



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA MEDICINA VETERINARIA
SEDE LA PATAGONIA**

**ANÁLISIS METAGENÓMICO DE MICROORGANISMOS DE
RELEVANCIA EN MEDICINA VETERINARIA IDENTIFICADOS EN
HUMEDALES URBANOS DE LA REGIÓN DE LOS LAGOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

Profesor Guía: Dr. Daniel Alejandro Medina Salas

Copatrocিনadora: MV. Catherine Paola Opitz Ríos

Estudiante: Alvaro Eduardo Burgos Pacheco

Puerto Montt, Chile

2024

® Alvaro Eduardo Burgos Pacheco.

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Puerto Montt, Chile

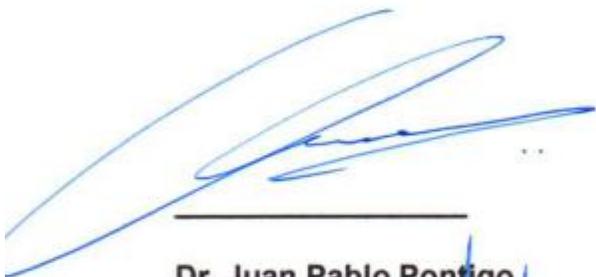
2024

HOJA DE CALIFICACIÓN

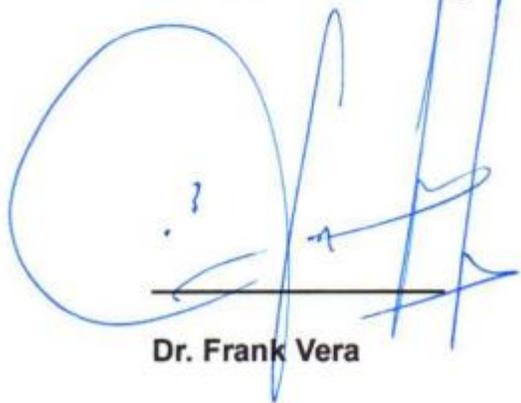
En Puerto Montt, el 22 de julio de 2024, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Álvaro Eduardo Burgos Pacheco de la carrera de Medicina Veterinaria ha aprobado su memoria de título para optar al grado de Médico Veterinario con una nota de 6,7



Dr. Daniel Medina



Dr. Juan Pablo Pontigo



Dr. Frank Vera

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco profundamente a mi profesor guía, Daniel Medina, por su extraordinaria disposición y dedicación al proceso de esta investigación. Su habilidad para señalar con precisión las áreas que necesitaban rectificación, identificar inconsistencias y proponer alternativas para mejorar continuamente esta memoria de título, fue un apoyo invaluable e indispensable para la culminación de este trabajo.

Agradezco a Catherine Opitz por su invaluable ayuda y apoyo en el laboratorio. Su dedicación y experticia en el procesamiento de muestras fueron fundamentales para el avance y la calidad de esta investigación. Este trabajo no habría sido posible sin su colaboración y compromiso.

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo por la financiación brindada a través del proyecto FONDECYT INICIACIÓN N°11230295 y también al Fondo de Vinculación Internacional N°FOVI220211. Sin su apoyo, este trabajo de investigación no habría sido posible.

Agradezco al Laboratorio Nacional de Computación de Alto Rendimiento (NLHPC) por el acceso a sus recursos computacionales de última generación, los cuales fueron esenciales para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a mi madre, Nidia Yohana, le expreso mi más sincero agradecimiento por su infinita paciencia, comprensión y apoyo incondicional, que me permitieron creer en mí mismo y superar mis miedos. A mi abuela materna, María, le agradezco profundamente por su inquebrantable amor y apoyo, siendo sus palabras de aliento y su constante presencia un faro de luz en los momentos más difíciles. A mi hermano Juan Pablo, mi mejor amigo y confidente, le agradezco de todo corazón por estar siempre ahí para escucharme, animarme y darme el empujón necesario cuando lo necesitaba.

Agradezco a Francisca Paredes por su constante apoyo y comprensión a lo largo de este proceso. Su paciencia, motivación y aliento han sido esenciales para la culminación de este trabajo. Su constante presencia y su capacidad para brindarme ánimo en los momentos más difíciles han sido invaluable.

Tabla de contenidos

	Pág.
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
1. Introducción	1
1.1 Aspectos generales de los humedales	1
1.2 Relación entre humedales y la salud animal	2
1.3 Características generales del análisis metagenómico de microorganismos	3
1.4 Iniciativa de Una Salud (One Health)	5
2. Hipótesis.....	9
3. Objetivos.....	9
3.1 Objetivo General	9
3.2 Objetivos Específicos	9
4. Materiales y Métodos	10
4.1 Tipo de estudio.....	10
4.2 Identificación de microorganismos a nivel de especies de la categoría taxonómica y genes de virulencia en los humedales urbanos.....	11
4.2.1 Área de estudio y obtención de muestras	11
4.2.2 Recuperación de los microorganismos y su material genético	12
4.2.3 Secuenciación del material genético.....	12
4.2.4 Análisis metagenómico	12
4.2.5 Identificación de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana	13
4.3 Descripción de las patologías provocadas por las especies pertenecientes a los microorganismos con genes de virulencia	13

4.4 Representación de datos	14
5.Resultados.....	15
5.1 Identificación de microorganismos a nivel de especie incluidos en la lista de enfermedades de notificación obligatoria	17
5.2 Identificación de microorganismos bacterianos infecciosos de importancia en Medicina Veterinaria.....	18
5.3 Identificación de genes de resistencia a los antimicrobianos	19
5.4 Identificación de mecanismos de genes de virulencia.....	21
5.5 Identificación de elemento móviles en humedales urbanos	26
5.6 Descripción de microorganismos con genes de virulencia hallados en los humedales urbanos.....	27
5.6.1 Descripción de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	27
5.6.2 Descripción de <i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>Enterocolitica</i>	28
5.6.3 Descripción de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	30
5.6.4 Descripción de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ...	31
6. Discusión	34
7.Conclusiones	41
8. Referencias	42
9. Anexo	55
9.1 Anexo 1.....	55
9.2 Anexo 2.....	57
9.3 Anexo 3.....	58

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de patologías de carácter bacteriano en el territorio nacional de denuncia obligatoria al Servicio Agrícola y Ganadero.....	7
Tabla 2. Funciones de genes de virulencia con respectivo microorganismo asociado. .	22
Tabla 3. Elementos genéticos móviles asociados a microorganismos recuperados de la base de datos PlasmidFinder hallados en los humedales urbanos de la Región los Lagos.	26

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo para el análisis metagenómico de escopeta (shotgun metagenomics).....	10
Figura 2. Ciudades de la Región de los Lagos donde se obtuvieron muestras para análisis metagenómico de escopeta.....	11
Figura 3. Abundancia de la taxonomía a nivel de especie se representa como un diagrama de barras apiladas de cada muestra	16
Figura 4. Abundancia relativa de especies bacterianas incluidas en la lista de notificación obligatoria pertenecientes a los humedales urbanos.....	18
Figura 5. Abundancia relativa de especies bacterianas infecciosas de relevancia en Medicina Veterinaria pertenecientes a los humedales urbanos.....	19
Figura 6. Representación gráfica de los genes de resistencia que otorgan de familias de antimicrobianos más abundante en los humedales urbanos.....	20
Figura 7. Representación de los productos antimicrobianos más abundantes en los humedales urbanos de la Región de los Lagos.....	21
Figura 8. Genes de virulencias asociados a <i>P. aeruginosa</i> , hallados en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos	23
Figura 9. Gene de virulencias asociados a <i>Y. enterocolitica subs. Enterocolitica</i> , hallados en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos	24
Figura 10. Genes de virulencias asociados a <i>E. coli</i> O157:H7 hallados en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos	25
Figura 11. Genes de virulencias asociado a <i>S. entérica subsp. Entérica serovar Thyphimurium</i> , hallados en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos	25

Resumen

Los humedales, ecosistemas de vital importancia para la biodiversidad y el equilibrio ecológico, enfrentan una constante amenaza por las actividades humanas. La contaminación y la sobrepoblación, junto con prácticas agrícolas y ganaderas intensivas, provocan un exceso de nutrientes que desencadena un crecimiento descontrolado de microorganismos. Esta alteración de la calidad del agua genera riesgos para la salud animal, humana y ambiental. En respuesta a este desafío, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile ha implementado un sistema de vigilancia epidemiológica mediante la lista de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO). Esta iniciativa permite la detección y notificación oportuna de enfermedades contagiosas de relevancia veterinaria, contribuyendo a la protección de la salud pública y el cuidado del medio ambiente.

En este trabajo se empleó la metagenómica de escopeta para caracterizar de manera integral las comunidades microbianas presentes en 13 humedales urbanos de la Región de Los Lagos, Chile. El objetivo principal fue identificar microorganismos de relevancia veterinaria, evaluar su potencial de resistencia a los antibióticos y caracterizar elementos genéticos móviles como plásmidos. Además, se proporcionó una descripción detallada de cada microorganismo que contiene genes de virulencia.

El estudio logró identificar una variedad de microorganismos de importancia veterinaria, incluyendo aquellos sujetos a declaración obligatoria ante el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Además, se encontraron especies de alta relevancia debido a su prevalencia en enfermedades animales en los distintos humedales estudiados. Cabe destacar que el análisis detectó genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia y elementos genéticos móviles, reflejando así la calidad sanitaria de cada humedal urbano estudiado.

Palabras claves: *Humedales, Metagenómica de escopeta, Medicina Veterinaria, Bacterias patógenas, Resistencia antimicrobiana.*

Abstract

Wetlands, ecosystems of vital importance for biodiversity and ecological balance, face constant threats from human activities. Pollution and overpopulation, along with intensive agricultural and livestock practices, lead to an excess of nutrients that trigger uncontrolled microbial growth. This deterioration in water quality poses risks to animal, human, and environmental health. In response to this challenge, the Agricultural and Livestock Service (SAG) of Chile has implemented an epidemiological surveillance system through the List of Notifiable Diseases (EDO). This initiative allows for the timely detection and reporting of contagious diseases of veterinary relevance, contributing to the protection of public health and environmental care.

In this study, shotgun metagenomics was employed to comprehensively characterize the microbial communities present in 13 urban wetlands in the Los Lagos Region of Chile. The main objective was to identify microorganisms of veterinary relevance, assess their potential antibiotic resistance, and characterize mobile genetic elements such as plasmids. Additionally, a detailed description of each microorganism containing virulence genes was provided.

The study managed to identify a variety of microorganisms of veterinary importance, including those subjects to mandatory declaration before the Agricultural and Livestock Service (SAG). In addition, species of high relevance were found due to their prevalence in animal diseases in the different wetlands studied. It should be noted that the analysis detected antibiotic resistance genes, virulence genes and mobile genetic elements, thus reflecting the health quality of each urban wetland studied.

Keywords: *Wetlands, Shotgun Metagenomics, Veterinary Medicine, Pathogenic Bacteria, Antimicrobial Resistance.*

1. Introducción

1.1 Aspectos generales de los humedales

Los humedales son ecosistemas en donde el agua desempeña un papel importante en la regulación del medio ambiente y de la vida vegetal y animal que allí se encuentra. Los humedales pueden ser naturales o creados artificialmente (Corporación Nacional Forestal [CONAF], 2013). La convención Ramsar (1971), utiliza una definición amplia de humedales, “que abarca todos los lagos y ríos, acuíferos subterráneos, pantanos y marismas, pastizales húmedos, turberas, oasis, estuarios, deltas y bajos de marea, manglares y otras zonas costeras, arrecifes coralinos, y sitios artificiales como estanques piscícolas, arrozales, embalses y salinas” (párr.3).

Los humedales se encuentran entre los entornos más productivos de la tierra y sirven como cunas de diversidad biológica, fuentes de agua y productores primarios de los que dependen innumerables especies de plantas y animales para sobrevivir (Ramsar, 1971). Tal como expresa National Geographic (2023) en la redacción de los 7 servicios ecosistémicos de los humedales, podemos ver que ayudan a reponer los acuíferos subterráneos, aseguran el suministro de alimentos, purifican y filtran el agua de contaminantes provenientes de pesticidas, industrias y minería, incluidos metales pesados y toxinas, y además nos proporcionan agua dulce. Por su capacidad para absorber precipitaciones, almacenarlas y proteger contra sequías, ayudan a reducir los efectos de tormentas e inundaciones. También pueden almacenar carbono, lo que ayuda a proteger contra el cambio climático. Más de 100.000 especies habitan estos lugares, lo que representa el 40% de todas las especies del mundo. Esta biodiversidad es proporcionada por las diversas especies de animales, plantas, hongos y bacterias que viven en ellas (Convención Ramsar, 2018; Universidad de Chile, 2021).

Chile posee una riqueza natural invaluable de más de 40.000 humedales, los cuales abarcan una superficie cercana a 4,5 millones de hectáreas, equivalente al 6% del territorio nacional. Estos ecosistemas, vitales para el equilibrio ambiental, se encuentran distribuidos a lo largo del país, desde la zona norte hasta la Patagonia (Museo de Historia Natural de Valparaíso [MHNV], 2023).

Sin embargo, a pesar de su importancia ecológica, estos humedales enfrentan diversos desafíos en materia de conservación. Un dato preocupante es que, según información del Banco de Datos Oficiales de Chile (DOE), el Ministerio del Medio Ambiente, al actualizar su registro nacional en el año 2020, solo reconoció un total de 1.400 humedales urbanos cifra que representa una fracción mínima de la totalidad de humedales existentes en el país (MHN, 2023).

Esta situación se ve agravada por la disparidad entre el registro nacional y los avances a nivel regional. Un ejemplo de ello lo encontramos en la Región de Los Lagos, donde, según el Ministerio del Medio Ambiente (MMA, 2022), ya se han decretado 549,3 hectáreas como humedales urbanos a nivel regional, con 30 humedales adicionales en proceso de tramitación. Esta brecha informativa dificulta la implementación efectiva de políticas públicas orientadas a la protección y restauración de los humedales, ya que no permite contar con una visión integral y actualizada de su distribución y estado de conservación a nivel nacional.

1.2 Relación entre humedales y la salud animal

A pesar de que los humedales siguen beneficiándonos de muchas maneras, actualmente la sociedad chilena no les da la atención necesaria a los humedales y no se valoran los servicios ecosistémicos que ofrecen. En esta situación, los intereses económicos territoriales tienen un impacto negativo en las funciones y la calidad del humedal, por falta de educación, no tener tenencia responsable de las mascotas, actividad turística masiva no controlada, residuos químicos y orgánicos de industrias, entre otras (Humedales de Chiloé, 2018). La contaminación y destrucción de estos ecosistemas genera cambios desfavorables para la flora y fauna que en normalidad se ubican en ellas, lo que genera condiciones apropiadas para la aparición de patógenos nuevos, generalmente de origen zoonótico (Marcos, 2013). Dado que los microorganismos que se encuentran en el agua de riego y en el agua utilizada para el consumo humano pueden terminar en las verduras crudas que comemos, es imperativo controlar la calidad de todas las fuentes de agua para tener control sobre enfermedades con potencial zoonótico (Castillo, 2021).

Una zoonosis es una enfermedad infecciosa que se transmite de los animales a los seres humanos. Puede ser causada por bacterias, virus y parásitos llegando a los humanos por

contacto directo o a través de los alimentos, el agua o el medio ambiente y representan un importante problema de salud pública en todo el mundo debido a nuestra relación con los animales y la naturaleza (Colegio Médico Veterinario de Chile [Colmevet], 2021, párr.2).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2023) ha alertado sobre la grave amenaza que representan las enfermedades zoonóticas para la salud humana. Se estima que el 61% de los 1.415 patógenos humanos conocidos tienen un origen zoonótico, es decir, que se han transmitido de animales a personas. Estas enfermedades son responsables de un número significativo de enfermedades y muertes, especialmente en las regiones menos desarrolladas del mundo. Estas patologías constituyen una grave amenaza para la salud pública a escala mundial, ocasionando al menos 2.400 millones de casos de enfermedades y 2,2 millones de muertes cada año. Este impacto desproporcionado se concentra principalmente en las regiones menos desarrolladas del planeta. Los animales son la fuente de aproximadamente el 75% de las nuevas enfermedades infecciosas que aparecen en los seres humanos. Tres de las cinco nuevas enfermedades humanas que aparecen cada año son causadas por animales.

Un ejemplo de lo anteriormente planteado es la leptospirosis, la que corresponde a la zoonosis más prevalente en el mundo y que normalmente se transmite entre mamíferos salvajes, mascotas domésticas y las personas a través del agua contaminada o por el contacto directo con la orina de animales infectados (Barros et al., 2014). Como dan a conocer Zunino y Pizarro (2007) especialmente en algunas regiones del sur de nuestro país se han realizado investigaciones sobre la leptospirosis animal. Las publicaciones sobre el tema informan altas tasas de infección por leptospirosis, en animales domésticos como el perro, bovinos, ovejas, caballos, cerdos y roedores silvestres. Esto confirma una gran preocupación para las comunidades de animales y seres humanos que estén relacionado a ambientes como lo son los humedales.

1.3 Características generales del análisis metagenómico de microorganismos

Desde que el inglés Robert Hooke en 1665 lograra visualizar células individuales, se marcó el comienzo de la teoría celular, pero si bien podía ver células no lograría caracterizar claramente a los microorganismos, esto años más tardes en 1674 logrado

por un comerciante holandés y científico aficionado Antón Van Leeuwenhoek que pudo observar realmente microorganismos vivos a través de lentes con aumento con las que construyó más de 400 microscopios (Tortora et al., 2007). Murray et al. (2017) expresa que 100 años después, el biólogo danés Otto Müller amplió el estudio realizado por Van Leeuwenhoek, donde logro organizar las bacterias en géneros y especies, lo cual daría el inicio de la clasificación taxonómica de los microorganismos.

Hoy en día sabemos que los microorganismos incluyen especies procariontes como bacterias y arqueas, así como también organismos eucariontes unicelulares tales como variedades de algas, hongos, protistas y los virus que son las formas de vida más frecuentes en la tierra. Se dice que los microorganismos dominan nuestro planeta de muchas maneras porque están a cargo de los ciclos biogeoquímicos globales que sustentan toda la vida en la Tierra (Hernández-De lira et al., 2014).

Es crucial destacar que, según las estimaciones, casi el 99% de los microorganismos no se pueden cultivar en un laboratorio y que sólo se ha identificado una pequeña porción de las especies de la increíblemente diversa vida microbiana que habita en el suelo, el agua y el aire que nos rodea (Novogene, 2021). Es por esta razón que la metagenómica permite determinar, explorar y analizar las comunidades microbianas de diversos ambientes como un todo, sin la necesidad de aislar los microorganismos de manera individual. Además, proporciona acceso a la taxonomía y la diversidad genómica, permitiendo el estudio de las rutas metabólicas y el comportamiento ecológico de las comunidades microbianas (Ospino et al., 2018).

Desde que aparecieron por primera vez, los métodos para realizar estudios de metagenomas se han convertido en herramientas capaces de describir gran cantidad de información taxonómica y funcional (Hernández-De lira et al., 2014). Tal es el caso de la secuenciación metagenómica de escopeta (del inglés "*shotgun metagenomics*"), que permite a los investigadores acceder a la secuencia de los genes de los organismos presentes en una muestra particular. Este método permite a los microbiólogos evaluar la diversidad y abundancia bacteriana, así como también, estudiar los genes presentes y describir sus funciones tales como patogenicidad que corresponde a como es el proceso de la enfermedad, patogenicidad que es la capacidad de un microorganismo de producir la

enfermedad, así como estudiar los genes de virulencia o factores de virulencia para saber la gravedad de la enfermedad que pueda generar el microorganismo y estos factores de virulencia son moléculas producidas por los microorganismos patógenos que proporcionan la capacidad de la colonización, la capacidad de sobrevivir en superficies ambientales y la infección, entre estos factores se encuentran lípidos, proteínas, carbohidratos entre otras, que tienen funciones específicas entre el patógeno y el huésped (Beceiro et al.,2012; Casadevall y Pirofski, 1999; Clínica Universidad de Navarra, 2023).

La secuenciación metagenómica de escopeta además tiene la capacidad de proporcionar a través de herramientas bioinformáticas las secuencia de genes de resistencia antimicrobianos y de elementos móviles, tales como plásmidos que pertenecen a los microorganismos, estos elementos son moléculas de DNA circulares que pueden replicarse de forma independiente del DNA bacteriano y que pueden transportar información genética entre bacterias relacionada con resistencia a antimicrobianos, producción de toxinas y genes de virulencia. Por lo tanto, la metagenómica de escopeta proporciona un medio para estudiar microorganismos no cultivables junto su información genética que de otro modo serían imposibles de analizar (Beceiro et al., 2012; Fresia et al., 2019; Illumina, 2018; Martínez, 2016).

El potencial de estas metodologías en medicina veterinaria es indiscutible, ya que permite identificar de manera precisa los patógenos que son fundamentales para la salud de los animales y, por ende, de las personas.

1.4 Iniciativa de Una Salud (One Health)

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021) define el término una salud como el objetivo global de aumentar la colaboración interdisciplinaria (salud pública, medicina, asistencia sanitaria, medicina veterinaria, investigación, ciencias medioambientales, entre otras) para prevenir, tratar y así mitigar amenazas de salud a nivel global. Como sostiene (Pérez, 2021) este concepto se vuelve más importante porque factores como la globalización, el cambio climático, la destrucción de ecosistemas naturales y el aumento de resistencia antimicrobiana contribuyen a la aparición y rápida propagación de enfermedades emergentes, muchas de las cuales son zoonóticas.

Los animales que entran en contacto con los humedales pueden afectar significativamente la salud pública, porque pueden actuar como reservorios de bacterias resistentes a los antibióticos y pueden transmitirlos a los humanos (Sen et al., 2019). Como afirma el Ministerio de la Salud (MINSAL, 2021) el abuso y el mal uso de antimicrobianos como los antibióticos como carbapenémicos, betalactámicos, tetraciclinas entre otras familias, han aumentado su resistencia y están poniendo en peligro áreas que creíamos que estaban resueltas, junto con el lento desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, son uno de los mayores problemas de salud pública y sanidad animal. Adicional a esto la OMS (2021) manifiesta que a medida que la resistencia de antimicrobianos se extiende por todo el mundo, los antibióticos son cada vez menos efectivos, lo que resulta en infecciones más complicadas de tratar y un aumento en la mortalidad.

Por ello es fundamental un enfoque de una salud para prevenir, detectar y abordar eficazmente los problemas de salud causados por las interacciones entre las personas, los animales y el medio ambiente (OMS, 2016). El conocimiento acerca de la presencia de enfermedades infecciosas en fauna silvestre es crucial para entender las consecuencias potenciales que éstas pueden tener en la conservación de especies silvestres y evaluar la amenaza que significan para la salud humana y animales domésticos, por lo que se evidencia una gran necesidad y enfoque en una salud para afrontar el aumento de enfermedades infecciosas que representan un problema para la salud animal, humana y medioambiental (Cárdenas, 2023).

Ante la amenaza que representan las enfermedades zoonóticas, se hace evidente la necesidad de implementar estrategias de respuesta rápida y eficaz. Esto implica acelerar los tiempos de detección y reacción, permitiendo a las empresas y profesionales del sector ofrecer herramientas y servicios esenciales para el control y la mitigación de estas enfermedades (Rodríguez et al., 2023).

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile, consciente de la importancia de la salud animal y humana, ha establecido un listado de enfermedades zoonóticas de declaración obligatoria. Este listado incluye patologías bacterianas que afectan tanto a animales como

a personas, y su declaración oportuna permite activar los mecanismos necesarios para su control y erradicación.

Tabla 1. Lista de patologías de carácter bacteriano en el territorio nacional de denuncia obligatoria al Servicio Agrícola y Ganadero.

Enfermedad denuncia obligatoria en Chile	Agente etiológico
Aborto enzoonótico ovino	<i>Chlamydia abortus</i>
Adenitis equina	<i>Streptococcus equi</i>
Agalaxia contagiosa	<i>Mycoplasma agalactiae</i>
Brucelosis	<i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella ovis</i> y <i>Brucella melitensis</i>
Campilobacteriosis genital bovina / Vibriosis	<i>Campylobacter fetus subsp venerealis</i>
Carbunco bacteridiano	<i>Bacillus anthracis</i>
Clamidiosis aviar	<i>Chlamydophila psittaci</i>
Cólera aviar	<i>Pasteurella multocida</i>
Erisipela porcina	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
Fiebre Q	<i>Coxiella burnetii</i>
Infección por <i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
Micoplasmosis aviar	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Mycoplasma synoviae</i> y <i>Mycoplasma meleagridis</i>
Paratuberculosis	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>
Purolosis	<i>Salmonella pullorum</i>
Salmonelosis	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Salmonella abortus ovis</i>
Tifosis aviar	<i>Salmonella gallinarum</i>
Tuberculosis bovina	<i>Mycobacterium bovis</i>

Fuente: Elaboración propia. Datos tomados de lista de enfermedades de denuncia obligatoria (EDO) al SAG (2019).

Además, existen otros géneros bacterianos que se han observado en cuerpos de agua y que agrupan a especies que pueden generar zoonosis tales como *Flavobacterium*,

Piscirickettsia, *Microcystis*, *Staphylococcus spp.*, *Leptospira spp.*, entre otras mencionadas que se pueden visualizar en Anexo 2 y que son de relevancia en Medicina Veterinaria (Beer,1987; Cárdenas, 2023; Vadilla et al., 2002).

En el presente estudio se analizará la microbiología de humedales urbanos de la Región de los Lagos, pertenecientes a las ciudades de Osorno (Las Quemadas y Ovejería), Llanquihue (El Loto, Baquedano, Las Ranas y Teodosio Sarao), Puerto Varas (Marina y Quebrada Parque), y Puerto Montt (La Paloma, Luis Ebel, Antiñir, Rupallán y Mirasol), mediante información obtenida desde la secuenciación metagenómica de escopeta, con el fin de describir qué especies de microorganismo de interés veterinario y qué tipos de elementos genómicos se encuentran en los cuerpos de agua estudiados. La información recopilada permitirá indicar el estado sanitario de los cuerpos de agua según la composición microbiológica y sus rutas funcionales presentes, y permitirá identificar si existen elementos que puedan constituir un riesgo para la salud animal, humana y ambiental.

2. Hipótesis

Los humedales urbanos de la Región de Los Lagos poseen microorganismos de interés veterinario con elementos genéticos funcionales que pueden impactar sobre la salud animal, humana y medioambiental.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Identificar microorganismos de interés veterinario en cuerpos de agua de humedales urbanos de la Región de Los Lagos y caracterizar la funcionalidad genética, mediante información obtenida desde la secuenciación metagenómica de escopeta de ADN.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Identificar la presencia de microorganismos de interés veterinario a nivel taxonómico de especie, en cuerpos de agua de humedales urbanos de la Región de Los Lagos.
- II. Caracterizar la existencia de genes de resistencia antimicrobianos y genes de virulencia pertenecientes a microorganismos de interés veterinario identificados en humedales urbanos de la Región de Los Lagos.
- III. Describir las patologías provocadas por las especies identificadas según la presencia de genes relacionados con la virulencia de estos.

4. Materiales y Métodos

4.1 Tipo de estudio

El presente estudio corresponde a una investigación cualitativa de tipo observacional que tiene un alcance descriptivo retrospectivo, que se llevó a cabo utilizando información obtenida desde metagenómica de escopeta para estudiar, caracterizar, identificar y asociar especies microbianas con su potencial impacto en la salud humana, animal y ambiental (Hernández y Mendoza, 2018).



Figura 1. Diagrama de flujo para el análisis metagenómico de escopeta (shotgun metagenomics). Fuente elaboración propia.

4.2 Identificación de microorganismos a nivel de especies de la categoría taxonómica y genes de virulencia en los humedales urbanos

4.2.1 Área de estudio y obtención de muestras

El área de estudio correspondió a los humedales urbanos pertenecientes a las ciudades de Osorno (Las Quemas y Ovejería), Llanquihue (El Loto, Baquedano, Las Ranas y Teodosio Sarao), Puerto Varas (Marina y Quebrada Parque) y Puerto Montt (Luis Ebel, La Paloma, Antifñir, Rupallán y Mirasol), ver figura 1. Para la obtención de las muestras, se utilizó una botella de vidrio estéril con capacidad de 1000 ml. Para evitar que los contaminantes de nuestras manos generen lecturas erróneas en la muestra, se utilizó guantes de látex limpios y previamente desinfectados con alcohol al 70%. El muestreo se realizó de forma manual, recuperando 2 litros de agua, esto dependiendo de la turbidez que se observe en el agua del cuerpo de agua, en condiciones normales y posteriormente se transportó en frío para su posterior procesamiento en el Laboratorio Institucional de la Universidad San Sebastián, Sede de la Patagonia, ubicado en la Ciudad de Puerto Montt, Chile (Fernández et al., 2022).



Figura 2. Ciudades de la Región de los Lagos donde se obtuvieron muestras para análisis metagenómico de escopeta.

4.2.2 Recuperación de los microorganismos y su material genético

Las muestras se filtraron individualmente a través de filtros de MCE (Ésteres de Celulosa) con tamaño de poro de 0,22 μm y 47 mm de diámetro, que es capaz de retener los microorganismos. Para lo cual, se hizo pasar el volumen de agua recuperado de cada muestra por individual mediante un sistema de presión negativa, el sistema de presión negativa crea un diferencial de presión que arrastra el agua a través del medio filtrante, donde los microorganismos quedan retenidos. Posteriormente, los filtros se traspasaron a tubos de plásticos estériles para realizar la extracción del ADN (Fernández et al., 2022; Forero et al., 2021; Hozbor et al., 2021).

Para la extracción de ADN se utilizó un kit de extracción AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, USA). El protocolo de extracción de ADN consiste en romper las células y separar los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares. La ruptura se realizó mediante métodos físicos, químicos y enzimáticos. El ADN obtenido se cuantificó y se evaluó su integridad mediante electroforesis (Fernández et al., 2022).

4.2.3 Secuenciación del material genético

Posterior a la recuperación del ADN de las muestras, estas fueron enviadas a un proveedor de servicio de secuenciación llamada Novogene (USA) con alta capacidad de secuenciación con tecnología de punta, que se encargó de realizar la secuenciación del genoma completo (metagenómica de escopeta). El servicio de secuenciación nos entregó archivos informáticos con las secuencias crudas del ADN, las que fueron utilizadas para la posterior descripción microbiológica. Finalmente, antes de realizar el análisis, se eliminaron todas las mediciones de ADN que no sean de nuestro interés, como por ejemplo el ADN de origen humano (López et al., 2021; Navgire et al., 2022).

4.2.4 Análisis metagenómico

Los procesos bioinformáticos fueron ejecutados a través del supercomputador más poderoso de Chile del Laboratorio Nacional de Computación de Alto Rendimiento (NLHPC). Una vez dentro del NLHPC, se empleó diversas herramientas bioinformáticas, una de ellas llamada Trimmomatic, donde su función principal es eliminar elementos de secuenciación de baja calidad de las secuencias crudas obtenidas (Krueger, 2011). Luego se realizó el ensamblaje de las lecturas mediante la herramienta MEGAHIT, la cual

esta optimizada para datos metagenómicos complejos (Li et al., 2015). Posteriormente al ensamblaje de los datos, se realizó un chequeo de calidad del ensamblaje del genoma mediante QUAST (Gurevich et al., 2013). La asignación taxonómica se realizó mediante Kraken2 que es una herramienta de bioinformática que se utiliza para la identificación de especies mediante el mapeo de las secuencias contra una base de datos taxonómicas (Palanisamy et al., 2023; Wood et al., 2019). Los resultados de este análisis fueron plasmados en una hoja en formato Excel en el cual se seleccionaron de toda la variedad de especies halladas los microorganismos con un número de lecturas mayores a 50, ya que un número de lecturas bajo (< 50 lecturas) puede proporcionar una identificación imprecisa de los taxones presentes. Esta información fue con el fin de identificar la presencia de especies bacterianas incluidas en la lista de enfermedades de notificación obligatoria (SAG, 2019). Véase en Tabla 1 y especies infecciosas bacterianas de importancia en Medicina Veterinaria (Beer, 1987). Datos que se pueden ver en Anexo 2.

4.2.5 Identificación de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana

La identificación de genes de virulencia se realizó mediante la herramienta bioinformática ABRicate, la cual permite identificar grandes cantidades de genes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos a partir de secuencias de genoma bacteriano de múltiples bases de datos como NCBI, VFDB, Resfinder y PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014; Chen et al., 2016; Feldgarden et al., 2019; Zankari et al., 2012). ABRicate genera un archivo de salida en formato de tabla que contiene información sobre los genes de resistencia antimicrobiana y virulencia presentes en la secuencia de genoma bacteriano. Los resultados se visualizarán en una hoja de cálculo y los principales hallazgos se resumirán mediante figuras (Seemann, 2020).

4.3 Descripción de las patologías provocadas por las especies pertenecientes a los microorganismos con genes de virulencia

Se realizó una descripción de las patologías provocadas por microorganismos con genes de virulencia de importancia en la salud animal. Para ello, se usarán las especies que presenten genes de virulencia de interés veterinario previamente identificadas a través de la base de datos de taxonomías bacterianas y de su análisis funcional. Posteriormente, se realizará una revisión bibliográfica de las enfermedades causadas por estas especies.

Cada enfermedad se describirá en base a la información recopilada utilizando bases de datos científicas como PubMed, Google Académico, ScienceDirect, y Springer, etc. La información que se incluirá en la descripción será la siguiente:

- Información general de la enfermedad: nombre de la enfermedad, etiología, signos clínicos, prevalencia y mortalidad.
- Patogénesis: mecanismos por los que el agente etiológico causa la enfermedad.

4.4 Representación de datos

La información recopilada se presentará principalmente a través de tablas, figuras y gráficos creados en Microsoft Excel y RStudio. Estas herramientas se caracterizan por su capacidad para procesar grandes cantidades de datos y una amplia gama de métodos de visualización cuantitativos y cualitativos, facilitando el análisis y la visualización de tendencias y patrones de la información (Kruchten, 2020; Madrid, 2023).

5.Resultados

5.1 Diversidad microbiana en humedales urbanos de la Región de Los Lagos

Estudios de metagenómica y bioinformática indican una composición y abundancia bacteriana heterogénea entre los humedales urbanos estudiados (Figura 3). Se identificaron un total de 6493 especies bacterianas, incluyendo los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Rahnella*, *Shewanella* y *Aeromonas*, que fueron las especies más abundantes en todos los humedales analizados.

En los humedales ubicados en Osorno, las especies más abundantes fueron *Rahnella aceris*, *Flavobacterium ammonificans*, *Limnohabitans sp. TEGF004*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Pseudomonas sivasensis*, mientras que las especies abundantes en los humedales de Llanquihue fueron *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas psychrophila*, *Pseudomonas monsensis*, *Serratia proteamaculans* y *Shewanella baltica*. Además, en el humedal de Puerto Varas, las especies bacterianas más abundantes fueron *Pseudomonas sp. B21-035*, *Pseudomonas protegens*, *Erwinia rhapontici*, *Rahnella aceris* y *Serratia proteamaculans*, mientras que en los humedales de Puerto Montt se observaron especies como *Serratia liquefaciens*, *Serratia fonticola*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas monsensis* y *Serratia grimesii*

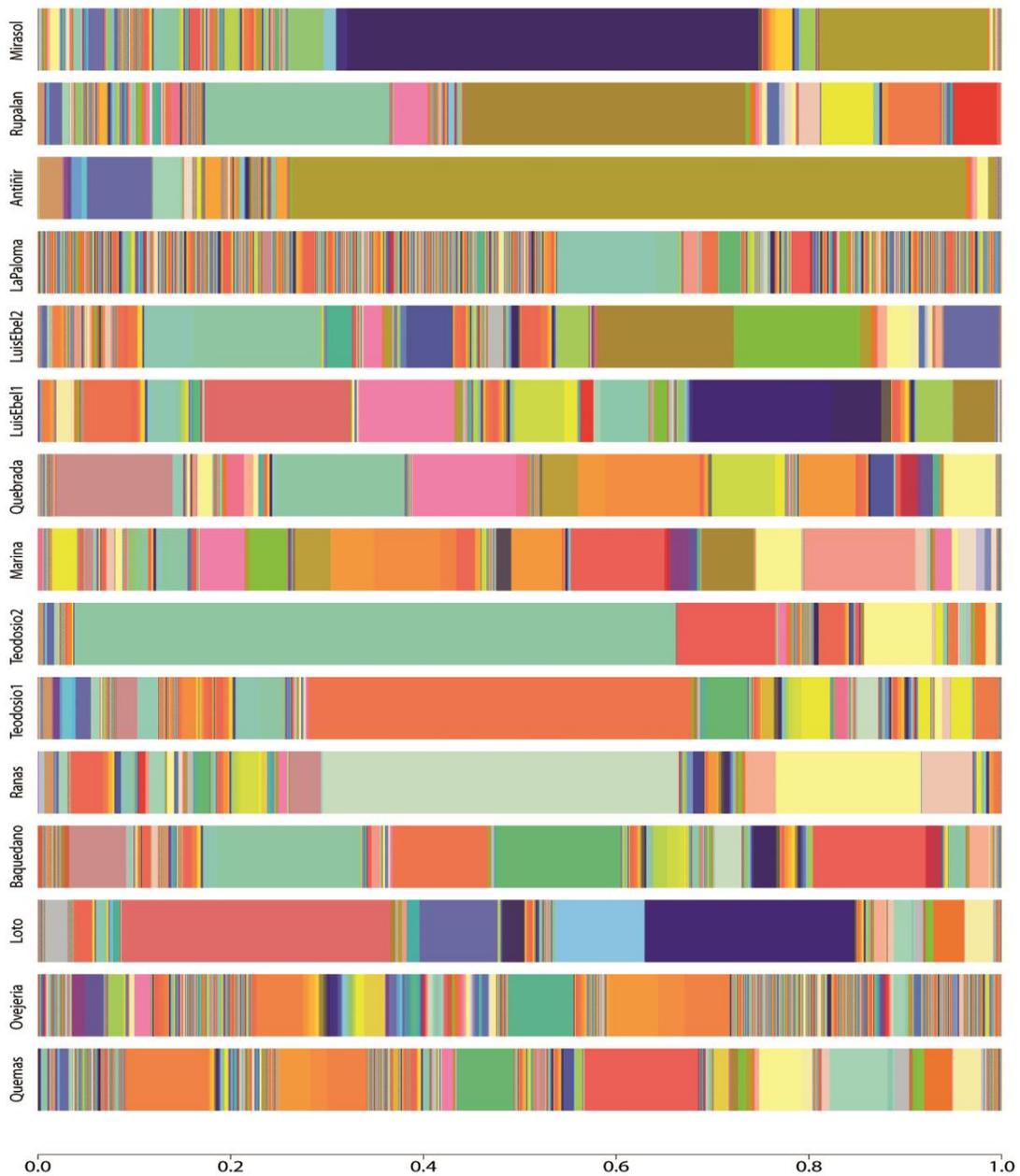


Figura 3. Abundancia de la taxonomía a nivel de especie se representa como un diagrama de barras apiladas de cada muestra. El patrón de color de cada barra muestra la estructura de la comunidad microbiana, mientras que la amplitud de cada color representa el porcentaje de abundancia de la taxonomía asignada

5.2 Identificación de microorganismos a nivel de especie incluidos en la lista de enfermedades de notificación obligatoria

En este estudio se identificó especies bacterianas de importancia en Medicina Veterinaria, incluidas en la lista de enfermedades de notificación obligatoria. Inicialmente al ensamblaje de los datos obtenidos desde el supercomputador del Laboratorio Nacional de Computación de Alto Rendimiento (NLHPC). Se realizó un chequeo de calidad del ensamblaje del genoma mediante QUAST, donde los resultados mostraron una media de contigs (segmentos de ADN superpuestos) de 15.728 pares de bases (pb) (N50) y una longitud media de contig (L50) de 9.925 pb, a partir de 15 muestras analizadas. El N50 representa la longitud del contig más largo que abarca la mitad del genoma ensamblado, mientras que el L50 indica la longitud mediana de todos los contigs., indicando que todas las muestras presentan una media aceptable para su evaluación. Las estadísticas detalladas de la calidad del ensamblaje se encuentran en el anexo 1 (Gurevich et al., 2013).

Posteriormente, se analizaron datos provenientes de la información contenida en plantillas Excel obtenidas mediante la herramienta bioinformática Kraken2 utilizada para el análisis taxonómico de información proveniente de metagenómica de escopeta. Ejemplo que se puede visualizar en anexo 3. Estas tablas, contienen la siguiente información: Taxonomías bacterianas de humedales urbanos pertenecientes a las ciudades de Osorno (Las Quemadas y Ovejería), Llanquihue (El Loto, Baquedano, Las Ranas y Teodosio Sarao), Puerto Varas (Marina y Quebrada Parque) y Puerto Montt (Luis Ebel, La Paloma, Antñir, Rupallán y Mirasol). En esta primera etapa del estudio se identificaron los microorganismos bacterianos que causan enfermedades de notificación obligatoria a nivel taxonómico de especie, representándose en un gráfico de mapa de calor según su abundancia en cada humedal. La figura 4, muestra la taxonomía en los diferentes humedales urbanos estudiados. Como se muestra en la figura, cada sitio tiene una distribución de abundancia diferente de especies bacterianas. Entre las especies identificadas que son de importancia para la salud Veterinaria y que son de notificación obligatoria al SAG, se encontraron las bacterias *Pasteurella multocida*, *Salmonella entérica subsp. Typhimurium*, *Chlamydia psittaci*, *Salmonella entérica subsp. Enteritidis*, *Coxiella burnetti*, *Bacillus anthracis* y *Streptococcus equi*.

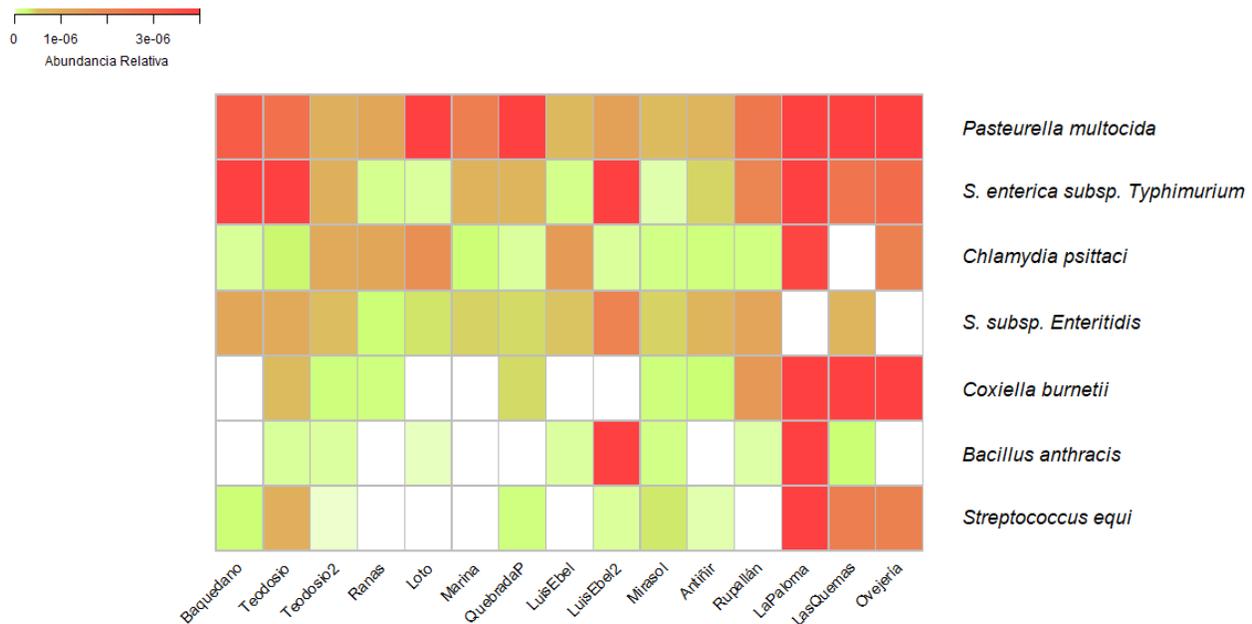


Figura 4. Abundancia relativa de especies bacterianas incluidas en la lista de notificación obligatoria pertenecientes a los humedales urbanos pertenecientes a las ciudades de Osorno, Llanquihue, Puerto Varas y Puerto Montt. El humedal con mayor abundancia relativa de microorganismos presentes en la lista de enfermedades de notificación obligatoria es el humedal La Paloma perteneciente a la ciudad de Puerto Montt.

5.2 Identificación de microorganismos bacterianos infecciosos de importancia en Medicina Veterinaria

Por otro lado, se identificó la presencia de microorganismos bacterianos que son infecciosos para la salud animal. La información fue representada en un gráfico de mapa de calor donde se muestran las especies identificadas en los diversos humedales urbanos de la Región de Los Lagos estudiados.

La figura 5 muestra que cada humedal contiene una abundancia relativa diferente y una diversidad taxonómica de microorganismos, que son importantes tanto para la salud animal como para la salud humana, debido a su potencial zoonótico. Los 5 microorganismos con mayores abundancias fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*.

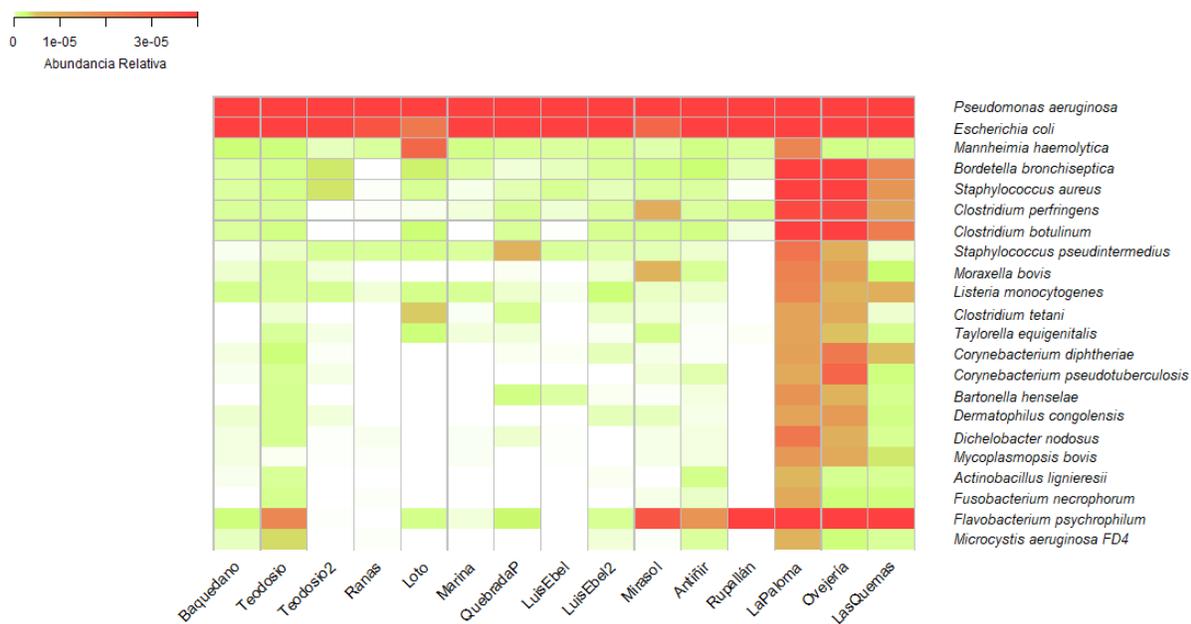


Figura 5. Abundancia relativa de especies bacterianas infecciosas de relevancia en Medicina Veterinaria pertenecientes a los humedales urbanos pertenecientes a las ciudades de Osorno, Llanquihue, Puerto Varas y Puerto Montt. El humedal con mayor abundancia relativa de especies bacterianas infecciosas es el humedal La Paloma perteneciente a la ciudad de Puerto Montt.

5.3 Identificación de genes de resistencia a los antimicrobianos

La segunda parte de estudio correspondió a identificar genes de resistencia a antimicrobianos, presentes en los humedales urbanos de la Región de los Lagos estudiados, los cuales se ubican en las ciudades de Osorno (Las Quemas), Llanquihue (El Loto, Baquedano, Las Ranas y Teodosio Sarao), Puerto Varas (Marina y Quebrada Parque) y Puerto Montt (Luis Ebel, Antiñir, Rupallán y Mirasol).

Se realizó la identificación de los genes de familias de antibióticos mediante la herramienta ABRicate (Seemann, 2020). Utilizando la base datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (Feldgarden et al., 2019). Cuyos resultados fueron representados en un gráfico de barras apiladas, donde se muestran los diferentes sitios estudiados, representación que se puede ver en la figura 6 donde se ve la frecuencia de familias de antibióticos, incluidos inhibidores de la síntesis de la pared celular como la familia de los betalactámicos que incluyen (penicilinas,

carbapenémicos, colistina, fosfomicina y cefalosporinas), inhibidores de la síntesis de proteínas (como macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, fenicoles y lincosamidas) e inhibidores de la subunidad de la ADN girasa (como Quinolonas), y esta frecuencia varía entre cada humedal estudiado y que pueden generar un riesgo para la salud humana, salud animal y salud medio ambiental.

Utilizando la misma herramienta bioinformática, se caracterizó la presencia de genes de resistencia antimicrobianos, mediante la base de datos Resfinder (Zankari et al., 2012). Los resultados fueron representados en un gráfico de torta, lo que se puede ver en la figura 7, la cual muestra a los genes de resistencia a productos antimicrobianos de mayor abundancia, tales como Amoxicilina, Ampicilina, Ciprofloxacino, Acido Nalidixico, Imipenem y entre otros genes presentes, que se hallaron en los humedales de la Región de Los Lagos.

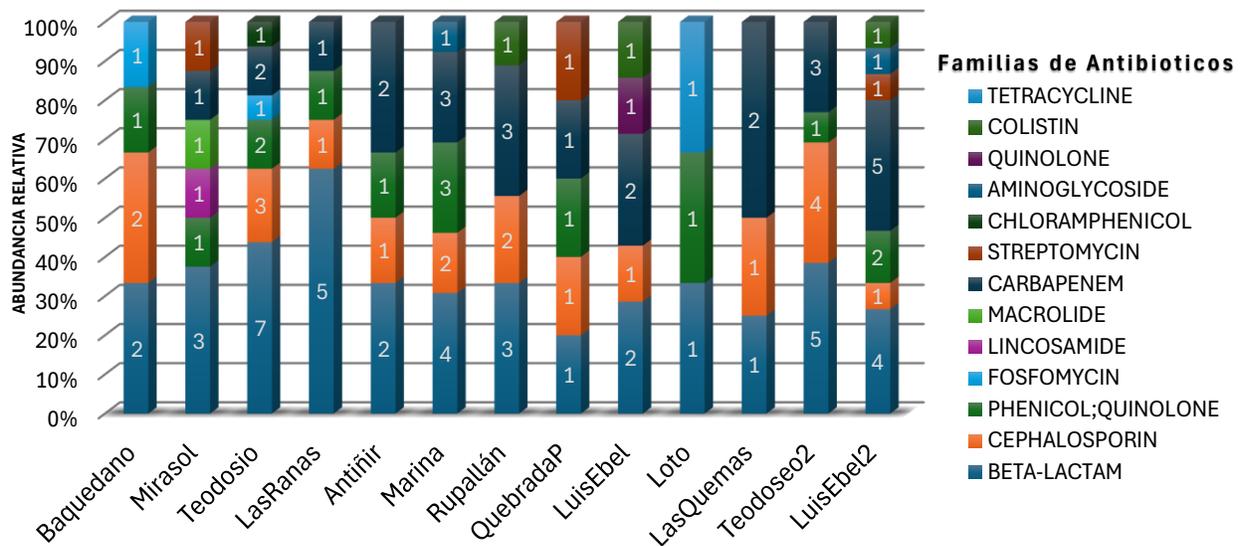


Figura 6. Representación gráfica de los genes de resistencia que otorgan de familias de antimicrobianos más abundante en los humedales urbanos de la Región de los Lagos. Se logra visualizar una gran diversidad de antimicrobianos donde el humedal con más frecuencia corresponde al humedal Teodosio Sarao perteneciente a la ciudad de Llanquihue, seguido del humedal Luis Ebel 2 perteneciente a la ciudad de Puerto Montt.

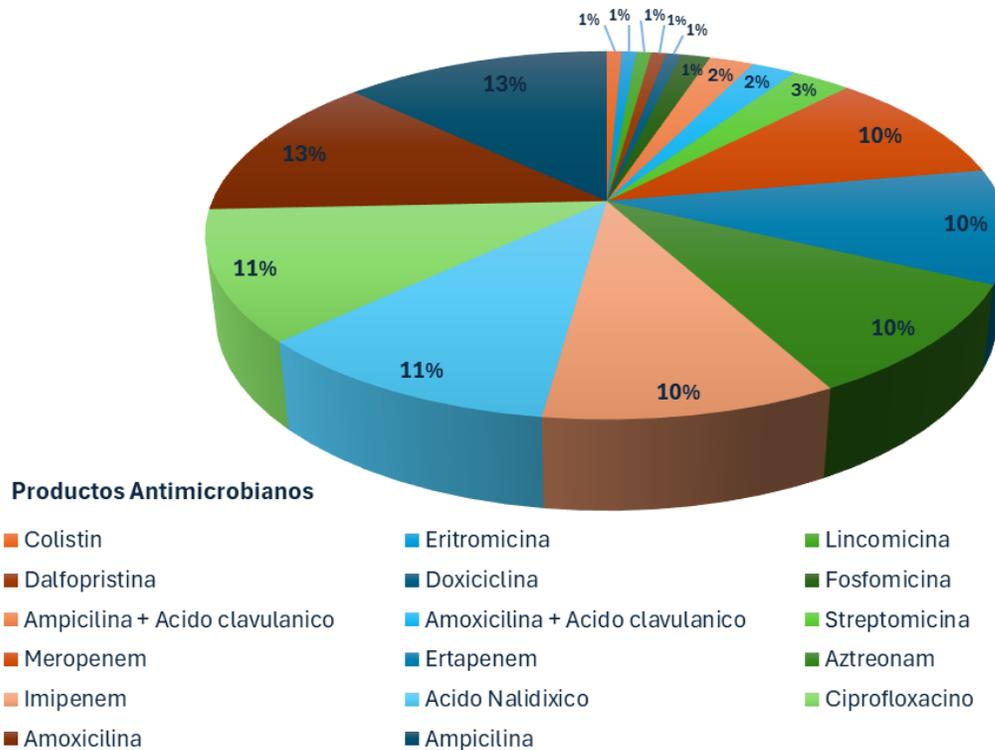


Figura 7. Representación de los productos antimicrobianos más abundantes en los humedales urbanos de la Región de los Lagos. Los genes con resistencia antimicrobiana más abundante corresponden a los productos antimicrobianos Amoxicilina y Ampicilina correspondiente a la familia de antimicrobianos de los Betalactámicos.

5.4 Identificación de mecanismos de genes de virulencia

En la tercera parte de este estudio, se realizó una caracterización de genes de virulencia o también llamados factores de virulencia presentes en los humedales urbanos estudiados, organizándolos a nivel de componente celular de la bacteria a la cual pertenece el producto para el cual codifica el gen de virulencia en el microorganismo identificado. Lo cual se resumen en la tabla 2, donde muestra la distribución de los genes por especie, siendo *P. aeruginosa* la especie bacteriana que posee mayor variedad de genes de virulencia. Donde se puede observar genes de virulencia con funciones de adherencia, exotoxinas, modulación inmune, movilidad, biofilm o factores de metabolismos en microorganismos como *Y. enterocolitica subsp. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *E. coli O157:H7* y *S. entérica subsp. entérica serovar tiphymurium*. Por otro lado, se caracterizó cada microorganismo hallado representándolo con un gráfico radial, donde se puede evidenciar la frecuencia de cada gen detectado mediante ABRicate con

la base de datos de VFDB (Base de Datos de Factores de Virulencia) (Chen et al., 2016). Ver figuras 8 al 11.

Tabla 2. Funciones de genes de virulencia con respectivo microorganismo asociado.

Gen de virulencia	Subclasificación del gen	Función	Nivel función biológica	Microorganismo asociado	
<i>csg</i>	<i>B, D, E, F y G</i>	Adherencia	Pared celular	<i>S. entérica subsp. entérica serovar tiphymurium</i>	
<i>spv</i>	<i>C</i>	Sistema de entrega de efectores	Citoplasma		
<i>ste</i>	<i>B</i>	Sistema de entrega de efectores	Membrana plasmática		
<i>alg</i>	<i>I y U</i>	Biofilm	Citoplasma Flagelos	<i>P. aeruginosa</i>	
<i>fle</i>	<i>N y Q</i>	Motilidad			
<i>flg</i>	<i>C, G, H y I</i>	Motilidad			
<i>mbt</i>	<i>H-like</i>	Factor nutricional/m etabólico	Pared celular		
<i>pil</i>	<i>G</i>	Adherencia	Membrana plasmática		
<i>pvd</i>	<i>H y S</i>	Factor nutricional/m etabólico			
<i>waa</i>	<i>F</i>	Modulación inmune			
<i>esp</i>	<i>X4 y X5</i>	Sistema de entrega de efectores	Pared celular		<i>E. coli O157:H7</i>
<i>yag</i>	<i>V, W, X, Y y Z</i>	Adherencia	Membrana plasmática		
<i>ykg</i>	<i>K</i>	Adherencia			
<i>che</i>	<i>Y</i>	Motilidad	Flagelos	<i>Y. enterocolitica subsp. Enterocolitica</i>	
<i>flg</i>	<i>B, C, G y H</i>	Motilidad			
<i>flh</i>	<i>C y D</i>	Motilidad			
<i>fli</i>	<i>A, G, M y P</i>	Motilidad			

Fuente: Elaboración propia. Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB) (Chen et al., 2016).

Pseudomonas aeruginosa

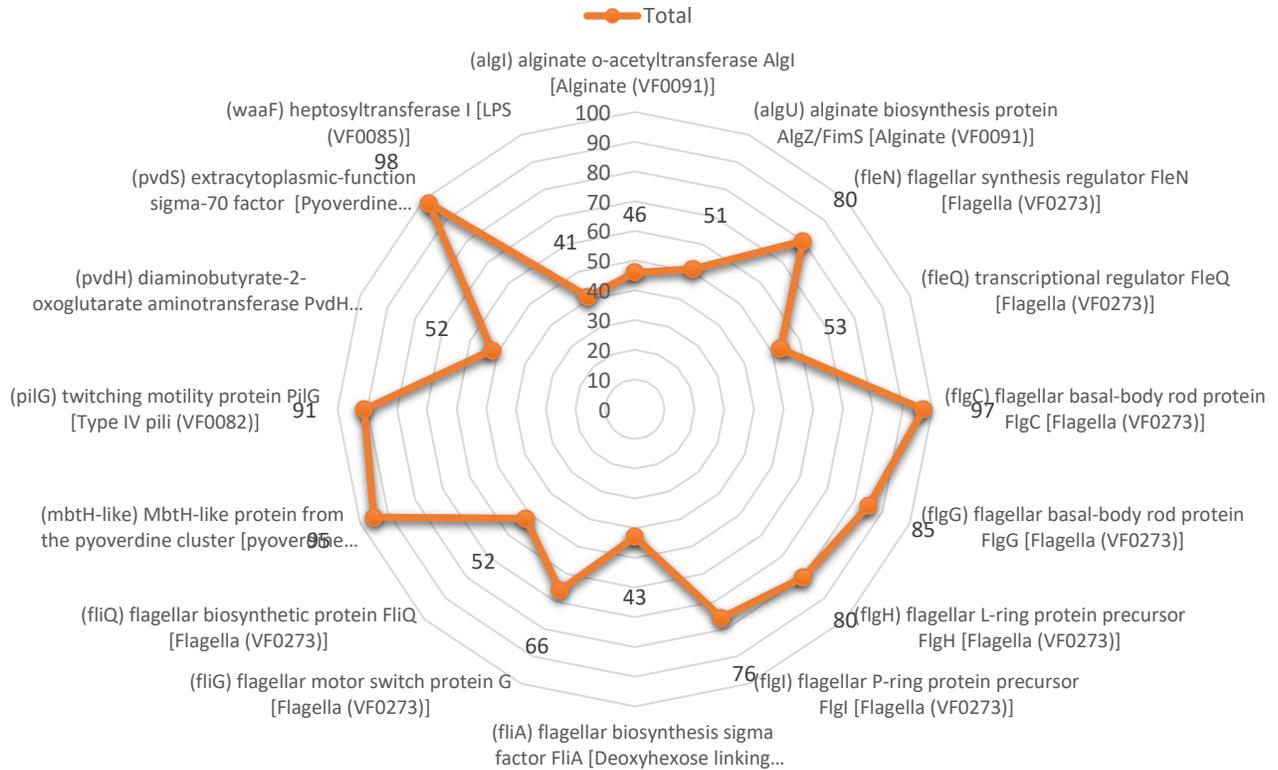


Figura 8. Genes de virulencias asociados a *P. aeruginosa*, hallados en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos. La expresión elevada de genes relacionados con la virulencia, como (pvdS) factor sigma de función extracitoplasmática-70 y proteína flgC del cuerpo basal del flagelo, indica una alta capacidad de la bacteria para moverse y adquirir nutrientes (Chen et al., 2016).

Yersinia enterocolitica subs. enterocolitica

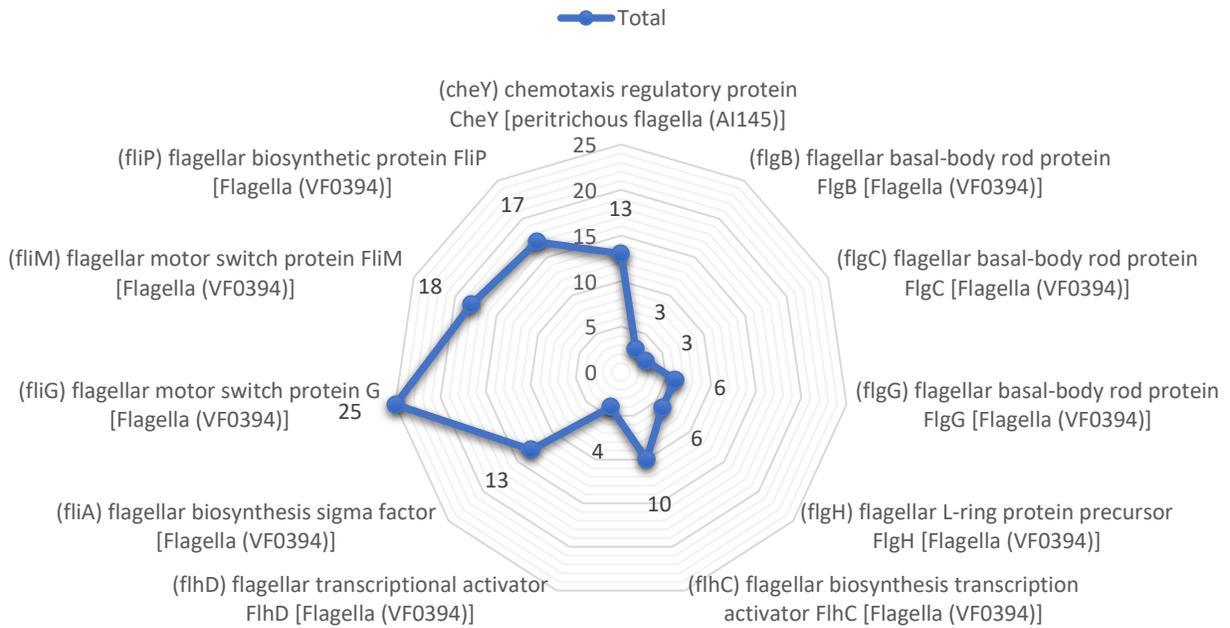


Figura 9. Gene de virulencias asociados a *Y. enterocolitica subs. Enterocolitica*, hallados en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos. Las proteínas del motor flagelar fliG y fliM son las más prominentes con valores de 25 y 18, respectivamente. Estas proteínas son cruciales para la rotación del flagelo, que es esencial para la motilidad bacteriana (Chen et al., 2016).

Escherichia coli 0157:H7

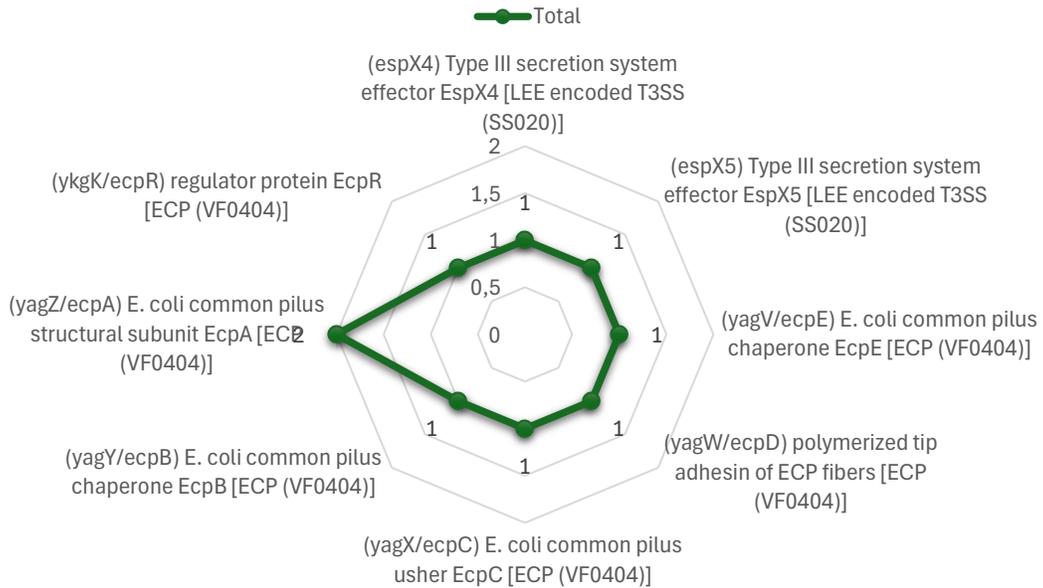


Figura 10. Genes de virulencias asociados a *E. coli* O157:H7 hallados en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos. El gen más abundante es *yagZ/ecpA*, que codifica la subunidad estructural EcpA del pili común de *E. coli*. Juegan un papel crucial en la adherencia a superficies y en la interacción con células huésped (Chen et al., 2016).

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium

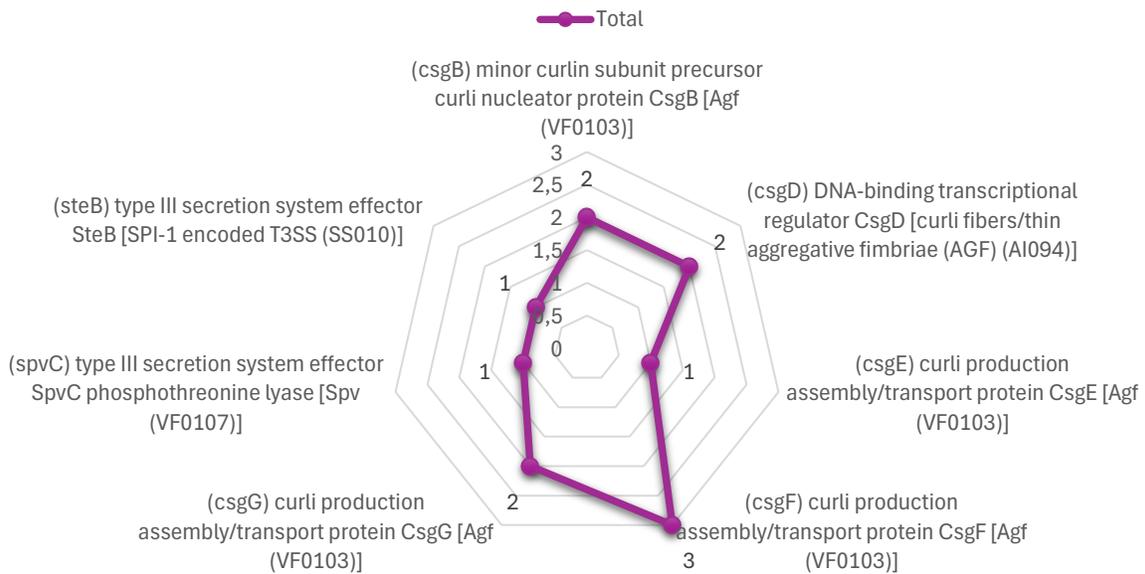


Figura 11. Genes de virulencias asociado a *S. entérica subsp. Entérica serovar Typhimurium*, hallados en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos. El gen

más abundante es CsgF, que codifica una proteína de ensamblaje/transporte de curli, los cuales son fibras extracelulares que ayudan a que las bacterias se adhieran a las superficies y formen biopelículas (Chen et al., 2016).

5.5 Identificación de elementos móviles en humedales urbanos

Por último, en este estudio utilizando la herramienta ABRicate y la base de datos de PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014; Seemann, 2020). Se lograron identificar elementos genéticos móviles plasmidiales, correspondientes a elementos que transportan material genético entre bacterias y que pueden estar relacionados con fenómenos de transferencia de genes resistencia a antimicrobianos, producción de toxinas y genes de virulencia. Los genes fueron descritos mediante el nombre del replicón del plásmido que es asociado a un microorganismo en particular y su número de acceso de la base de datos de la NCBI. Estos elementos genéticos están presentes en los humedales urbanos estudiados, entre ellas se encontraron elementos móviles asociados a microorganismos como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, información que se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de genes de elementos móviles asociados a microorganismos recuperados de la base de datos PlasmidFinder hallados en los humedales urbanos de la Región los Lagos.

Microorganismo asociado	PlasmidFinder	
	Nombre del Replicón	N° de Acceso
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Col440I_1	CP023920.1
	ColRNAI_1	DQ298019
	IncR_1	DQ449578
<i>Escherichia coli</i>	IncFIB(pB171)_1_pB171	AB024946
	IncQ2_1	FJ696404
<i>Citrobacter freundii</i>	RepA_1_pKPC-CAV1321	CP011611
<i>Serratia entomophila</i>	pADAP_1	AF135182
<i>Salmonella spp.</i>	IncFII(p14)_1_p14	JQ418538
<i>Serratia marcescens</i>	IncHI2_1	BX664015

Fuente: Elaboración propia. Obtenida de base de datos Plasmidfinder (Carattoli et al., 2014).

5.6 Descripción de microorganismos con genes de virulencia hallados en los humedales urbanos

En la caracterización de genes de virulencia o también llamados factores de virulencia presentes en los humedales urbanos estudiados, se hallaron genes asociados a microorganismos como *Y. enterocolitica subsp. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *E. coli O157:H7* y *S. entérica subsp. entérica serovar tiphymurium*, donde a continuación se detallará información general de la enfermedad, nombre de la enfermedad, etiología, signos clínicos, prevalencia, mortalidad y mecanismos por los que el agente etiológico causa la enfermedad.

5.6.1 Descripción de *Pseudomona aeruginosa*

Pseudomona aeruginosa pertenece al género *Pseudomonas* que constituye a una bacteria gramnegativa, aeróbica facultativa, que no esporula, con motilidad por flagelos polares que le confiere la motilidad necesaria. Este patógeno común puede sobrevivir con éxito en el agua y el suelo consumiendo nutrientes mínimos y tolerando una amplia gama de condiciones físicas. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista común que causa infecciones en humanos, animales, plantas e invertebrados (Jeong et al., 2024; Paz-Zarza et al., 2019).

En perros, se ha reportado *P. aeruginosa* como un agente infeccioso ampliamente reconocido que causa otitis externa y otitis media. Las condiciones crónicas propician el crecimiento de bacterias y hongos, lo que empeora la enfermedad. Estos microorganismos causan lesiones secundarias por la irritación constante y su proliferación excesiva. Los animales afectados sufren picazón intensa, secreción de los oídos y, en casos graves, dolor muy fuerte. Estas bacterias pueden ser resistentes a muchos antibióticos, lo que dificulta el tratamiento eficaz de pacientes con sistemas inmunitarios debilitados. Debido a factores de resistencia a los medicamentos como la expulsión de medicamentos y la presencia de porinas (Broglia et al., 2020; Jiménez, 2024). Delano et al. (2002) menciona también que se ha asociado *Pseudomonas aeruginosa* junto a otras bacterias como *E.coli*, *Staphylococcus aureus* y *Actinomyces* a generar problemas en la glándula mamaria en ovinos, caprinos y bovinos como mastitis subclínicas difícil de poder detectar.

En humanos *P. aeruginosa* es un organismo oportunista que causa infección. Infecciones del tracto urinario, infecciones respiratorias, dermatitis, sepsis y diversas infecciones sistémicas, especialmente en pacientes con quemaduras graves, cáncer e inmunocomprometidos (Cedré et al., 2007). Reem et al. (2024) indica que *Pseudomonas spp.*, se podría encontrar en aguas de consumo así provocando su transmisión, donde además podría participar en la aparición de resistencias a los antibióticos al beber esta agua por la capacidad de formar biopelículas en las cañerías, llaves, duchas, etc.

Hoy en día se sabe que *P. aeruginosa* es un microorganismo de gran importancia en los hospitales por generar infecciones nosocomiales que pueden encontrarse en sectores como la unidad de cuidados intensivo (UCI), El tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo presenta un desafío significativo debido a su resistencia a diversos antibióticos, particularmente aquellos pertenecientes al grupo de los betalactámicos y penemes. Además, este organismo posee la capacidad de adquirir mecanismos de resistencia adicionales a otras clases de antibióticos, incluyendo betalactámicos, lo que complica aún más las estrategias terapéuticas (Costa et al., 2021; Pachori et al., 2019).

En Chile, el Ministerio de Salud (2015) ha informado a través de un informe de vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, que las infecciones del tracto urinario son de las infecciones más frecuente que llegan afectar a pacientes adultos que se encuentran en la unidad de cuidados intensivo, donde de 2.117 casos registrados en este informe asociados a catéteres urinarios, se confirmaron 236 casos por el agente *P. aeruginosa*.

5.6.2 Descripción de *Yersinia enterocolitica* subsp. *Enterocolitica*

Yersinia enterocolitica subsp. *Enterocolitica* es una bacteria coco bacilo gramnegativa, aerobio facultativo y móvil, perteneciente al género *Yersinia* y clasificada dentro de la familia Enterobacteriaceae, la cual comprende 11 especies. Entre las especies del género *Yersinia* que pueden causar infecciones en humanos se encuentran *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*. La enfermedad causada por *Y. enterocolitica*, conocida como yersiniosis, afecta principalmente a niños menores de cinco años y generalmente no traspasa la barrera intestinal. Esta bacteria es zoonótica, lo que

significa que puede transmitirse entre animales y humanos. *Y. enterocolitica* es relevante debido a su papel como patógeno entérico y su capacidad de transmitirse a través de alimentos en humanos, además de afectar frecuentemente a la fauna silvestre y a mamíferos domésticos (OMS, 2019; Rodríguez et al., 2000).

La transmisión de *Y. enterocolitica* en animales ocurre principalmente a través de la vía fecal-oral, a través del consumo de alimentos o agua contaminados donde sus principales reservorios son el cerdo, ganado vacuno y animales silvestres como roedores, aves, ciervos y otros animales salvajes, donde la bacteria reside principalmente en el intestino (Acha y Szyfres, 2001). La mayoría de los animales se infectan dentro de los dos primeros años de vida, los animales menores de un año son más susceptibles, especialmente cuando están presentes otros factores como estrés nutricional, destete, un mal calostroaje, altas temperaturas, etc (Zamora et al., 1997).

En humanos *Y. enterocolitica* es un patógeno que invade el tracto intestinal, especialmente en personas jóvenes. Los síntomas clínicos más comunes provocados por este agente son enteritis, ileítis terminal, linfadenitis mesentérica, sepsis y algunos otros síntomas extraintestinales. Los casos de enterocolitis, se presenta la diarrea, con fiebre y dolor abdominal similar al cuadro de apendicitis (Rodríguez et al., 2000).

La distribución de *Yersinia enterocolitica* es global, con incidencias variables según la región. En Europa y América del Norte, los brotes de yersiniosis se asocian frecuentemente con alimentos contaminados, sobre todo carne de cerdo poco cocinada, lácteos no pasteurizados, o vegetales regados con aguas contaminadas, por ejemplo, zanahorias almacenadas en frío durante largos periodos de tiempo. Si bien la yersiniosis no es una enfermedad común en Chile por la sub-notificación de enfermedades transmitidas por los alimentos, solo se han registrado 5 casos entre 2011 y 2021 según la Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria (ACHIPIA, 2023), su impacto en la salud pública no debe subestimarse. Esta infección bacteriana, aunque de baja incidencia, puede presentar complicaciones graves, requiriendo incluso hospitalización en algunos casos.

5.6.3 Descripción de *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli, es una bacteria gramnegativa que reside habitualmente en el intestino de animales de sangre caliente, como los humanos. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, algunas pueden desencadenar enfermedades graves, como la colitis hemorrágica (Lencina et al., 2024).

Entre estas cepas patógenas se encuentra la *E. coli* O157:H7, caracterizada por su estructura gran negativa, no formadora de esporas, pueden ser móviles gracias a flagelos peritricos y notable capacidad de supervivencia tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos. Esta característica la convierte en un patógeno particularmente resistente y adaptable, capaz de prosperar en diversas condiciones ambientales (Han et al., 2023).

La bacteria *E. coli* O157:H7 (EHEC) representa una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. Esta bacteria, proveniente principalmente del ganado vacuno, causa enfermedades como el síndrome urémico hemolítico (SHU), una afección que afecta principalmente a niños y puede ser mortal (Lara-Duran et al., 2019). Diversos estudios, como el de Olvera et al. (2010), confirman que el ganado vacuno es el principal reservorio de la bacteria EHEC. Esta bacteria reside en el intestino de los animales sin causarles daño, pero se libera en sus heces, contaminando el suelo, el agua y el alimento.

La colibacilosis, causada por la *E. coli* patógena, es una de las principales causas de septicemia, diarrea, neumonía, meningitis y panoftalmitis en terneros recién nacidos. Si bien la fiebre alta no es un síntoma típico de *E. coli*, esta enfermedad puede presentar complicaciones graves en algunos casos. Entre estas se encuentran la acidosis grave (desequilibrio ácido-base en la sangre), la depresión (decaimiento extremo del estado de ánimo) y la postración (debilidad extrema que impide realizar actividades normales). En situaciones muy graves, la mortalidad puede llegar a ser del 75%. Esta enfermedad puede provocar la muerte de los animales, generando importantes pérdidas económicas para la industria ganadera debido a la alta morbilidad, menores tasas de crecimiento y altos costos de tratamiento y prevención (Delano et al., 2002; Shahrani et al., 2014).

En humanos la bacteria *E. coli* reside habitualmente en nuestro intestino. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas y desempeñan funciones beneficiosas como la digestión de alimentos, la producción de vitaminas y la protección contra bacterias dañinas, algunas cepas de *E. coli* pueden ser patógenas y causar enfermedades, principalmente diarrea. Entre ellas, las cepas, STEC (*E. coli* productora de toxina Shiga), ETEC (*E. coli* enterotoxigénica), EPEC (*E. coli* enteropatógena), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) y DAEC (*E. coli* de adherencia difusa) (CDC, 2024; Rípodas et al., 2017).

La principal forma de transmisión de la *E. coli* O157:H7 es a través de alimentos contaminados, especialmente carne cruda o insuficientemente cocida. Otras vías de transmisión incluyen el contacto directo con animales, la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, la transmisión de persona a persona por vía fecal-oral, así como el consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados, vegetales crudos y agua. Esto se debe a la contaminación de los alimentos con heces de ganado bovino debido a medidas de higiene inadecuadas (MINSAL, 2017). La infección puede ser asintomática o provocar síntomas como diarrea, que en ocasiones evoluciona a diarrea con sangre, calambres abdominales, vómitos y fiebre. En algunos casos, los pacientes desarrollan síndrome hemolítico urémico (SHU), el cual se caracteriza por anemia hemolítica, una reducción en las plaquetas sanguíneas e insuficiencia renal (ACHIPIA, 2017).

En Chile, *E. coli* STEC (O157:H7) está bajo vigilancia de laboratorio conforme al DS 158/04 (MINSAL, 2014). Durante el periodo de 2007 a 2013, el Instituto de Salud Pública (ISP) recibió un total de 2,425 cepas para la confirmación de STEC, de las cuales el 24.7% (599 cepas) fueron confirmadas como positivas (ACHIPIA, 2017).

5.6.4 Descripción de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es una bacteria gramnegativa intracelular facultativa, móvil y no esporulado. Este patógeno, altamente adaptable, tiene la capacidad de invadir diversos organismos huéspedes, ocasionando significativas pérdidas económicas en la industria ganadera (Zhang et al., 2024).

La bacteria *S. typhimurium* es uno de los patógenos más importantes transmitidos por los alimentos a nivel mundial y constituye la principal causa de brotes de intoxicación alimentaria en Chile. Además de causar significativas enfermedades gastrointestinales, esta bacteria puede provocar infecciones sistémicas graves, especialmente en poblaciones vulnerables como niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos. Es por ello por lo que, en Chile, la salmonelosis es una enfermedad que debe ser reportada obligatoriamente a las autoridades sanitarias. Para su diagnóstico definitivo, se recurre al Instituto de Salud Pública (ISP), que actúa como laboratorio nacional de referencia (Barreto et al., 2016).

La *Salmonella spp.*, es una bacteria común en el tracto digestivo de los rumiantes. Cuando esta bacteria se multiplica de forma descontrolada, puede provocar una enfermedad llamada salmonelosis. Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación aguda del estómago y los intestinos, lo que se traduce en diarrea o disentería. Las heces de los animales afectados pueden contener moco, sangre y tener un olor pútrido. Además, los animales con salmonelosis suelen presentar pérdida de apetito (anorexia) y fiebre (hipertermia). La morbilidad, es decir, la cantidad de animales afectados puede llegar al 25%, y la mortalidad, el número de animales que fallecen, puede ser considerable. Una de las complicaciones más graves es la septicemia, una infección generalizada que puede provocar meningitis (inflamación de las meninges que rodean el cerebro y la médula espinal), poliartritis (inflamación de varias articulaciones) y neumonía (inflamación de los pulmones). En los animales que superan la fase aguda de la infección, la diarrea intermitente puede persistir como consecuencia de una infección crónica (Delano et al., 2002).

En humanos la salmonelosis, la transmisión generalmente es por el consumo de alimento contaminado y se manifiesta de forma abrupta con fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y, en ocasiones, vómitos. Estos síntomas suelen aparecer entre 6 y 72 horas (generalmente entre 12 y 36 horas) después de haber ingerido la bacteria y la enfermedad suele durar entre 2 y 7 días. En la mayoría de los casos, la salmonelosis es leve y los pacientes se recuperan sin necesidad de tratamiento específico. Sin embargo, en niños

pequeños y en personas mayores, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en riesgo la vida (OMS, 2018).

En Chile, entre 2011 y 2021, se registraron 8.037 casos de salmonelosis, una enfermedad transmitida por alimentos contaminados con la bacteria *Salmonella spp.* De estos casos, 810 personas requirieron hospitalización y lamentablemente 3 fallecieron. La salmonelosis se posiciona como la infección más frecuente en el país, principalmente debido a prácticas de higiene inadecuadas por parte de la población (ACHIPIA, 2023).

La carne de aves, los huevos y otros productos pecuarios son vectores cruciales para la transmisión del serovar. Por lo tanto, es esencial las medidas de control rigurosas desde la granja hasta el consumo en las casas. Además, la implementación de prácticas de bioseguridad y el monitoreo continuo en todas las etapas de la cadena alimentaria son fundamentales para reducir el riesgo de infección y proteger la salud pública (Gonmei et al., 2023).

6. Discusión

El crecimiento demográfico acelerado, junto con la urbanización no planificada y la deforestación extensiva, ha modificado significativamente las fronteras entre las poblaciones humanas y animales, alterando de manera considerable el equilibrio de los ecosistemas (Rodríguez et al., 2023). Estas actividades antropogénicas no solo contribuyen a la pérdida de biodiversidad y a la destrucción de hábitats naturales, sino que también incrementan la incidencia de enfermedades zoonóticas al facilitar el contacto entre humanos y fauna silvestre (OMS, 2020). La caracterización de los microorganismos presentes en cuerpos de agua urbanos es un área de investigación de gran relevancia para la salud pública y la formulación de políticas. Esta información permite comprender en profundidad la diversidad microbiana local, identificar patrones de resistencia a los antibióticos y establecer relaciones entre la actividad humana, la infraestructura urbana y el bienestar de las poblaciones (Salazar et al., 2022).

En este estudio mediante la secuenciación metagenómica de escopeta de bacterias, se pudo determinar la presencia de especies bacterianas, genes de resistencias a los antibióticos, genes de virulencias y elementos móviles como plásmidos, en los humedales urbanos de la Región de Los Lagos, donde la información microbiológica pueda dar cuenta del impacto antropogénico sobre estos ecosistemas, se lograron identificar, por un lado, *P. multocida*, *S. entérica subsp. Typhimurium*, *C. psittaci*, *S. entérica subsp. Enteritidis*, *C. burnetti*, *B. anthracis* y *S. equi* que se puede visualizar en la figura 4, de las cuales son de notificación obligatoria al Servicio Agrícola y Ganadero, la notificación oportuna al SAG permite tomar medidas oportunas para controlar y prevenir, la propagación de estas enfermedades, minimizando su impacto en la salud humana, la producción ganadera y el medio ambiente (SAG, 2019). Las especies patógenas identificadas, están estrechamente vinculadas a enfermedades en animales, también representan una amenaza para la salud humana. Estas enfermedades pueden ser transmitidas directamente a humanos o mediante de personas como vectores para su propagación a otras especies. El medio ambiente actúa como un escenario crucial para la supervivencia y propagación de estas especies patógenas hacia sus respectivos hospedadores. La lluvia juega un rol fundamental en la acumulación de microorganismos

en cuerpos de agua, destinos finales del agua pluvial, facilitando la dispersión de estos agentes patógenos (Castillo, 2021).

Como ocurrió en el año 2001, donde la ciudad de Valdivia, Chile, se vio afectada por un brote de Ántrax (*B. anthracis*), una enfermedad zoonótica altamente contagiosa. Cuatro personas enfermaron tras entrar en contacto con animales infectados, el brote puso en manifiesto la crucial importancia de la bioseguridad y la prevención en las prácticas de manejo animal y sus productos. La implementación de protocolos más estrictos para el manejo animal y la gestión de sus productos, junto con la educación de la población y la vigilancia epidemiológica, son fundamentales para prevenir y controlar brotes de enfermedades zoonóticas (PAHO, 2002). También como lo ha notificado la González (2023) que *S. entérica subsp. Enteritidis* tiene uno de los patrones de aislamiento más grande los últimos años en los alimentos, al igual *S. entérica subsp. Typhimurium* que además tienen gran relevancia por la resistencia a los antibióticos.

En agosto de 2017, la Provincia de Osorno, en la Región de Los Lagos de Chile, experimentó un brote de fiebre Q. La enfermedad, inicialmente detectada como neumonías graves en trabajadores de predios ganaderos, también afectó a sus familiares y personal de salud. Este episodio pone de manifiesto la posibilidad de que la contaminación ambiental con restos después del parto de animales infectados haya contribuido a la propagación de la bacteria *C. burnetii*, causante de la fiebre Q (MINSAL, 2017). Aunque la probabilidad de infección por *S. equi* a través del agua es baja, como se indica en el estudio de Echeverri-Toro et al. (2019), estas infecciones pueden manifestarse de varias maneras. Entre las formas posibles se incluyen la meningitis, infecciones del tracto respiratorio inferior, infecciones de tejidos blandos, glomerulonefritis postestreptocócica y diversas infecciones del sistema cardiovascular como endocarditis, pericarditis, aneurismas micóticos y tromboflebitis séptica.

Además, las especies que son de relevancia en Medicina Veterinaria que no se encuentran como notificación obligatoria al SAG, pero que son importantes tanto para la salud animal como para los humanos, entre las especies bacterianas con mayores abundancias relativas *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. bronchiseptica*, *S. aureus* y *C. perfringens* que se pueden visualizar en la figura 5. Su abundancia relativa es parecida encontrada

en la investigación de Stehling et al. (2024) donde evaluaron la calidad de aguas en arroyos en Brasil, donde se encontró una mayor abundancia relativa en la especie de *P. aeruginosa*, donde además tiene una gran importancia para la resistencia antimicrobiana, la cual igual fue identificada en los humedales urbanos de la Región de los Lagos.

Como menciona Ballesteros et al. (2023) donde se caracterizaron 7 humedales con diferentes cargas antropogénicas con secuenciación de amplicones, en Bogotá, Colombia, donde se puede apreciar una carga parecida a los estudiados en los humedales de la Región Los Lagos, donde se observaron géneros como *Pseudomonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Aeromonas spp.*, *Micoplasma spp.*, entre otras. Al igual como menciona Cárdenas (2023) donde describe microorganismos con interés veterinario en los cuerpos de agua en la Región de Los Lagos del Humedal el Loto de Puerto Varas, donde se hallaron mediante metagenómica de escopeta especies patógenas como *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowaede*, *Mycoplasma synoviae*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Leptospira aeuriginosa*, *Leptospira interrogans* y *Microcystis aeruginosa*, que tienen gran relevancia en la salud animal y humana. La presencia de patógenos en humedales urbanos representa un riesgo potencial para la salud animal, especialmente para aquellas especies que interactúan directamente con estos cuerpos de agua. Los animales de granja, animales de compañía e incluso la fauna silvestre pueden verse expuestos a patógenos a través del contacto con agua contaminada, el consumo de alimentos o pastoreo en zonas aledañas a los humedales.

El presente estudio identificó la presencia de microorganismos en el agua de humedales urbanos que son altamente relevantes para la salud humana y no están relacionados con animales. Entre estos microorganismos se encuentran bacterias como *Vibrio cholerae* serogrupos O1 y O139, las cuales están comúnmente asociadas con el cólera, una grave enfermedad diarreica. El agua actúa como un reservorio y vehículo de transmisión para estas bacterias, según lo demostrado en numerosos estudios. Estas bacterias tienen el potencial de provocar brotes epidémicos de cólera, lo que representa un riesgo considerable para la salud pública (OMS, 2023; Zhang et al., 2024).

Además del *Vibrio cholerae*, se identificaron otras bacterias de importancia para la salud humana, como *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Estas bacterias suelen encontrarse en ambientes acuáticos y pueden causar infecciones graves, especialmente en personas con sistemas inmunodeprimidos o con heridas abiertas expuestas al agua contaminada (Heitmann et al., 2005; Poblete et al., 2002).

Esto evidencia la utilidad del análisis metagenómico de escopeta donde además de reconocer no solo hasta género como es el caso de metagenómica de amplicones, esta te permite llegar hasta nivel de especies de la tabla taxonómica, determinando de una manera más precisa que especie de bacteria se encuentra en ese lugar para poder tener manejos ambientales y terapéuticos adecuados.

Con respecto a lo anterior, los estudios relacionados al análisis metagenómico de escopeta se basan en identificar la diversidad microbiana o buscar especies específicas y no las rutas metabólicas de estos microorganismos. La detección de genes de resistencia antibiótica en los humedales representa un problema de salud pública significativo. Como menciona Li et al. (2024) la presencia de estos genes puede dificultar el tratamiento efectivo de infecciones bacterianas, poniendo en riesgo la vida de las personas. La resistencia a antimicrobianos es un fenómeno global en aumento, y su presencia en ambientes acuáticos como los humedales es particularmente preocupante debido a su estrecha conexión con la actividad humana y animal.

El estudio de Salazar et al. (2022) reveló la notable influencia de las actividades humanas, especialmente provenientes de hospitales adyacentes a entornos urbanos, en la configuración de la comunidad microbiana de estas zonas. Este estudio pone en manifiesto el papel fundamental que desempeñan los efluentes hospitalarios como vías de diseminación de bacterias resistentes a antimicrobianos, transformando los entornos urbanos en potenciales focos y reservorios de estos patógenos resistentes. Estos microorganismos resistentes pueden, posteriormente, ingresar al medio ambiente en general, incluyendo cuerpos de agua cercanos. La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa una grave amenaza para la salud pública mundial. Según estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en 2021 alrededor de 700.000 personas fallecieron a causa de infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos.

Este escenario alarmante se ve exacerbado por el uso inadecuado de estos fármacos. A nivel global, se estima que entre un 30% y 40% de las prescripciones de antibióticos son innecesarias, principalmente para tratar enfermedades de origen viral, como las infecciones respiratorias. Chile no escapa a esta realidad, destacándose como uno de los países latinoamericanos con mayor consumo de antibióticos, con un incremento del 55% entre 1998 y 2015.

Por su parte, el estudio de Fresia et al. (2019) proporcionó evidencia adicional de la prevalencia de la resistencia a los antibióticos en entornos costeros. Este estudio examinó 20 áreas costeras en Montevideo, Uruguay, incluyendo muestras de playas y aguas residuales, para caracterizar las comunidades bacterianas y sus repertorios de virulencia y resistencia a antimicrobianos. Como era de esperar, se encontraron genes de resistencia a los antibióticos tanto en aguas residuales como en ambientes de playa, con similitudes con los identificados en humedales urbanos de la Región de Los Lagos en Chile. Estos genes incluían familias de betalactámicos, aminoglucósidos, carbapenémicos, tetraciclinas y macrólidos.

De manera similar, Campanini-Salinas et al. (2024) emplearon metagenómica de escopeta para investigar la Bahía de Puerto Varas, Chile. Este estudio detectó diversos genes de virulencia y resistencia a los antibióticos, principalmente asociados con resistencia a macrólidos, betalactámicos y tetraciclinas. Los microorganismos identificados en este estudio portan genes de resistencia a antibióticos que coinciden con las familias de antibióticos más comúnmente empleadas en el ámbito de la medicina veterinaria y medicina humana en Chile. Esta alarmante coincidencia resalta la urgencia de implementar estrategias integrales para combatir la resistencia antimicrobiana, abarcando tanto el sector veterinario como el sector de la salud humana.

En cuanto a los genes de virulencia y elementos móviles como plásmidos identificados, se observa una distribución similar a la reportada por Fresia et al. (2019) quien encontró genes asociados a *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Yersinia*. En particular, especies como *E. coli*, identificada en el presente estudio, que son de gran importancia debido a su implicación en infecciones del tracto urinario en humanos. Asimismo, la presencia de *Salmonella spp.*, en alimentos y agua, conocida por su alta prevalencia en

infecciones gastrointestinales. Estos genes de virulencia son responsables de la gravedad de dichas infecciones y la movilización del material genético a través de plásmidos ha contribuido a la multirresistencia en estos géneros (De Toro et al., 2014; Miranda-Estrada et al., 2017). Estos resultados resaltan la importancia de los cuerpos de agua que se encuentran cerca de zonas urbanas que actúan como reservorio y vehículo de genes de virulencia y elementos móviles que son responsables de determinar mecanismos patogénicos conocidos en bacterias clínicamente relevantes.

Estos estudios recientes ponen en evidencia la alarmante realidad de la resistencia a los antibióticos y presencia de bacterias patógenas en ambientes acuáticos, con graves consecuencias potenciales para la salud humana, animal y el equilibrio ecológico. La detección de genes resistentes a antibióticos en humedales, playas y aguas residuales revela la existencia de reservorios de resistencia que pueden afectar a la fauna marina y terrestre y, en última instancia, ingresar a la cadena alimentaria humana.

Esta problemática se intensifica en regiones como Los Lagos, donde las precipitaciones abundantes contribuyen a la acumulación de microorganismos en cuerpos de agua. Estos reservorios actúan como puntos de entrada para los antibióticos provenientes de diversas fuentes, como la agricultura, la ganadería y el uso humano, promoviendo la proliferación de bacterias resistentes.

Abordar esta problemática requiere un enfoque de Una sola Salud, como indica la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), que involucre a diversos actores, desde las autoridades sanitarias y ambientales hasta la industria farmacéutica y la sociedad civil. Es fundamental implementar estrategias para reducir el uso excesivo de antibióticos, promover prácticas agrícolas y ganaderas sostenibles, y mejorar el tratamiento de aguas residuales, lo cual debe verse reflejado en las políticas públicas y la legislación vigente. Además, es crucial fomentar la educación y concienciación de la población sobre el impacto de sus acciones en los ecosistemas y la salud pública, así como fortalecer la investigación y el monitoreo de la salud ambiental. La colaboración internacional y la adopción de tecnologías innovadoras también juegan un papel esencial en la protección y restauración de los humedales.

La investigación científica debe intensificar sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos métodos de detección, como la metagenómica de escopeta, para identificar con mayor precisión microorganismos y mecanismos de resistencia a los antibióticos, así como elementos móviles presentes en el medio ambiente. Esta información crucial permitirá evaluar las repercusiones de estos factores en la salud animal, humana y ambiental, facilitando la toma de decisiones para mitigar esta amenaza silenciosa.

7. Conclusiones

En los humedales urbanos de la Región de Los Lagos, se han identificado diversas especies bacterianas de importancia en Medicina Veterinaria. Entre estas se encuentran *Pasteurella multocida*, *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium*, *Chlamydia psittaci*, *Salmonella enterica* subsp. *Enteritidis*, *Coxiella burnetii*, *Bacillus anthracis* y *Streptococcus equi*, todas ellas sujetas a notificación obligatoria al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Además, se han detectado especies con alta prevalencia que son relevantes para la salud animal, entre las especies bacterianas con mayores abundancias relativas fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* notablemente, el humedal La Paloma presentó la mayor cantidad de especies patógenas significativas en Medicina Veterinaria.

Nuestro estudio demostró la utilidad de nuestro enfoque para identificar determinantes genéticos como genes de resistencia a antimicrobianos asociados a Betalactámicos, Macrólidos, Carbapenémicos, entre otras familias, también genes de virulencia que fueron descritos y asociados a microorganismos como *E. coli* O157:H7, *S. entérica* subsp. *Typhimurium*, *P. aeruginosa* y *Y. enterocolitica* subsp. *Enterocolitica* y elementos móviles como plásmidos que están presentes en humedales de la Región de Los Lagos.

8. Referencias

- Acha, P., y Szyfres, B. (2001). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Paho.org. <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2017/Acha-Zoonosis-Spa.pdf>
- Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria. (2017). *Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC)*. Gob.cl. <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-07-STEC-v01.pdf>
- Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., y Retamal, P. (2016). *Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile*. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 33(5), 547-557. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000500010>
- Barros, M., Sáenz, L., Lapierre, L., Núñez, C. y Medina-Vogel, G. (2014). *High prevalence of pathogenic Leptospira in alien American mink (Neovison vison) in Patagonia*. *Revista chilena de historia natural (Valparaíso, Chile: 1983)*, 87(1). <https://doi.org/10.1186/s40693-014-0019-x>
- Beceiro, A., Tomás, M., y Bou, G. (2012). *Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 30(8), 492-499. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.011>
- Beer, J. (1987). *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos (1.a reimpresión)*. ACRIBIA.
- Brogliá, G., Marchetti, L., Buchamer, A., y Mestorino, N. (2020). *Pseudomonas aeruginosa en la otitis externa canina: situación actual*. *Analecta veterinaria*, 40(1), 048. <https://doi.org/10.24215/15142590e048>
- Campanini-Salinas, J., Opitz-Ríos, C., Sagredo-Mella, J., Contreras S., D., Gimenez, M., Paez, P. A., Tarifa, M. C., Concha-Rubio, N. D., y Medina, D. A. (2024).

- Antimicrobial resistance elements in coastal water identified from Llanquihue Lake, Chile.* En *Preprints*. <https://doi.org/10.20944/preprints202406.0310.v1>
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., y Hasman, H. (2014). *In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Cárdenas, V. (2023). *Descripción de microorganismos con interés veterinario identificados desde cuerpos de agua en la Región de Los Lagos* [memoria para optar al título de médico veterinario]. Universidad San Sebastián
- Casadevall, A., y Pirofski, L.-A. (1999). *Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infection and Immunity*, 67(8), 3703-3713. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.3703-3713.1999>
- Castillo, N. (2021). *Microorganismos en el agua ¿Debemos preocuparnos?*. Ciencia UNAM. <https://ciencia.unam.mx/leer/1098/microorganismos-en-el-agua-debemos-preocuparnos->
- Cedré, B., Fariñas, M., Callicó, A., Moya, A., Díaz, D., Parajón, E., Valdés, Y., y Sifontes, S. (2007). *Evaluación en animales del efecto protector de una inmunoglobulina anti Pseudomonas aeruginosa para uso terapéutico.* Sld.cu. <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v16n1/vac03107.pdf>
- Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. (2024). *E. coli Infection (Escherichia coli)*. <https://www.cdc.gov/ecoli/about/kinds-of-ecoli.html>
- Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., y Jin, Q. (2016). *VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on.* *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D694-D697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>
- Clínica Universidad de Navarra. (2023). *Virulencia.* cun.es. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/virulencia>

Colegio Médico Veterinario de Chile. (2021). *Día Mundial las Zoonosis: 65% de las enfermedades en seres humanos son de origen animal*. Colmevet. cl. <https://colmevet.cl/noticia/dia-mundial-las-zoonosis-65-de-las-enfermedades-en-seres-humanos-son-de-origen-animal>

Corporación Nacional Forestal. (2013). *Los humedales y la importancia de conservarlos*. Conaf. cl. <https://n9.cl/a66zr>

Costa, J. S. T. da, Lima, C. A., Vera-Leiva, A., San Martín Magdalena, I., Bello-Toledo, H., Domínguez Yévenes, M., Opazo-Capurro, A., Mella Montecinos, S., Quezada-Aguiluz, M., y González-Rocha, G. (2021). *Carbapenemasas en aislamientos de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales de Chile*. *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 38(1), 81-87. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182021000100081>

De Toro, M., Seral, C., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., y Sáenz, Y. (2014). Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de Salmonella enterica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32(1), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.006>

Delano, M. L., Mischler, S. A., y Underwood, W. J. (2002). *Biology and diseases of ruminants: Sheep, goats, and cattle*. In *Laboratory Animal Medicine* (pp. 519-614). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012263951-7/50017-X>

Echeverri-Toro, L. M., Castañeda, L., y Agudelo, C. A. (2019). *Artritis séptica por Streptococcus equi: reporte de un caso y revisión de la literatura*. *Org.co*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922019000400402

Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., Tyson, G. H., Zhao, S., Hsu, C.-H., McDermott, P. F., Tadesse, D. A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J. P., y Klimke, W. (2019). *Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance*

- genotype-phenotype correlations in a collection of isolates*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 63(11). <https://doi.org/10.1128/aac.00483-19>
- Fernández, C., Opitz, C., Riquelme, P., y Sandoval, G. (2022). *Guía de tecnologías implementadas en monitoreo de calidad de agua del lago Llanquihue en plataforma “lago en línea”*. Lagoenlinea.cl. <https://www.lagoenlinea.cl/biblioteca-view.php?id=103>
- Forero-Pineda, N., Marín-Suárez, J., Forero- Ulloa, F. E., y Gómez-Palacio, A. (2021). *Extracción de ADN bacteriano a partir de cuerpos de agua de uso agrícola*. Ciencia y agricultura, 18(1), 36-45. <https://doi.org/10.19053/01228420.v18.n1.2021.11703>
- Fresia, P., Antelo, V., Salazar, C., Giménez, M., D’Alessandro, B., Afshinneko, E., Mason, C., Gonnet, G. H., y Iraola, G. (2019). Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters. Microbiome, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0648-z>
- Gonmei, L., Inbaraj, S., Geyi, D., Prakashan, L., Dhiman, H., Athira, V., y Thomas, P. (2023). *Evaluation of bacteriophage cocktail as biopreservatives against Salmonella enterica serovar Typhimurium in chicken meat*. Food Bioscience, 56(103290), 103290. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103290>
- González, G. (2023). *Nuevos patógenos significativos. Mitos y realidades*. Gob.cl. <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2023/08/Microorganismos-emergentes-Gustavo-Gonzales-junio-2023.pdf>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., y Tesler, G. (2013). *QUAST: quality assessment tool for genome assemblies*. Bioinformatics (Oxford, England), 29(8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Han, A., Paek, J., y Lee, S.-Y. (2023). *Thermal resistance of Escherichia coli O157:H7 in laboratory media, milk, and beef extracts during non-isothermal processing at various heating rates*. Food Microbiology, 110(104187), 104187. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104187>

- Heitmann G., I., Jofré M., L., Hormázabal O., J. C., Olea N., A., Vallebuona S., C., y Valdés H., C. (2005). *Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 22(2), 131–140. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182005000200003>
- Hernández, R., y Mendoza, C. (2018). *Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta*. mcgrawhill. <https://acortar.link/7XnsFT>
- Hernández-De Lira, I. O., Huber, D., Luévanos-Escareño, M. P., Hernández Terán, F., Sáenz-Mata, J., y Balagurusamy, N. (2014). *Metagenómica: concepto y aplicaciones en el mundo microbiano*. *Fronteras En Microbiología Aplicada*, 156. <https://n9.cl/10lvd>
- Hozbor, M. C., Peressutti, S. R., y Di Mauro, R. (2021). *Optimización de metodologías para estudio de diversidad bacteriana asociada a microplásticos*. Gob.ar. Consultado el 27 de octubre de 2023. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2022/03/hozbor_et_al_inf_proced_002_2021_metodo_bactmicropla.pdf
- Humedales de Chiloé. (2018). *Humedales de Chiloé-amenazas*. Humedales de Chiloé. <http://humedaleschiloe.cl/amenazas/>
- Illumina. (2018). *Shotgun metagenomic sequencing*. Illumina.com. Consultado el 14 de septiembre de 2023, de <https://www.illumina.com/areas-of-interest/microbiology/microbial-sequencing-methods/shotgun-metagenomic-sequencing.html>
- Jeong, G.-J., Khan, F., Tabassum, N., Jo, D.-M., Jung, W.-K., y Kim, Y.-M. (2024). *Roles of Pseudomonas aeruginosa siderophores in interaction with prokaryotic and eukaryotic organisms*. *Research in Microbiology*, 104211, 104211. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2024.104211>

- Jiménez, A. (2024). *Otitis canina por Pseudomonas*. *Revisión Bibliográfica*. Vanguardia Vet. Recuperado 24 de mayo de 2024, de <https://www.vanguardiaveterinaria.com.mx/otitis-canina-por-pseudomonas>
- Kruchten, A. E. (2020). *A curricular bioinformatics approach to teaching undergraduates to analyze metagenomic datasets using R*. *Frontiers in microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.578600>
- Krueger, F. (2011). *Trimmomatic Manual: V0.32*. Usadellab.org. http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/Trimmomatic_Manual_V0.32.pdf
- Lara-Duran, J. A., Silva Vega, M., Bañuelos Valenzuela, R., Delgadillo Ruiz, L., y Delgadillo Ruiz, O. (2019). *Incidencia de Escherichia coli O157:H7 en heces de rumiantes lactantes con síndrome diarreico*. *Revista MVZ Cordoba*, 24(3), 7339-7345. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1232>
- Lencina, F. A., Bertona, M., Stegmayer, M. A., Olivero, C. R., Frizzo, L. S., Zimmermann, J. A., Signorini, M. L., Soto, L. P., y Zbrun, M. V. (2024). *Prevalence of colistin-resistant Escherichia coli in foods and food-producing animals through the food chain: A worldwide systematic review and meta-analysis*. *Heliyon*, 10(5), e26579. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26579>
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., y Lam, T.-W. (2015). *MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph*. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(10), 1674-1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Li, Y., Liu, C., Li, Q., y Mao, S. (2024). *Fluorescence analysis of antibiotics and antibiotic-resistance genes in the environment: A mini review*. *Zhongguo Hua Xue Kuai Bao [Chinese Chemical Letters]*, 109541, 109541. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2024.109541>

- López, C., Candelas, F., Carmona, M., y Palomo., A. (2021). *Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica*. Seimc.org. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento71.pdf>
- Madrid, H. (2023). *Tabla De Frecuencia En Excel: Analiza Tus Datos Cualitativos*. Hojas y Datos. Consultado el 02 de noviembre de 2023 <https://hojasydatos.com/excel/tablas-de-frecuencia-en-excel-analiza-tus-datos-cualitativos/>
- Marcos, E. (2013). *El Concepto Una salud Como Integrador de la Interfase Humano-Animal-Ambiental, Frente a las Enfermedades Emergentes, Reemergentes y Transfronterizas*. Siicsalud.com. https://www.siicsalud.com/pdf/epidemiologia_salud_1_3_42813.pdf#page=15
- Martínez, M. G. (2016). "Detección y estudio de plásmidos en muestras de sedimento/suelo de diferentes sitios del continente antartico". Edu.uy. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10129/1/uy24-18407.pdf>
- Ministerio de Salud. (2014). *Diagnóstico de salud Región Metropolitana 2014*. Gobiernosantiago.cl. <https://www.gobiernosantiago.cl/wp-content/uploads/2014/12/Seremi-de-Salud-Regi%C3%B3n-Metropolitana-Diagn%C3%B3stico-de-Salud-de-la-Regi%C3%B3n-Metropolitana-2014-Diciembre-2014.pdf>
- Ministerio de salud. (2017). *Fiebre Q*. Minsal.cl. <https://epi.minsal.cl/fiebre-q-situacion-epidemiologica/>
- Ministerio de Salud. (2017). *Instrucciones para la vigilancia nacional de laboratorio para escherichia coli productor de toxina shiga*. Ispch.cl. <https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2017/07/Circular%20N%C2%B0%2002%20DEL%2014.07.2017%20ISP%20CIRCULAR%20VIGILANCIA%20N>

[ACIONAL%20LAB.%20ESCHERICHIA%20COLI%20PRODUCTOR%20TOXINA%20SHIGA%20STEC.pdf](#)

Ministerio de Salud. (2021). *Plan nacional contra la resistencia a los antimicrobianos Chile 2021-2025*. Minsal. cl. <https://diprece.minsal.cl/wp-content/uploads/2021/10/Plan-Nacional-Contra-la-Resistencia-a-los-Antimicrobianos-Chile-2021-2025.pdf>

Ministerio del Medio Ambiente. (2022). *Región de Los Lagos ya cuenta con más de 500 hectáreas de humedales urbanos protegidos por ley*. mma.gob.cl. <https://mma.gob.cl/region-de-los-lagos-ya-cuenta-con-mas-de-500-hectareas-de-humedales-urbanos-protegidos-por-ley/>

Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., y Castro-Alarcón, N. (2017). *Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de Escherichia coli uropatógena en dos localidades de México*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(7), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2017). *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences. <https://books.google.at/books?id=GOaVDgAAQBAJ>

Museo de Historia Natural de Valparaíso. (2023). *“Revitalizar y restaurar los humedales degradados” es el lema del 2023*. Gob. cl. <https://www.mhmv.gob.cl/noticias/revitalizar-y-restaurar-los-humedales-degradados-es-el-lema-del-2023>

National Geographic. (2023). *Los 7 servicios ecosistémicos de los humedales*. National Geographic. <https://n9.cl/qv4po>

Navgire, G. S., Goel, N., Sawhney, G., Sharma, M., Kaushik, P., Mohanta, Y. K., Mohanta, T. K., y Al-Harrasi, A. (2022). *Analysis and Interpretation of metagenomics data: an approach*. *Biological Procedures Online*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12575-022-00179-7>

Novogene. (2021). *Shotgun metagenomic sequencing*. Novogene. Consultado el 17 de septiembre de 2023, de <https://www.novogene.com/us-en/services/research-services/metagenome-sequencing/shotgun-metagenomic-sequencing/>

Organización Mundial de la Salud. (2016). *One Health*. Openwho.org. <https://openwho.org/channels/onehealth?locale=es>

Organización Mundial de la Salud. (2018). *Salmonella (no tifoidea)*. Who.int. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

Organización Mundial de la Salud. (2019). *Yersinia enterocolitica (Infección con)*. Woah.org. <https://www.woah.org/app/uploads/2022/02/yersinia-enterocolitica-infection-with.pdf>

Organización Mundial de la Salud. (2020). *Zoonosis*. Who.int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>

Organización Mundial de la Salud. (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. Who.int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Organización Mundial de la Salud. (2023). *Cólera*. Who.int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cholera>

Organización Panamericana de la Salud (2002). *El sistema de vigilancia de Enfermedades Transmisibles*. Paho.org. <https://www3.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/Redes-eer-Atlanta2002-13c-chi.pdf>

Organización Panamericana de la Salud. (2021). CHILE: Mesa Intersectorial de RAM lanza segunda versión del Plan Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos. Paho.org. <https://www.paho.org/es/noticias/8-10-2021-chile-mesa-intersectorial-ram-lanza-segunda-version-plan-nacional-contra>

Organización Panamericana de la Salud. (2023). *Día Mundial de las Zoonosis: proteger la salud animal ayuda a preservar la salud humana*. Paho.org. <https://n9.cl/se614>

- Ospino Bejarano, K. A., Castilla Pérez, M. G., y Sánchez-Mora, R. M. (2018). *Resistencia microbiana desde una perspectiva metagenómica*. Nova, 16(29), 91-100. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v16n29/1794-2470-nova-16-29-00091.pdf>
- Pachori, P., Gothwal, R., y Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance Pseudomonas aeruginosa in intensive care unit; a critical review. *Genes & Diseases*, 6(2), 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>
- Palanisamy, V., Bosilevac, J. M., Barkhouse, D. A., Velez, S. E., y Chitlapilly Dass, S. (2023). *Shotgun-metagenomics reveals a highly diverse and communal microbial network present in the drains of three beef-processing plants*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1240138>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., y Vázquez-López, R. (2019). Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>
- Pérez, L. (2021). *El papel del veterinario en la estrategia One Health*. porciNews, la revista global del porcino. <https://porcinews.com/papel-del-veterinario-en-la-estrategia-one-health/>
- Poblete U, R., Andresen H, M., Pérez C, C., Dougnac L, A., Díaz P, O., y Tomicic F, V. (2002). *Vibrio vulnificus: una causa infrecuente de shock séptico*. *Revista Médica de Chile*, 130(7), 787–791. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872002000700011>
- Ramsar. (1971). *¿Qué son los humedales?* Ramsar.org. Recuperado 2 de septiembre de 2023, de <https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/info2007sp-01.pdf>
- Ramsar. (2018). *Estado de los humedales del mundo y de los servicios que prestan a las personas* 2018. Ramsar.org. https://www.ramsar.org/sites/default/files/flipbooks/ramsar_gwo_spanish_web.pdf

- Reem, A., Almansoob, S., Senan, A. M., Kumar Raj, A., Shah, R., Kumar Shrewastwa, M., y Kumal, J. P. P. (2024). *Pseudomonas aeruginosa and related antibiotic resistance genes as indicators for wastewater treatment*. *Heliyon*, 10(9), e29798. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29798>
- Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., y Macho Martínez, M. (2017). *Investigación de Escherichia Coli productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos*. *Sanidad militar*, 73(3), 147-152. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712017000300002>
- Rodríguez, A., Olivero, S., Ortiz, F., y Medina, D. (2023). *Propuesta de estrategias y acciones «One Health» para la zona austral de Chile y Argentina*. *Unasalud*. cl. <https://n9.cl/485ym>
- Rodríguez, J., Vargas, A., y Herrer, M. L. (2000). *Diarrea por Yersinia enterocolitica: reporte de un caso*. *Revista médica del Hospital nacional de niños Dr. Carlos Saenz Herrera*, 35(1-2), 79-82. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462000000100012
- Salazar, C., Giménez, M., Riera, N., Parada, A., Puig, J., Galiana, A., Grill, F., Vieytes, M., Mason, C. E., Antelo, V., D'Alessandro, B., Risso, J., y Iraola, G. (2022). *Human microbiota drives hospital-associated antimicrobial resistance dissemination in the urban environment and mirrors patient case rates*. *Microbiome*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01407-8>
- Seemann, T. (2020). *ABRicate: :mag_right: Mass screening of contigs for antimicrobial and virulence genes*. Consultado el 01 de noviembre de 2023 <https://github.com/tseemann/abricate>
- Sen, K., Berglund, T., Soares, M. A., Taheri, B., Ma, Y., Khalil, L., Fridge, M., Lu, J., y Turner, R. J. (2019). *Antibiotic Resistance of E. coli Isolated From a Constructed Wetland Dominated by a Crow Roost, With Emphasis on ESBL and AmpC*

- Containing *E. coli*. *Frontiers in microbiology*, 10, 1034.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01034>
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2019). *lista de enfermedades de denuncia obligatoria (edo) al sag. Gob. cl.*
https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/enfermedades_denuncia_obligatoria_sag_9-10-2019.pdf
- Shahrani, M., Dehkordi, F. S., y Momtaz, H. (2014). *Characterization of Escherichia coli virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran*. *Biological Research*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-28>
- Stehling, E. G., Furlan, J. P. R., Lopes, R., Chodkowski, J., Stopnisek, N., Savazzi, E. A., y Shade, A. (2024). *The relationship between water quality and the microbial virulome and resistome in urban streams in Brazil*. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 348(123849), 123849.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123849>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., y Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología* (9a ed.). Ed. Médica Panamericana. <https://books.google.at/books?id=Nxb3iETuwplC>
- Universidad de Chile. (2021). *Humedales en Chile: los múltiples beneficios de estos reservorios de biodiversidad que hoy están bajo amenaza*. Uchile.cl.
<https://uchile.cl/noticias/178754/u-de-chile-podcast-humedales-y-su-importancia-para-el-ecosistema>
- Vadilla, S., Píriz, S., y Mateos, E. (2002). *Manual de microbiología veterinaria*. https://uss-primo.hosted.exlibrisgroup.com/permalink/f/2omn3/uss_librosdigitales7648
- Wood, D., Lu, J. y Langmead, B. (2019). *Improved metagenomic analysis with Kraken 2*. *Genome Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Zamora, J., Reinhardt, G., Polette, M., Macias, P., y English, J. (1997). *Aislamiento de Yersinia enterocolitica y de Yersinia kristensenii en fecas de ovinos*. *Archivos de*

Medicina Veterinaria, 29(2), 301-305. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x1997000200016>

Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., y Larsen, M. V. (2012). *Identification of acquired antimicrobial resistance genes*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(11), 2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>

Zhang, J., Wu, Y., Li, W., Xie, H., Li, J., Miao, Y., Yang, Z., Zhou, Y., y Wang, X. (2024). *Effects of a novel Bacillus subtilis GXYX crude lipopeptide against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice*. Heliyon, 10(6), e28219. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28219>

Zhang, Q., Alter, T., Strauch, E., Eichhorn, I., Borowiak, M., Deneke, C., y Fleischmann, S. (2024). *German coasts harbor non-O1/non-O139 Vibrio cholerae with clinical virulence gene profiles*. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 120(105587), 105587. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105587>

Zunino M, E., y Pizarro P, R. (2007). *Leptospirosis: Puesta al día*. Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología, 24(3). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182007000300008>

9. Anexo

9.1 Anexo 1. Estadísticas de calidad de ensamblaje realizadas por Quast para la secuencia de metagenómica de escopeta para los humedales urbanos de la Región de Los Lagos.

Baquedano

	tube1_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	341109
# contigs (>= 1000 bp)	53601
# contigs (>= 5000 bp)	5741
# contigs (>= 10000 bp)	2459
# contigs (>= 25000 bp)	659
# contigs (>= 50000 bp)	169
Total length (>= 0 bp)	300057133
Total length (>= 1000 bp)	166484180
Total length (>= 5000 bp)	79537041
Total length (>= 10000 bp)	56816975
Total length (>= 25000 bp)	29679554
Total length (>= 50000 bp)	13184377
# contigs	150648
Largest contig	296733
Total length	232570721
GC (%)	57.41
N50	2153
N90	623
auN	11411.6
L50	17628
L90	108860
# N's per 100 kbp	0.00

Teodosio

	tube2_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	355476
# contigs (>= 1000 bp)	57674
# contigs (>= 5000 bp)	8121
# contigs (>= 10000 bp)	2760
# contigs (>= 25000 bp)	469
# contigs (>= 50000 bp)	120
Total length (>= 0 bp)	327527811
Total length (>= 1000 bp)	190398341
Total length (>= 5000 bp)	93756005
Total length (>= 10000 bp)	56981315
Total length (>= 25000 bp)	23398400
Total length (>= 50000 bp)	11586267
# contigs	152791
Largest contig	412758
Total length	254702830
GC (%)	54.86
N50	2777
N90	635
auN	12026.5
L50	17282
L90	107412
# N's per 100 kbp	0.00

Las Ranas

	tube3_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	6449
# contigs (>= 1000 bp)	2136
# contigs (>= 5000 bp)	1287
# contigs (>= 10000 bp)	955
# contigs (>= 25000 bp)	463
# contigs (>= 50000 bp)	164
Total length (>= 0 bp)	43058401
Total length (>= 1000 bp)	41139734
Total length (>= 5000 bp)	39004189
Total length (>= 10000 bp)	36601036
Total length (>= 25000 bp)	28545413
Total length (>= 50000 bp)	18010488
# contigs	3336
Largest contig	927260
Total length	41927044
GC (%)	54.61
N50	41815
N90	7675
auN	100450.1
L50	230
L90	1085
# N's per 100 kbp	0.00

Marina Parque

	tube4_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	155210
# contigs (>= 1000 bp)	27890
# contigs (>= 5000 bp)	3194
# contigs (>= 10000 bp)	1592
# contigs (>= 25000 bp)	596
# contigs (>= 50000 bp)	193
Total length (>= 0 bp)	168499277
Total length (>= 1000 bp)	105151470
Total length (>= 5000 bp)	60782664
Total length (>= 10000 bp)	49708639
Total length (>= 25000 bp)	34120978
Total length (>= 50000 bp)	20368959
# contigs	78096
Largest contig	796097
Total length	139557067
GC (%)	55.49
N50	3136
N90	651
auN	34296.3
L50	5505
L90	53566
# N's per 100 kbp	0.00

Quebrada Parque

	tube5_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	91284
# contigs (>= 1000 bp)	19431
# contigs (>= 5000 bp)	3508
# contigs (>= 10000 bp)	1623
# contigs (>= 25000 bp)	612
# contigs (>= 50000 bp)	294
Total length (>= 0 bp)	137684752
Total length (>= 1000 bp)	102873331
Total length (>= 5000 bp)	70711934
Total length (>= 10000 bp)	57773044
Total length (>= 25000 bp)	42727707
Total length (>= 50000 bp)	31822134
# contigs	45819
Largest contig	501598
Total length	120767319
GC (%)	55.59
N50	8612
N90	774
auN	48699.9
L50	1906
L90	26081
# N's per 100 kbp	0.00

Luis Ebel

	tube6_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	75672
# contigs (>= 1000 bp)	23658
# contigs (>= 5000 bp)	4664
# contigs (>= 10000 bp)	2142
# contigs (>= 25000 bp)	673
# contigs (>= 50000 bp)	234
Total length (>= 0 bp)	141869094
Total length (>= 1000 bp)	117216781
Total length (>= 5000 bp)	77933260
Total length (>= 10000 bp)	60330577
Total length (>= 25000 bp)	38277562
Total length (>= 50000 bp)	23270197
# contigs	42309
Largest contig	896053
Total length	130265275
GC (%)	59.34
N50	8346
N90	998
auN	42185.8
L50	2669
L90	23680
# N's per 100 kbp	0.00

El Loto

	tube7_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	18124
# contigs (>= 1000 bp)	3879
# contigs (>= 5000 bp)	659
# contigs (>= 10000 bp)	446
# contigs (>= 25000 bp)	227
# contigs (>= 50000 bp)	126
Total length (>= 0 bp)	41745697
Total length (>= 1000 bp)	34569004
Total length (>= 5000 bp)	29082190
Total length (>= 10000 bp)	27550429
Total length (>= 25000 bp)	23992348
Total length (>= 50000 bp)	20573384
# contigs	9651
Largest contig	939903
Total length	38555585
GC (%)	57.28
N50	65650
N90	977
auN	160437.2
L50	104
L90	4012
# N's per 100 kbp	0.00

Teodosio 2

	tube8_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	132744
# contigs (>= 1000 bp)	32677
# contigs (>= 5000 bp)	5622
# contigs (>= 10000 bp)	2634
# contigs (>= 25000 bp)	815
# contigs (>= 50000 bp)	214
Total length (>= 0 bp)	187580088
Total length (>= 1000 bp)	139476383
Total length (>= 5000 bp)	86054566
Total length (>= 10000 bp)	65442276
Total length (>= 25000 bp)	37620918
Total length (>= 50000 bp)	17099880
# contigs	69577
Largest contig	523861
Total length	165055424
GC (%)	56.84
N50	5589
N90	780
auN	20144.4
L50	4954
L90	42973
# N's per 100 kbp	0.00

Mirasol

	tube1_2_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	95283
# contigs (>= 1000 bp)	8620
# contigs (>= 5000 bp)	687
# contigs (>= 10000 bp)	363
# contigs (>= 25000 bp)	192
# contigs (>= 50000 bp)	126
Total length (>= 0 bp)	76295955
Total length (>= 1000 bp)	38358997
Total length (>= 5000 bp)	24606388
Total length (>= 10000 bp)	22360368
Total length (>= 25000 bp)	19684111
Total length (>= 50000 bp)	17466436
# contigs	28965
Largest contig	1302336
Total length	51881825
GC (%)	54.70
N50	3669
N90	615
auN	103502.8
L50	1001
L90	19553
# N's per 100 kbp	0.00

Antiñir

	tube3_2_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	115842
# contigs (>= 1000 bp)	6768
# contigs (>= 5000 bp)	334
# contigs (>= 10000 bp)	203
# contigs (>= 25000 bp)	131
# contigs (>= 50000 bp)	93
Total length (>= 0 bp)	83397617
Total length (>= 1000 bp)	33631070
Total length (>= 5000 bp)	24089059
Total length (>= 10000 bp)	23222407
Total length (>= 25000 bp)	22122718
Total length (>= 50000 bp)	20784447
# contigs	38434
Largest contig	1607975
Total length	54539542
GC (%)	50.00
N50	1733
N90	572
auN	208312.7
L50	1647
L90	28203
# N's per 100 kbp	0.00

Rupallán

	tube4_2_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	26383
# contigs (>= 1000 bp)	5395
# contigs (>= 5000 bp)	1817
# contigs (>= 10000 bp)	1112
# contigs (>= 25000 bp)	532
# contigs (>= 50000 bp)	342
Total length (>= 0 bp)	87529407
Total length (>= 1000 bp)	77250381
Total length (>= 5000 bp)	69921070
Total length (>= 10000 bp)	64913438
Total length (>= 25000 bp)	56070926
Total length (>= 50000 bp)	49217856
# contigs	13448
Largest contig	1493971
Total length	82678067
GC (%)	53.68
N50	83480
N90	1910
auN	167276.6
L50	221
L90	3247
# N's per 100 kbp	0.00

Ovejería

	tube5_2_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	619174
# contigs (>= 1000 bp)	80737
# contigs (>= 5000 bp)	10598
# contigs (>= 10000 bp)	2647
# contigs (>= 25000 bp)	325
# contigs (>= 50000 bp)	99
Total length (>= 0 bp)	482892299
Total length (>= 1000 bp)	247804932
Total length (>= 5000 bp)	107401909
Total length (>= 10000 bp)	53485693
Total length (>= 25000 bp)	21292497
Total length (>= 50000 bp)	13522523
# contigs	219174
Largest contig	697617
Total length	340324113
GC (%)	51.39
N50	2453
N90	614
auN	14024.8
L50	28854
L90	157383
# N's per 100 kbp	0.00

La Paloma

	tube6_2_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	309782
# contigs (>= 1000 bp)	15015
# contigs (>= 5000 bp)	502
# contigs (>= 10000 bp)	173
# contigs (>= 25000 bp)	49
# contigs (>= 50000 bp)	6
Total length (>= 0 bp)	157945791
Total length (>= 1000 bp)	28729210
Total length (>= 5000 bp)	5965465
Total length (>= 10000 bp)	3761733
Total length (>= 25000 bp)	1862065
Total length (>= 50000 bp)	351739
# contigs	83937
Largest contig	61955
Total length	73522797
GC (%)	54.15
N50	822
N90	536
auN	2652.6
L50	23938
L90	69720
# N's per 100 kbp	0.00

Las Quemadas

	tube7_2_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	501554
# contigs (>= 1000 bp)	46129
# contigs (>= 5000 bp)	2545
# contigs (>= 10000 bp)	947
# contigs (>= 25000 bp)	258
# contigs (>= 50000 bp)	53
Total length (>= 0 bp)	308749422
Total length (>= 1000 bp)	106852775
Total length (>= 5000 bp)	32343850
Total length (>= 10000 bp)	21576633
Total length (>= 25000 bp)	11079001
Total length (>= 50000 bp)	3975956
# contigs	172283
Largest contig	166798
Total length	190831995
GC (%)	53.25
N50	1155
N90	564
auN	5503.0
L50	35469
L90	136258
# N's per 100 kbp	0.00

Luis Ebel

	tube9_2_final.contigs
# contigs (>= 0 bp)	171790
# contigs (>= 1000 bp)	39229
# contigs (>= 5000 bp)	6630
# contigs (>= 10000 bp)	2639
# contigs (>= 25000 bp)	651
# contigs (>= 50000 bp)	176
Total length (>= 0 bp)	217954715
Total length (>= 1000 bp)	155097912
Total length (>= 5000 bp)	89879848
Total length (>= 10000 bp)	62268251
Total length (>= 25000 bp)	32626480
Total length (>= 50000 bp)	16589954
# contigs	86909
Largest contig	383565
Total length	187796628
GC (%)	57.38
N50	4531
N90	732
auN	20053.2
L50	7474
L90	55613
# N's per 100 kbp	0.00

Fuente: Elaboración propia. Datos tomados de *análisis de calidad por QUAST* (Gurevich et al., 2013).

9.2 Anexo 2. Especies bacterianas infecciosas con peligro para la salud animal.

Enfermedad provocada	Agente etiológico
Actinobacilosis o “lengua de palo”	<i>Actinobacillus lignieresii</i>
Enfermedad por arañazo de gato	<i>Bartonella henselae</i>
Traqueobronquitis infecciosa	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>
Carbunco sintomático o “mancha”	<i>Clostridium chauvoei</i>
Enterotoxemia	<i>Clostridium perfringens</i>
Tetano	<i>Clostridium tetani</i>
Linfoadenitis caseosa	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
Foot-rot	<i>Dichelobacter nodosus</i>
Ehrlichiosis canina	<i>Ehrlichia canis</i>
Enfermedad intestinal	<i>Escherichia coli</i>
Necrobacilosis, Difteria, Foot-rot y Mastitis	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Leptospirosis</i>	<i>Leptospira spp.</i>
Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>
Enfermedad respiratoria bovina	<i>Mannheimia haemolytica</i>
Intoxicación por toxinas	<i>Microcystis aeruginosa</i>
Conjuntivitis infecciosa bovina o “pinkeye”	<i>Moraxella bovis</i>
Anemia infecciosa felina	<i>Mycoplasma haemofelis</i>
Pleuropneumonía contagiosa bovina	<i>Mycoplasma bovis</i>
Otitis externas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Infecciones de la piel (abscesos, pioderma, mastitis)	<i>Staphylococcus spp.</i>

Fuente: Elaboración propia. Datos tomados de (Beer, 1987; Cárdenas, 2023; Vadilla et al., 2002).

9.3 Anexo 3. Ejemplo de información taxonómica contenida en plantillas Excel obtenidas mediante la herramienta bioinformática Kraken2. Las columnas representan el nombre taxonómico (name), nivel taxonómico (lvl_type) y el total de lecturas por taxonomía identificada (total_all).

#perc	tot_all	tot_lvl	1_all	1_lvl	2_all	lvl_type	taxid	name
309.867	122166662	122166662	3212695	3212695	5009882	U	0	unclassified
690.133	272089106	40263	12113436	1041	13359543	R	1	root
689.894	271994817	28121	12112047	512	13357915	R1	131567	cellular organisms
688.933	271615828	498779	12109565	14055	13354288	D	2	Bacteria
675.954	266498763	551412	12032867	21792	13170772	P	1224	Pseudomonadota
659.237	259908087	989177	11873371	38440	12738549	C	1236	Gammaproteobacteria
435.971	171884063	5071	8273093	306	9622888	O	72274	Pseudomonadales
435.934	171869562	259998	8272087	13005	9622105	F	135621	Pseudomonadaceae
435.145	171558409	41492206	8256544	1371079	9602653	G	286	Pseudomonas
168.272	66342253	22281602	2472404	935010	2702710	G1	196821	unclassified Pseudomonas
20.479	8074050	8074050	207192	207192	3641	S	2825975	Pseudomonas sp. SCA2728.1_7
0.0002	770	770	1	1	0	S1	1448140	Pseudomonas aeruginosa YL84

Fuente: Elaboración propia. Datos tomados de resultados Kraken2 (Wood et al., 2019).