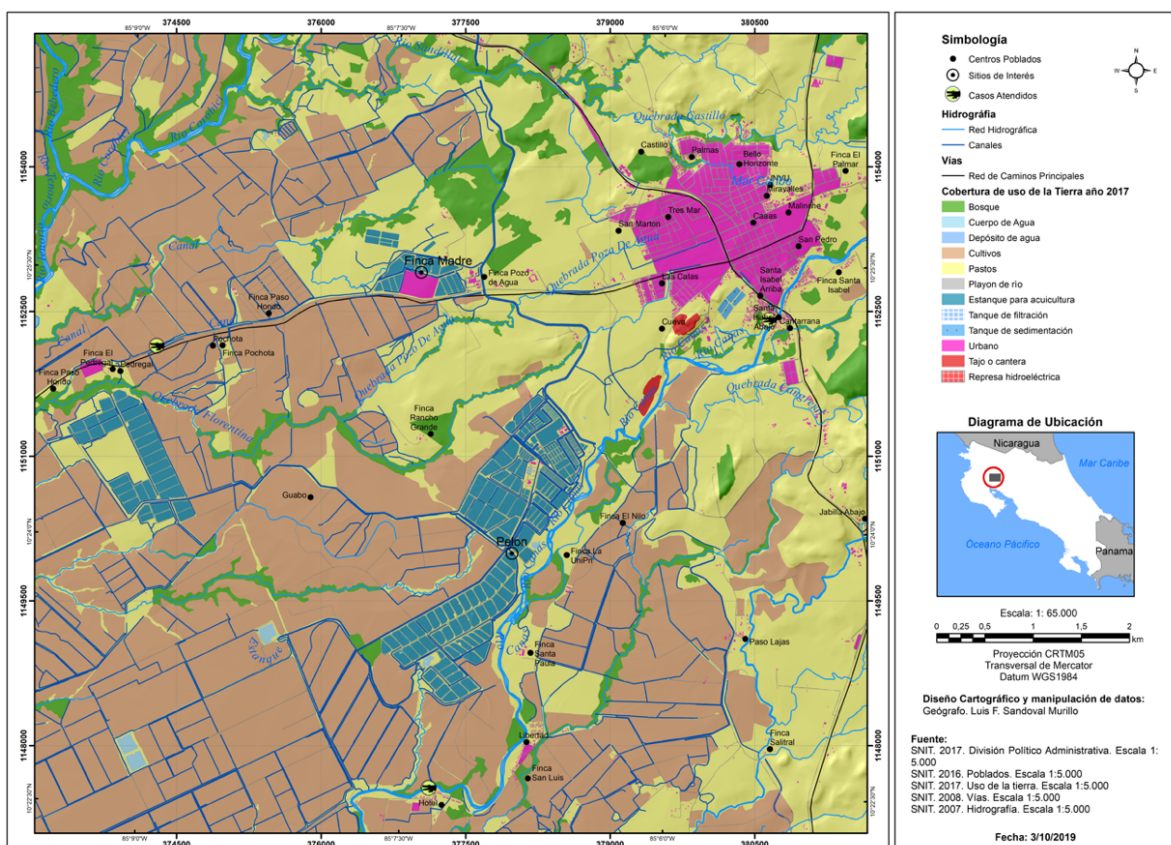
1. Determinar el perfil de sensibilidad a antibióticos de aislamientos de *E. coli* contra las principales clases de antibióticos utilizados para el tratamiento de bacterias Gram negativas.
2. Evaluar el grado de resistencia de los aislamientos de *E.coli* ante los antibióticos utilizados en fincas de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

## **2. Marco Metodológico**

El estudio se realizó en colaboración con la empresa AquaCorporación Internacional S.A (ACISA) ubicada en Cañas, Costa Rica. Además se cuenta con el apoyo del proyecto “Propuesta de atención a los conflictos generados por el aumento poblacional de cocodrilos (*Crocodylus acutus*: Cuvier), tendiente a la ampliación del conocimiento, la generación de capacidades y la disminución del riesgo en el Gran Humedal del Tempisque y el Pacífico Central como caso piloto (Código SIA: 0217-16)” del Laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Ciencias Biológicas y el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria, estas últimas pertenecientes a la Universidad Nacional.

## Área de estudio

La investigación se realizó en Cañas, Guanacaste, específicamente en las fincas de la empresa de ACISA (Figura 1). La zona se encuentra a una elevación de 85 msnm, con una temperatura media de alrededor de 27,6 °C y precipitación media anual de aproximadamente 1544 mm (Restrepo-Sáenz et al., 2004). Esta empresa maneja hasta 600 hectáreas de espejos de agua en la cuenca media del río Tempisque, en el cual los encuentros con cocodrilos en los estanques de cultivo de tilapia son frecuentes. Ante esta situación la empresa inició un plan de manejo para abordar la problemática (Bolaños, 2012). Actualmente el plan de manejo está inscrito y aprobado por el Área de Conservación Arenal Tempisque (ACAT) del Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC).



**Figura 1.** Ubicación del sitio de muestreo en las tres fincas de la empresa de ACISA, Cañas, Guanacaste, Costa Rica.

## **Población de muestreo**

Se muestrearon 63 ejemplares adultos de cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*), provenientes del Gran Humedal Tempisque y que ingresaron a los estanques de producción. Los cocodrilos llegan a este sitio por ríos aledaños o ríos que atraviesan la propiedad, así como por canales de riego que le suministran el agua al proyecto. Los animales son capturados en los estanques de producción de tilapia y posteriormente son reubicados a un recinto para su mantenimiento por un período de días o meses, según se estableció en el plan de manejo que mantenían en la empresa ACISA y el Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC). Esta actividad se desarrolla en la empresa con el fin de tener un manejo más eficiente de los animales y de esa forma garantizar la seguridad de sus trabajadores.

## **Toma de Muestra**

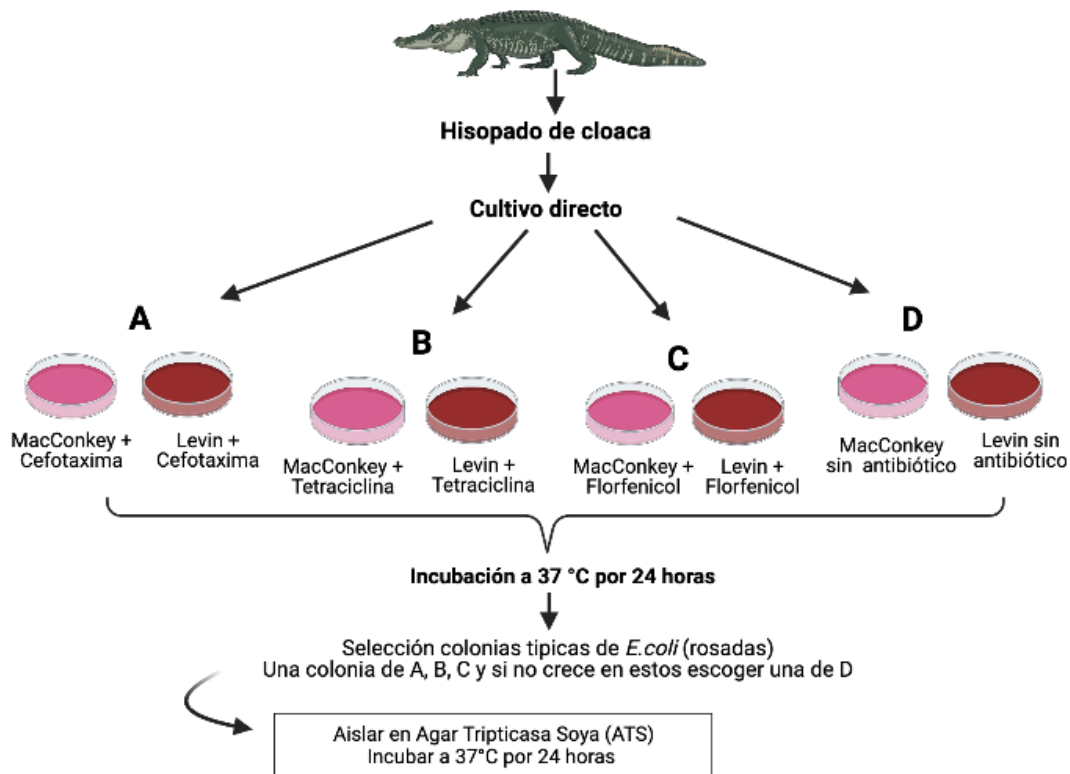
Se realizó un muestreo de la cloaca de cada animal capturado. Primeramente, se capturaron los cocodrilos en las diferentes fincas muestreadas y se escanearon el chip del animal ubicado al costado superior de las patas, que nos brinda información de sexo, edad, procedencia. Posteriormente con la técnica de hisopado se torna a tomar la muestra, la cual consiste en introducir un hisopo estéril (previamente humedecido con solución salina 0.85%) en la cloaca y se efectúan movimientos de rotación. Inmediatamente se introdujo el hisopado en un medio líquido enriquecedor (ECB líquido), para posteriormente ser transportado en un recipiente a temperatura entre 8 a 10°C al Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional.

## **Aislamiento de *E. coli***

Una vez en el laboratorio los hisopos fueron cultivados en placas de agar MacConkey y Levin (ver Figura 2) con (A) cefotaxima (Sigma) (2 mg/L), para detectar resistencia a las cefalosporina de 3ra generación, con (B) tetraciclina (Sigma) (16 mg/L) para detectar resistencia a las tetraciclinas, con (C) florfenicol (Sigma) (8 mg/L) para detectar resistencia a fenicoles, o (D) sin antibiótico para detectar aislamientos sensibles a los antibióticos anteriormente mencionados (Pachón, 2009).

En caso de crecimiento de colonias sospechosas de *E. coli* (colonias rosadas fermentadoras de lactosa y agar MacConkey o colonias de color azulado-negro con cierto brillo metálico en agar Levine), se seleccionó una colonia resistente en cada uno de los casos descritos anteriormente, para la posterior identificación. Si no hubo crecimiento en estas placas, se seleccionó una colonia de las placas sin antibiótico.

Las colonias presuntivas se cultivaron posteriormente en agar Tripticasa de soya (ver Figura 2). En el caso de los placas con los antibióticos de tetraciclina y florfenicol se evaluaron el tiempo después que comenzó el muestreo en comparación con los placas de cefotaxima y sin antibiótico. Por lo tanto, el número de muestras varió para estos platos al final del total de aislamientos.



**Figura 2.** Metodología utilizada del procesamiento de colonias típicas de *E. coli* y detección de aislamientos resistentes a antibióticos *C. acutus*. A. placas con cefotaxima, B. placas tetraciclina, C. placas florfenicol y D. placas sin antibióticos.

Como control de calidad de los medios de cultivo y su idóneo uso, se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC33495 y *Pseudomonas aeruginosa* ATC27853 para verificar su crecimiento en los medios de antibiótico donde no deberían crecer y en los medios sin antibiótico donde sí hay crecimiento (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Crecimiento de las cepas control en la elaboración de la calidad y uso de los medios de cultivo con y sin antibiótico durante la investigación.

Cepa control	Medios de cultivo							
	Mc+C	Lv+ C	Mc+T	Lv+T	Mc+F	Lv+F	McSA	LvSA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NC	NC	NC	NC	NC	NC	C	C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC33495	NC	NC	NC	NC	NC	NC	C	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATC27853	NC	NC	NC	NC	NC	NC	C	C

Mc+C: MacConkey + cefotaxima (2 mg/L)

Lv+C: Levin + cefotaxima (2 mg/L)

Mc+T : MacConkey + Tetraciclina (16 mg/L)

Lv+T : Levin + Tetraciclina (16 mg/L)

Mc+F: MacConkey + Florfenicol (8 mg/L)

Lv+F: Levin + Florfenicol (8 mg/L)

McSA: MacConkey sin antibiótico

LvSA: Levin sin antibiótico

NC: No crece

C: Crece

Como parte de la identificación bioquímica de *E.coli* se realizó preliminarmente una prueba de indol. Los aislamientos que fueron positivos a la prueba de indol se procedió a confirmarlos bioquímicamente por medio del equipo VITEK 2 Compact (BioMeriux) con la tarjeta GN de Gram negativos. Los aislamientos confirmados se suspendieron en leche descremada estéril (10%) con glicerol estéril (20%) en alícuotas de 1 ml por duplicado y se congelaron a -80°C, con el fin de realizar después los análisis de perfiles de susceptibilidad a



los antibióticos (Cushing et al., 2011; Forbes et al., 2009; Foti et al., 2013; Gatica-Colima y López-Esparza, 2011).

## **Determinación del perfil de sensibilidad a los antibióticos**

A todos los aislamientos de *E. coli* obtenidos, se les realizó un perfil de sensibilidad a los antibióticos utilizando el equipo Vitek 2 Compact (BioMeriux), mediante la tarjeta AST-N279. Esta tarjeta incluye los siguientes antibióticos: nitrofurantoína, colistina, trimetoprima/sulfametoxazol, ciprofloxacina, meropenem, imipenem, piperacilina/tazobactam, gentamicina, amikacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefepime, ceftazidime, cefotaxima y ácido nalidíxico. Adicionalmente se analizó el perfil de sensibilidad a los antibióticos florfenicol y tetraciclina (no presentes en la tarjeta AST-N279) mediante la técnica de difusión de disco Kirby Bauer. El equipo permitió además confirmar aislamientos que presenten el fenotipo tipo BLEE ( $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido) que son de un valor indispensable en salud pública. Para la ejecución de los ensayos y la interpretación de los resultados, se utilizaron las guías de interpretación del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021).

Para evaluar el grado de resistencia, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) utilizando la técnica de microdilución según las indicaciones de la guía del CLSI (M100S) (CLSI, 2016) y el uso de tiras ETEST, de las muestras en donde primeramente se realizó una suspensión de las bacterias positivas a 0,5 McFarland en solución salina. Posteriormente se suspendieron en Agar Mueller Hinton, y por último se tomó una tira de E-TEST y se la colocó en medio de la placa y se incubó 24h a 37°C. La MIC se realizó en los aislamientos que muestren resistencia al florfenicol y a la tetraciclina, ambos antibióticos ampliamente utilizados en acuicultura. Posteriormente al tener los perfiles de sensibilidad y la MIC de cada aislamiento se calcularon los valores correspondientes de la MIC 50 y MIC 90, que nos indican las concentraciones más bajas del antibiótico a las que se inhibieron el 50% y el 90% de los aislamientos de *E. coli*.

## **Características de los cocodrilos muestreados**

A cada cocodrilo capturado se le registraban datos como: el sexo del animal, número de identificación individual, tamaño, lugar de procedencia (finca de procedencia y número de estanque), y fecha de ingreso al recinto de mantenimiento. La población de muestreo se calculó para un total de 50 ejemplares de cocodrilos debido a la disponibilidad de animales en los lugares de captura y porque su manejo es complejo por su comportamiento agresivo.

## **Análisis de datos**

Por medio de los perfiles de sensibilidad que se originan del equipo Vitek 2 Compact, se realizó un perfil de resistencia para cada aislamiento, generando un gráfico de barras del conteo de antibióticos que presentaron resistencia. Además, se realizó un gráfico de dispersión de la concentración de antibiótico en tetraciclina de la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria para verificar la concentración del 50% y 90% de las muestras que presentaban resistencia. Se realizó una correlación de Spearman entre el perfil de resistencia de los diferentes antibióticos evaluados, con las siguientes características de la población: la procedencia, el tamaño del animal y el sexo (Romero-Sancho, 2014).

## **3. Resultados**

### **Aislamiento de *E. coli***

En total se muestrearon 63 animales, pero se obtuvo 53 aislamientos, de los cuales eran 21 hembras y 32 machos de distintos lugares de procedencia y con tamaños variables (de un 1.88 m a 3.88 m). De los 63 animales muestreados se obtuvieron 55 aislamientos de *E. coli*, con un 87% de recuperación entre el aislamiento. Al inicio del estudio no se utilizó medio enriquecedor (caldo EC) previo al cultivo en los agaros. Esto pudo afectar el rendimiento de recuperación de *E. coli* en las primeras muestras. Posteriormente cuando se introdujo el uso del caldo EC, se mejoró el porcentaje de muestras positivas a *E. coli*.

Del total de aislamientos obtenidos, de acuerdo con el análisis realizado por el equipo Vitek 2 Compact (BioMeriux), se obtuvo un porcentaje de identidad bioquímica con la especie bacteriana *E. coli* de un 99% de probabilidad.

## Perfil de sensibilidad a los antibióticos

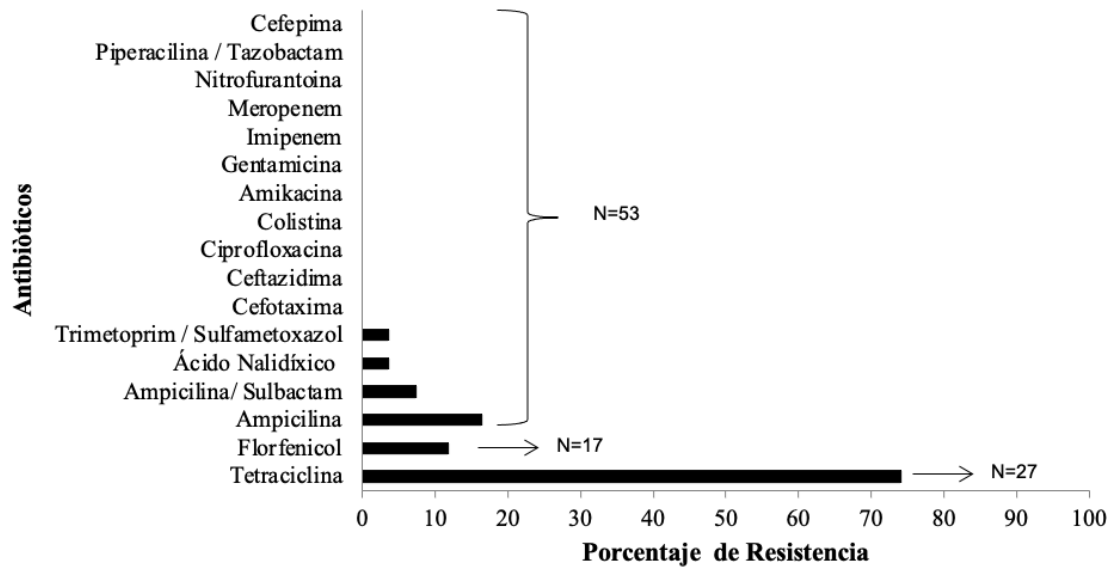
En los perfiles de sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *E. coli* obtenidos de los cocodrilos, detectamos un 82% de aislamientos totalmente susceptibles y un 18% aislamientos con de resistencia a algún antibiótico, por ejemplo: trimetoprima/sulfametoxazol, ampicilina, ampicilina/sulbactam, y ácido nalidíxico (Figura 3). Los demás antibióticos evaluados (nitrofurantoína, colistina, ciprofloxacina, meropenem, imipenem, piperacilina/tazobactam, gentamicina, amikacina, cefepime, ceftazidime, cefotaxima) fueron susceptibles para todos los aislamientos.

En el caso de la detección de la resistencia a las cefalosporinas de 3ra generación (para buscar bacterias con presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)), no se detectó ningún aislamiento positivo a este antibiótico.

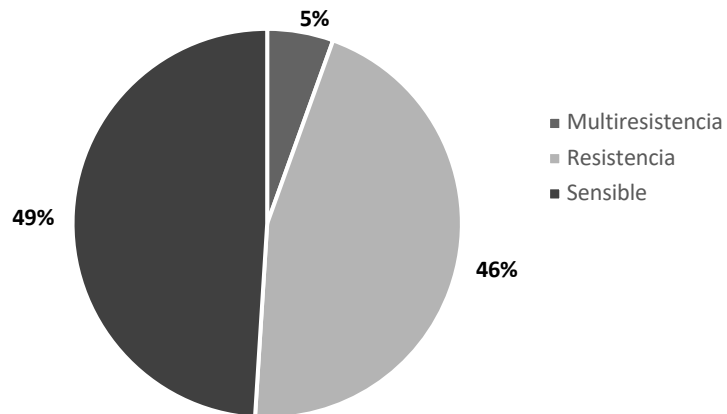
Adicional al panel de antibióticos evaluados en el Vitek 2, parte de las muestras también se evaluaron para detectar la resistencia a tetraciclinas y florfenicol (antibióticos utilizados en fincas de producción de tilapia). En el caso de tetraciclina, se logró aislar 27 aislamientos de los 63 muestras evaluadas. No se evaluaron todas las muestras para este antibiótico porque el proveedor se retrasó con la entrega de este reactivo. A pesar de esto, se obtuvieron 27 aislamientos con un 26% (n=7) de susceptibilidad a tetraciclina y un 74% (n=20) de resistencia del total de aislamientos que fueron probados. Para la evaluación del florfenicol sucedió la misma situación, hubo un gran atraso para la entrega del antibiótico, y solamente logramos analizar 17 aislamientos con el muestreo dirigido, al final logramos obtener un 12% (n=2) de resistencia y un 88% (n=15) susceptible de los aislamientos (Figura 3).

En el caso de la detección de la frecuencia y grado de resistencia, se obtuvo que 49% eran susceptibles, un 46% de los aislamientos eran resistentes a uno o dos antibióticos (ampicilina, ampicilina/sulbactam, tetraciclina y florfenicol) y solo un 3% presentaban resistencia a más de dos antibióticos (trimetoprima/sulfametoxazol, ampicilina, ampicilina/sulbactam, ácido nalidíxico, tetraciclina y florfenicol; ver Figura 4).

**Porcentajes resistencia en perfiles susceptibilidad a antibióticos en *E.coli***



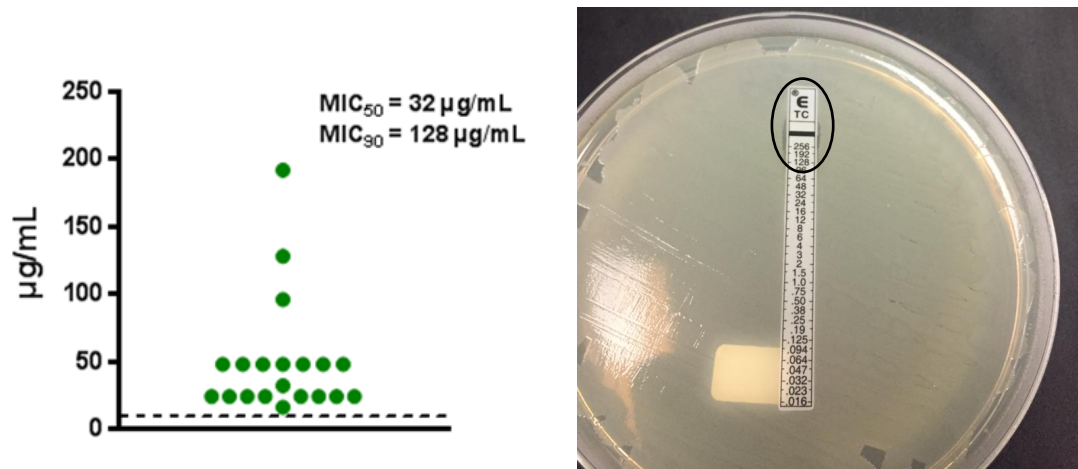
**Figura 3.** Prevalencia de los diferentes perfiles de susceptibilidad antibióticos expresados por porcentaje de resistencia en los aislamientos analizados de *E.coli* obtenidos de la cloaca de los cocodrilos capturados en Cañas, Guanacaste, Costa Rica.



**Figura 4.** Determinación de los porcentajes de resistencia y multiresistencia en los aislamientos de *E. coli* obtenidos de la cloaca de los cocodrilos capturados en Cañas, Guanacaste, Costa Rica.

## Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) a tetraciclina y florfenicol

Para la evaluación del grado de resistencia a la tetraciclina, se evaluó Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por medio de tiras ETEST (bioMérieux). Además, se calculó la MIC 50 y MIC 90. En el caso de la MIC 50 se obtuvo una concentración de 32  $\mu\text{g/mL}$  y para la MIC 90 una concentración de 128  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 5).



**Figura 5.** Concentraciones de tetraciclina (MIC 50 Y MIC 90) en aislamientos de *E. coli* resistentes, por medio de la prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) con el uso de tiras ETEST (bioMérieux) donde se marca el halo de susceptibilidad de color negro.

## **Análisis de datos**

En las correlaciones de Spearman se encontró una relación de un 68% entre el sexo y la resistencia a la ampicilina. En referencia a la correlación de resistencia y el lugar de procedencia se observó que el antibiótico evaluado con mayor correlación con esta variable fue ácido nalidíxico con un 72%. En cuanto la relación entre el tamaño del animal y los antibióticos se logró observar que el antibiótico con mayor correlación con la variable fue tetraciclina con un 92% correlación.

## **4. Discusión**

En los perfiles de sensibilidad evaluados, se detectaron diferentes porcentajes de resistencia. Como se observa en la Figura 3, algunos aislamientos presentaron resistencia contra trimetoprima/sulfametoxazol.

La trimetoprima es un antibiótico muy utilizado para infecciones del tracto urinario. Es usado tanto para humanos como a nivel veterinario, siendo una de las moléculas antimicrobianas más utilizadas a nivel mundial. La resistencia a este antibiótico se da por la disminución de la permeabilidad de la membrana, y por la sobreproducción de la enzima causada por la participación de las mutaciones (Kraupner et al., 2020). La investigación de Brenner et al. (2011), cita que éstas son moléculas que se pueden encontrar en aguas superficiales contaminadas de antibióticos, lo cual puede justificar los resultados en los aislamientos encontrados

Por otro lado, Furness et al. (2017), utilizaron ratones, topillos y musarañas, como centinelas de la variación y distribución de resistencia antimicrobianos en un ambiente costero, por medio del análisis de *E. coli*, y detectaron 79% de resistencia a los antimicrobianos. Entre los antibióticos resistentes encontrados esta la ampicilina y la trimetoprima, las cuales son moléculas típicas en medios acuáticos contaminados, cercanos a producciones acuícolas tal y como en nuestro caso. En este sentido, los resultados obtenidos pueden deberse a que la contaminación en ambientes acuáticos genera un potencial riesgo para la transmisión de genes de resistencia para los animales y humanos en estas regiones (Furness et al., 2017).

El uso de tetraciclinas, que es uno de los antibióticos más utilizados en la finca de producción, puede influir directamente en el alto porcentaje de resistencia encontrado (de un

75% entre los aislamientos obtenidos). Se ha comprobado que las tetraciclinas son antibióticos muy utilizados en la industria alimentaria, agrícola, animal y acuicultura. Tal y como encontramos en la zona de estudio, ésta es una de las moléculas con mayor número de genes de resistencia. Sus mecanismos se asocian a la unión del ribosoma en elongación e inhibe la entrega del complejo factor ternario, así mismo, la participación de elementos móviles como plásmidos, transposones, transposones conjugativos e integrones contribuye al aumento de la resistencia de esta molécula en el ambiente (Roberts y Schwarz, 2016).

Cabe mencionar, que las tetraciclinas se encuentran entre los antibióticos de importancia crítica para la OMS, por el uso indiscriminado que se le da este fármaco y que en el marco regulatorio es muy escaso y de poca vigilancia entre los países productores de acuicultura (Santos y Ramos, 2018). Esta situación se relaciona con nuestros resultados, ya que en Costa Rica igualmente no existen programas de vigilancia del uso de los antibióticos, solamente se cuenta con un reglamento de residuos de fármacos en las industrias, realizado por el ente de SENASA.

En nuestros aislamientos algunas presentaban un perfil resistente o multiresistente. Esta característica es preocupante ya en este sitio que se produce pescado para consumo humano. La multiresistencia se caracteriza por presentar de resistencia a más de dos familias de antibióticos. Este es uno de los mayores retos del sistema sanitario actualmente, ya que representa un peligroso problema para la salud pública y ambiental. Desafortunadamente la globalización, el uso indiscriminado de antibióticos en la cría de los peces en la acuicultura, el uso de múltiples agentes de amplio espectro y la falta de buenas prácticas y planes de gestión de los antimicrobianos, son de los factores más responsables de la propagación de la resistencia a los antibióticos (Vivas et al., 2019), situación que puede presentarse en la finca de estudio.

Los resultados obtenidos son similares al estudio realizado por Jobbins y Alexander (2015), en el cual se muestra que, de los animales silvestres muestreados, el 41,3% contenía aislamientos de *E. coli* resistentes a uno o dos de los 10 antibióticos analizados, y el 13,3% de los aislados mostraron resistencia a múltiples fármacos. Así mismo, aquellas especies muestreadas con estrategias de historia de vida acuáticas o semiacuáticas como cocodrilo, hipopótamo, nutria y antílope albergaban mayores niveles de *E. coli* resistente a múltiples fármacos. Entre lo más común está ampicilina, doxiciclina, estreptomina, tetraciclina o

trimetoprim-sulfametoxazol, mencionando que uno de los factores asociados eran aguas contaminadas cercanas a asentamientos humanos.

El haber obtenido en nuestro estudio una MIC 50 de 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una MIC 90 de 128  $\mu\text{g}/\text{m}$ , es de resaltar, ya que, según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020), los aislamientos de Gram negativos son resistentes a las tetraciclinas cuando superan los 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En los resultados se puede determinar que la resistencia encontrada del 50% de los aislamientos de *E. coli* en comparación a las concentraciones establecidas por CLSI fueron el doble, observando una resistencia considerable en los aislamientos.

Por otra parte, la resistencia encontrada al florfenicol fue baja con un 12% de los aislamientos. No obstante, cabe destacar que sí se encontraron *E. coli* resistente a este antibiótico. El florfenicol es un antibiótico de amplio espectro muy utilizado en los sistemas pecuarios y de acuicultura, y su uso constante ha originado igualmente genes de resistencia en el ambiente. Por ejemplo, en un estudio de resistencia de *E. coli* aislado de cerdos en Taiwán, usando florfenicol, la resistencia aumentó del 39,2% en 2003 al 78,3% en 2007, y la tasa de prevalencia del genes resistentes presentaba una tendencia ascendente a lo largo del tiempo del análisis (Li et al., 2020). Esto es una situación preocupante convirtiéndose un problema de afectación animal y humana.

El éxito de aislamiento de *E. coli* fue de un 87%. La ausencia de recuperación del 13% de las muestras se pudo deber a que no se utilizó medio de enriquecimiento EC al inicio del proyecto. El uso un medio enriquecedor favorece multiplicación bacteriana por tener una mayor disponibilidad de nutrientes. Al ser las bacterias únicas y con requisitos nutricionales específicos, los medios enriquecedores líquidos se convierten en una estrategia efectiva previa al cultivo (Bonnet et al., 2020).

En relación con los resultados encontrados de las correlaciones entre los perfiles de resistencia de los aislamientos y las variables de medición de los cocodrilos, se observó que uno de los antibióticos con mayor relación al sexo del animal fue la ampicilina. Esto puede relacionarse a que fue de los antibióticos que mayormente se detectó resistencia entre los aislamientos. Para la correlación del lugar de procedencia tanto de estanque como de recinto el antibiótico con la mayor correlación fue el ácido nalidíxico. Esto puede relacionarse que en los dos sitios hay *E.coli* resistente a este antibiótico y por lo tanto presenta una correlación positiva.



Por último, para la variable de tamaño se observó que el antibiótico con mayor relevancia y un porcentaje más alto en la correlación fue la tetraciclina. Esto puede relacionarse a que la mayoría de los tamaños rondaban los 2 a 3 metros y que estos animales eran resistentes a este antibiótico.

No obstante, la resistencia a los antibióticos es una problemática multifactorial en que las características de los animales son importantes, y para su control se debe proponer grandes desafíos por su complejidad (Martínez, 2009). Como se observó en los resultados por la presencia de aislamientos multirresistentes, además como se evidencia la resistencia a los antibióticos, no se limita a áreas geográficas específicas o especies de animales como en el caso de los cocodrilos (OIE, 2017). El uso desmedido de los antibióticos puede liberarse en el ambiente y de esa forma cambia la composición de un ecosistema, altera la biodiversidad y la microbiota en el ambiente (Harnisz et al., 2015).

El uso de *E. coli* como indicador microbiológico, fue efectivo destacando que esta bacteria al estar presente en muchos animales puede generar información de una gran diversidad de ambientes. Además, tiene la capacidad de transportar genes de virulencia y de resistencia a los antibióticos (Lagerstrom y Hadly, 2021), aquí demostrado por la alta presencia de resistencia en los aislamientos detectados.

Por último, es importante destacar el papel de los cocodrilos como un bioindicador ambiental. Se menciona que las especies bioindicadores se utilizan para evaluar la calidad del ambiente a lo largo del tiempo. Desde una perspectiva de gestión, estas especies brindan información sobre lo que es y lo que no es biológicamente sostenible. Además, estos bioindicadores se valoran a través de cambios en su aptitud individual, densidad de población, composición de la comunidad y procesos ecosistémicos (Zanardi et al., 2020), características que se encuentran en esta especie de reptil. Por su fácil adaptabilidad y distribución a lo largo de la zona de muestreo el cocodrilo nos brindó información de relevancia sobre la adquisición y diseminación de los agentes de resistencia antimicrobianos.

## 5. Conclusiones

Los resultados del presente estudio indican la presencia de aislamientos de *E. coli* resistentes tanto en antibióticos de uso humano como antibióticos de uso animal. Además, en este estudio no se detectó un fenotipo BLEE en los aislamientos de *E. coli* de los cocodrilos muestreados en los diferentes lugares.

Los antibióticos evaluados en los perfiles de sensibilidad en aislamientos de *E. coli* obtenidos a partir de heces de cocodrilos muestran multirresistencia. La MIC en los aislamientos resistentes a tetraciclina fue alta.

Los niveles de resistencia antibacteriana obtenidos a partir de heces del cocodrilo americano, generan una presión selectiva de genes de resistencia en el ambiente, donde puede ocurrir un traslape horizontal de los mismos, provocando otras especies bacterianas o animales se colonicen con estos genes de resistencia. No obstante se necesita más estudios para corroborar el traslape de genes en los ambientes.

## 6. Recomendaciones

- Se recomienda un estudio genético para determinar los genes de virulencia y la clonalidad de la *E.coli* detectada en el estudio, para una mejor comprensión de la resistencia en este ambiente.
- La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un hecho de vital importancia para la población mundial. Es una problemática que no solamente afecta a los humanos, sino como observamos en la investigación, es un problema que también se presenta en el ambiente y en los animales silvestres, donde la clave es lograr implementar planes de vigilancia, supervisión o de gestión del uso adecuado de los antibióticos en cualquier actividad que haga uso de los mismos.
- Se recomiendan mayores estudios en fauna silvestre y en muestras ambientales para indagar la presencia de la resistencia a los antibióticos.

## **Fuentes de Financiamiento**

La investigación fue financiada por el proyecto “Propuesta de atención a los conflictos generados por el aumento poblacional de cocodrilos (*Crocodylus acutus*: Cuvier), tendiente a la ampliación del conocimiento, la generación de capacidades y la disminución del riesgo en el Gran Humedal del Tempisque y el Pacífico Central como caso piloto (Código SIA: 0217-16)”. Así mismo, por el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria a cargo del Dr. Elías Barquero. También se financió por el Grupo de Especialistas en Cocodrilos (CSG), en la obtención de una beca de investigación en su proyecto “IUCN-SSC Crocodile Specialist Group Fritz Huchzermeyer Veterinary Science Student Research Assistance Scheme (FHVS-SRAS) ”.

## **Conflicto de Intereses**

Sin conflicto de intereses

## 7. Bibliografía

- Acevedo Barrios, R. L., y Severiche Sierra, C. A. (2013). Identificación de Bacterias Resistentes a Di-Bromo-Mercurio aisladas de Sedimentos en Playas de Cartagena de Indias, Caribe Colombiano. *AVANCES Investigación En Ingeniería*, 10(2), 73-79.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697-705. doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., y Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1740–1534 (Electronic)), 251–259. doi.org/10.1038/nrmicro2312.
- Alonso-Tabet, M. (2009). *Comportamiento del cocodrilo americano (Crocodylus acutus) en el refugio de fauna " Monte Cabaniguán" Cuba*. (Tesis Doctoral). Universidad de Alicante, España y Universidad de Pinar del Río, Cuba.
- Ang, J. Y., Ezike, E., y Asmar, B. I. (2004). Antibacterial resistance. *Indian Journal of Pediatrics*, 71(3), 229-239. doi.org/10.1007/BF02724275
- Angulo, A. S. (2017). *Identificación de genes de resistencia a antimicrobianos en Panthera onca y Puma concolor y su relación con el grado de antropogenización en Costa Rica*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional, Costa Rica.
- Balaguera-Reina, S. A, y González-Maya, J. F. (2010). Percepciones, conocimiento y relaciones entre los Crocodylia y poblaciones humanas en la Vía Parque Isla de Salamanca y su zona de amortiguamiento, Caribe colombiano. *Revista Latinoamericana de Conservación | Latin American Journal of Conservation*, 1(1) 53-63.

- Baldi, M., Barquero Calvo, E., Hutter, S. E., y Walzer, C. (2019). Salmonellosis detection and evidence of antibiotic resistance in an urban raccoon population in a highly populated area, Costa Rica. *Zoonoses and Public Health*, 66(7). <https://doi.org/10.1111/zph.12635>
- Baquero, F., Alvarez-Ortega, C., y Martinez, J. L. (2009). Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 469-476. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00053.x>
- Barrios, R. y Sierra, C. A. (2013). Identificación de Bacterias Resistentes a Di-Bromo-Mercurio aisladas de Sedimentos en Playas de Cartagena de Indias, Caribe Colombiano. *Avances Investigación en Ingeniería*, 10(2), 73-79. Recuperado a partir de <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/avances/article/view/2750>
- Blanco-Peña, K., Esperón, F., Torres-Mejía, A. M., Torre, A., Cruz, E., y Jiménez-Soto, M. (2017). Antimicrobial resistance genes in pigeons from public parks in Costa Rica. *Zoonoses and Public Health*, 64(7), 1-8, e23–e30. [doi.org/10.1111/zph.12340](https://doi.org/10.1111/zph.12340)
- Bolaños, J. R. (2012). Manejo de cocodrilos (*Crocodylus acutus*) en estanques de cultivo de tilapia en Cañas, Guanacaste. *Revista de Ciencias Ambientales*, 43(1), 63-72. <https://doi.org/10.15359/rca.43-1.6>
- Brenner, C., Mallmann, C., Arsand, D., Mayer, F., y Martins, A. (2011). Determination of sulfamethoxazole and trimethoprim and their metabolites in hospital effluent. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 39(1), 28-34. <https://doi.org/10.1002/clen.201000162>
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., y Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>

- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137-1144. doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., y Zúñiga, A. E. (2013). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*, 38(2), 149-158. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/html/283/28338208/>
- Carlos-Erazo, N. (2016). Enterobacterias y su resistencia antimicrobiana en el caimán blanco (*Caiman crocodilus*) de vida libre en el río Madre de Dios, Tambopata-Perú. *Revista Latinoamericana De Recursos Naturales*, 12(2), 53-59. Recuperado a partir de <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/251>
- Centro para el control y la prevención de Enfermedades. (17 de setiembre del 2023). *Prescripción y uso de antibióticos*. <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/should-know.html>
- Charruau, P., Pérez-Flores, J., Pérez-Juárez, J. G., Cedeño-Vázquez, J. R., y Rosas-Carmona, R. (2012). Oral and cloacal microflora of wild crocodiles *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in the Mexican Caribbean. *Diseases of Aquatic Organisms*, 98(1), 27-39. doi.org/10.3354/dao02418
- Charruau, P., y Hénaut, Y. (2012). Nest attendance and hatchling care in wild American crocodiles (*Crocodylus acutus*) in Quintana Roo, Mexico. *Animal Biology*, 62(1), 29-51. doi.org/10.1163/157075511X597629
- CLSI. (2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Pennsylvania, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute. In *M100S, 26th Edition*.

- Cupul-Magaña, F., A. Rubio-Delgado., F. Molano-Rendón y A. Reyes-Juárez. (2008). Contenido estomacal de neonatos de *Crocodylus acutus* (Cuvier, 1807) en Boca Negra, Jalisco. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana*, 16, 41-45.
- Cushing, A., Pinborough, M. y Stanford, M. (2011). Review of bacterial and fungal culture and sensitivity results from reptilian samples submitted to a UK laboratory. *Veterinary Record*, 169(15), 390. doi.org/10.1136/vr.d4636
- Davies, J., y Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. doi.org/10.1128/MMBR.00016-10
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., y Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current opinion in microbiology*, 14(3), 251-258. doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004
- Fernández, L., y Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 661-681. doi.org/10.1128/CMR.00043-12
- Forbes, B.A. (2009). *Bailey y Scott Diagnostico microbiologico*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Foti, M., Giacobello, C., Fisichella, V., y Latella, G. (2013). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from captive reptiles. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 22(3), 270-274. doi.org/10.1053/j.jepm.2013.08.007
- Furness, L. E., Campbell, A., Zhang, L., Gaze, W. H., y McDonald, R. A. (2017). Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Environmental Research*, 154, 28-34. https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.014

- García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J. A., y Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista española de quimioterapia*, 24(2), 57-20.
- Gatica-Colima, A. y López-Esparza, J. (2011). Aislamiento de Salmonella y otras enterobacterias de carne fresca de víbora de cascabel *Crotalus* spp. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 7 (2): 78-88. Recuperado a partir de <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/194>
- Gonçalves, L. F., De Oliveira Martins, P., De Melo, A. B. F., Da Silva, R. C. R. M., De Paulo Martins, V., Pitondo-Silva, A., y de Campos, T. A. (2016). Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 6(1), 1-4. doi.org/10.1016/j.jgar.2016.02.003
- Gorla, N. (2016). Los animales domésticos y silvestres como centinelas de salud ambiental. *Investigación, Ciencia y Universidad*, 1(1), 46-51. Recuperado. <http://repositorio.umaza.edu.ar/handle/00261/830>
- Gruen, R. L. (2009). Crocodile attacks in Australia: Challenges for injury prevention and trauma care. *World Journal of Surgery*, 33(8), 1554-1561. doi.org/10.1007/s00268-009-0103-6
- Harnisz, M., Korzeniewska, E., y Gołaś, I. (2015). The impact of a freshwater fish farm on the community of tetracycline-resistant bacteria and the structure of tetracycline resistance genes in river water. *Chemosphere*, 128, 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.035>



- Hernández, J. (2007). Convivir con nuestros cocodrilos. *Ambientico*, 166 (2), 11-13.  
Recuperado a partir de [https://www.ambientico.una.ac.cr/wp-content/uploads/tainacan-items/5/17231/166\\_11-12.pdf](https://www.ambientico.una.ac.cr/wp-content/uploads/tainacan-items/5/17231/166_11-12.pdf)
- Hernández, I. S., Marín, M. S., González, J. S. M., Montero, J. R. B., y Ramírez, J. S. (2022). Potential habitat of the American crocodile (*Crocodylus acutus*: Reptilia: Crocodylidae) and identification of areas of interaction with humans in Costa Rica. *South American Journal of Herpetology*, 25(1), 66-75. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-21-00037.1>
- Hessain, A. M., Al-Arfaj, A. A., Zakri, A. M., El-Jakee, J. K., Al-Zogibi, O. G., Hemeg, H. A., y Ibrahim, I. M. (2015). Molecular characterization of *Escherichia coli* O157: H7 recovered from meat and meat products relevant to human health in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(6), 725-729. [doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.009](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.009)
- Huchzermeyer, F.W. (2003). *Crocodiles: biology, husbandry and diseases*. Oxon, Londres: Ediciones CABI.
- Hurtado, P. S. H. (2012). *Alimentación y nutrición de crías de cocodrilo de río, Crocodylus acutus, en cautiverio en la UMA Reptilario Cipactli*. (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA).
- Jiménez, J.A. (2005). *Conceptualización del caudal ambiental en Costa Rica: Determinación Inicial para el Río Tempisque*. San José, Costa Rica: UICIN-Mesoamericana.
- Jobbins, S. E., y Alexander, K. A. (2015). From whence they came—antibiotic-resistant *Escherichia coli* in African wildlife. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(4), 811-820. <https://doi.org/10.7589/2014-11-257>

- Karesh, W. B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, M., ... y Machalaba, C. C. (2012). Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *The Lancet*, 380(9857), 1936-1945. doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X
- Khan, I., Yasir, M., Kumosani, T., Abbas, A. T., Barbour, E. K., Jiman-Fatani, A. A., y Azhar, E. I. (2016). Assessment of Bacterial Density, Diversity, and Antibiotic Resistance-Dissemination from Multidrug-Resistant *Escherichia coli* to Rat's Gut Microbiota in Presence and Absence of Antibiotic Treatment: A Useful Animal Model for Future Investigations. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 14(2), 170-184.
- Kheiri, R., Ranjbar, R., Khamesipour, F., y Akhtari, L. (2016). Role of Antibiotic in Drug Resistance and Integrons Prevalence in *Escherichia coli* Isolated from Human and Animal Specimens. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 22(6), 953-959. doi.org/10.9775/kvfd.2016.15684
- Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., y 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. doi.org/10.1128/AEM.01821-08
- Kraupner, N., Ebmeyer, S., Hutinel, M., Fick, J., Flach, C. F., y Larsson, D. J. (2020). Selective concentrations for trimethoprim resistance in aquatic environments. *Environment International*, 144, 106083. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106083
- Lagerstrom, K. M., y Hadly, E. A. (2021). The under-investigated wild side of *Escherichia coli*: genetic diversity, pathogenicity and antimicrobial resistance in wild animals. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1948), 20210399. https://doi.org/10.1098/rspb.2021.0399

- Landecker, H. (2016). Antibiotic resistance and the biology of history. *Body y Society*, 22(4), 19-52. <https://doi.org/10.1177/1357034X14561341>
- Levy, S., y O'brien, T. F. (2005). Global antimicrobial resistance alerts and implications. *Clinical Infectious Diseases*, 41(4), S219-S220.
- Li, P., Zhu, T., Zhou, D., Lu, W., Liu, H., Sun, Z., ... y Xu, T. (2020). Analysis of resistance to florfenicol and the related mechanism of dissemination in different animal-derived bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 369. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00369>
- Liu, X., Steele, J. y Meng, X. 2017. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: a review. *Environmental Pollution*, 223, 161-169. Doi : 10.1016/j.envpol.2017.01.003
- Lulijwa, R., Rupia, E. y Alfaro, A. 2019. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, 12, 640-663. doi: 10.1111/raq.12344
- Magaña, C. (2005). La mordida del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*), ¿es potencialmente séptica? *Revista Biomedica*, 16, 65-67.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., y Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. [doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x)
- Magnino, S., Colin, P., Dei-Cas, E., Madsen, M., McLauchlin, J., Nöckler, K., y Van Peteghem, C. (2009). Biological risks associated with consumption of reptile products. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 163-175. [doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.001](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.001)

- Manno, G., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., Vandamme, P., Lorini, R., Minicucci, L., y Bevivino, A. (2004). Epidemiology and clinical course of Burkholderia cepacia complex infections, particularly those caused by different Burkholderia cenocepacia strains, among patients attending an Italian Cystic Fibrosis Center. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1491-1497. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.42.4.1491-1497.2004>
- Marcos, E. (2013). El Concepto Una salud Como Integrador de la Interfase Humano-Animal-Ambiental, Frente a las Enfermedades Emergentes, Reemergentes y Transfronterizas. *Epidemiología y Salud*, 1(3), 16.
- Martinez, 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. Martinez, 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>
- Mellata, M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic Escherichia coli: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne pathogens and disease*, 10(11), 916-932. [doi.org/10.1089/fpd.2013.1533](https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1533)
- Mermin, J., Hutwagner, L., Vugia, D., Shallow, S., Daily, P., Bender, J., Emerging Infections Program FoodNet Working Group. (2004). Reptiles, Amphibians, and human Salmonella Infection: a population-based, case-control study. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(Supplement\_3), S253-S261. [doi.org/10.1086/381594](https://doi.org/10.1086/381594)
- Millanao, A., Barrientos, M., Gómez, C., Tomova, A., Buschmann, A., Dölz, H., y Cabello, F. C. (2011). Uso inadecuado y excesivo de antibióticos: Salud pública y salmonicultura en

- Chile. *Revista Médica de Chile*, 139(1), 107-118. doi.org/10.4067/S0034-98872011000100015
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., y Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28, 648-656. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>
- Organización Mundial de la Salud. OMS. 2011. Tackling antibiotic resistance from a food perspective. [<http://www.euro.who.int/data/assets/pdf/file/0005/136454/e94889.pdf>]. Revisado: 1 de Julio 2021
- OIE (2017): *Aquatic Animal Health Code*. World Organisation for Animal Health. 20th Edition. France.
- Pachón, C. (2009). *Aislamiento e identificación, serotipificación de enterobacterias del género Salmonella en una población de Crocodylus intremedius y Testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de Biología Tropical RobertoFranco E.B.T.R.B de la Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Programa Profesional de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, Colombia.
- Paterson, D. L., y Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657-686. doi.org/10.1128/CMR.18.4.657
- Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., y Pompliano, D. L. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 6(1), 29-40. doi.org/10.1038/nrd2201
- Peñuela, M., Valencia, J., y Gordon, L. (2011). Revisión sobre la importancia de la fauna silvestre en la epidemiología de la leptospirosis. *Biosalud*, 10(2), 112-122.

- Pesapane, R., Ponder, M., y Alexander, K. A. (2013). Tracking pathogen transmission at the human–wildlife interface: banded mongoose and *Escherichia coli*. *Ecohealth*, 10(2), 115-128. doi.org/10.1007/s10393-013-0838-2
- Phalitakul, S., Wongtawatchai, J., Sarikaputi, M., y Viseshakul, N. (2006). The molecular detection of Taura syndrome virus emerging with White spot syndrome virus in penaeid shrimps of Thailand. *Aquaculture*, 260(1), 77-85. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.040
- Plascencia, A. E., y Almada, M. D. C. B. (2012). La acuicultura y su impacto al medio ambiente. *Estudios Sociales*, 8(2), 221-232.
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., e Igrejas, G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Frontiers in Microbiology*, 5(23), 2-12. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00023
- Redshaw, C. H., Stahl-Timmins, W. M., Fleming, L. E., Davidson, I., y Depledge, M. H. (2013). Potential changes in disease patterns and pharmaceutical use in response to climate change. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 16(5), 285-320. doi.org/10.1080/10937404.2013.802265
- Restrepo-Sáenz, C., Ibrahim, M., Harvey, C., Harmand, J. M., y Morales, J. (2004). Relaciones entre la cobertura arbórea en potreros y la producción bovina en fincas ganaderas en el trópico seco en Cañas, Costa Rica. *Agroforestería de las Américas* 41-42. Recuperado a partir <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/3814>
- Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., Hiney, M., Smith, P., y Pickup, R. W. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline

- resistance determinant Tet A. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 3883-3890. doi.org/10.1128/AEM.66.9.3883-3890.2000
- Roberts, M. C., y Schwarz, S. (2016). Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment, and humans. *Journal of environmental quality*, 45(2), 576-592. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.04.0207>
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475. doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011
- Romero-Sancho, M. F. (2014). *Determinación preliminar de los patrones de resistencia antimicrobiana de las bacterias pertenecientes al género Staphylococcus spp. causantes de pioderma en pacientes caninos atendidos en clínicas veterinarias del Área Metropolitana*. (Tesis Pregrado). Universidad Nacional de Costa Rica, Costa Rica.
- Sánchez-Ramírez, J. (2001). *Estado de la población de cocodrilos (Crocodylus acutus) en el río Tempisque, Guanacaste*, Heredia, Costa Rica: Editorial INBIO,
- Santos, L., y Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., y Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725-759. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>

- Segura, P. A., François, M., Gagnon, C., y Sauvé, S. (2009). Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environmental health perspectives*, 117(5), 675. doi.org/10.1289/ehp.11776
- Smith, R., y Coast, J. (2013). The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ (Clinical research ed)*, 346(1), 1-5. doi.org/10.1136/bmj. f1493
- Sørum, H. (2006) Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Aarestrup, F.M. (ed.). Washington, DC, USA: *American Society for Microbiology Press*, 13(1), 213–238. <https://doi.org/10.1128/9781555817534.ch13>
- Tafur, J. D., Torres, J. A., y Villegas, M. V. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217-226.
- Taylor, L. H., Latham, S. M., y Mark, E. J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 356(1411), 983-989. doi.org/10.1098/rstb.2001.0888
- Thorbjarnarson, J., Mazzotti, F., Sanderson, E., Buitrago, F., Lazcano, M., Minkowski, K., y Trelancia, A. M. (2006). Regional habitat conservation priorities for the American crocodile. *Biological Conservation*, 128(1), 25-36. doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.013
- Torres, C., y Zarazaga, M. (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25, 29-37.
- Vargas-Abella, J. C., Tarazona-Manrique, L. E., y Andrade-Becerra, R. J. (2023). Serotipificación y perfil de resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp. aislados de crocodilos en cautiverio. *Revista MVZ Córdoba*, 28(1), e3045-e3045. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-47.2.271>.



Vivas, R., Barbosa, A. A. T., Dolabela, S. S., y Jain, S. (2019). Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: an overview. *Microbial Drug Resistance*, 25(6), 890-908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>

Zanardi, G., Iemmi, T., Spadini, C., Taddei, S., Cavirani, S., y Cabassi, C. S. (2020). Wild micromammals as bioindicators of antibiotic resistance in ecopathology in Northern Italy. *Animals*, 10(7), 1184. <https://doi.org/10.3390/ani10071184>