
Coselección de bacterias resistentes a carba- penémicos y tolerantes a metales pesados en ambientes acuáticos contaminados de Gua- temala: caso de la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos

María Gabriela Castillo Mejía



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Coselección de bacterias resistentes a
carbapenémicos y tolerantes a metales
pesados en ambientes acuáticos
contaminados de Guatemala: caso de la
microcuenca de los ríos Contreras y
Villalobos**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
María Gabriela Castillo Mejía
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología
Guatemala, 2025

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Coselección de bacterias resistentes a
carbapenémicos y tolerantes a metales
pesados en ambientes acuáticos
contaminados de Guatemala: caso de la
microcuenca de los ríos Contreras y
Villalobos**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
María Gabriela Castillo Mejía
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología
Guatemala, 2025

Vo.Bo.:



(f)

Ph.D. Dalia Lau-Bonilla

Tribunal Examinador:



(f)

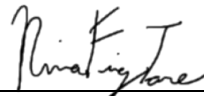
Ph.D. Dalia Lau-Bonilla

(f)



PhD. Kristina Ríos

(f)



Lcda. Nina Figueroa

Fecha de aprobación: Guatemala, 18 de junio de 2025.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y a la Universidad del Valle de Guatemala que hicieron posible la realización de esta investigación.

En primer lugar, agradezco profundamente a mi asesora, Ph.D. Dalia Lau, por su guía constante, sus valiosas observaciones y su apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso. Agradezco especialmente a la Ph.D. Patrizia Lupo, quien fue un pilar fundamental para el desarrollo de esta nueva línea de investigación y me acompañó de forma incondicional durante cada etapa del camino.

Extiendo mi gratitud al comité evaluador, a la Ph.D. Kristina Ríos, por su apoyo profesional y emocional, y a la Lcda. Nina Figueroa, por sus aportes valiosos durante la evaluación de este trabajo.

Agradezco sinceramente a la jefa del Laboratorio de Bioquímica y Microbiología, Lcda. Christa Contreras,

así como al departamento en general, por facilitarme los recursos y el espacio necesarios para llevar a cabo esta investigación.

A mis amistades Ximena, Andrés, Ángela, Mariana, Carlos, Beverly y Fofó, y a todos mis profesores que contribuyeron a mi formación profesional, gracias por su apoyo, su compañía y por compartir conmigo esta aventura.

Finalmente, agradezco con todo mi corazón a mi madre, por apoyarme siempre en estas locuras; a mi padre, por brindarme la oportunidad de acceder a una educación superior; y a mi hermana, por darme el ánimo y la confianza para culminar esta etapa.

Gracias, Dios. . . ¡Lo logramos!

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| Agradecimientos | iv |
| Lista de figuras | xiii |
| Lista de cuadros | xiv |
| Resumen | xvi |
| Abstract | xviii |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Objetivos | 5 |
| 2.1. Objetivo general | 5 |
| 2.2. Objetivos específicos | 5 |
| 3. Justificación | 7 |
| 4. Marco contextual | 10 |
| 5. Marco teórico | 12 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.1. | Resistencia bacteriana a los antibióticos | 12 |
| 5.1.1. | Carbapenemasas | 13 |
| 5.1.2. | División de los β -lactámicos . | 14 |
| 5.1.3. | Clasificación de los β -lactámicos | 15 |
| 5.2. | Enterobacterias | 16 |
| 5.2.1. | Enterobacterias resistentes a carbapenemasas (ERC) . . . | 17 |
| 5.3. | Carbapenemasas y genes de resistencia | 18 |
| 5.3.1. | Carbapenemasas de clase A . | 18 |
| 5.3.2. | Clase A β -lactamasas | 20 |
| 5.3.3. | <i>Klebsiella pneumoniae</i> resis- tente a carbapenémicos (KPC) | 21 |
| 5.3.4. | Metalo- β -lactamasas (MBL) . | 24 |
| 5.3.5. | Clasificación y diversidad de las Metalo- β -lactamasas (MBL) . | 25 |
| 5.3.6. | Metalo- β -lactamasas de Nueva Delhi (NDM) | 26 |
| 5.3.7. | Metalo- β -lactamasas de Vero- na codificadas por integrón (VIM) | 27 |
| 5.3.8. | Imipenemasa (IMP) | 28 |
| 5.3.9. | Clase D β -lactamasas | 29 |
| 5.3.10. | Las β -lactamasas hidrolizantes de oxacilina 48 (OXA-48-like) y sus variantes | 30 |
| 5.4. | Resistencia a los antimicrobianos en ríos urbanos | 31 |
| 5.4.1. | Bacterias productoras de carba- penemasas recuperadas de eco- sistemas fluviales | 32 |
| 5.5. | Coselección de resistencia a múltiples antibióticos en bacterias patógenas en cuerpos de agua contaminados con me- tales pesados | 35 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.5.1. | Gen integrón-integrasa de clase 1 (<i>intI1</i>) | 38 |
| 5.5.2. | Elemento ISCR1: Región común de la secuencia de inserción | 39 |
| 5.6. | Cuerpos de agua en Guatemala | 42 |
| 5.6.1. | Microcuenca río Contreras | 42 |
| 5.6.2. | Río Villalobos | 44 |
| 5.7. | Guatemala en el contexto de resistencia a carbapenémicos | 46 |
| 5.7.1. | Incidencia de infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas en Guatemala | 46 |
| 6. | Alcance | 48 |
| 7. | Metodología | 52 |
| 7.1. | Diseño metodológico | 52 |
| 7.1.1. | Diseño, enfoque y tipo de investigación | 52 |
| 7.1.2. | Población y muestra | 53 |
| 7.1.3. | Población | 53 |
| 7.1.4. | Muestra | 53 |
| 7.2. | Criterios de inclusión y exclusión | 53 |
| 7.2.1. | Variables | 55 |
| 7.2.2. | Hipótesis | 56 |
| 7.3. | Metodología | 57 |
| 7.3.1. | Recolección de muestras | 57 |
| 7.3.2. | Determinación de metales pesados: plomo, cadmio y arsénico | 59 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 7.3.3. | Detección, identificación y aislamiento de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) mediante el medio selectivo CHROMagar mSuperCARBA® | 60 |
| 7.3.4. | Extracción de ADN de las cepas resistentes a carbapenémicos | 61 |
| 7.3.5. | Identificación de genes codificantes de carbapenemasas mediante PCR múltiple | 63 |
| 7.3.6. | Análisis de qPCR y PCR para los genes móviles relacionados con la resistencia a metales <i>intl1</i> e <i>ISCR1</i> | 63 |
| 7.3.7. | Secuenciación de las muestras positivas para resistencia a genes carbapenémicos y genes móviles relacionados con la resistencia a metales <i>intl1</i> e <i>ISCR1</i> | 64 |
| 7.3.8. | Análisis bioinformático | 65 |
| 8. | Resultados | 68 |
| 8.1. | Resultados fenotípicos | 68 |
| 8.1.1. | Identificación y distribución fenotípica de enterobacterias en los ríos Contreras y Villalobos | 68 |
| 8.1.2. | Caracterización bioquímica de bacterias aisladas de los ríos Contreras y Villalobos mediante API20E y prueba de oxidasa | 72 |
| 8.2. | Resistencia bacteriana en los ríos Contreras y Villalobos a carbapenémicos | 74 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 8.2.1. | Resistencia bacteriana en los ríos Contreras y Villalobos evaluada mediante CHROMagar TM mSuperCARBA [®] y Meropenem [®] | 74 |
| 8.2.2. | Evaluación comparativa de la resistencia bacteriana a carbapenémicos (Meropenem [®] e Imipenem + Cilastatina [®] y una combinación de ambos) en cepas aisladas de los ríos Contreras y Villalobos | 75 |
| 8.3. | Extracción de ADN | 77 |
| 8.4. | Detección de genes codificantes de carbapenemasa | 78 |
| 8.4.1. | Detección de genes móviles relacionados con la resistencia a metales pesados <i>ISCR1</i> | 80 |
| 8.5. | Cuantificación del gen <i>Int11</i> relacionado con metales pesados por medio de qPCR | 81 |
| 8.6. | Análisis bioinformático de la secuenciación- <i>tag</i> de enterobacterias resistentes a carbapenémicos y metales pesados | 87 |
| 8.7. | Identificación molecular de las enterobacterias resistentes a carbapenémicos y metales pesados | 90 |
| 8.8. | Determinación de metales pesados en muestras de agua de los ríos Villalobos y Contreras mediante ASV | 94 |
| 9. | Discusión | 96 |
| 10. | Conclusiones | 116 |

| | |
|---------------------------|------------|
| 11.Recomendaciones | 118 |
| 12.Bibliografía | 120 |
| 13.Anexos | 142 |
| 13.1. POE I | 143 |
| 13.2. POE II | 148 |
| 13.3. POE III | 153 |
| 13.4. POE IV | 159 |
| 13.5. POE V | 164 |

Lista de figuras

| | | |
|------|--|----|
| 5.1. | Ejemplos de MBL cromosómicos y asociados a plásmidos (Boyd et al., 2020). | 23 |
| 5.2. | Vista satelital de la microcuenca del río Contreras, ubicada en la zona nororiente de la Ciudad de Guatemala, mostrando su integración en el entorno urbano y áreas naturales cercanas . . | 43 |
| 5.3. | Vista satelital del río Villalobos y sus alrededores en Villa Nueva, Guatemala, destacando zonas residenciales cercanas como Condado Catalina y Residenciales Villalobos. | 45 |
| 7.1. | Selección de puntos de muestreo en el río Villalobos, entrando desde la carretera CA-9. Elaborado con QGIS versión 3.28 | 58 |
| 7.2. | Selección de puntos de muestreo en la microcuenca del río Contreras, entrando desde la UVG. Elaborado con QGIS versión 3.28 | 58 |

| | | |
|-------|--|----|
| 8.1. | Dispersión de géneros bacterianos en el río Contreras por punto de muestreo y dilución | 69 |
| 8.2. | Dispersión de géneros bacterianos en el río Villalobos por punto de muestreo y dilución | 70 |
| 8.3. | Distribución de los géneros bacterianos en los ríos Contreras y Villalobos . . | 71 |
| 8.4. | Cuadro 6.5. Comparación de especies según CHROMagar TM mSuperCARBA [®] y API20E, además de la prueba de oxidasa en cepas de ambos ríos . . . | 73 |
| 8.5. | Distribución del conteo de colonias bacterianas resistentes tras la filtración de agua en Meropenem [®] (4 µg/mL), aisladas en CHROMagar TM mSuperCARBA [®] a partir de muestras del río Contreras y Villalobos | 74 |
| 8.6. | Mapa de calor para el perfil de resistencia de aislamientos bacterianos obtenidos en los ríos Contreras y Villalobos con respecto a diferentes antibióticos carbapenémicos | 76 |
| 8.7. | Detección de genes codificantes para carbapenemasas (<i>blaVIM</i> , <i>blaKPC</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaOXA48-like</i> y <i>blaNDM</i>) | 79 |
| 8.8. | Detección de gen MGE ISCR en cepas ERC | 80 |
| 8.9. | Curva de disociación para el gen <i>Int11</i> en las muestras de los ríos Contreras y Villalobos | 81 |
| 8.10. | Abundancia relativa del gen <i>Int11</i> en los ríos Contreras y Villalobos | 83 |

| | |
|--|----|
| 8.11. Distribución de la abundancia relativa del gen <i>Intl1</i> según la presencia del gen <i>ISCR1</i> | 84 |
| 8.12. Distribución de la abundancia relativa del gen <i>Intl1</i> según la presencia del gen <i>blaNDM</i> | 85 |
| 8.13. Distribución de la abundancia relativa del gen <i>Intl1</i> según la presencia del gen <i>blaKPC</i> | 86 |
| 8.14. Calidad de secuencias analizadas de cepas resistentes a carbapenémicos (ERC) en el río Contreras y Villalobos mediante <i>fastQC</i> | 88 |
| 8.15. Identificación molecular de las cepas resistentes a carbapenémicos (ERC) en los ríos Contreras y Villalobos | 90 |
| 8.16. Identificación molecular de las cepas resistentes a carbapenémicos (ERC) en el río Contreras y Villalobos | 93 |
| 8.17. Concentración de metales pesados en los ríos Villalobos y Contreras analizados mediante ASV. | 95 |

Lista de cuadros

| | | |
|------|---|----|
| 7.1. | Concentración mínima inhibitoria (MIC) con antibióticos carbapenémicos Meropenem [®] e Imipenem [®] en medio CHROMagar mSuperCARBA [®] | 61 |
| 7.2. | Cuantificación y pureza de las muestras resistentes a carbapenémicos mediante NanoDrop [™] (Thermo Scientific [™]) . . . | 62 |
| 7.3. | Clasificación de las cepas (ERC) seleccionadas para la comprobación de genes específicos mediante secuenciación tipo <i>tag</i> | 65 |
| 8.1. | Quantification and purity of carbapenem-resistant isolates using Thermo Scientific [™] NanoDrop [™] | 78 |
| 8.2. | Concentraciones de Pb, Cd y As detectadas mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV). | 94 |

La resistencia bacteriana a antibióticos de importancia clínica, especialmente a carbapenémicos, constituye una amenaza creciente para la salud pública y los ecosistemas acuáticos, particularmente en áreas con descargas de aguas residuales urbanas. Este estudio evaluó la presencia y caracterización de bacterias resistentes a carbapenémicos en los ríos Contreras y Villalobos, Ciudad de Guatemala, con el objetivo de identificar su potencial como reservorios de genes de resistencia y su relación con elementos genéticos móviles. Se recolectaron muestras de agua superficial en varios puntos, las cuales fueron filtradas mediante membranas de $0.45 \mu\text{m}$ y cultivadas en medio cromogénico CHROMagar™ mSuperCARBA® suplementado con Meropenem® e Imipenem® + Cestaleina. Las cepas aisladas fueron caracterizadas fenotípicamente mediante el sistema API20E y la prueba de oxidasa. Posteriormente, se extrajo ADN con el método PCI y se realizaron PCRs específicos para los genes *bla*NDM, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*IMP,

blaVIM, así como para los elementos *ISCR1* e *Intl1*. Los productos amplificados se secuenciaron y se analizaron con las bases de datos *ResFinder* y *CARD* para confirmar su identidad y perfil de resistencia. Los resultados revelaron la presencia de cepas pertenecientes a *Escherichia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, portadoras de los genes *blaKPC*, *blaOXA-48-like* y *blaNDM*, junto con elementos móviles *ISCR1* e *Intl1*. Estos hallazgos evidencian que los ríos actúan como reservorios de resistencia y como posibles focos de diseminación por transferencia horizontal de genes, representando un riesgo para la salud pública y el medio ambiente. Se destaca la necesidad de fortalecer el monitoreo ambiental y aplicar medidas integrales de control de contaminación para mitigar la propagación de resistencia antimicrobiana en entornos acuáticos urbanos.

Bacterial resistance to clinically important antibiotics, especially carbapenems, constitutes a growing threat to public health and aquatic ecosystems, particularly in areas receiving discharges of urban wastewater. This study evaluated the presence and characterization of carbapenem-resistant bacteria in the Contreras and Villalobos rivers, Guatemala City, with the aim of identifying their potential as reservoirs of resistance genes and their association with mobile genetic elements. Surface water samples were collected at various sites, filtered through 0.45 μm membranes, and cultured on chromogenic medium CHROMagarTM mSuperCARBA[®] supplemented with Meropenem[®] and Imipenem[®] + Cestaleina. The isolated strains were phenotypically characterized using the API20E system and the oxidase test. Subsequently, DNA was extracted using the PCI method, and specific PCR assays were performed for the genes *bla*NDM, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*IMP, *bla*VIM, as well as for the elements *ISCR1* and *Int11*. The ampli-

fied products were sequenced and analyzed using the *ResFinder* and *CARD* databases to confirm their identity and resistance profile. The results revealed the presence of strains belonging to *Escherichia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, and *Pseudomonas*, carrying the *blaKPC*, *blaOXA-48-like*, and *blaNDM* genes, along with the mobile elements *ISCR1* and *Int11*. These findings show that rivers act as resistance reservoirs and potential foci for dissemination through horizontal gene transfer, posing a risk to public health and the environment. This underscores the need to strengthen environmental monitoring and implement comprehensive pollution control measures to mitigate the spread of antimicrobial resistance in urban aquatic environments.

CAPÍTULO 1

Introducción

La resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas actuales para la salud mundial. En mayo de 2024, la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualizó su lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana, incorporando cuatro nuevas combinaciones y clasificándolas en categorías de prioridad crítica, alta y media, según su morbilidad y la urgencia de intervenciones específicas para combatirlas (OMS, 2024). Este problema es especialmente preocupante en países de ingresos medios y bajos, como Guatemala, donde la limitada regulación del uso de antibióticos y la falta de estrategias efectivas de control agravan la situación.

En países en desarrollo, la resistencia a los antimicrobianos es impulsada por la alta incidencia de enfermedades infecciosas, el uso excesivo de antibióticos por automedicación, su aplicación sistemática como promotores del crecimiento en la industria pe-

cuaria y la deficiente implementación de regulaciones para el manejo de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (Acharya & Wilson, 2019). Estos factores reflejan la dinámica de la resistencia bacteriana y la necesidad de adaptar nuevas estrategias para su control (World Health Organization, 2024).

En Guatemala, la resistencia bacteriana a los carbapenémicos es un problema emergente de gran preocupación, especialmente en entornos hospitalarios. Según el Instituto de Patología Tropical, la implementación de sistemas de vigilancia y protocolos para el manejo de la RAM ha permitido identificar microorganismos con alta resistencia, entre ellos *Escherichia coli*, con 15 genes diferentes en dos plásmidos; *Acinetobacter baumannii*, portadora del gen resistente a carbapenémicos *OXA-23*; y *Pitti*, portadora del gen NDM-1. Además, *Enterococcus* spp. y otras especies multirresistentes han sido detectadas en infecciones intrahospitalarias, lo que representa un desafío crítico para la salud pública (Instituto de Patología Tropical – UFG, 2014).

El primer aislamiento de bacterias productoras de carbapenemasas en Guatemala se registró en 2010. Para 2020, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, a través del Departamento de Epidemiología, alertó sobre el primer hallazgo de carbapenemasas de tipo OXA-48 en el país. El Laboratorio Nacional de Salud confirmó la presencia de esta enzima en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, lo que resalta la importancia de la vigilancia y detección de este mecanismo de resistencia en todos los esta-

blecimientos de salud. La presencia de esta enzima en bacterias incrementa la morbilidad y mortalidad de las infecciones asociadas a la atención en salud (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, 2020).

A pesar de la creciente preocupación por la resistencia bacteriana mediada por carbapenemasas en Guatemala, pocos estudios han abordado su relación con la contaminación ambiental en ecosistemas acuáticos. La microcuenca del río Contreras, ubicada en la cuenca del río Las Vacas, es una de las zonas con mayores problemas ambientales y de seguridad hídrica en la región metropolitana del país. Por otra parte, el río Villalobos, también en la región metropolitana, presenta una alta contaminación debido a la expansión y falta de infraestructura de saneamiento en los municipios de Villa Nueva, San Miguel Petapa y Villa Canales, lo que ha contribuido al vertido directo de desechos sólidos y líquidos en el río (Fuentes Montepeque, 2015). El río Villalobos desemboca en el lago de Amatitlán, conectado a otras subcuencas que forman parte de la cuenca del río Motagua (AIDA, 2025). Ambos ecosistemas reciben descargas de aguas residuales domésticas, hospitalarias e industriales, lo que genera un ambiente propicio para la propagación de bacterias resistentes y la dispersión de genes de resistencia (Urrutia, 2020).

Las actividades antropogénicas son responsables de la co-contaminación de sistemas hídricos. La inclusión de metales pesados como cobre (Cu) y arsénico (As), provenientes de la acuicultura, fertilizantes, la

industria de la construcción y pesticidas, contribuye a la contaminación ambiental. Esta coexposición de bacterias a metales pesados y antibióticos sugiere una contaminación conjunta que favorece la propagación de la multirresistencia a antibióticos impulsada por estos metales (Song et al., 2019; Squadrone, 2020).

No obstante, en Guatemala no existen estudios previos que analicen la relación entre la contaminación por metales pesados y la resistencia a los carbapenémicos en entornos acuáticos. Esta investigación tiene como objetivo determinar la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos en bacterias aisladas de la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos, y su relación con la contaminación por metales pesados.

2.1. Objetivo general

- Determinar la presencia de bacterias resistentes a carbapenémicos en la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos, así como su posible relación con la contaminación por metales pesados.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar bacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos por medio de la metodología en placa en CHROMagar mSuper CARBA[®].
- Determinar la prevalencia y distribución de los genes codificantes de carbapenemasas *blaVIM*, *blaKPC*, *blaIMP*, *blaOXA48-like* y *blaNDM* pre-

senten en las bacterias aisladas de la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos mediante PCR, con el fin de evaluar la propagación de la resistencia a antibióticos.

- Establecer la relación entre los genes móviles de resistencia a metales pesados *intI1* e *ISCR1* con la resistencia a carbapenémicos mediante PCR y qPCR.
- Analizar el agua de la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos para determinar la presencia y concentración de metales pesados mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV).

En los últimos años, la resistencia bacteriana ha incrementado su ritmo de propagación debido al uso desmedido de antibióticos. La selección de bacterias resistentes se ha observado en diversos entornos, siendo los ecosistemas de agua dulce y marinos particularmente afectados, ya que reciben efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, escorrentías de actividades agrícolas y otros insumos antropogénicos que incrementan la cantidad de bacterias resistentes a los antibióticos (Squadrone, 2020). Asimismo, se ha evidenciado que los metales pesados presentes en cuerpos de agua pueden conferir mecanismos de resistencia a los metales (MR) y, simultáneamente, favorecer la resistencia a los antibióticos. Ambos mecanismos suelen encontrarse codificados en plásmidos, lo que indica la existencia de coresistencia en bacterias que poseen ambas características (Pal et al., 2017; Squadrone, 2020).

En Guatemala se han realizado pocos estudios sobre la detección de genes de carbapenemasas. En diciembre de 2011, el país fue el primero en Latinoamérica en confirmar la presencia de una bacteria productora de carbapenemasa tipo NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase) (Mora et al., 2017). En julio de 2010, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) emitió una alerta epidemiológica por la diseminación de carbapenemasas en *K. pneumoniae* en Latinoamérica, notificando a la red hospitalaria del Laboratorio Nacional de Salud (LNS). En 2013, se reportó la detección fenotípica y genotípica de carbapenemasas en enterobacterias BLEE+ provenientes de hospitales de un grupo privado en la Ciudad de Guatemala, así como en cepas almacenadas por el LNS en 2012. Estos análisis identificaron el gen *blaNDM-1* en el 19 % (22/118) de las muestras y el gen *blaKPC-2* en el 16 % (19/118) (Chinchilla et al., 2013). En 2017, en el Hospital General San Juan de Dios, se determinó la presencia del gen *blaNDM* en el 90.7 % (49/54) de los aislamientos de *K. pneumoniae* (Velásquez Porta & Lau Bonilla, 2017). Finalmente, en 2021, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social reportó la detección del gen *blaOXA-48-like* en cuatro aislamientos de *K. pneumoniae* y uno de *E. coli*, provenientes de distintos hospitales nacionales (Pasteran et al., 2012; Velásquez Porta & Lau Bonilla, 2017).

Estos hallazgos evidencian la amplia diseminación de este mecanismo de resistencia desde el primer caso reportado en el Hospital General San Juan de Dios. Por ello, resulta crucial diseñar estrategias de moni-

toreo y mitigación en cuerpos de agua contaminados, ya que estos descubrimientos pueden servir como base para la implementación de políticas de salud pública en el país. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo determinar la presencia de bacterias resistentes a carbapenemasas en la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos, así como su relación con la contaminación por metales pesados, con el fin de prevenir la diseminación de estos mecanismos de resistencia en fuentes hídricas, dada la amenaza que representan para la población guatemalteca.

Una investigación desarrollada en 2023 en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, en Quetzaltenango, evaluó la eficacia del medio cromogénico CHROMagar mSuperCARBA para la detección fenotípica de bacterias productoras de carbapenemasas, en comparación con la técnica de PCR como estándar de referencia. El estudio reportó una sensibilidad de 97.7 % y un valor predictivo positivo (VPP) de 99.0 %, aunque con una especificidad más baja (64.9 %) y un valor predictivo negativo (VPN) de 45.3 %. Además, se identificó la presencia de genes de carbapenemasas en muestras fecales humanas, siendo el gen *blaNDM* el más prevalente (17.7 %), seguido del gen *blaIMP* (3.6 %), y sin detección del gen *blaKPC*. Los hallazgos pusieron en evidencia la existencia de múltiples falsos positivos al utilizar únicamente el método en placa, lo cual resalta la importancia de complementar las técnicas fenotípicas con herramientas

moleculares para mejorar la vigilancia epidemiológica (Yantuche Menchú, 2023).

En el año 2022 se realizó un estudio en Guatemala titulado *Evaluación de resistencia a Imipenem y Meropenem en enterobacterias aisladas del Río Villalobos, en Guatemala*, en el cual se evidenció la presencia de enterobacterias resistentes a carba-penémicos, específicamente en tres cuencas del río Villalobos. Se reportó que *Klebsiella pneumoniae* fue la especie más frecuente, mostrando resistencia tanto a Imipenem como a Meropenem, con mayor índice al primero. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre las cuencas. Se concluyó que las aguas del río Villalobos constituyen un reservorio ambiental importante para la diseminación de bacterias resistentes. Este hallazgo resalta la necesidad de continuar con la caracterización genética de los mecanismos de resistencia, así como de evaluar la multirresistencia a otras clases de antibióticos, con el fin de comprender mejor el impacto epidemiológico de estos patógenos en el ambiente (Cabrerera Jérez, 2022).

5.1. Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos es una problemática actual significativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista actualizada de patógenos resistentes a antimicrobianos. En prioridad crítica que necesita nuevas opciones de tratamiento se encuentran *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y Enterobacterias resistentes a carbapenémicos, con la producción de carbapenemasas como mecanismo más frecuente (OMS, 2024). Las *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos, especialmente *Klebsiella pneumoniae*, han surgido como causas importantes de morbilidad y mortalidad entre las infecciones adquiridas en el hospital y asociadas con cuidados a largo plazo (Venter, 2019).

5.1.1. Carbapenemasas

Los carbapenémicos son antibióticos betalactámicos con un amplio espectro de actividad contra numerosos microorganismos Gram positivo y Gram negativo, tanto aerobios como anaerobios. Se emplean para tratar infecciones graves potencialmente mortales que no responden a la terapia antibiótica estándar. Los carbapenémicos se unen a las *PBP* (*Penicillin Binding Protein*), proteínas bacterianas principalmente transpeptidasas y transglicosilasas que son esenciales en la síntesis del peptidoglicano que forma las paredes celulares de las bacterias (Lai et al., 2022). Esto altera la integridad de la pared celular bacteriana y causa apoptosis. El mecanismo de acción es similar al de los antibióticos betalactámicos y las cefalosporinas; sin embargo, los carbapenémicos presentan una estructura de anillo betalactámico fusionado, resistente a la mayoría de las betalactamasas producidas por bacterias con el fin de inactivar antibióticos similares a la penicilina. Los carbapenémicos son muy eficaces en el tratamiento de infecciones causadas por *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, enterobacterias y muchas especies de *Pseudomonas*, *Bacteroides* y *Acinetobacter* (Wanger et al., 2017).

Los carbapenémicos son fármacos de último recurso utilizados para el tratamiento de las infecciones resistentes a múltiples fármacos (MDR). La propagación de la resistencia a los carbapenémicos constituye una crisis sanitaria mundial. Estos inhiben la síntesis de la pared celular. Los cuatro carbapenémicos más utilizados clínicamente son: meropenem, doripe-

nem, ertapenem e imipenem (Potter et al., 2016). La resistencia a los antibióticos de las bacterias Gram negativo se produce mediante diversos mecanismos, entre los que se incluyen: la alteración del sitio blanco en ciertos antibióticos, el incremento de la expresión de los sistemas de eflujo, la alteración de la permeabilidad de la membrana externa por pérdida de porinas y la producción de enzimas que inactivan los antibióticos, siendo las betalactamasas las más prevalentes (Rada et al., 2018). Estas enzimas escinden el enlace amida en el anillo betalactámico y se consideran el principal mecanismo de resistencia a la familia de antibióticos betalactámicos.

Su clasificación se basa tradicionalmente en la estructura primaria o en las características funcionales. Ambler las agrupa en cuatro clases moleculares (A a D) a partir de la secuencia de aminoácidos, mientras que Bush las clasifica en grupos funcionales según la inhibición de las clases específicas de betalactámicos y en las propiedades de inactivación de los inhibidores de betalactamasas (Ambler et al., 1997; Bush et al., 1995).

5.1.2. División de los β -lactámicos

Los betalactámicos se dividen en cuatro grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carba-penémicos. Estos comparten una estructura molecular y un mecanismo de acción comunes, inhibiendo las transpeptidasas, que catalizan la reticulación de pép-

tidos durante las etapas finales de la biosíntesis de la pared celular. Esto provoca que las paredes celulares bacterianas se debiliten y se rompan bajo presión osmótica. Los carbapenémicos, siendo una subclase de los betalactámicos, son antibióticos muy eficaces, especialmente contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, y se reservan con frecuencia para infecciones multirresistentes. Poseen una variación única en su estructura molecular central: además del anillo betalactámico, contienen un anillo carbapenémico que les confiere una estabilidad excepcional frente a la mayoría de las enzimas betalactamasas que pueden inactivar otros betalactámicos (Hughes et al., 2019).

5.1.3. Clasificación de los β -lactámicos

Entre los grupos funcionales, se encuentra el grupo 1, en el que se ubican las cefalosporinas de clase molecular C, las cuales son activas contra las cefalosporinas de tercera generación y las cefamicinas, como el cefoxitín. Asimismo, estas son resistentes a la acción inhibidora del ácido clavulánico y del sulbactam, y poseen una gran afinidad frente al aztreonam (Bush et al., 1995).

Ahora bien, en el grupo 2, correspondiente a las clases moleculares A y D, se incluyen las serin-betalactamasas y múltiples subgrupos, de los cuales los de mayor importancia clínica son dos subgrupos de la clase A: las betalactamasas de espectro extendido, que hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro

y antibióticos monobactámicos (inhibidas por el ácido clavulánico), y las serin-carbapenemasas, con capacidad de hidrolizar toda clase de betalactámicos. Las de clase D presentan propiedades de hidrólisis frente a los carbapenémicos (Walther-Rasmussen & Høiby, 2006).

Finalmente, las betalactamasas que requieren iones divalentes de zinc se clasifican en el grupo 3 como metalo- β -lactamasas de clase molecular B. Se diferencian inicialmente por su habilidad para hidrolizar carbapenémicos, en contraste con su baja afinidad o capacidad hidrolítica frente a los monobactámicos. Además, no son inhibidas por el ácido clavulánico o el tazobactam, pero sí por quelantes de iones metálicos como el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) (Laraki et al., 1999).

5.2. Enterobacterias

Las enterobacterias son una familia diversa de *Gamma*proteobacteria que incluye bacterias comunes como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y menos frecuentes, como *Proteus mirabilis*, *Raoultella planticola* y *Citrobacter freundii*, todas ellas patógenos humanos con creciente resistencia a antibióticos. La resistencia a carbapenémicos surge por la hidrólisis de los β -lactámicos mediante enzimas carbapenemasas especializadas o por cambios en la permeabilidad de la membrana, a través de

mutaciones en las bombas de eflujo o en porinas, acopladas con la expresión de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Potter et al., 2016). Las BLEE se definen como enzimas producidas por bacterias que pueden hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido como ceftazidima, ceftriaxona y aztreonam, además de penicilinas (Lai et al., 2022). Las carbapenemasas provienen de la clasificación de Ambler: clase A (serina β -lactamasas), clase D (oxacilinasas) y clase B (metalo- β -lactamasas, MBLs).

5.2.1. Enterobacterias resistentes a carbapenemasas (ERC)

Las enterobacterias productoras de carbapenemasas (ERC) se describen como “superbacterias”, debido a que presentan resistencia a los antibióticos carbapenémicos —considerados fármacos de último recurso para infecciones— junto con otros antibióticos β -lactámicos. Su resistencia se debe a la producción de la enzima carbapenemasa, que hidroliza y desactiva la molécula del fármaco. Ejemplos incluyen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* y el complejo *Enterobacter cloacae*. Muchos de los genes que codifican carbapenemasas se encuentran en plásmidos que pueden transferirse entre bacterias, lo que incrementa la probabilidad de diseminación de este tipo de resistencia (Hughes et al., 2019).

Las ERC pueden encontrarse en portadores asintomáticos. Estas bacterias comprenden una amplia

familia de bacilos Gram negativo que comúnmente colonizan a los humanos y, en ocasiones, causan enfermedades. Son anaerobios facultativos que residen frecuentemente en el tracto intestinal, formando parte de la microbiota intestinal normal. Las enterobacterias patógenas frecuentes incluyen *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Yersinia pestis*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*. Se ha observado que las cepas resistentes a carbapenémicos como *K. pneumoniae* (KPC — Clase A), metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM — Clase B), metalo- β -lactamasa codificada por el integrón de Verona (VIM — Clase B), metalo- β -lactamasa imipenemasa (IMP — Clase B) y variantes de oxacilinasas-48 (OXA-48 — Clase D) son las más comunes en las Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas.

5.3. Carbapenemasas y genes de resistencia

5.3.1. Carbapenemasas de clase A

La primera carbapenemasa de clase A se informó en 1990 en un aislado de *Serratia marcescens* del Reino Unido. Posteriormente, se identificaron muchas carbapenemasas de clase A después del descubrimiento de la enzima de *S. marcescens* (*blaSME-1*), incluidas la enzima de espectro extendido de Guayana (*blaGES-2*), la carbapenemasa de *K. pneumoniae* (*blaKPC*), la imipenemasa/no-metalocarbapenemasa-A (*blaI-*

IMI/NMC), la carbapenemasa *Serratia fonticola* uno (*blaSPC-1*) y *blaSHV-38*. Muchas variantes de *blaGES* son únicamente BLEE, pero las mutaciones puntuales frecuentes confieren mayores propiedades hidrolíticas contra carbapenémicos en variantes específicas. El alineamiento filogenético de los genes de carbapenemasas de clase A determinó que *blaSME*, *blaGES*, *blaKPC* y *blaIMI/NMC* constituyen un grupo separado de *blaSFC-1* y *blaSHV-38*. Las carbapenemasas de clase A son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. La KPC es la carbapenemasa de clase A más común en enterobacterias. Los casos esporádicos de enzimas previamente descubiertas, como SME y NMC, así como el hallazgo de nuevos genes, requieren caracterización molecular para identificar carbapenemasas potencialmente pandémicas antes de su propagación (Nordmann et al., 2011; Potter et al., 2016).

Las carbapenemasas de clase A pertenecen al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush y comprenden cinco grupos principales: SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBS. Los grupos SME, IMI y NMC son principalmente de codificación cromosómica y nunca se han detectado en especies de *Pseudomonas*. Las enzimas pertenecientes al grupo SME (1 a 3) se han detectado únicamente en *Serratia marcescens*, mientras que las IM (1 y 2) y NMC-A se han encontrado en especies de *Enterobacter*. Las enzimas NMC-A (no metalo-carbapenemasas de la clase A) se identificaron en 1990 en un aislamiento clínico de *E. cloacae* con resistencia a ampicilina, cefalotina e imipenem, pero

con sensibilidad al cefoxitín y a las cefalosporinas de espectro extendido. El gen se codificó en el cromosoma de este microorganismo y presentó características fenotípicas diferentes a las de todas las carbapenemasas descritas previamente. Posteriormente, en los años 2003 y 2006, se identificaron en aislamientos de *E. cloacae* en Seattle (Washington) y Nueva York; en 2004 en Argentina; y en 2012 en Finlandia (Rada et al., 2018).

5.3.2. Clase A β -lactamasas

Las carbapenemasas de clase A se han detectado en *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella* spp. y otras. Las familias enzimáticas principales incluyen: no metalocarbapenemasa A (NMC), betalactamasa no hidrolizante de imipenem (IMI), enzima de *S. marcescens* (SME), enzima Guayana de espectro extendido betalactamasa (GES) y *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC). Estas hidrolizan eficientemente las penicilinas, todas las cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos y algunos inhibidores de betalactamasas (Angles-Yanqui et al., 2020).

5.3.3. *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos (KPC)

Desde su identificación inicial en 1996 en Carolina del Norte, las cepas productoras de KPC se han propagado por todo el mundo, causando importantes brotes hospitalarios en América del Norte, Europa, Asia y América Latina. Esto ha llevado a una reducción de las opciones terapéuticas, resultando en altas tasas de mortalidad y morbilidad, un aumento en la duración de la estancia hospitalaria y mayores costos asociados (Ocampo et al., 2015).

En 2001 se descubrió una cepa resistente a carbapenémicos de *K. pneumoniae* con el gen *blaKPC* en Estados Unidos (Carolina del Norte). Este gen es, en gran medida, responsable de conferir resistencia a carbapenémicos en infecciones por CRE en el hemisferio occidental (Potter et al., 2016).

A diferencia de otras carbapenemasas de clase A como *blaNMC* y *blaSME*, el gen *blaKPC* es transmitido por plásmidos, lo que facilita la rápida aparición de enterobacterias distintas de *K. pneumoniae*. La eficiente hidrólisis de carbapenémicos por KPC confiere altos niveles de resistencia en ausencia de cambios complementarios en la permeabilidad de la membrana o expresión de BLEE, distinguiéndose así de otras serina- β -lactamasas (DeLeo et al., 2014).

Las variantes descritas hasta ahora van desde KPC-1 hasta KPC-10, principalmente en enterobacterias. Aunque sus genes no estén en formato de casetes

genéticos en integrones, sí están asociados a elementos genéticos móviles (MGEs), como secuencias de inserción o transposones. La propagación global de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos (CR-Kp) se ha asociado, en gran medida, al tipo de secuencia 258 (ST258) y sus variantes relacionadas (grupo clonal 258, CG258). Este grupo clonal se ha vinculado al 70 % de los brotes de KPC-Kp en Estados Unidos y aproximadamente al 90 % de las infecciones por KPC-Kp en Israel, siendo además el clon predominante en Argentina y Brasil.

Las cepas ST258 son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos y suelen portar genes plasmídicos que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos, así como mutaciones cromosómicas que confieren resistencia a fluoroquinolonas. La resistencia a carbapenémicos en estas cepas está codificada predominantemente por la carbapenemasa KPC, cuyo gen *blaKPC* se encuentra en un elemento transponible (Tn4401) integrado en numerosos plásmidos diferentes. Esto permite que *blaKPC*, junto con otros elementos de resistencia asociados a plásmidos, se intercambie fácilmente entre *K. pneumoniae* y otras enterobacterias, una característica clave para su propagación y alta prevalencia en cepas multirresistentes (DeLeo et al., 2014).

| Tipo MBL | Especie | Enzima(s) | Subclase |
|-------------------|---------------------------------------|--|----------|
| Cromosomal | <i>Bacillus cereus</i> | BcII | B1 |
| | <i>Chryseobacterium indologenes</i> | IND | B1 |
| | <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> | BlaB | B1 |
| | <i>Myroides odoratinimus</i> | MUS y MYO | B1 |
| | <i>Bacteroides fragilis</i> | CfiA/CcrA | B1 |
| | <i>Aeromonas</i> spp. | CphA | B2 |
| | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | L1 | B3 |
| | <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> | GOB | B3 |
| Plásmido asociado | | Metalo- β -lactamasa codificada por el integrón Verona (VIM) | B1 |
| | | Metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM) | B1 |
| | | Imipenemasa (IMP) | B1 |
| | | Metalo- β -lactamasa de Sao Paulo (SPM) | B1 |
| | | Imipenemasa alemana (GIM) | B1 |
| | | KHM | B1 |
| | | Imipenemasa holandesa (DIM) | B1 |
| | | <i>Serratia</i> metalo- β -lactamasa (SMB) | B3 |
| | | Imipenemasa de Adelaida (AIM) | B3 |

Figura 5.1: Ejemplos de MBL cromosómicos y asociados a plásmidos (Boyd et al., 2020).

Las MBL (metalo- β -lactamasas) se diferencian de las β -lactamasas de clase A y D por el uso de zinc en lugar de una serina catalítica en la hidrólisis mediada por el sitio activo. Por consiguiente, las MBL son inhibidas por quelantes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido dipicolínico (DPA), pero no por el ácido clavulánico ni por otros inhibidores de las β -lactamasas de uso clínico. A menudo presentan perfiles de hidrólisis contra todas las β -lactamasas, excepto las monobactámicas, y pueden conferir un alto nivel de resistencia cuando se combinan con cambios en la permeabilidad de la

membrana y la producción de BLEE (Potter et al., 2016) .

La clase B se ha identificado en *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y diversas enterobacteriáceas, entre otras. Estas enzimas hidrolizan casi todos los betalactámicos, con excepción de los monobactámicos (como el aztreonam); no son inhibidas por el ácido clavulánico, pero sí por EDTA. Entre las enzimas representativas se incluyen: la imipenemasa (IMP), la metalo- β -lactamasa codificada por el integrón de Verona (VIM), la metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM), la imipenemasa alemana (GIM) y la metalo- β -lactamasa de São Paulo (SPM) (Angles-Yanqui et al., 2020).

5.3.4. Metallo- β -lactamasas (MBL)

Las enzimas MBL son una preocupación particular y están cada vez más diseminadas en todo el mundo. Muchos productores de MBL presentan múltiples resistencias a otros fármacos, lo que deja pocas opciones de tratamiento. Los carbapenémicos evaden la mayoría de las β -lactamasas, pero son hidrolizados por las MBL, así como por algunas β -lactamasas de serina del sitio activo (SBL), en particular los miembros de los grupos KPC y OXA-48-like. Las MBL son cromosómicas y ubicuas en algunos no fermentadores, incluyendo *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp. y *Chryseobacterium* spp., que re-

presentan una preocupación clínica moderada. Una minoría de cepas de *Bacteroides fragilis* presentan una MBL, CfiA o CcrA, codificada cromosómicamente; sin embargo, esto es poco común y se expresa de forma significativa solo si una secuencia de inserción *upstream* proporciona un promotor eficiente. No obstante, las MBL adquiridas son de mayor importancia, ya que se están propagando entre miembros de *Enterobacterales* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estas se asocian con fenotipos extremadamente resistentes a fármacos (XDR), y los productores usualmente también muestran resistencia a múltiples aminoglucósidos, fluoroquinolonas y otros agentes, así como a β -lactámicos (Boyd et al., 2020; Sobia et al., 2022).

5.3.5. Clasificación y diversidad de las Metallo- β -lactamasas (MBL)

Las β -lactamasas se clasifican según dos sistemas principales. El primero se basa en los perfiles de sustrato y la vulnerabilidad a los inhibidores, ubicando a las MBL en el grupo 3, mientras que los grupos 1 y 2 comprenden las SBL. El segundo clasifica a las β -lactamasas según sus secuencias de aminoácidos, reconociendo cuatro clases de enzimas. Las MBL forman la clase B, mientras que las SBL se dividen en las clases A, C y D. Las MBL son estructural y mecánicamente diferentes de las SBL, lo que sugiere un origen evolutivo distinto.

En cuanto a las enzimas de clase B, se dividen a

su vez en tres subclases (B1, B2 y B3) según las diferencias en la secuencia de aminoácidos en el sitio activo, los ligandos de zinc, la estequiometría del zinc, la arquitectura del bucle y los perfiles de sustrato. Las MBL adquiridas de mayor importancia, que comprenden los tipos IMP, NDM y VIM, pertenecen a la subclase B1. Hidrolizan todos los antibióticos β -lactámicos disponibles en la actualidad, excepto los monobactámicos (como el aztreonam), al igual que la mayoría o todas las demás enzimas de las subclases B1 o B3 (Sobia et al., 2022).

Por el contrario, las MBL CphA (subclase B2) de *Aeromonas* spp. tienen una actividad de espectro estrecho dirigida exclusivamente contra los carbapenémicos. Es importante destacar que, independientemente de la subclase, las MBL no son inhibidas por el ácido clavulánico, el sulbactam, el tazobactam o el avibactam, ni por las sulfonas del ácido penicilánico ni por los diazabicyclooctanos.

5.3.6. Metallo- β -lactamasas de Nueva Delhi (NDM)

Las MBL adquiridas más importantes del subgrupo B1 (Figura. 5.1) suelen denominarse según el lugar donde se describieron por primera vez; por ejemplo, la metallo- β -lactamasa codificada por el integrón de Verona (VIM) y la metallo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM). La primera MBL adquirida (imipenemasa; IMP-1) se informó en la década de 1990 a partir de aislados clínicos de *P. aeruginosa* y *Serratia marces-*

cens en Japón, y su familia incluye actualmente más de 85 variantes de secuencia. La primera enzima VIM se identificó en *P. aeruginosa* en 1997, con más de 69 variantes descritas desde entonces. En la actualidad, la NDM es la MBL más prevalente en *Enterobacteriales* y *Acinetobacter baumannii*. Fue identificada por primera vez en 2008 en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* de un paciente que había viajado a Suecia desde Nueva Delhi, India. Desde entonces, se han descrito veintinueve variantes de la NDM (Sobia et al., 2022). La NDM es endémica en varias regiones de Asia y responsable de brotes esporádicos en todo el mundo. Hasta marzo de 2025, se han identificado 17 variantes de NDM según la base de datos del NCBI, presentes en diversos tipos de plásmidos. Esto refleja la alta diversidad de especies de *Enterobacteriaceae* que se ha demostrado que la expresan (NCBI, 2025).

5.3.7. Metallo- β -lactamasas de Verona codificadas por integrón (VIM)

La metallo- β -lactamasa codificada por el integrón de Verona (VIM) es una de las MBL más comunes que causan infecciones en humanos (Kohler et al., 2020). Las enzimas VIM constituyen uno de los subgrupos de las metallo- β -lactamasas de la subclase molecular B1 (MBL B1), de la cual se han descrito 46 variantes. La enzima VIM-1 se detectó por primera vez a finales de la década de 1990 en el norte de Italia, en un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa*

resistente a carbapenémicos y asociada a un casete genético insertado por un integrón de clase 1 situado en el cromosoma bacteriano.

En Latinoamérica, se ha reportado la enzima VIM-2 en Colombia, Chile, Venezuela, Brasil y Argentina, en aislamientos de *P. aeruginosa*. Esta enzima comparte el 90 % de identidad con la VIM-1 en la secuencia de aminoácidos. Un estudio reciente en Medellín, Colombia, evidenció aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos en cinco hospitales de tercer nivel, indicando que la frecuencia de aislamientos productores de la enzima VIM-2 era similar a la de los aislamientos productores de KPC-2, lo que sugiere una rápida difusión de *P. aeruginosa* productora de estas carbapenemasas. Asimismo, se observó una estrecha relación genética entre los aislamientos dentro de cada hospital, lo que indica su transmisión intrahospitalaria (Rada et al., 2018).

5.3.8. Imipenemasa (IMP)

La imipenemasa se ha convertido en una enzima de creciente relevancia, especialmente en Asia, desde que se descubrió en la década de 1990 en Japón. Actualmente existen 88 variantes de enzimas de tipo IMP, siendo la IMP-1 la más comúnmente identificada. Está codificada por los genes *bla*_{IMP}, junto con otras enzimas de este grupo como VIM, SPM y GIM. La IMP pertenece a la clase B de β -lactamasas y posee actividad carbapenemasa. Similar a otras MBL,

la imipenemasa rompe el anillo β -lactámico utilizando zinc como catalizador y puede ser inhibida por EDTA. Se transfiere comúnmente entre organismos, especialmente bacterias Gram negativo, a través de integrones de clase 1 o clase 3. El descubrimiento de bla_{IMP-1} fue reportado por primera vez en Japón en 1988, a partir de la cepa GN17203 de *Pseudomonas aeruginosa* (Pongchaikul & Mongkolsuk, 2022).

5.3.9. Clase D β -lactamasas

Las β -lactamasas de clase D se denominan oxacilinasas (OXA) debido a que escinden oxacilina, además de penicilina, lo que las distingue de las β -lactamasas de clase A. Inicialmente se caracterizaron como β -lactamasas de espectro extendido. En 1985, se descubrió que la OXA-23 confería resistencia al imipenem en un aislado de *Acinetobacter baumannii* del Reino Unido (Potter et al., 2016). Las enzimas similares a OXA-48 son serina β -lactamasas (SBL) que pertenecen a la clase molecular D. Esta familia es la más diversa de las cuatro clases de β -lactamasas definidas por Ambler. Las SBL hidrolizan sus sustratos formando un intermediario acilo a través de la serina del sitio activo.

Las β -lactamasas de clase D (DBL) o tipos OXA poseen oxacilina como su sustrato preferido en términos de k_{cat}/K_m , que mide la eficiencia catalítica. OXA-48 presenta una estructura dimérica, similar a OXA-10, OXA-13 y OXA-46, compuesta por dos subunidades

idénticas. El sitio activo está en una grieta estrecha que presenta tres motivos típicos de DBL, además de la cadena lateral carbamilada de Lys73 (Docquier et al., 2009). Estos elementos son críticos para el reconocimiento del sustrato y para la catálisis.

5.3.10. Las β -lactamasas hidrolizantes de oxacilina 48 (OXA-48-like) y sus variantes

En 2001, se obtuvo un aislado de *Klebsiella pneumoniae* de un paciente en Estambul, Turquía, que resultó ser resistente a múltiples fármacos, incluyendo los carbapenémicos. Este aislamiento permitió identificar una nueva β -lactamasa de tipo OXA, denominada OXA-48, clasificada en la clase D de Ambler. Esta enzima y sus variantes están ahora ampliamente distribuidas en *K. pneumoniae* y otras *Enterobacteriaceae*, y también se han reportado en *Acinetobacter baumannii*, representando uno de los desarrollos más relevantes en la resistencia a carbapenémicos en la última década (Evans & Amyes, 2014).

Los tipos OXA-48 hidrolizan penicilinas, pero en su mayoría no afectan a cefalosporinas de espectro extendido, mientras que los tipos OXA de *Acinetobacter* hidrolizan tanto penicilinas como cefalosporinas. Desde su primera descripción, la enzima OXA-48 se ha identificado en diversas variantes que, en conjunto, forman la subfamilia “OXA-48-like”. Estas están formadas por 261–265 aminoácidos codificados por los genes *bla*_{OXA-48-like}, ubicados en plásmidos (Pitout et

al., 2015).

Las variantes difieren de OXA-48 en sustituciones y/o deleciones de entre uno y cinco aminoácidos (Mairi et al., 2018). Las β -lactamasas tipo OXA-48 son notoriamente difíciles de detectar en el laboratorio clínico, lo que complica la implementación de medidas de control de infecciones y facilita su proliferación de forma sigilosa (Boyd et al., 2020).

5.4. Resistencia a los antimicrobianos en ríos urbanos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un fenómeno en el que los microorganismos ya no responden a los medicamentos antimicrobianos disponibles. Este problema ha aumentado drásticamente en los últimos años y se considera una de las mayores amenazas para la salud mundial del siglo XXI. Los ríos urbanos han emergido recientemente como importantes impulsores de la prevalencia de la RAM. Debido a la rápida industrialización y urbanización, estos cuerpos de agua se han visto fuertemente influenciados por actividades antropogénicas, a través de la descarga masiva de desechos industriales y domésticos que contienen antibióticos, metales pesados, biocidas y pesticidas. Esto favorece el crecimiento de bacterias resistentes a los antibióticos (ARB) y la presencia de un acervo de genes de resistencia a los antibióticos (ARG), lo que tiene un efecto adverso sobre la salud

humana y el medio ambiente (Reddy et al., 2022).

En un estudio realizado en el lago Tai, China, se evaluó la prevalencia, origen y riesgo de genes de resistencia a antibióticos en los sedimentos de este lago urbano (Chen, Jing, et al., 2019). Se detectaron un total de 203 subtipos de ARG, con predominio de genes de resistencia a múltiples fármacos, macrólidos-lincosamidas-estreptograminas, quinolonas, bacitracina y sulfonamidas. En sedimentos de ríos urbanos se identificaron, además, diversos genes de resistencia a metales/biocidas y elementos genéticos móviles (MGE) como transposones, integrones y plásmidos. Recientemente, se han detectado fuertes asociaciones entre ARG y genes de resistencia a metales/biocidas, así como con MGE, mediante análisis de concurrencia empleando *contigs* portadores de ARG (ACC), lo que indica una transferencia horizontal de genes (HGT) activa en ecosistemas de ríos urbanos (Chen, Chen, et al., 2019).

5.4.1. Bacterias productoras de carbapenemasas recuperadas de ecosistemas fluviales

Estudios previos han revelado la presencia de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas y/o β -lactamasas de espectro extendido en muestras recolectadas de ríos, efluentes y sistemas de alcantarillado hospitalario. Entre las enzimas detectadas se incluyen KPC, IMI, VIM, IMP, OXA-48-like y NDM, destacan-

do su transporte en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. La presencia de estas bacterias resistentes en ambientes acuáticos sugiere que estos nichos constituyen un reservorio potencial de nuevos genes de resistencia a carbapenémicos. Asimismo, bacterias resistentes de origen humano pueden liberarse al medio ambiente, propagando sus genes de resistencia a especies ambientales. Por otro lado, las enterobacterias productoras de carbapenemasas (ERC), detectadas en granjas, fincas, mascotas y animales silvestres, también pueden llegar al entorno acuático a través del estiércol (Piedra-Carrasco et al., 2017).

Las ERC en aguas residuales y superficiales pueden incluir *E. coli* patógena intestinal y *E. coli* extraintestinal (ExPEC), las cuales son capaces de causar enfermedades en humanos y animales gracias a la presencia de factores de virulencia específicos. Se ha establecido que las influencias antropogénicas representan uno de los principales aportes de CPE a los sistemas fluviales. El entorno acuático ofrece nichos ideales para la conservación y diseminación de carbapenemasas asociadas a elementos genéticos móviles (MGEs), tales como plásmidos, secuencias de inserción y transposones, mediante procesos de transferencia horizontal de genes. Estos MGEs contribuyen activamente a la contaminación xenogenética del ecosistema acuático (Bleichenbacher et al., 2020).

La contaminación se define como la diseminación de materiales con efectos nocivos. Los elementos móviles del ADN y los genes de resistencia a antibióticos, introducidos al ambiente por la actividad humana,

son considerados contaminantes emergentes de alta preocupación. A diferencia de los contaminantes convencionales, estos elementos tienen la capacidad de replicarse y evolucionar (Bleichenbacher et al., 2020; Marti et al., 2014). El ADN xenogenético porta múltiples genes que confieren diversos rasgos, los cuales están físicamente ligados a diferentes familias de módulos genéticos móviles. Las interacciones entre estos módulos permiten al ADN xenogenético generar su propia diversidad mediante ensamblaje y transposición combinatoria, favoreciendo su evolución continua.

Los flujos de desechos que diseminan bacterias portadoras de ADN xenogenético a menudo también contienen antibióticos, desinfectantes y metales pesados, generando una presión selectiva que favorece la conservación y propagación de estos elementos a nuevos linajes celulares (Gillings et al., 2018; Wozniak & Waldor, 2010). En consecuencia, tanto las interacciones entre diferentes ADN xenogenéticos como la presión ejercida por contaminantes convencionales contribuyen a la diversidad, distribución y abundancia de estos elementos. La supervivencia y diseminación de los elementos xenogenéticos se ve favorecida por tres tipos de contaminantes: metales pesados, antibióticos y otros compuestos xenobióticos, los cuales promueven su selección y replicación (Gillings et al., 2018).

5.5. Coselección de resistencia a múltiples antibióticos en bacterias patógenas en cuerpos de agua contaminados con metales pesados

La mayoría de los metales, como el cobre (Cu), cromo (Cr), cobalto (Co), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn), son esenciales para la fisiología de los organismos vivos. Otros elementos, como los metaloides mercurio (Hg) y arsénico (As), así como los metales cadmio (Cd), plomo (Pb) y vanadio (V), no poseen funciones biológicas conocidas y son tóxicos para la biota, incluso en concentraciones muy bajas. Las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a estos elementos, como la formación de complejos metálicos, el secuestro y desintoxicación de metales mediante la reducción de iones intracelulares, y la expulsión activa de metales a través de bombas de eflujo (Squadrone, 2020).

Los genes de resistencia a metales (MRG) se han identificado tanto en genomas bacterianos como en elementos genéticos móviles (MGEs), en bacterias aisladas de ambientes extremos o ecosistemas contaminados por actividades geológicas o antropogénicas. El mercurio es un metal persistente a nivel mundial; se han identificado transposones resistentes al Hg, y se ha determinado que los mecanismos de resistencia al mercurio fueron de los primeros en ser dilucidados en bacterias, junto con los de resistencia al cobre, la plata, el antimonio y el zinc (Kholodii et al., 2003). La posibilidad de que los metales seleccionen bacterias

resistentes a los antibióticos mediante coselección ha sido motivo de preocupación desde 1974 (Koditschek & Guyre, 1974). La asociación entre tolerancia a metales y resistencia a antibióticos se conoce como resistencia cruzada, la cual ocurre cuando un solo mecanismo, como las bombas de eflujo multitóxicas, es capaz de expulsar tanto metales como antibióticos de la célula bacteriana (Squadrone, 2020).

Se ha demostrado que la cercanía física de los genes de resistencia en los MGEs incrementa significativamente la probabilidad de transferencia horizontal de genes (HGT) entre bacterias. La contaminación del agua con metales pesados favorece la selección y diseminación de estructuras genéticas como los integrones, los cuales desempeñan un papel esencial en el desarrollo de multirresistencias. La coresistencia entre mercurio y antibióticos puede darse mediante integrones que contienen transposones asociados a resistencia a Hg. Los integrones, aunque no son genéticamente móviles por sí mismos, requieren de transposones para su transferencia a través de plásmidos, y están directamente involucrados en la diseminación de genes de resistencia. Estos elementos pueden capturar e intercambiar fragmentos de ADN conocidos como casetes genéticos (Seiler & Berendonk, 2012). Los integrones de clase 1, particularmente frecuentes en hábitats contaminados, se consideran claves en la mediación de la coselección al conferir ventajas adaptativas bajo condiciones ambientales estresantes.

La resistencia adquirida a metales pesados en bacterias fue reportada por primera vez en una cepa

de *Staphylococcus aureus* resistente al mercurio en 1960 por Moore (Richmond & John, 1964). Posteriormente, se evidenció que los genes de resistencia al mercurio y a la penicilina estaban ligados en plásmidos. Esta Coselección bacteriana puede explicarse por dos mecanismos principales: la resistencia cruzada, en la cual un único mecanismo confiere resistencia a múltiples compuestos; y la coresistencia, en la que dos o más genes de resistencia se encuentran presentes en el mismo MGE (plásmido, integrón o transposón), confiriendo resistencia simultánea a diferentes tóxicos (Imran et al., 2019).

Se ha demostrado que el gen de resistencia al mercurio puede cotransferirse junto con genes de resistencia a antibióticos entre bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias receptoras. Por ejemplo, se observó que una cepa de *Salmonella abortus*, resistente a ampicilina, arsénico, cadmio y mercurio, perdía dicha resistencia tras un tratamiento de “plasmid curing”, un proceso mediante el cual se eliminan plásmidos responsables de funciones específicas como la resistencia a antibióticos, la virulencia o la degradación de compuestos aromáticos (Patwardhan et al., 2018). A través de la secuenciación genómica completa del patógeno multirresistente *Salmonella enterica* serovar Typhi cepa CT18, se identificó un plásmido conjugativo (pHCM1) que codifica resistencia a múltiples antibióticos, como ampicilina (*bla*), estreptomicina (*strAB*), cloranfenicol (*catI*), sulfonamida (*sulIII*) y trimetoprima (*dhfr1b*), además de incluir el operón de resistencia al mercurio (Imran et al., 2019).

Los microplásticos también han sido reconocidos como “hot spots” o puntos críticos para la coselección de resistencia a antibióticos inducida por metales en entornos acuáticos, debido a su capacidad para absorber una amplia variedad de contaminantes en sus superficies. En consecuencia, se consideran vectores potenciales para el desarrollo y propagación de patógenos multirresistentes. Recientemente, se reportó que la resistencia a múltiples antibióticos estaba mediada por plásticos en el sur de la Antártida. Siete cepas aisladas de residuos plásticos en este entorno extremo mostraron actividad en la formación de biopelículas y presentaban resistencia a cefalosporinas, quinolonas y β -lactámico (Laganà et al., 2019).

5.5.1. Gen integrón-integrasa de clase 1 (*intI1*)

La selección de resistencia a antibióticos impulsada por metales es notablemente mayor cuando tanto los genes de resistencia a metales (MRG) como los genes de resistencia a antibióticos (ARG) están situados en los mismos elementos genéticos móviles (MGE). Tal es el caso de los integrones de clase 1, *intI1*. Se ha observado que las abundancias de *intI1* son mayores en entornos contaminados con metales. Este gen se ha asociado estrechamente con el MRG *czcA*, que codifica la resistencia al cobalto (Co), zinc (Zn) y cadmio (Cd), así como con la resistencia a las betalactamasas (Gupta et al., 2022).

El *intI1* ha sido propuesto como un proxy, dado

que está vinculado a genes que confieren resistencia a antibióticos, desinfectantes y metales pesados. Se encuentra en diversos grupos taxonómicos de bacterias patógenas y no patógenas, y puede mobilizarse entre taxones mediante transferencia horizontal de genes (HGT) debido al vínculo físico con elementos genéticos móviles (MGEs), como plásmidos y transposones. Su abundancia puede cambiar rápidamente en respuesta a presiones externas, como la presencia de antibióticos. Las presiones selectivas impuestas por actividades humanas recientes han dado lugar a la aparición de la variante clínica altamente conservada *intI1*, cuya elevada presencia en el medio ambiente indica contaminación y un *hot spot* o punto crítico potencial para la transferencia de resistencia a los antimicrobianos (RAM) (Okonkwo et al., 2023).

5.5.2. Elemento ISCR1: Región común de la secuencia de inserción

El elemento ISCR1 (Región Común de la Secuencia de Inserción) es el miembro más extendido de la familia ISCR y está presente con frecuencia en las γ -proteobacterias que se encuentran en entornos clínicos. El ISCR1 se identificó por primera vez como una región conservada que interrumpe el segmento conservado 3' (3'CS) de los integrones de clase 1. La región *downstream* (aguas abajo) de ISCR1, en el lado *oriIS*, es variable y a menudo se asocia con genes de resistencia a los antibióticos (ARG) (Lallement et al., 2018). El ISCR1 se ha detectado en varias posi-

ciones aguas abajo del gen *blaNDM* y en especies de *Escherichia* y *Klebsiella*. Se localiza principalmente en integrones complejos de clase 1; sin embargo, no siempre se encuentran genes de integrasa cerca de *blaNDM* (Acman et al., 2022).

Los elementos ISCR destacan por su estrecha asociación con una amplia variedad de genes de resistencia a antibióticos. El ISCR1 está vinculado con varios genes de β -lactamasa de clase A, incluidos cuatro grupos de espectro extendido: el gen *blaCTX-M*, el gen de β -lactamasa de clase A de espectro extendido *blaVEB-3* reportado en China, y el gen *blaPER-3* aislado de *Aeromonas punctata* en Francia. Este elemento de inserción es un factor clave en la movilización y diseminación de genes de resistencia a antibióticos, particularmente los de β -lactamasa. El ISCR1 utiliza un mecanismo de replicación en círculo rodante (*rolling-circle replication*) mediado por una enzima tipo transposasa (Rep), lo que le permite capturar secuencias génicas adyacentes aguas abajo, como el gen *blaCTX-M*, y transferirlas a otros MGE como integrones y plásmidos. Este mecanismo es clave para el secuestro del gen *blaCTX-M-2* desde el cromosoma de bacterias del género *Kluyvera ascorbata*, facilitando su inserción en plásmidos y su posterior propagación en bacterias patógenas. Una vez movilizado, el ISCR1 suele encontrarse adyacente a integrones de clase 1 complejos, como In35, InS21 o In60. En estos casos, el gen de resistencia no se presenta en forma de casete, sino como parte de la región conservada 3'CS, lo que permite una expresión eficiente del gen *blaCTX-M*. La asociación con ISCR1

ha contribuido significativamente a la diseminación global de las β -lactamasas en reservorios clínicos, ambientales y animales, siendo un vector genético clave en la evolución y expansión de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, especialmente en contextos con presiones selectivas como el uso de antimicrobianos y metales pesados (Toleman et al., 2006).

Asimismo, el ISCR1 ha sido implicado en la movilización de genes de β -lactamasas de clase C, en particular, aquellos relacionados con la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y cefamicinas. A diferencia de las BLEE de clase A, las β -lactamasas de clase C no suelen ser inhibidas por el ácido clavulánico o el tazobactam (Thomson & Bonomo, 2005). En diversos genes de cefalosporinas, como *blaDHA-1*, *blaCMY-1*, *blaCMY-8* y *blaCMY-11*, se han encontrado elementos ISCR1. Esto indica su papel crucial en el secuestro y movilización desde el cromosoma de especies ambientales, como *Morganella morganii* y *Aeromonas hydrophila*, hacia plásmidos presentes en patógenos clínicos como *E. coli* y *Klebsiella spp.* El mecanismo de acción es similar al observado en los genes *blaCTX-M*, utilizando un sistema de replicación en círculo rodante que permite capturar y movilizar genes localizados aguas abajo, lo que sugiere una movilización independiente facilitada por ISCR1 (Toleman et al., 2006).

5.6. Cuerpos de agua en Guatemala

5.6.1. Microcuenca río Contreras

La microcuenca del río Contreras tiene una extensión de 5.58 km² y se encuentra dentro de la cuenca del río Las Vacas, en la región metropolitana de Guatemala. Esta cuenca es una de las más afectadas por problemas ambientales y de seguridad hídrica en la región, reportándose que la tasa de extracción y uso del agua es 40 veces mayor que la cantidad disponible en su territorio. Además, el río Las Vacas es un afluente del río Motagua, altamente impactado por la problemática de los desechos sólidos y las aguas servidas. La microcuenca del río Contreras se ubica en territorio que alberga dos campus centrales universitarios: la Universidad del Valle de Guatemala y la Universidad Rafael Landívar. Ambas instituciones cuentan con plantas de tratamiento de aguas residuales, cuyos efluentes descargan en el río Contreras. En la parte baja se localiza el Parque Ecológico Municipal Jacarandas de Cayalá, así como proyectos inmobiliarios como Encinos de Cayalá y Acantos de Cayalá (FUNCAGUA, 2024).

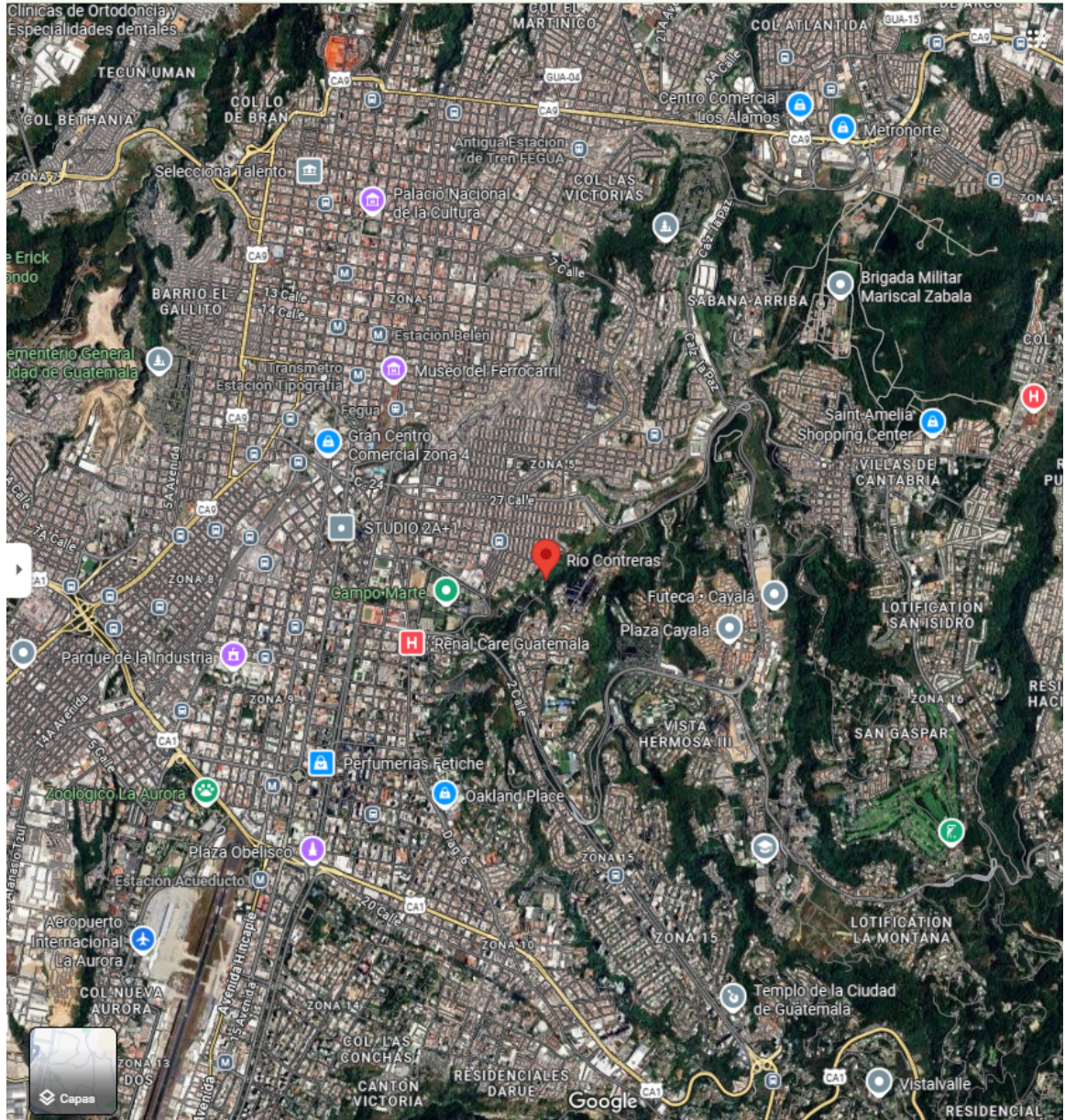


Figura 5.2: Vista satelital de la microcuenca del río Contreras, ubicada en la zona nororiente de la Ciudad de Guatemala, mostrando su integración en el entorno urbano y áreas naturales cercanas

5.6.2. Río Villalobos

La cuenca hidrográfica del río Villalobos limita al norte con la vertiente del río Las Vacas y al sur con la cuenca del lago de Amatitlán. Tiene un área de 331.81 km^2 y se divide en cuatro subcuencas: El Bosque ($1,324 \text{ m}^2$), Tuluja ($5,467 \text{ m}^2$), Las Minas ($11,759 \text{ m}^2$) y Platanitos ($20,800 \text{ m}^2$) (Córdova Tercero, 2010). . Esta cuenca se caracteriza por recibir residuos domésticos, industriales, agrícolas y hospitalarios provenientes del sur de la Ciudad de Guatemala y de municipios como Villa Nueva, San Miguel Petapa, Villa Canales y Mixco.

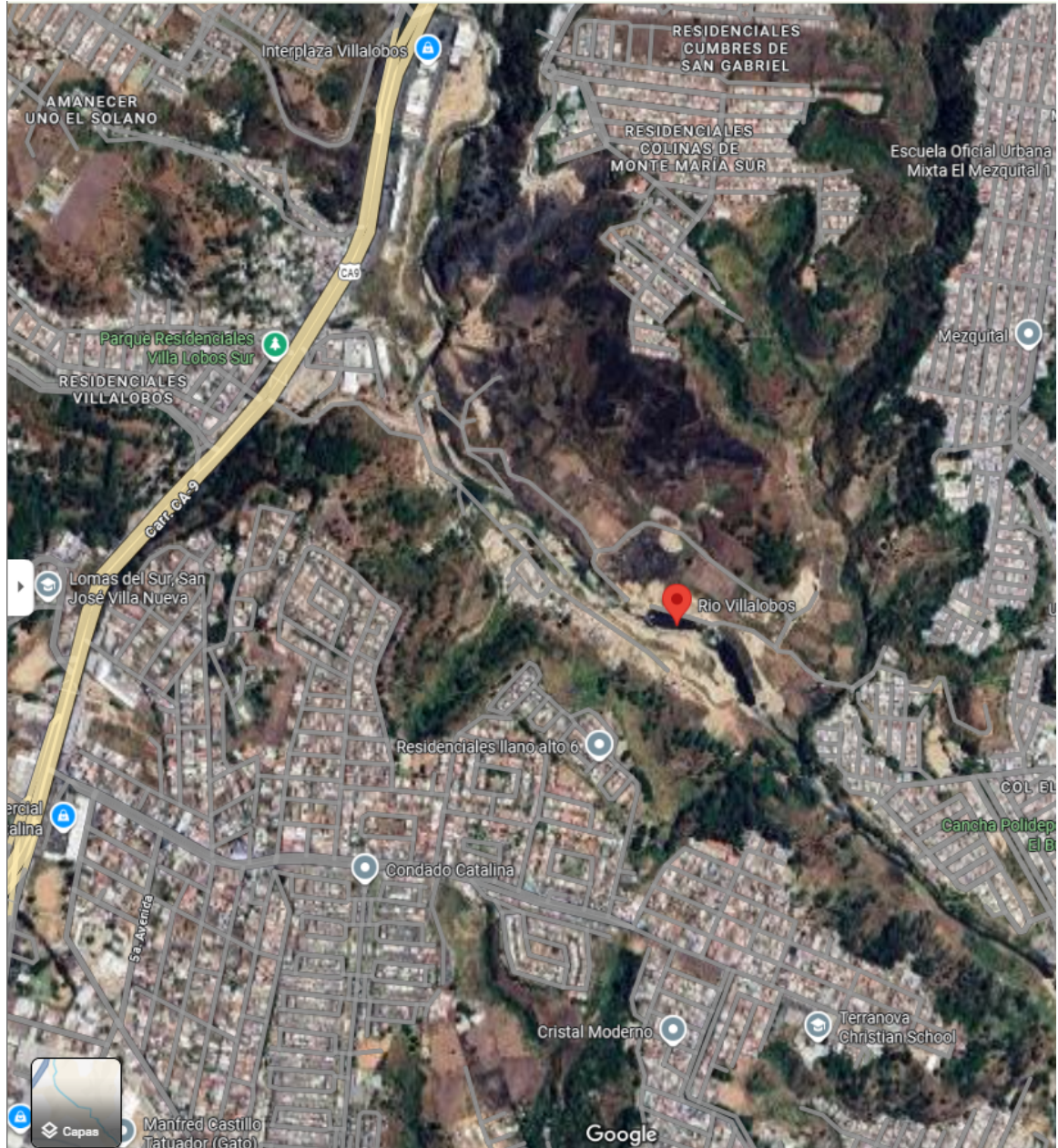


Figura 5.3: Vista satelital del río Villalobos y sus alrededores en Villa Nueva, Guatemala, destacando zonas residenciales cercanas como Condado Catalina y Residenciales Villalobos.

5.7. Guatemala en el contexto de resistencia a carbapenémicos

En Latinoamérica, Guatemala fue el primer país en el que se confirmó, en diciembre de 2011, la presencia de una bacteria productora de la carbapenemasa de tipo NDM-1 (Nueva Delhi, metalo- β -lactamasa). En el año 2016, se llevó a cabo un estudio en los hospitales Nacional Pedro Bethancourt de Antigua Guatemala, Nacional de Escuintla y Nacional de Amatitlán, con el objetivo de caracterizar a los pacientes en los que se utilizaron carbapenémicos. Los resultados mostraron una prevalencia de resistencia a estos antibióticos del 16.4 % en una muestra de 348 expedientes. Esta problemática es especialmente relevante en el departamento de Guatemala, particularmente en las unidades de cuidados intensivos de los hospitales mencionados (Mora et al., 2017).

5.7.1. Incidencia de infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas en Guatemala

En noviembre de 2020, el Laboratorio Nacional de Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) notificó la detección de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* y una cepa de *Escherichia coli* productoras de OXA-48. Los aislamientos fueron reportados por el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, Ciudad de Guatemala, y por el Hospital Regional de Quiché, respectivamente, y ambos fueron

confirmados por el Laboratorio Nacional de Salud.

La cepa de *K. pneumoniae* se aisló a partir de un aspirado traqueal de un paciente sin antecedentes de viajes al extranjero, mientras que la cepa de *E. coli* se aisló de una muestra de orina de otro paciente, igualmente sin antecedentes de viajes fuera del país.

Adicionalmente, se han reportado otros dos casos de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo OXA-48, ambos procedentes del Hospital Nacional Especializado de Villa Nueva, sin evidencia de brotes por *K. pneumoniae* o *E. coli* productoras de OXA-48. Es importante destacar que la portación asintomática de bacterias portadoras del gen OXA-48 facilita su diseminación y la transferencia de este mecanismo de resistencia, mediante plásmidos, a otras cepas bacterianas. Estos hallazgos, provenientes de aislamientos en dos hospitales de la red pública y uno de la seguridad social, subrayan la importancia de fortalecer la vigilancia y detección de carbapenemasas en todos los establecimientos de salud del país, ya que la presencia de estas enzimas incrementa la morbilidad y mortalidad de las infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS) (MSPAS, 2020).

La resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas actuales para la salud mundial. En mayo de 2024, la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualizó su lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana, incorporando cuatro nuevas combinaciones y clasificándolas en categorías de prioridad crítica, alta y media, según su morbi-mortalidad y la urgencia de intervenciones específicas para combatirlas. Este problema es especialmente preocupante en países de medianos y bajos ingresos, como Guatemala, donde la limitada regulación del uso de antibióticos y la falta de estrategias efectivas de control agravan la situación. (OMS, 2024)

Se ha observado que, en países en desarrollo, la resistencia a los antimicrobianos es impulsada por la alta incidencia de enfermedades infecciosas, el uso excesivo de antibióticos por automedicación, su aplicación sistemática como promotores del crecimiento en

la industria pecuaria y la deficiente implementación de regulaciones para el manejo de la resistencia a los antimicrobianos (RAM). (Acharya & Wilson, 2019) Estos factores reflejan la dinámica de la resistencia bacteriana y la necesidad de adaptar nuevas estrategias para su control. (World Health Organization, 2024)

En Guatemala, la resistencia bacteriana a los carbapenémicos es un problema emergente de gran preocupación, especialmente en entornos hospitalarios. Según el Instituto de Patología Tropical, la implementación de sistemas de vigilancia y protocolos para el manejo de la RAM ha permitido identificar microorganismos con alta resistencia, entre ellos *Escherichia coli*, con 15 genes diferentes en dos plásmidos; *Acinetobacter baumannii*, portadora del gen resistente a carbapenémicos *OXA-23*; y *Acinetobacter pittii*, portadora del gen *NDM-1*. Además, *Enterococcus* spp. y otras especies multirresistentes han sido detectadas en infecciones intrahospitalarias, lo que representa un desafío crítico para la salud pública. (Instituto de Patología Tropical – UFG, 2014)

El primer aislamiento de bacterias productoras de carbapenemasas en Guatemala se registró en 2010. Para 2020, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, a través del Departamento de Epidemiología, alertó sobre el primer hallazgo de carbapenemasas de tipo *OXA-48* en el país. El Laboratorio Nacional de Salud confirmó la presencia de esta enzima en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, lo que resalta la importancia de la vigilancia y detección

de este mecanismo de resistencia en todos los establecimientos de salud. La presencia de esta enzima en bacterias incrementa la morbilidad y mortalidad de las infecciones asociadas a la atención en salud. (Gobierno de Guatemala, 2020)

A pesar de la creciente preocupación por la resistencia bacteriana mediada por carbapenemasas en Guatemala, pocos estudios han abordado su relación con la contaminación ambiental en ecosistemas acuáticos. La microcuenca del río Contreras, ubicada en la cuenca del río Las Vacas, es una de las zonas con mayores problemas ambientales y de seguridad hídrica en la región metropolitana del país. Por otra parte, el río Villalobos ubicado en la región metropolitana, la expansión y falta de infraestructura de saneamiento en los municipios de Villa Nueva, San Miguel Petapa y Villa Canales han contribuido al vertido directo de desechos sólidos y líquidos en el río, intensificando su contaminación. (Fuentes Montepeque, 2015) El río Villalobos desemboca en el lago de Amatitlán, el cual está conectado a otras subcuencas que forman parte de la cuenca del río Motagua. (AIDA, 2025) Ambos ecosistemas reciben descargas de aguas residuales domésticas, hospitalarias e industriales, lo que genera un ambiente propicio para la propagación de bacterias resistentes y la dispersión de genes de resistencia. (Urrutia, 2020)

Se ha determinado que las actividades antropogénicas son responsables de la cocontaminación de sistemas hídricos. Se ha observado que la inclusión de metales pesados como cobre (Cu) y arsénico (As),

provenientes de la acuicultura, fertilizantes, la industria de la construcción y pesticidas contribuye a la contaminación ambiental. Esta coexposición de bacterias a metales pesados y antibióticos sugiere una contaminación conjunta que permite la propagación de la multirresistencia a antibióticos impulsada por estos metales. (Song et al., 2019; Squadrone, 2020)

No obstante, en Guatemala no existen estudios previos que analicen la relación entre la contaminación por metales pesados y la resistencia a los carbapenémicos en entornos acuáticos. Esta investigación tiene como objetivo determinar la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos en bacterias aisladas de la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos y su relación con la contaminación por metales pesados.

7.1. Diseño metodológico

7.1.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación

El diseño de la investigación es de tipo cuasiexperimental no aleatorizado, ya que se trabajará con un grupo de cepas bacterianas previamente seleccionadas, sin realizar asignación aleatoria de los tratamientos. La variable dependiente es la resistencia a carbapenémicos y su posible relación con la presencia de metales pesados, mientras que la variable independiente está representada por las cepas bacterianas aisladas de la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos.

7.1.2. Población y muestra

7.1.3. Población

La población del estudio está conformada por cepas bacterianas aisladas de cuatro puntos distintos de la microcuenca de los ríos Contreras y Villalobos. Estas cepas presentan resistencia a carbapenémicos y han sido previamente caracterizadas en estudios microbiológicos.

7.1.4. Muestra

La muestra está conformada por bacterias aisladas de tres puntos de muestreo dentro de la microcuenca del río Contreras y del río Villalobos. Estas cepas fueron identificadas previamente y presentan resistencia a carbapenémicos.

7.2. Criterios de inclusión y exclusión

Se incluirán en el estudio las cepas de bacterias que presenten un resultado positivo para la resistencia a carbapenémicos mediante el medio selectivo CHROMagar mSuperCARBA®. A estas cepas se les analizará la presencia de genes codificantes de carbapenemasas, así como genes móviles de resistencia a

metales pesados (MRG), como *Intl1* e *ISCR1*, mediante PCR múltiple y qPCR, respectivamente.

Como criterio de exclusión, aquellas bacterias que no cumplan con los criterios previamente mencionados no serán viables para el estudio.

7.2.1. Variables

| Variable | Definición conceptual | Naturaleza | Nivel medición | de Definición operacional |
|---|--|--------------|----------------|---|
| Resistencia carbapenémicos | a Bacterias capaces de proliferar en presencia de antibióticos carbapenémicos, debido a mecanismos como la producción de enzimas carbapenemasas que inactivan a estos antibióticos. | Cualitativa | Ordinal | Se detecta mediante el medio selectivo CHROMagar mSuperCARBA® e identificación fenotípica de colonias resistentes. |
| Presencia de genes codificantes carbapenemasas | Presencia de genes de codificantes de carbapenemasas <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{OXA48-like}</i> , y <i>bla_{NDM}</i> . | Cuantitativa | Dicotómica | Se detecta mediante PCR múltiple a partir del ADN extraído de las cepas resistentes a carbapenémicos |
| Presencia de genes móviles relacionados con la resistencia a metales pesados | Presencia de genes móviles MGEs relacionados con la resistencia a metales pesados Gen integrón-integrasa de clase I (IntI1) así como el elemento ISCR1, Región Común de la Secuencia de Inserción | Cualitativa | Dicotómica | Se detecta mediante qPCR a partir del ADN extraído de las cepas resistentes a carbapenémicos |
| Concentración de metales pesados en la microcuenca del río Contreras y el Villalobos | Concentración de metales tales como plomo Pb, mercurio Hg, cadmio Cd, arsénico As, cromo Cr, zinc Zn y cobre Cu; presentes o disueltos en cuerpos de agua. | Cuantitativa | Continua | Se determina mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV) con potenciostato y electrodo de mercurio. Se expresa en partes por billón (ppb). |
| Ubicación del punto de muestreo | Punto específico para la selección de una muestra de interés para el estudio. | Cualitativa | Nominal | Se identifican tres puntos de muestreo en la microcuenca del río Contreras. |
| Enterobacterias presentes en la microcuenca del río Contreras y el Villalobos | Familia de bacterias Gram negativo, siendo <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> y Coliformes. | Cualitativa | Nominal | Se identifican fenotípicamente especies resistentes a carbapenémicos (<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i>) |

7.2.2. Hipótesis

Hipótesis nula

La presión selectiva ejercida por los metales pesados en la microcuenca del río Contreras y el río Villalobos favorece la persistencia y diseminación de bacterias resistentes a carbapenémicos, las cuales presentan una mayor prevalencia de genes de resistencia a carbapenemasas y metales pesados, sugiriendo un mecanismo de coselección de mecanismos de resistencia.

Hipótesis alternativa

La presión selectiva ejercida por los metales pesados en la microcuenca del río Contreras y el río Villalobos no favorece la persistencia y diseminación de bacterias resistentes a carbapenémicos, las cuales presentan una mayor prevalencia de genes de resistencia a carbapenemasas y metales pesados, sugiriendo un mecanismo de co-selección de mecanismos de resistencia.

7.3. Metodología

7.3.1. Recolección de muestras

El acceso a la microcuenca del río Contreras se realizó a través del parqueo 1 de la Universidad del Valle de Guatemala, donde se identificaron cuatro puntos de muestreo. En cada punto, utilizando guantes, se introdujeron contenedores estériles con tapa de rosca directamente en la corriente del río, variando las alturas para obtener muestras representativas. Las muestras se tomaron por triplicado y las réplicas fueron almacenadas bajo refrigeración. De igual manera, en el río Villalobos se siguió el mismo procedimiento, accediendo desde la carretera CA9 y recolectando muestras en las condiciones previamente descritas.

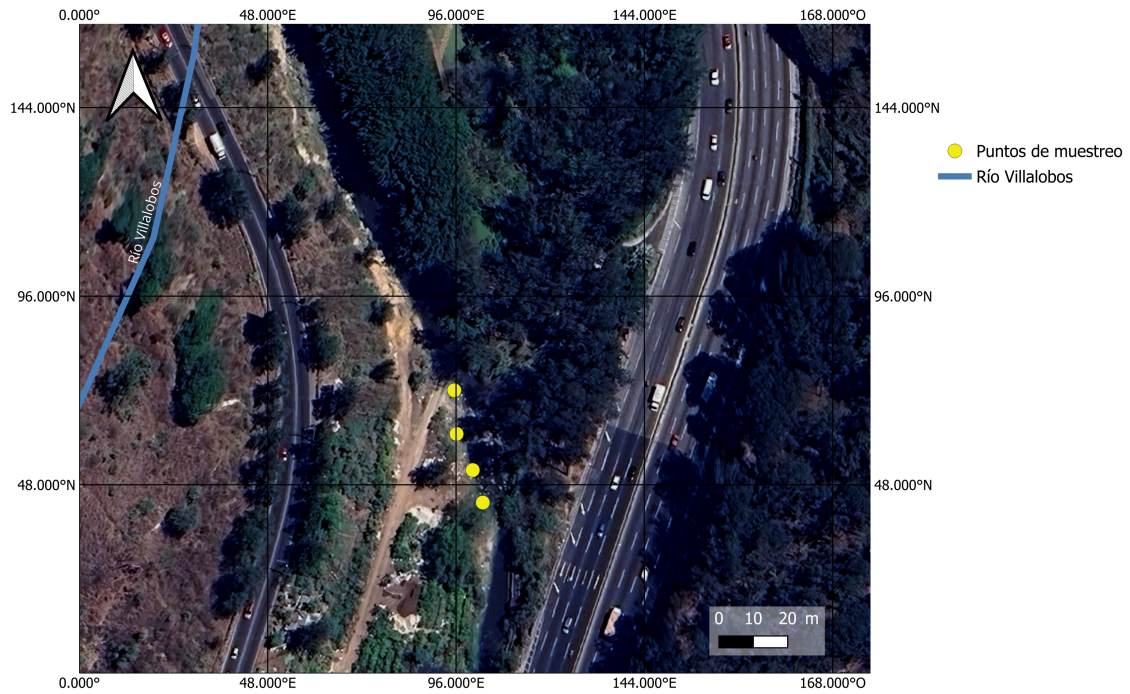


Figura 7.1: Selección de puntos de muestreo en el río Villalobos, entrando desde la carretera CA-9. Elaborado con QGIS versión 3.28

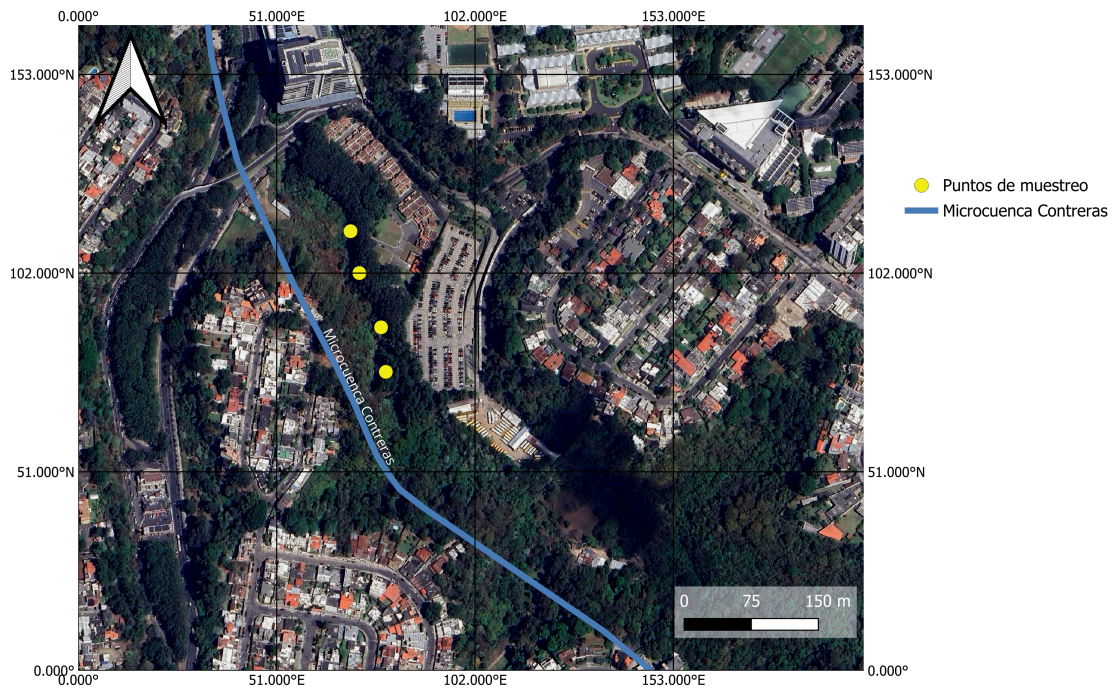


Figura 7.2: Selección de puntos de muestreo en la microcuenca del río Contreras, entrando desde la UVG. Elaborado con QGIS versión 3.28

7.3.2. Determinación de metales pesados: plomo, cadmio y arsénico

Para la determinación de múltiples metales pesados en las muestras de agua de la microcuenca del río Contreras, se utilizó el método de voltamperometría de redisolución anódica (ASV) con un potenciostato y un electrodo modificado con película de mercurio (ItalSens IS-HM). Las muestras de agua se acidificaron a un pH aproximado de 2.5 utilizando HCl, con el fin de garantizar que los iones metálicos permanecieran en solución.

El electrodo se acondicionó en una solución de HCl 100 mM para activar la película de mercurio. Posteriormente, se aplicó un potencial de deposición de -1.15 V mientras se agitaba la muestra durante 120 segundos para favorecer el transporte de masa. La solución se dejó reposar por 10 segundos y, seguidamente, se realizó el análisis de redisolución utilizando voltamperometría de onda cuadrada (SWV), con parámetros optimizados para maximizar la sensibilidad y la selectividad.

Las corrientes correspondientes a la oxidación de los metales Pb, Cd y As se registraron en el software del equipo y se analizaron mediante el método de adición estándar, con el fin de calcular las concentraciones de metales pesados (en ppb) presentes en las muestras del río Contreras.

7.3.3. Detección, identificación y aislamiento de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) mediante el medio selectivo CHROMagar mSuperCARBA®

Con el objetivo de realizar pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC), se prepararon seis medios de 450 mL con antibiótico Meropenem® siguiendo las especificaciones del Cuadro 7.1. Posteriormente, se realizaron tres iteraciones de diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) de cada muestra de agua, de las cuales 100 µL fueron sembrados en el medio CHROMagar mSuperCARBA®.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se identificaron fenotípicamente las colonias observadas, confirmando la presencia de *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.

Adicionalmente, para realizar una comparación fenotípica, se llevó a cabo una prueba bioquímica mediante el sistema API20E, lo que permitió confirmar la identidad de las cepas aisladas utilizando el software APIWEB™. Finalmente, se procedió al aislamiento de cada bacteria para la elaboración de un cepario correspondiente a cada punto muestreado. Asimismo, se realizó un filtrado al vacío de las muestras del río Contreras y del río Villalobos utilizando un filtro de membrana de 0.45 µm. Los filtros se colocaron en placas CHROMagar mSuperCARBA® suplementadas con Meropenem® a una concentración de 4 µg/mL.

De igual manera, se elaboró un mapa de *spots* con los aislamientos seleccionados como resistentes correspondientes a cada río, en placas con Meropenem[®] 4 µg/mL, Imipenem[®] 4 µg/mL y una combinación de ambos antibióticos, con el fin de evaluar la resistencia de las cepas.

Cuadro 7.1: Concentración mínima inhibitoria (MIC) con antibióticos carbapenémicos Meropenem[®] e Imipenem[®] en medio CHROMagar mSuperCARBA[®]

| Concentración | Volumen de antibiótico |
|---------------|------------------------|
| 0.125 µg/mL | 1.125 µL |
| 0.25 µg/mL | 2.25 µL |
| 0.50 µg/mL | 4.5 µL |
| 1 µg/mL | 9 µL |
| 2 µg/mL | 18 µL |
| 4 µg/mL | 36 µL |

7.3.4. Extracción de ADN de las cepas resistentes a carbapenémicos

A partir del cepario con crecimiento en concentraciones de 4 µg/mL y 2 µg/mL de Meropenem[®], correspondiente a cada punto de muestreo, se realizó un cultivo *overnight* en caldo LB con el objetivo de obtener biomasa suficiente para la extracción de ADN. La extracción se efectuó mediante el método clásico de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI). Posteriormente, la concentración de ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV-Visible NanoDrop[®] (Thermo Fisher Scientific[®]), siguiendo el protocolo específico para la determinación de ácidos nucleicos.

La pureza del extracto se evaluó mediante las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$. Valores cercanos a 1.8 en $A_{260/280}$ indican ADN puro sin contaminación proteica, mientras que un cociente $A_{260/230}$ cercano a 2.0 sugiere ausencia de contaminantes orgánicos como fenoles o sales residuales. Con base en estos resultados, se determinó la calidad del ADN extraído y se procedió a establecer la presencia o ausencia de los genes de interés. El procedimiento completo se encuentra descrito en el documento POE V.

Cuadro 7.2: Cuantificación y pureza de las muestras resistentes a carbapenémicos mediante NanoDrop™ (Thermo Scientific™)

| Muestra | Concentración (ng/ μ L) | A260/280 | A260/230 |
|---------|-----------------------------|----------|----------|
| VN 10 | 160.8 | 1.68 | 1.66 |
| VN 100 | 55.2 | 1.76 | 1.05 |
| RCA | 19.8 | 1.81 | 1.74 |
| RCR | 118.9 | 1.62 | 1.97 |
| RC10 | 30.2 | 1.74 | 1.18 |
| RCR2110 | 199.8 | 1.68 | 2.00 |
| RCP2 | 13.5 | 1.54 | 0.97 |
| RCP4 | 4072.0 | 1.95 | 1.96 |

Nota. Las siglas VN indican que las muestras provienen del río Villalobos, mientras que RC corresponde a muestras de la microcuenca del río Contreras. Los códigos numéricos y literales (A, R y P) fueron asignados para facilitar la identificación y localización de las muestras durante el estudio.

7.3.5. Identificación de genes codificantes de carbapenemasas mediante PCR múltiple

Para la detección de los genes codificantes de carbapenemasas *blaVIM*, *blaKPC*, *blaIMP*, *blaOXA-48-like* y *blaNDM*, se utilizaron extractos de ADN purificados de las cepas previamente confirmadas como resistentes a carbapenémicos. La metodología para la detección de estos genes mediante PCR múltiple se encuentra detallada en el POE II. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al % (indicar concentración utilizada), corriéndose a 100 V durante 30 minutos.

7.3.6. Análisis de qPCR y PCR para los genes móviles relacionados con la resistencia a metales *intl1* e *ISCR1*

Se utilizaron extractos de ADN de las cepas confirmadas como resistentes a carbapenemasas para la amplificación de dos elementos genéticos móviles (*intl1* e *ISCR1*) que confieren resistencia a diversas clases de metales.

La detección del gen *intl1* se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el sistema de detección SYBR Green.

Mientras que, para el gen *ISCR1* se llevó a cabo una reacción de PCR convencional, con el objetivo de confirmar su presencia a través de la amplificación del fragmento esperado.

- ***intl1*** qPCR:
 - Forward: 5'-TTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTG-3'
 - Reverse: 5'-TGCCGTGATCGAAATCCAGATCCT-3'
 - Producto esperado: 109bp (Okonkwo2023) .
- ***ISCR1*** PCR:
 - Forward: 5'-ATGGTTTCATGCGGGT-3'
 - Reverse: 5'-CTGAGGGTGTGAGCGAG-3'
 - Producto esperado: 475bp (Wang2012) .

Las reacciones de qPCR se realizaron mediante la detección con SYBR Green en un sistema de PCR en tiempo real, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las abundancias relativas de los elementos genéticos móviles y de los genes de resistencia a metales se calcularon utilizando el método de comparación de ciclos umbral ($\Delta\Delta C_t$) para cada muestra.

7.3.7. Secuenciación de las muestras positivas para resistencia a genes carbapenémicos y genes móviles relacionados con la resistencia a metales *intl1* e *ISCR1*

Los productos de PCR positivos fueron seleccionados para su confirmación mediante secuenciación. Se eligieron nueve muestras que mostraron resistencia a carbapenémicos, específicamente para los genes *blaNDM* y *blaKPC*. Asimismo, se seleccionaron dos muestras de cada río para confirmar la presencia de los

genes móviles relacionados con resistencia a metales *intl1* e *ISCR1*.

Las muestras VNMX corresponden al ADN de VN10 y RCMX al ADN de RC10, ambas con resultados positivos para *intl1* e *ISCR1*. La secuenciación se realizó mediante el servicio Sanger de Macrogen[®], utilizando el gen objetivo descrito en el Cuadro 7.3. Se efectuó una secuenciación bidireccional para cada muestra.

Cuadro 7.3: Clasificación de las cepas (ERC) seleccionadas para la comprobación de genes específicos mediante secuenciación tipo *tag*

| Código | Especie | Gen objetivo |
|-------------|---------------------------|--------------|
| VN 10 | <i>E. coli</i> | <i>NDM</i> |
| VN 100 | <i>E. coli</i> | <i>NDM</i> |
| RCA | <i>Klebsiella</i> | <i>KPC</i> |
| RCR | <i>Klebsiella</i> | <i>KPC</i> |
| RC10 | <i>E. coli</i> | <i>KPC</i> |
| RCR2110 | <i>Acinetobacter spp.</i> | <i>intl1</i> |
| VN10 | <i>E. coli</i> | <i>intl1</i> |
| VNMX : VN10 | <i>E. coli</i> | <i>ISCR1</i> |
| RCMX : RC10 | <i>Klebsiella</i> | <i>ISCR1</i> |

7.3.8. Análisis bioinformático

Se realizó un análisis con la herramienta ResFinder (CGE, Technical University of Denmark), con el objetivo de confirmar la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos (AMR), específicamente aquellos genes *bla* asociados a resistencia a carbapenémicos, en las cepas previamente identificadas. Se empleó un

umbral de identidad (%ID) del 90 % como criterio para considerar una coincidencia positiva. Este análisis permitió identificar con precisión los genes de resistencia presentes en cada muestra.

Complementariamente, se utilizó la base de datos CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) para validar la presencia de los genes de resistencia a carbapenémicos mediante una comparación con la base de datos de ResFinder. Se consideraron únicamente alineaciones con los criterios *Perfect hit* y *Strict hit*, aplicando un filtro de $\geq 95\%$ de identidad y una cobertura de alta calidad en las secuencias. Es importante señalar que, si bien se identificaron otros genes de resistencia no relacionados con carbapenémicos, estos fueron excluidos del presente análisis.

Para el gen *ISCR1*, se empleó la base de datos ISFinder (Institut Pasteur), especializada en secuencias de elementos genéticos móviles, particularmente secuencias de inserción (IS). El análisis se aplicó exclusivamente a la muestra *RCMX_ISCR1*, identificando alineaciones significativas con la familia *ISCR*, lo que confirmó la presencia de dicho elemento genético móvil.

En cuanto a la notación utilizada, **N.I.** (no identificado) se refiere a casos en los que no se detectó ninguna coincidencia significativa, mientras que **N.A.** (no aplica) se emplea para aquellas muestras en las que el análisis no era pertinente debido a que el gen objetivo no correspondía a una secuencia tipo IS. Por último, para el gen *Int1* se intentó su confirmación

mediante la herramienta IntegronFinder; sin embargo, no se logró detectar la estructura del integrón en las secuencias analizadas. Por ello, se conservaron únicamente los resultados obtenidos mediante qPCR.

8.1. Resultados fenotípicos

8.1.1. Identificación y distribución fenotípica de enterobacterias en los ríos Contreras y Villalobos

A continuación, se presentan los resultados del análisis fenotípico de las muestras recolectadas en el río Contreras en cuatro puntos de muestreo, utilizando el medio cromogénico CHROMagarTM mSuperCARBA®. Este medio permitió identificar y diferenciar géneros bacterianos (enterobacterias) en tres niveles de dilución: 1:10, 1:100 y 1:1000.

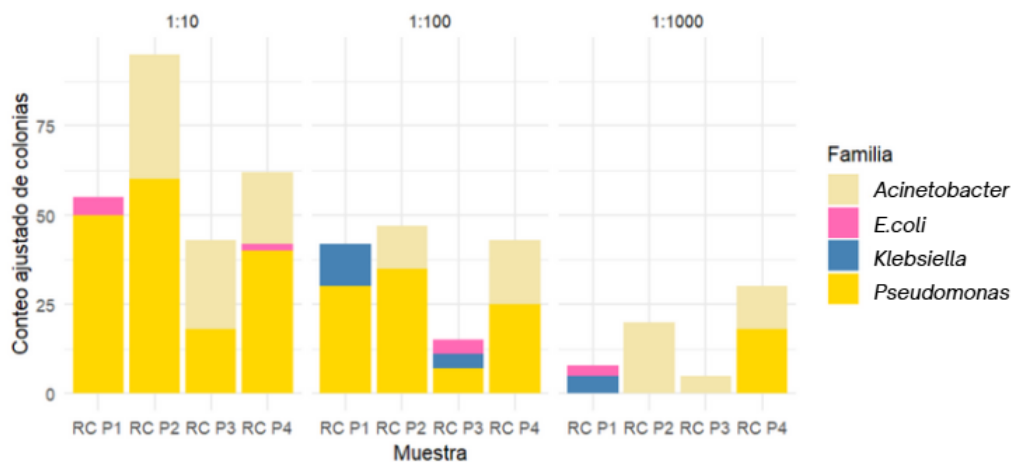


Figura 8.1: Dispersión de géneros bacterianos en el río Contreras por punto de muestreo y dilución

En la Figura 8.1 se observa la distribución relativa de cuatro géneros bacterianos: *Acinetobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*, en función de la dilución y del punto de muestreo (RC-P1 a RC-P4). Los colores asignados a cada género corresponden a las características fenotípicas expresadas en el medio cromogénico, las cuales están relacionadas con la producción de diferentes tipos de enzimas β -lactamasas.

Se determinó una mayor abundancia de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* en todos los puntos de muestreo, en comparación con *Klebsiella* y *E. coli*, que se obtuvieron en menor proporción. Esto sugiere una variabilidad en la composición bacteriana del río según la ubicación y la concentración de las muestras, indicando diferencias en la contaminación fecal.

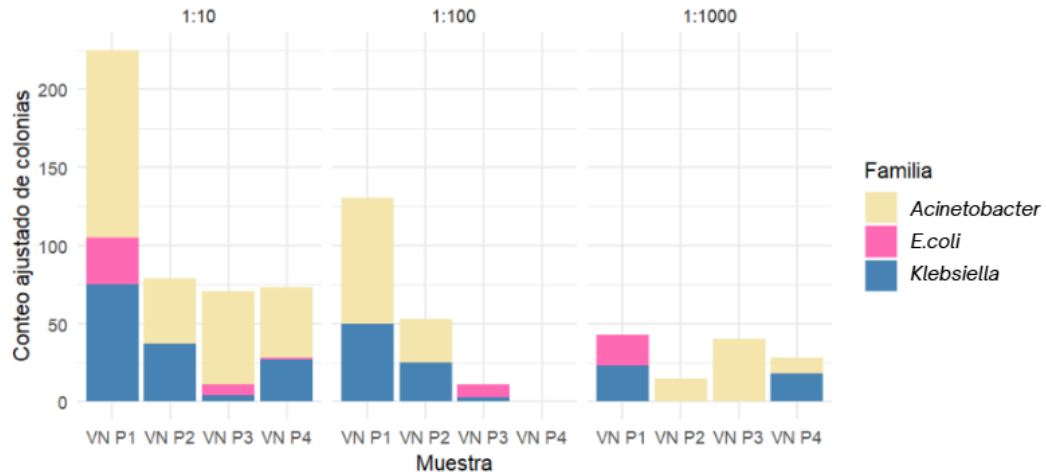


Figura 8.2: Dispersión de géneros bacterianos en el río Villalobos por punto de muestreo y dilución

En la figura anterior se presenta la variabilidad de las colonias bacterianas identificadas, correspondientes a los géneros *Acinetobacter*, *Escherichia coli* y *Klebsiella*, en cuatro puntos de muestreo VN (P1 a P4). Se observa una mayor abundancia total en la dilución 1:10 del punto VN P1, donde predomina *Acinetobacter*, seguido por *Klebsiella* y, en menor proporción, *E. coli*.

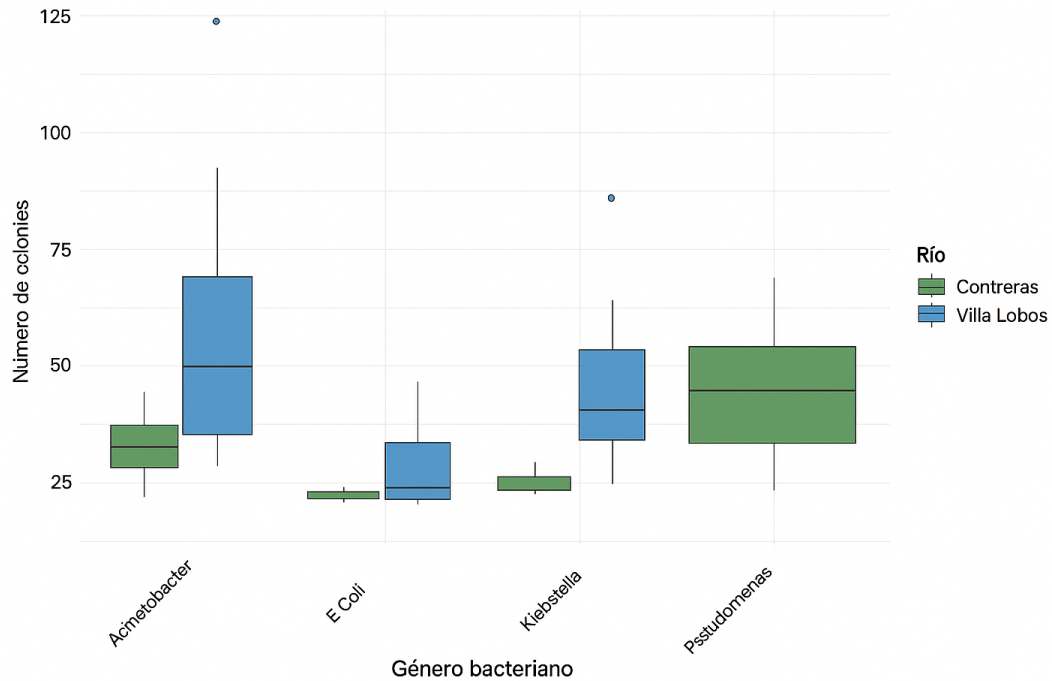


Figura 8.3: Distribución de los géneros bacterianos en los ríos Contreras y Villalobos

Se presenta la distribución del conteo ajustado de colonias para cada género bacteriano (*Acinetobacter*, *E. coli*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*) en los ríos Contreras y Villalobos. Se observa que el río Villalobos presenta una mayor variabilidad y valores más elevados de conteo para *Acinetobacter*, incluyendo un valor atípico superior a 120 colonias. En comparación, en el río Contreras los valores se concentran en rangos más bajos. Esta diferencia sugiere un mayor índice de contaminación en el río Villalobos.

8.1.2. Caracterización bioquímica de bacterias aisladas de los ríos Contreras y Villalobos mediante API20E y prueba de oxidasa

En el Cuadro 6.5 se presentan los resultados obtenidos para la identificación bacteriana a partir de cepas aisladas de los ríos Contreras y Villalobos, empleando la identificación presuntiva en CHROMagar™ mSuperCARBA®, el análisis bioquímico con el sistema API20E y el software APIWEB™, así como la prueba de actividad oxidasa.

Como se esperaba, las cepas clasificadas como *E. coli* y *Klebsiella spp.* presentaron un resultado negativo para la prueba de oxidasa. Lo mismo se observó en las cepas identificadas como *Acinetobacter spp.*, consistente con su perfil bioquímico. En contraste, la cepa RCP4, presumiblemente correspondiente al género *Pseudomonas*, mostró una reacción positiva, lo cual es característico de este grupo bacteriano.

En cuanto a la comparación entre la identificación presuntiva en el medio cromogénico y los resultados del sistema API20E, se determinó una correlación en la mayoría de las cepas. No obstante, se observaron algunas discrepancias. En la cepa VN10, identificada inicialmente como *E. coli* en CHROMagar™, el sistema API20E la clasificó como *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, con un porcentaje de identidad del 75 %. Esta asignación genera poca confiabilidad, dado que el medio utilizado está formulado específicamente para aislar enterobacterias productoras de carbapenemasas, no *Salmonella*. Este resultado po-

dría atribuirse a la ausencia de reactivos clave o a condiciones subóptimas durante la prueba bioquímica.

De igual forma, para la cepa RCR2110, presumiblemente del género *Acinetobacter*, se obtuvo un porcentaje de identidad del 52.1 %, indicando baja confiabilidad en la identificación. En conclusión, aunque existe concordancia general entre el medio cromogénico y la prueba API20E para la mayoría de los aislamientos, los resultados con porcentajes de identidad bajos (≤ 99) sugieren la necesidad de emplear métodos más robustos para su confirmación, como la secuenciación molecular del gen 16S.

| Código | Especie sugerida bacteriana según CHROMagar™ mSuperCARBA® | Especie sugerida bacteriana según API20E | %ID | Prueba oxidasa |
|---------|--|--|-------|----------------|
| VN 10 | <i>E.coli</i> | <i>Salmonella enterica ssp arizonae</i> | 75.0% | Negativa |
| VN 100 | <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli 1</i> | 92.6% | Negativa |
| RCA | <i>Klebsiella</i> | <i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i> | 81.0% | Negativa |
| RCR | <i>Klebsiella</i> | <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> | 96.8% | Negativa |
| RC10 | <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli 1</i> | 90.0% | Negativa |
| RCR2110 | <i>Acinetobacter</i> spp. | <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | 52.1% | Negativa |
| RCP2 | <i>Acinetobacter</i> spp. | <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> | 83.4% | Negativa |
| RCP4 | <i>Pseudomonas</i> spp. | <i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> | 75.0% | Positiva |

Cuadro 6.5. Comparación de especies según CHROMagar™ mSuperCARBA® y API20E, además de la prueba de oxidasa en cepas de ambos ríos

8.2. Resistencia bacteriana en los ríos Contreras y Villalobos a carbapenémicos

8.2.1. Resistencia bacteriana en los ríos Contreras y Villalobos evaluada mediante CHROMagar™ mSuperCARBA® y Meropenem®

Posteriormente, se muestran los resultados de la filtración de las muestras recolectadas en los ríos Contreras y Villalobos mediante un filtro de membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ en placas del medio cromogénico CHROMagar™ mSuperCARBA® suplementadas con el antibiótico Meropenem® a una concentración de $4\ \mu\text{g}/\text{m}$

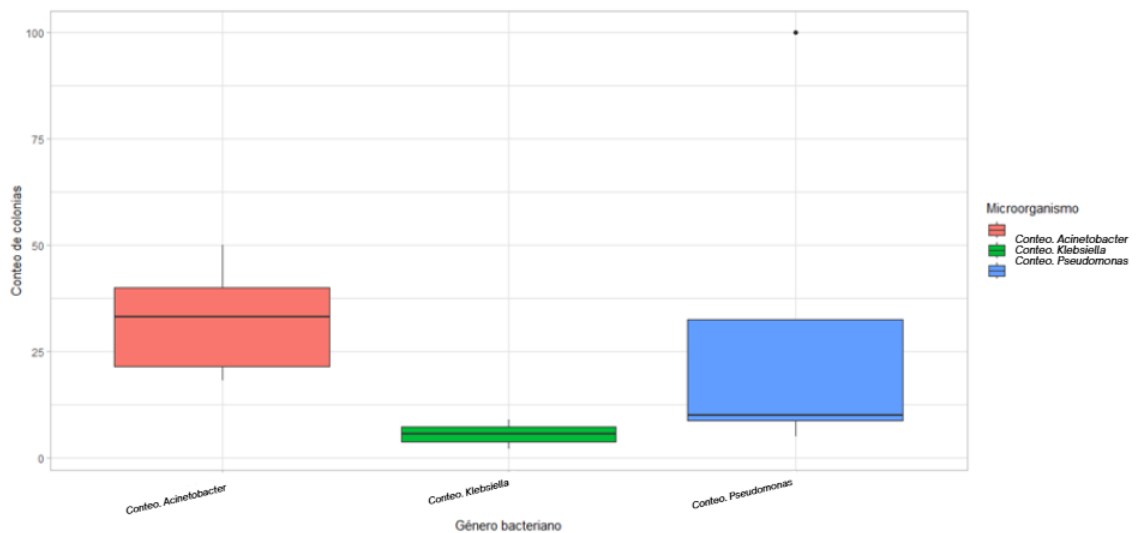


Figura 8.5: Distribución del conteo de colonias bacterianas resistentes tras la filtración de agua en Meropenem® ($4\ \mu\text{g}/\text{mL}$), aisladas en CHROMagar™ mSuperCARBA® a partir de muestras del río Contreras y Villalobos

La figura anterior destaca una mayor abundancia de

colonias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, con medianas de conteo superiores a la distribución de *Klebsiella* y la ausencia de *Escherichia coli*. *Acinetobacter* mostró una distribución con valores aproximados entre 20 y 45 colonias, mientras que el género *Pseudomonas* presentó una variabilidad mayor y un valor atípico superior a 100 colonias, indicando la presencia de cepas altamente resistentes. En comparación, *Klebsiella* presentó conteos considerablemente menores, cercanos al límite inferior. Esto permite indicar que los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* son más frecuentes bajo presión antibiótica en estos cuerpos de agua urbana contaminados.

8.2.2. Evaluación comparativa de la resistencia bacteriana a carbapenémicos (Meropenem[®] e Imipenem + Cilastatina[®] y una combinación de ambos) en cepas aisladas de los ríos Contreras y Villalobos

A partir de los aislamientos bacterianos obtenidos de los ríos Contreras y Villalobos, se realizó un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana utilizando placas de agar cromogénico CHROMagar[™] mSuperCARBA[®] cuadriculadas, con el objetivo de evaluar la capacidad de crecimiento de cada cepa en presencia de carbapenémicos. Las cepas fueron sembradas de forma puntual (*spot*) sobre tres tipos de placas: una suplementada con una combinación de Meropenem[®] (2 µg/mL) e Imipenem/Cilastatina[®] (2 µg/mL), alcan-

zando una concentración total de 4 µg/mL, y dos placas individuales conteniendo Meropenem[®] (4 µg/mL) e Imipenem/Cilastatina[®] (2 µg/mL), respectivamente.

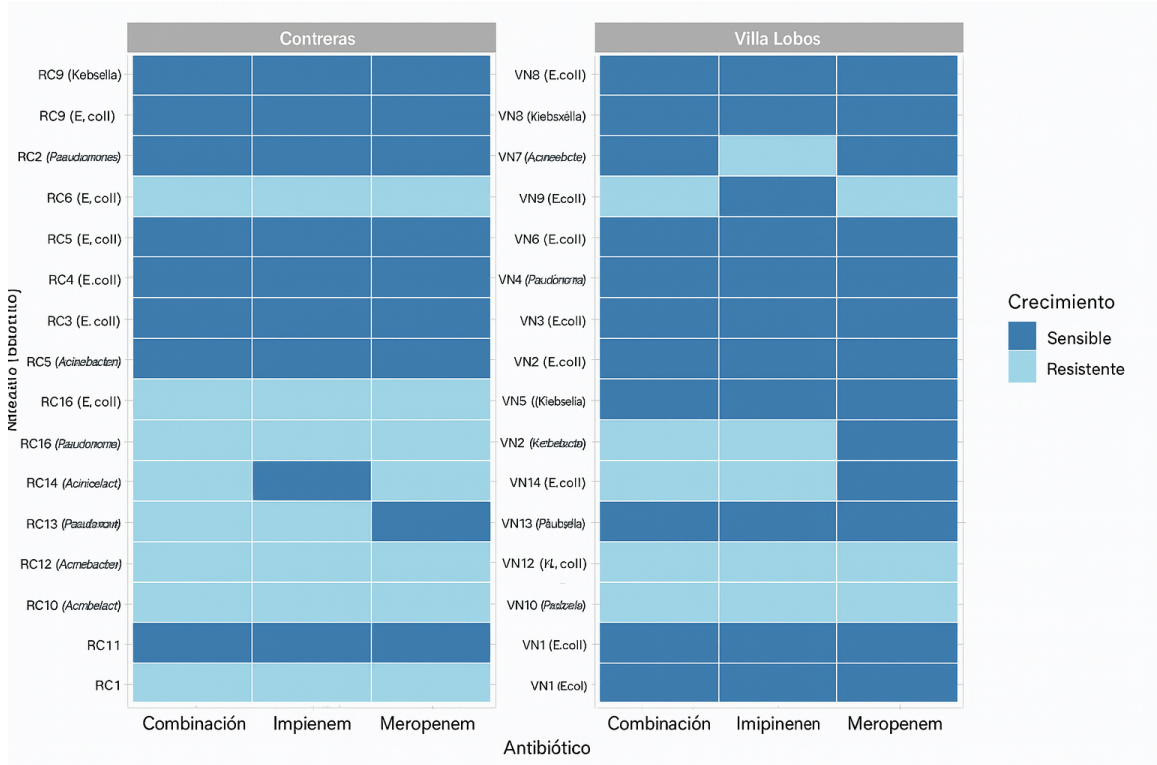


Figura 8.6: Mapa de calor para el perfil de resistencia de aislamientos bacterianos obtenidos en los ríos Contreras y Villalobos con respecto a diferentes antibióticos carbapenémicos

El mapa de calor describe patrones diferenciales de resistencia bacteriana frente a los carbapenémicos evaluados, donde se observa una mayor proporción de aislamientos resistentes a la combinación de ambos antibióticos en el río Villalobos, con un total de 35 muestras resistentes, en comparación con el río Contreras, que presentó 26 cepas resistentes. Asimismo, en cuanto a géneros bacterianos, se establece que los que predominan en el río Villalobos son *Escherichia*

coli y *Klebsiella*, mostrando un crecimiento constante ante los tres antibióticos. Mientras que, para el río Contreras, se determinaron cepas de *Acinetobacter* y *Pseudomonas* que presentaron sensibilidad. Estos hallazgos sugieren la presencia de mecanismos de resistencia mediados por enzimas β -lactamasas con actividad frente a múltiples carbapenémicos, lo que induce preocupación y la necesidad de una vigilancia continua en cuerpos de agua urbana.

8.3. Extracción de ADN

Las muestras de los ríos Contreras y Villalobos fueron recolectadas de cuatro puntos diferentes en el mes de marzo. Dichas muestras fueron evaluadas mediante el agar cromogénico CHROMagarTM mSuperCARBA[®] suplementado con el antibiótico Meropenem[®] (4 μ g/mL), con el fin de detectar la presencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC).

A partir de los resultados, se seleccionaron ocho cepas resistentes, de las cuales seis pertenecen a la microcuenca del río Contreras y dos al río Villalobos. La extracción de ADN se realizó empleando el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI). Posteriormente, se cuantificó la concentración de ADN y la pureza utilizando el espectrofotómetro UV-Visible NanoDrop[®] (Thermo Fisher Scientific[®]).

Table 8.1: Quantification and purity of carbapenem-resistant isolates using Thermo Scientific™ NanoDrop™

| Sample | Concentration (ng/ μ L) | A260/280 | A260/230 |
|---------|-----------------------------|----------|----------|
| VN 10 | 160.8 | 1.68 | 1.66 |
| VN 100 | 55.2 | 1.76 | 1.05 |
| RCA | 19.8 | 1.81 | 1.74 |
| RCR | 118.9 | 1.62 | 1.97 |
| RC10 | 30.2 | 1.74 | 1.18 |
| RCR2110 | 199.8 | 1.68 | 2.00 |
| RCP2 | 13.5 | 1.54 | 0.97 |
| RCP4 | 4072 | 1.95 | 1.96 |

Nota: Concentración y pureza de los extractos de ADN obtenidos de los ríos Contreras y Villalobos, seleccionados como cepas resistentes mediante el resultado en CHROMagar™ mSuperCARBA®. El ratio de pureza A260/280 indica la razón de absorbancia a 260 nm y 280 nm para ácidos nucleicos

En el cuadro anterior se describe la concentración y la pureza de las muestras resistentes a carbapenémicos (ERC) procesadas mediante el método PCI. Se determinó que las muestras de ambos ríos presentan un ratio de pureza para ácidos nucleicos dentro del rango esperado (1.8–2.0) y, asimismo, un índice A260/230 asociado a contaminantes orgánicos con valores cercanos a 2.0. (Kaeppler et al., 2020)

8.4. Detección de genes codificantes de carbapenemasa

La identificación de genes codificantes de carbapenemasas (*blaVIM*, *blaKPC*, *blaIMP*, *blaOXA48-like*

y *blaNDM*) se evaluó mediante PCR múltiplex en cepas previamente seleccionadas como enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC), provenientes de ambos ríos. Se determinó la presencia de bandas definidas de aproximadamente ~ 512 bp, correspondientes al gen *blaNDM*, en muestras del río Villalobos, en aislamientos previamente identificados como cepas de *Escherichia coli*. Es importante mencionar que, en las muestras R3 a R5 se observaron bandas tenues alrededor de ~ 916 bp, relacionadas con el gen *blaKPC*. No obstante, debido a la baja intensidad de las bandas, estas muestras fueron enviadas a Macrogen[®] para confirmar específicamente la presencia de dicho gen.



Figura 8.7: Detección de genes codificantes para carbapenemasas (*blaVIM*, *blaKPC*, *blaIMP*, *blaOXA48-like* y *blaNDM*)

Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 0.3% para la visualización de productos de PCR de genes codificantes para carbapenemasas (*blaVIM*, *blaKPC*, *blaIMP*, *blaOXA48-like* y *blaNDM*). En el pozo 1 se colocó la escalera molecular molecular GeneRuler 1kb ThermoScientific[®], seguido en el pozo 2 por el control negativo. En los siguientes pozos se cargaron las siguientes muestras: pozo 3, la muestra R1 (código RCP2); en el pozo 4, la muestra V1 (código VN100); en el pozo 5, la muestra V2 (código VN10); en el pozo 6, la muestra R2 (código RCR2110); en el pozo 7, la muestra R3 (código RCR); en el pozo 8, la muestra R4 (código RCA); y en el pozo 9, la muestra R5 (código RC10). Finalmente, en el pozo 10 se presenta nuevamente la escalera molecular

8.4.1. Detección de genes móviles relacionados con la resistencia a metales pesados *ISCR1*

La detección de genes móviles asociados a la resistencia a metales pesados se evaluó mediante la amplificación del gen *ISCR1* (Insertion Sequence Common Region 1) por PCR. De las siete muestras analizadas, se observaron bandas definidas y de alta intensidad alrededor de ~ 475 bp. Se confirmó la presencia del gen en la muestra VN10 del río Villalobos, correspondiente a *E. coli*, y en la muestra RC10 del río Contreras, correspondiente a la misma especie.



Figura 8.8: Detección de gen MGE ISCR en cepas ERC

Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 0.3% para la visualización de productos de PCR de genes de carbapenemasas. En el pozo 1 se colocó el control negativo. En los siguientes pozos se cargaron las siguientes muestras: pozo 2, la muestra A (código VN10); en el pozo 3, la muestra B (código RCR2110); en el pozo 4, la muestra C (código RCR); en el pozo 5, la muestra D (código RCA); en el pozo 6, la muestra E (código VN100); en el pozo 7, la muestra F (código RC10); y en el pozo 8, la muestra G (código RCP2)

8.5. Cuantificación del gen *Intl1* relacionado con metales pesados por medio de qPCR

Para evaluar la presencia del gen integrasa de integrón clase 1 (*Intl1*) en muestras de los ríos Contreras y Villalobos, se llevó a cabo una reacción de qPCR en tiempo real utilizando los cebadores F3 y R3, validados previamente por Rosewarne et al. (2010) y recomendados por (Okonkwo et al., 2023) por su buena especificidad y cobertura. Se consideró como positiva la detección de señales de fluorescencia con valores de Ct mayores a 30.

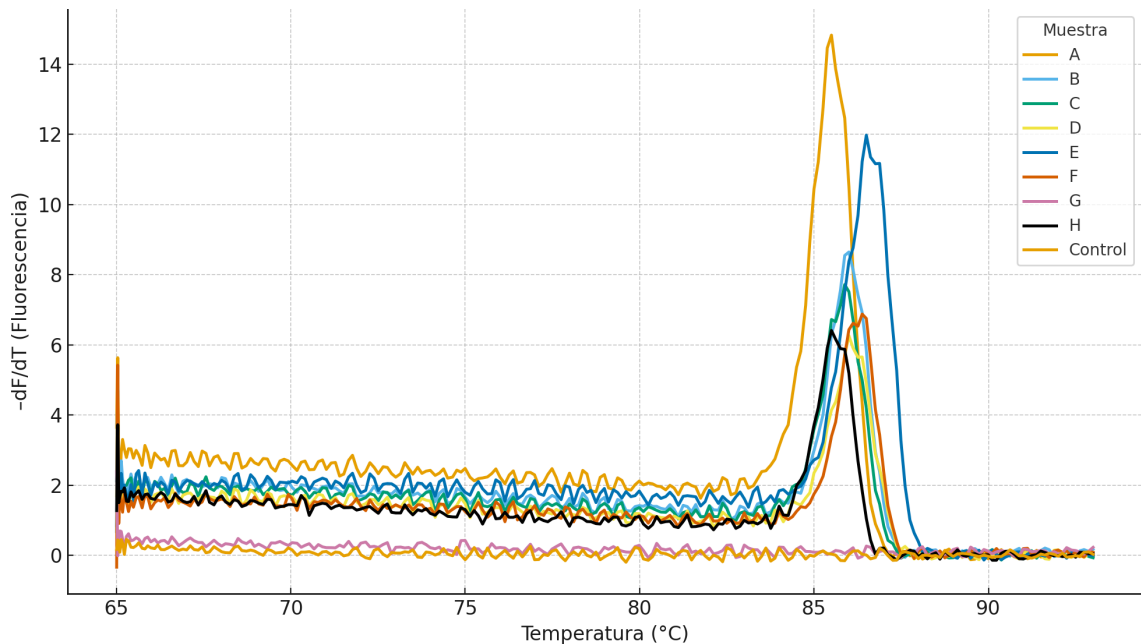


Figura 8.9: Curva de disociación para el gen *Intl1* en las muestras de los ríos Contreras y Villalobos

Nota: Elaboración propia

Las curvas de amplificación (Figura 8.9), en compa-

ración con el control negativo, muestran que siete de las ocho muestras presentaron valores de Ct dentro del rango establecido (20–25), lo que indica la presencia del gen *intl1*. La muestra G (código RCP4) se determinó como negativa, al no presentar amplificación detectable.

La curva de disociación (Figura 8.9) evidenció un único pico definido en el rango de 85–87 °C para todas las muestras positivas, lo cual confirma la especificidad de la amplificación y descarta la presencia de productos inespecíficos o contaminación en el control.

Asimismo, el análisis de abundancia relativa estimada mediante el método 2^{-Ct} , representado en escala logarítmica (Figura 8.10), indicó que las muestras A (código VN100) y E (código VN10) presentaron los niveles más altos de expresión del gen *intl1*, seguidas por las muestras B (código RCA), F (código RC10) y C (código RCR). En contraste, las muestras D (código RCR2110) y H (código RCP2) mostraron niveles más bajos, mientras que la muestra G (código RCP4) no presentó amplificación.

Estos resultados confirman que el gen *intl1* constituye un biomarcador confiable de contaminación ambiental y un indicador del potencial de diseminación de genes de resistencia a antibióticos .

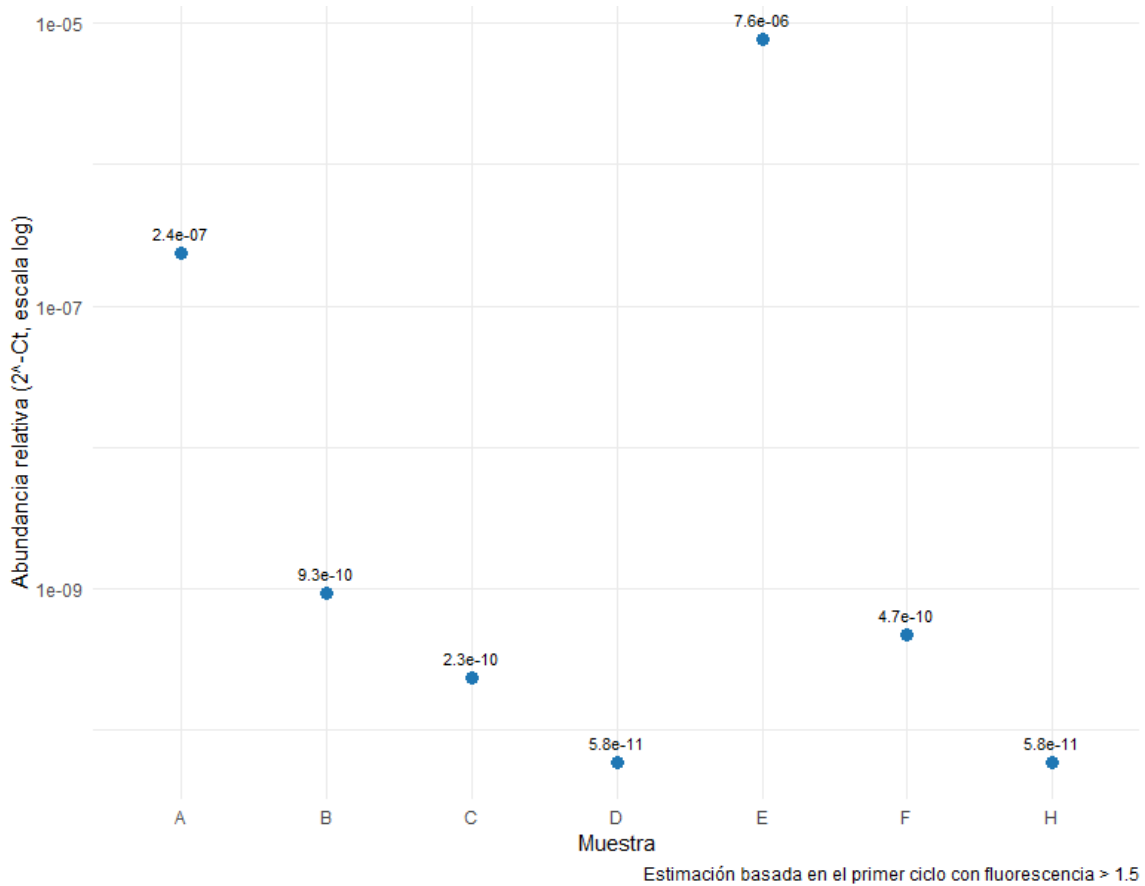


Figura 8.10: Abundancia relativa del gen *Intl1* en los ríos Contreras y Villalobos

Nota. La abundancia relativa del gen *Intl1* se estimó utilizando el método 2^{-Ct} , en escala logarítmica, considerando como umbral de detección un valor de fluorescencia mayor a 1.5. Esta aproximación permitió comparar de forma relativa la cantidad del gen objetivo en las muestras de ADN, asumiendo una eficiencia cercana al 100 % y condiciones de amplificación homogéneas. Los valores de Ct fueron tomados directamente del primer ciclo en el que la fluorescencia superó el umbral establecido

Adicionalmente, se realizaron gráficas de violín que describen cómo varía la abundancia relativa del gen *Intl1* en función de la presencia o ausencia de los genes *blaNDM*, *blaKPC* e *ISCR1*, previamente identificados por PCR en las muestras de los ríos Contreras y Villalobos.

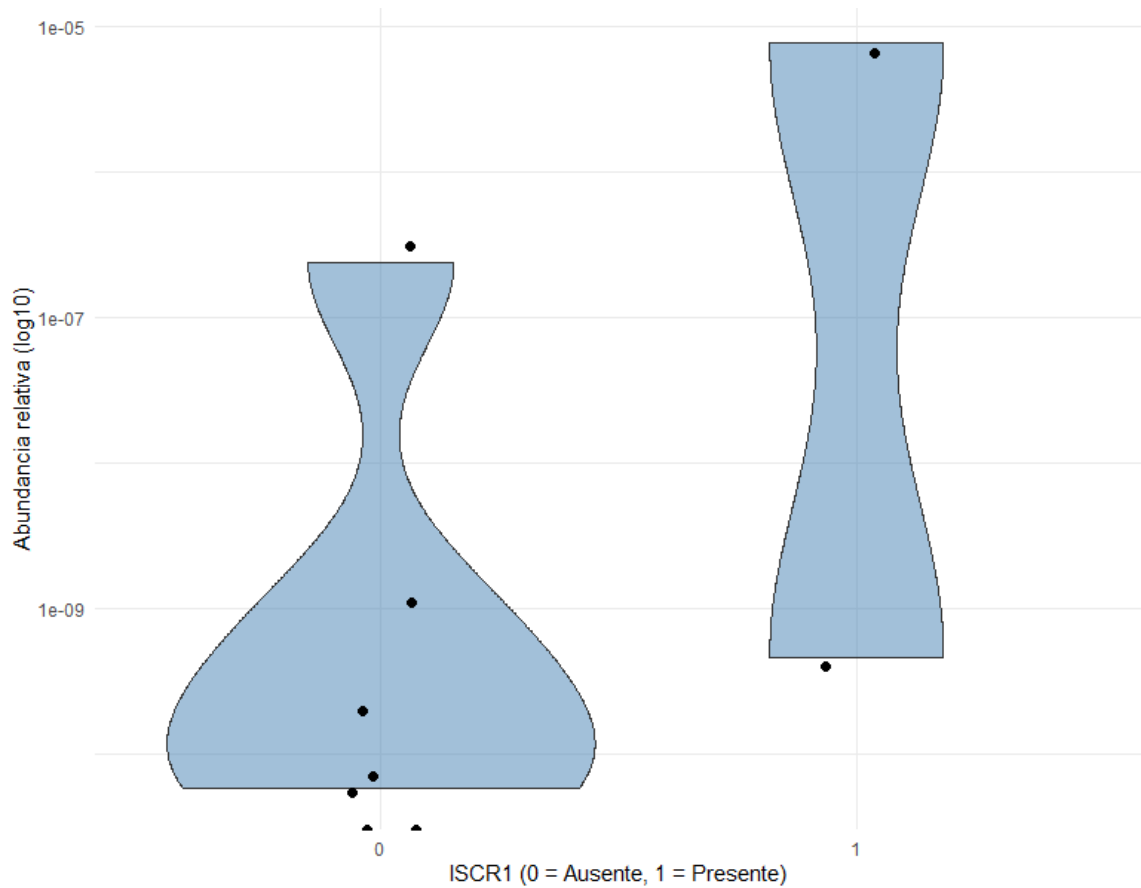


Figura 8.11: Distribución de la abundancia relativa del gen *Intl1* según la presencia del gen *ISCR1*

La figura muestra la distribución de la abundancia relativa del gen *Intl1* en función de la presencia del gen *ISCR1*. Se observa que las muestras con presencia de *ISCR1* presentan una alta variabilidad, con valores que oscilan desde niveles bajos ($\sim 10^{-9}$) hasta valores máximos ($\sim 10^{-5}$) de abundancia relativa del gen *Intl1*. En comparación, las muestras en las que el gen *ISCR1* está ausente muestran valores consistentemente bajos, sin presencia de valores extremos. Esta distribución sugiere una posible coocurrencia entre ambos elementos genéticos móviles, lo cual coincide

con estudios previos que describen la participación conjunta de *ISCR1* e integrones clase 1 en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos a través de elementos genéticos móviles (MGE). (Gillings et al., 2015; Toleman & Walsh, 2010)

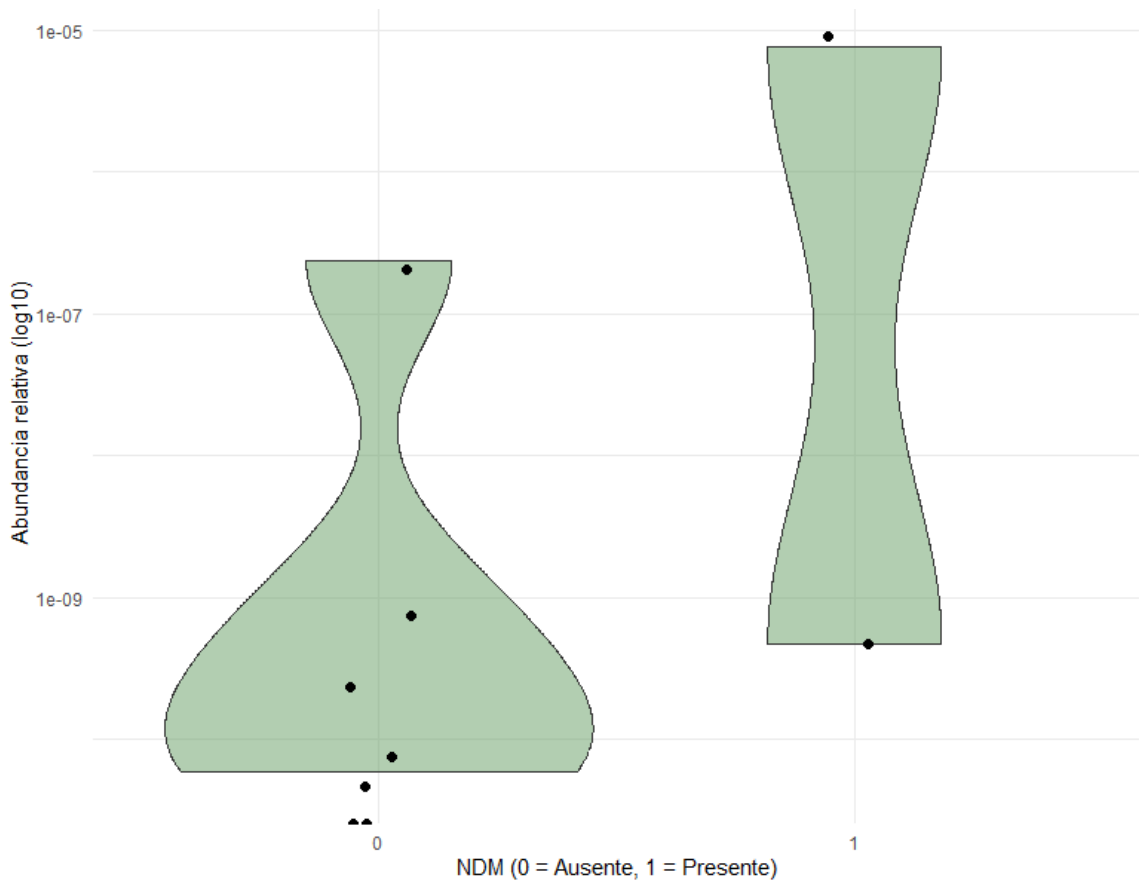


Figura 8.12: Distribución de la abundancia relativa del gen *Intl1* según la presencia del gen *blaNDM*

En las muestras de los ríos Contreras y Villalobos se observa que las positivas para el gen *blaNDM* tienden a mostrar niveles más elevados de *Intl1*, alcanzando valores de hasta $\sim 10^{-5}$. En contraste, las muestras negativas para *blaNDM* presentan una mayor dispersión, pero dentro de rangos más bajos ($\sim 10^{-9}$ a $\sim 10^{-7}$). Estos resultados sugieren una posible relación entre

ambos genes, dado que se ha documentado que los integrones de clase 1, así como las regiones asociadas a elementos *ISCR1*, actúan como vehículos de genes de resistencia a metales y antibióticos (MRGs) para la incorporación de resistencia a genes *blaNDM*. (Li et al., 2020; Tavares et al., 2022)

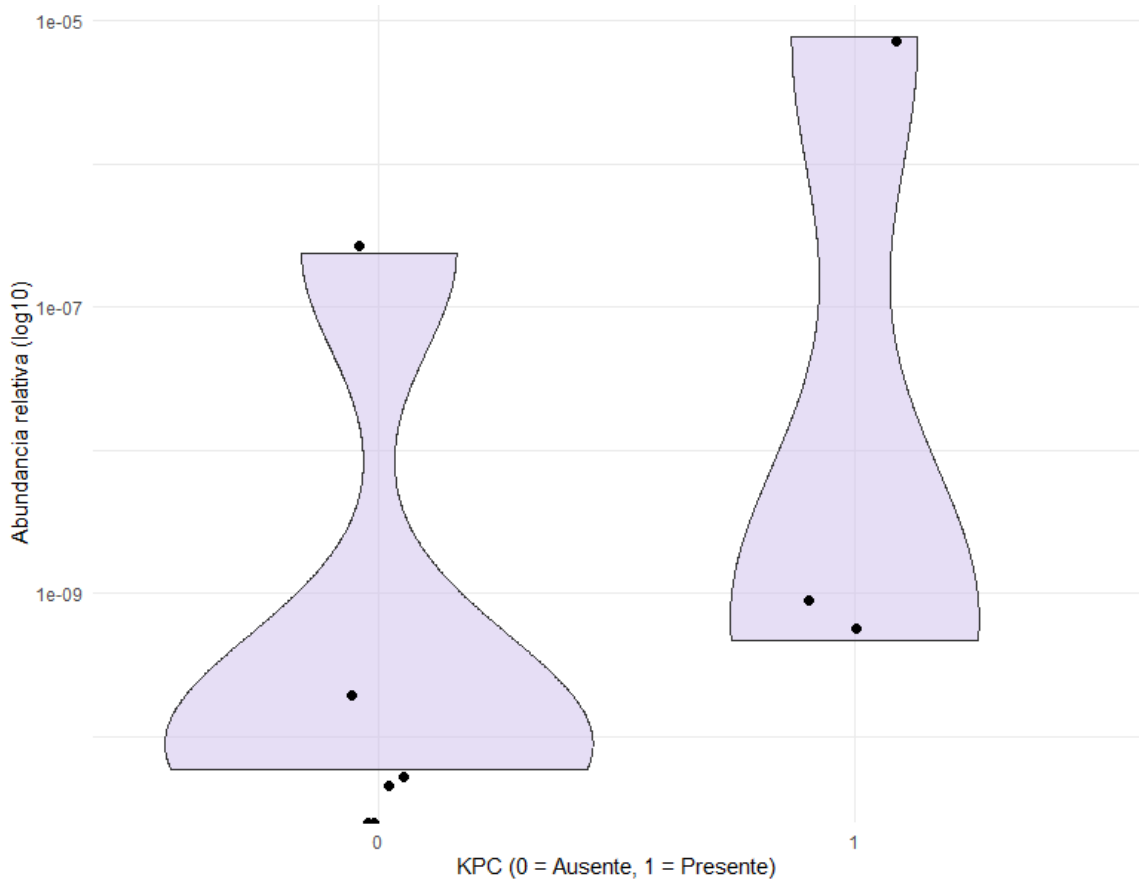


Figura 8.13: Distribución de la abundancia relativa del gen *Intl1* según la presencia del gen *blaKPC*

La distribución de la abundancia relativa del gen *Intl1* en función de la presencia del gen *blaKPC* muestra que las muestras positivas para *blaKPC* tienden a presentar niveles más altos de *Intl1*, alcanzando valores de hasta $\sim 10^{-5}$. En contraste, las muestras ne-

gativas se concentran en valores más bajos, alrededor de $\sim 10^{-9}$. Estos resultados respaldan la coexistencia de integrones de clase 1 y genes *blaKPC* como vehículos genéticos para la adquisición y diseminación de genes de resistencia a carbapenémicos. (Lima et.al., 2014)

8.6. Análisis bioinformático de la secuenciación-*tag* de enterobacterias resistentes a carbapenémicos y metales pesados

Para confirmar los resultados de amplificación por PCR y qPCR, las cepas clasificadas como enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) fueron enviadas para secuenciación al laboratorio externo MacroGene[®] (Corea del Sur), con el objetivo de confirmar la presencia de los genes de interés: *blaKPC*, *blaNDM*, *intl1* e *ISCR1*. Para el análisis de las secuencias obtenidas, se generaron secuencias consensuadas a partir de los archivos **.fasta**, utilizando lecturas bidireccionales de cada muestra en el software CodonCode Aligner, versión 12.0.1, operando en un entorno Windows 11 Home Single Language, con un procesador Intel[®] Core[™] i7-11370H @3.30 GHz de 11^a generación y 16 GB de RAM.

La evaluación de la calidad de las secuencias se realizó mediante el programa FastQC, con el cual se determinaron los parámetros de éxito o advertencia

de cada muestra. Los resultados se codificaron como **verde (+)** cuando el parámetro fue aprobado, **azul (*)** en caso de advertencia, y **naranja (-)** si no cumplió con los estándares establecidos. Cabe señalar que, dado que no se trató de una secuenciación de genoma completo, sino de genes individuales amplificados, los criterios de calidad e interpretación se ajustaron en función del contexto experimental. Finalmente, no se obtuvieron secuencias válidas para las siguientes combinaciones de muestra y gen: RC10 y RCR para *blaKPC*, VNMX para *ISCR1*, y RCP2110 para *intl1*.

| Parámetros de Calidad | RCA_KPC | RCMX_ISCR1 | VN10_NDM | VN100_NDM | VN10G_Intl1 |
|---|---------|------------|----------|-----------|-------------|
| Estadísticas básicas | + | + | + | + | + |
| Calidad de secuencia base | + | + | + | + | + |
| Calidad de secuencia <i>per tile</i> | * | * | * | * | * |
| Puntuación de calidad por secuencia contenido de base por secuencia | - | - | - | - | - |
| Contenido de GC por secuencia | + | + | + | + | + |
| Contenido de bases N | + | + | + | + | + |
| Distribución de longitud de secuencia | + | + | + | + | + |
| Niveles de duplicación de secuencia | * | * | * | * | * |
| Secuencias sobrerrepresentadas | - | - | - | - | - |
| Contenido de adaptadores | + | + | + | + | + |

Cuadro 8.14: Calidad de secuencias analizadas de cepas resistentes a carbapenémicos (ERC) en el río Contreras y Villalobos mediante *fastQC*

Los análisis de calidad de las secuencias crudas corresponden a amplicones generados por PCR de genes específicos asociados a resistencia bacteriana (*blaKPC*, *blaNDM*, *intl1* e *ISCR1*). En el cuadro anterior se observa que todas las muestras cumplieron con los parámetros de calidad en los módulos de

estadísticas básicas, calidad por base, contenido de GC, contenido de bases N, distribución de longitud de secuencia y contenido de adaptadores, lo que indica que las secuencias obtenidas presentan una calidad adecuada para su uso en análisis posteriores.

Respecto a los parámetros con advertencias, es importante considerar que las secuencias corresponden a genes individuales amplificados por PCR, por lo que los criterios de calidad aplicados deben interpretarse de manera diferenciada en comparación con la secuenciación genómica. En el módulo de **calidad de secuencia por tile** (*) se observaron ligeras fluctuaciones en la calidad promedio de las lecturas; no obstante, en el contexto de secuencias cortas y específicas, estas variaciones no comprometen la utilidad de los datos (Andrews, 2010). De igual manera, los niveles de duplicación de secuencia (*) son comunes en productos de PCR, dado que todas las secuencias corresponden al mismo fragmento genético (Goodwin et al., 2016).

En cuanto a los parámetros no aprobados, el módulo de **contenido de bases por secuencia** (-) evidenció un sesgo en la proporción de bases en posiciones específicas, lo que puede atribuirse a la presencia de cebadores (Zhou et al., 2011). Finalmente, en relación con las secuencias sobrerrepresentadas, se determinó que el propio amplicón fue la secuencia dominante, lo cual es esperable y aceptable en este tipo de análisis dirigido (*target*), en el que todas las lecturas corresponden al mismo fragmento (Tremblay et al., 2015).

8.7. Identificación molecular de las enterobacterias resistentes a carbapenémicos y metales pesados

Los resultados obtenidos mediante la herramienta NCBI-BLAST permitieron identificar con mayor precisión las cepas resistentes a carbapenémicos (ERC) y metales pesados a partir de la base de datos. Es importante mencionar que el análisis de calidad de las secuencias crudas, realizado previamente con FastQC, permitió establecer con confiabilidad el uso apto de dichos archivos. En el Cuadro . 7 se describe la caracterización molecular de las cepas aisladas en los ríos Contreras y Villalobos, basada en la región blanco del gen de interés.

| Cepa | Descripción | Blast Match | Accesion ID | Porcentaje de identidad |
|-------------|---|--|-------------|-------------------------|
| RCMX_ISCR1 | Escherichia coli strain plasmid p98217-contig_6 | <i>Escherichia coli</i> | CP173499.1 | 99.32% |
| VN10RG_Int1 | Escherichia coli strain 11A20CPO008 plasmid p11A20008_A_NDM | <i>Escherichia coli</i> | PV023095.1 | 98.65% |
| VN100_NDM | Escherichia coli strain NSC468 New Delhi metallo-beta-lactamase (blaNDM) gene | <i>Escherichia coli</i> | MF140533.1 | 99.81% |
| VN10_NDM | Escherichia coli strain NSC468 New Delhi metallo-beta-lactamase (blaNDM) gene | <i>Escherichia coli</i> | MF140533.1 | 99.81% |
| RCA_KPC | Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae RTE-E3 DNA | <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> | AP025034.1 | 83.72% |

Cuadro 8.15: Identificación molecular de las cepas resistentes a carbapenémicos (ERC) en los ríos Contreras y Villalobos

La identificación se realizó tomando en cuenta el

porcentaje de identidad con la secuencia de referencia, el cual fue superior al 98 % en la mayoría de las cepas, lo que respalda la confiabilidad de la asignación taxonómica a nivel de especie. Estos resultados permiten evaluar la diversidad genética y la composición molecular de las cepas (ERC), así como su distribución en ambientes acuáticos urbanos de Guatemala. A partir de la Figura 7.15, se identificó la presencia de *Escherichia coli* en muestras provenientes de ambos ríos, mientras que *Klebsiella pneumoniae* fue detectada exclusivamente en el río Contreras.

En la Figura 7.16 se describen los genes de resistencia a carbapenémicos identificados en cepas analizadas mediante herramientas bioinformáticas. Los análisis realizados con la herramienta ResFinder permitieron confirmar la presencia de genes de resistencia (ARG), específicamente aquellos relacionados con los carbapenémicos, destacando el gen *blaNDM-5* como el más recurrente entre las cepas de ambos ríos. Las muestras RCMX_ISCR1, VN10RG_Int11, VN100_NDM y VN10_NDM presentaron identidades superiores al 99.8 % con genes *blaNDM*, lo cual respalda su relevancia en la resistencia a β -lactámicos de amplio espectro.

La muestra VN10RG_Int11 también mostró presencia de *blaTEM-1B*; se ha observado que dicha enzima puede conferir resistencia a ciertos antibióticos, incluyendo algunos carbapenémicos en bacterias (Yigit et al., 2001). Asimismo, se identificaron otros genes como *blaNDM-20* en dos cepas del río Villalobos, los cuales están asociados a la inactivación de

carbapenémicos.

Por otro lado, en la muestra RCA_KPC no se logró identificar genes *bla* mediante ResFinder, lo que se atribuye a limitaciones en la cobertura de la secuencia (Bortolaia et al., 2020). No obstante, presentó un perfil de resistencia complejo identificado por CARD, que incluyó genes como *LptD*, *KpnG*, *KpnH*, *marA* y *MdtQ*, relacionados principalmente con mecanismos de eflujo de antibióticos y de reducción de la permeabilidad de membrana, involucrados en la resistencia antibiótica, particularmente a carbapenémicos (Stefaniak et al., 2024).

Finalmente, el análisis mediante ISFinder permitió identificar elementos genéticos móviles involucrados en la diseminación de genes de resistencia. En la muestra del río Contreras RCMX_ISCR1 se observó una alineación significativa con el elemento *ISVsa3* de la familia ISCR, con un puntaje de bits de 58 y un valor de 1.00E-08, lo que indica una alta confianza en la asignación. Esto permite establecer una relación directa entre el gen *blaNDM-5* y la movilidad mediada por elementos ISCR, lo que podría facilitar su diseminación horizontal en ambientes acuáticos contaminados (Siguiet et al., 2006). Cabe resaltar que, para el gen *Int1* se intentó su confirmación mediante la herramienta IntegronFinder; sin embargo, no se logró detectar la estructura del integrón en las secuencias, por lo que se conservan únicamente los resultados obtenidos a través del qPCR.

8.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A CARB

| ResFinder | RCMXR_ISCR1 | VN10RG_IntI1 | VN100_NDM | VN10_NDM | RCA_KPC | |
|--|------------------------------|--|--|--|-----------------------------|---|
| Gen de resistencia | <i>bla_{NDM-5}</i> | <i>bla_{TEM-1B}, bla_{NDM-5}</i> | <i>bla_{NDM-5}, bla_{NDM-20}</i> | <i>bla_{NDM-5}, bla_{NDM-20}</i> | N. I | |
| % Identidad | 100.0% | 100.% | 99.81% | 99.81% | N. I | |
| CARD | | | | | | |
| Criterio RGI | Perfecto | Perfecto | Perfecto | Perfecto | Perfecto | Estricto |
| Término ARO | NDM-5 | NDM-5, TEM-1 beta-lactamasa | NDM-5, TEM-1 beta-lactamasa | NDM-5, TEM-1 beta-lactamasa | LptD | KpnG, KpnH, marA, MdtQ |
| Criterios de detección | Modelo homologo de proteína | Modelo homologo de proteína | Modelo homologo de proteína | Modelo homologo de proteína | Modelo homologo de proteína | Modelo homologo de proteína |
| Mecanismo de resistencia | Inactivación del antibiótico | Inactivación del antibiótico | Inactivación del antibiótico | Inactivación del antibiótico | Eflujo de antibióticos | Eflujo de antibióticos, permeabilidad reducida a los antibióticos |
| % Identidad de la región coincidente | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99.74% |
| ISfinder | | | | | | |
| Secuencias que producen alineaciones significativas | ISVsa3 | - | - | - | - | - |
| ISFamilia | ISCR | - | - | - | - | - |
| Origen | <i>Vibrio Salmonicida</i> | - | - | - | - | - |
| Puntuación (bits) | 58 | - | - | - | - | - |
| E.value | 1.00E ⁻⁰⁸ | - | - | - | - | - |

Cuadro 8.16: Identificación molecular de las cepas resistentes a carbapenémicos (ERC) en el río Contreras y Villalobos

Nota: Identificación de genes *bla* y elementos móviles asociados a metales pesados en cepas resistentes a carbapenémicos. La notación **N.I.** (no identificado) se refiere a los casos en los que no se detectó ninguna coincidencia significativa, mientras que el símbolo (-) se utiliza para aquellas muestras en las que el análisis no era pertinente debido a que el gen objetivo no correspondía a una secuencia tipo IS

8.8. Determinación de metales pesados en muestras de agua de los ríos Villalobos y Contreras mediante ASV

Mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV) con el sensor IS-HM1 de PalmSens[®], se determinaron las concentraciones de plomo (Pb), cadmio (Cd) y arsénico (As) en muestras de agua recolectadas de los ríos Villalobos y Contreras. Los resultados descritos en el Cuadro . 9 indican que el río Contreras presentó mayores niveles de los tres metales analizados en comparación con el río Villalobos.

Cuadro 8.2: Concentraciones de Pb, Cd y As detectadas mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV).

| Muestra | Plomo (ppb) | Cadmio (ppb) | Arsénico (ppb) |
|----------------|-------------|--------------|----------------|
| Río Villalobos | 4.53 | N.A. | 18.10 |
| Río Contreras | 29.19 | 1.21 | 1.62 |

Nota: Concentraciones de metales pesados en las muestras de ambos ríos urbanos

En el cuadro se observa una concentración de 29.19 ppb de plomo en el río Contreras, mientras que en el río Villalobos el valor fue considerablemente menor (4.53 ppb). En cuanto al arsénico, estuvo presente en ambos ríos, con un valor alto en el río Villalobos (18.10 ppb) y 1.62 ppb para el río Contreras. El cadmio fue detectado únicamente en el río Contreras, con una concentración de 1.21 ppb, mientras que en el río Villalobos no se obtuvo una señal confiable para su cuantificación. Se generó una gráfica (Figura 7.17) para ilustrar la concentración

8.8. DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN MUESTRAS DE AGUA DE LOS RÍOS VI

de cada río según el metal analizado.

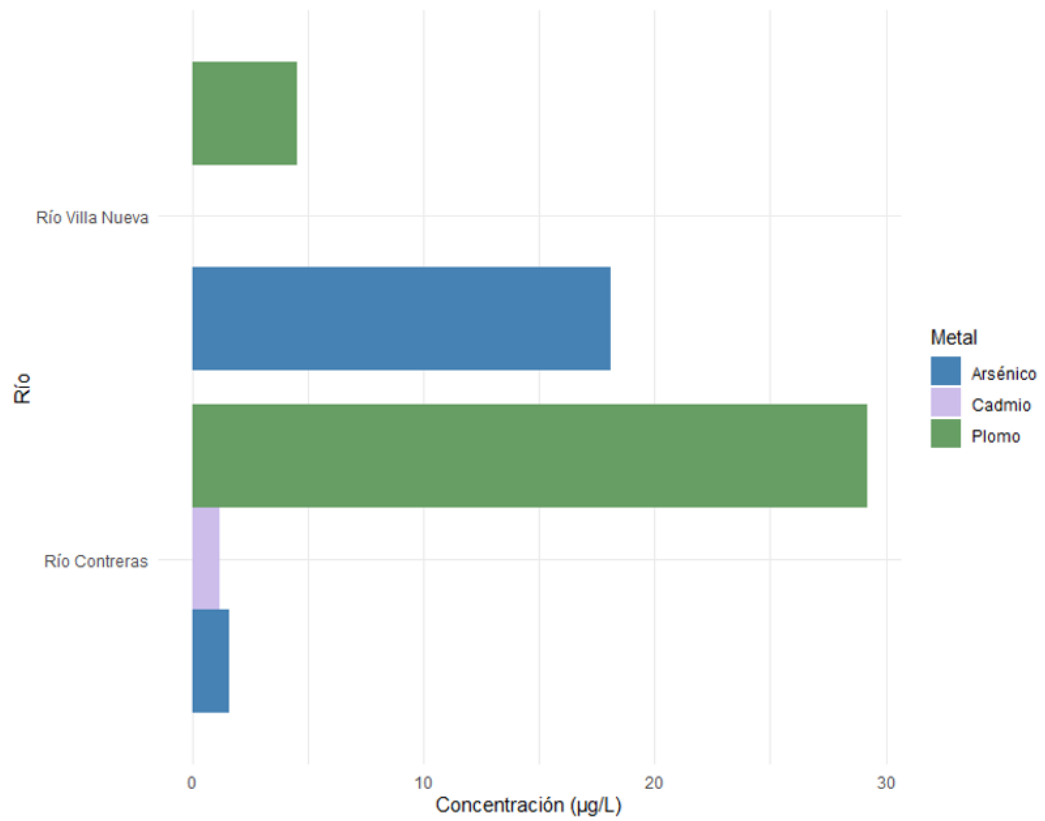


Figura 8.17: Concentración de metales pesados en los ríos Villalobos y Contreras analizados mediante ASV.

La resistencia a los antibióticos es una de las amenazas más significativas para la salud pública a nivel mundial, con consecuencias particularmente graves en países de ingresos bajos y medianos como Guatemala, donde la regulación del uso de antimicrobianos y las estrategias de control aún son insuficientes (OMS, 2024). Diversos estudios han señalado que los cuerpos de agua contaminados por actividades antropogénicas pueden contener simultáneamente antibióticos y metales pesados, los cuales ejercen presiones selectivas combinadas que favorecen la coselección de genes de resistencia presentes en plásmidos móviles (Pal et al., 2017; Squadrone, 2020). Por ello, este estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de bacterias portadoras de genes de resistencia a carbapenémicos y metales pesados (*bla**NDM*, *bla**KPC*, *bla**OXA-48-like*, *bla**IMP*, *bla**VIM*, *ISCR1* e *Intl1*) en muestras de agua de las microcuencas de los ríos Contreras y Villalobos, evaluando su posible asociación con la conta-

minación por metales pesados y aportando evidencia sobre los riesgos emergentes para la salud ambiental y humana en Guatemala.

El medio CHROMagar™ mSuperCARBA® permite la selección y diferenciación de bacterias mediante compuestos cromogénicos que reaccionan con enzimas específicas de los microorganismos. Al escindirse el sustrato, se libera un cromóforo que adquiere un color distintivo, lo cual facilita la identificación fenotípica por género bacteriano (Aeyal, 2022). En este estudio, esta tecnología permitió identificar la distribución de bacterias en ambos ríos. La Figura 8.3 muestra que el río Villalobos presentó mayor variabilidad y mediana en el conteo de colonias de *Acinetobacter* ~30, con un valor atípico superior a 120 colonias, lo que sugiere un punto de contaminación extrema. En ambos ríos, los conteos de *Escherichia coli* fueron bajos, aunque se observó una dispersión ligeramente mayor en el río Contreras. *Klebsiella* mostró mayor presencia en el río Villalobos, mientras que *Pseudomonas* solo fue detectada en el río Contreras, con una mediana de aproximadamente ~25 colonias.

Como se mencionó anteriormente, el CHROMagar identifica bacterias mediante la reacción de enzimas específicas con sustratos cromogénicos, produciendo colores distintivos que permiten una identificación rápida a nivel de género o grupo bacteriano. En cambio, la prueba API 20E usa veinte pruebas bioquímicas para generar un perfil numérico que identifica con mayor precisión especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae* y otros grupos. Por ello, las discrepancias entre ambos métodos son esperadas, ya que CHROMagar

es rápido y selectivo, mientras que API 20E ofrece una identificación más detallada (Samra et al., 1998; Juang & Morgan, 2001).

La caracterización bioquímica mediante API 20E permitió comparar la identificación presuntiva del agar cromogénico con los resultados bioquímicos (Figura.8.4). Se encontró concordancia en la mayoría de los aislamientos; sin embargo, se reportaron discrepancias. Esto se observa con la cepa VN10, identificada inicialmente como *Escherichia coli*, que fue clasificada por el sistema API como *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, con una identidad del 75 %, lo cual genera dudas sobre su confiabilidad debido al diseño específico del medio cromogénico para enterobacterias productoras de carbapenemasas. Este resultado probablemente se debió a errores metodológicos, especialmente a la degradación del reactivo VP2, por lo que se recomienda repetir la prueba con reactivos frescos (O'Hara et al., 1992). De igual forma, la cepa RCR2110 mostró una identidad del 52.1 %, por lo que se sugiere el uso de métodos más robustos como la secuenciación del gen 16S rRNA o el análisis genómico completo (WGS).

Posteriormente, se filtró el agua mediante una membrana y se cultivó en CHROMagar™ mSuperCARBA® suplementado con *Meropenem*® (4 µg/mL), con el objetivo de aislar enterobacterias resistentes. Según el CDC, una enterobacteria se considera resistente a carbapenémicos (CRE) cuando presenta una concentración mínima inhibitoria (MIC) ≥ 4 µg/mL para al menos un carbapenémico (CDC, 2024). Como se

observa en la Figura 8.5, los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* presentaron una mayor resistencia al antibiótico, con una mediana más alta en *Pseudomonas* ~35 colonias y una mayor variabilidad entre las muestras, posiblemente asociada a un valor atípico. La alta frecuencia de estos géneros en las muestras sugiere que *Pseudomonas* y *Acinetobacter* están mejor adaptados a sobrevivir en ambientes acuáticos contaminados, dado que estas bacterias no solo poseen mecanismos intrínsecos de resistencia, como membranas externas menos permeables, producción de beta-lactamasa tipo AmpC y sistemas de eflujo de la familia RND, sino que también presentan una notable capacidad de persistencia en condiciones ambientales adversas (Lupo et al., 2018). Esto incluye tolerancia a desinfectantes, metales pesados y otros contaminantes comúnmente presentes en aguas residuales urbanas. Además, tienen la capacidad de adquirir y transferir genes de resistencia mediante elementos móviles, lo que facilita su predominancia en nichos donde la presencia de antibióticos u otros factores de estrés selecciona bacterias multirresistentes (Durante-Mangoni et al., 2019).

El ensayo de susceptibilidad, realizado con placas suplementadas con combinaciones de Meropenem® e Imipenem/Cilastatina®, mostró que el río Villalobos presentó la mayor proporción de cepas resistentes (35), frente al río Contreras (26) (Figura 8.6). Los géneros más frecuentes en Villalobos fueron *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Según Cabrera Jérez (2022), *Klebsiella pneumoniae* fue la enterobacteria más común en el río Villalobos, representando el 31.57 % de

los aislamientos. Aunque en ese estudio no se aisló *E. coli*, tres años después se evidenció un crecimiento constante de esta especie resistente a carbapenémicos, sugiriendo una adaptación al entorno. Este comportamiento podría explicarse por la alta carga de aguas residuales domésticas, industriales y hospitalarias que recibe el río Villalobos (Fuentes Montepeque, 2015), considerando que ambas especies forman parte de la microbiota intestinal y son comúnmente excretadas en aguas negras.

Además, *E. coli* y *Klebsiella* han sido reportadas como prevalentes en estudios de resistencia en Guatemala y son indicadores clave de contaminación fecal en cuerpos de agua dulce (OMS, 2014). El hallazgo de *E. coli* resistente a carbapenémicos es preocupante, ya que estos antibióticos son de último recurso. Estudios han documentado que esta especie puede desarrollar resistencia bajo presión selectiva, como en un caso clínico donde el uso prolongado de imipenem y meropenem condujo a la aparición del gen *blaKPC-3* (Hong et al., 2005). Por su parte, *K. pneumoniae* es un reservorio ambiental y clínico reconocido de genes de carbapenemasas como *blaKPC*, *blaNDM* y *blaOXA-48-like*, debido a su capacidad para adquirir y diseminar estos genes mediante elementos genéticos móviles como plásmidos e integrones. Esta especie se ha aislado con frecuencia en ambientes acuáticos contaminados, donde actúa como vector eficiente de resistencia antibiótica, lo que explica su predominancia y resistencia frente a carbapenémicos en el río Villalobos (Elkady et al., 2024; Schreiber et al., 2021).

En contraste, el río Contreras presentó un comportamiento similar al del río Villalobos en cuanto a la presencia de bacterias resistentes, aunque con una predominancia de cepas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, las cuales, en su mayoría, fueron sensibles a los antibióticos carbapenémicos evaluados. No obstante, se evidenció que los cuatro géneros bacterianos analizados mostraron algún grado de resistencia a meropenem e imipenem en las distintas microcuencas estudiadas. Tal como se ha reportado en la literatura, las enterobacterias resistentes pueden diseminarse eficazmente en ambientes acuáticos impactados por descargas hospitalarias, domésticas e industriales, donde las condiciones favorecen la selección y transferencia horizontal de genes de resistencia como *blaKPC* y *blaNDM*, frecuentemente asociados a plásmidos conjugativos (Han et al., 2020; Yasmin et al., 2022). Estos hallazgos confirman la presencia de mecanismos de resistencia mediados por enzimas β -lactamasas con actividad frente a múltiples carbapenémicos, lo cual representa una amenaza creciente para la salud pública y subraya la necesidad de implementar sistemas de vigilancia microbiológica permanente en cuerpos de agua urbanos.

Para la evaluación molecular, se seleccionaron únicamente las cepas resistentes aisladas en Meropenem[®] del ensayo de susceptibilidad. Se trabajó con ocho cepas, seis provenientes del río Contreras y dos del río Villalobos. Todas presentaron una calidad adecuada de ADN, con ratios de pureza (260/280) dentro de los rangos esperados (1.8–2.0), y ratios de (230/260) cercanos a 2.0, lo que indica ausencia de contaminación

por fenoles u otros compuestos orgánicos. Además, se obtuvieron concentraciones elevadas de ADN, aptas para análisis posteriores (Kaepler et al., 2020).

Mediante PCR múltiple, se evaluó la presencia de genes codificantes *blaVIM*, *blaKPC*, *blaIMP*, *blaOXA48-like* y *blaNDM*. Los resultados revelaron la presencia de bandas definidas de aproximadamente ~ 512 bp, correspondientes al gen *blaNDM*, en aislamientos previamente identificados como cepas de *Escherichia coli* (Figura.8.7). La detección del gen *blaNDM* en cepas de *E. coli* aisladas de ríos urbanos concuerda con lo reportado en estudios previos, los cuales han documentado que este gen de resistencia se ha vuelto cada vez más prevalente en cuerpos de agua contaminados. Esta tendencia se atribuye a la presión selectiva ejercida por la presencia de antibióticos residuales y metales pesados, factores que favorecen tanto la persistencia como la diseminación horizontal de genes de resistencia entre bacterias ambientales (Ahmad et al., 2018).

Los análisis realizados mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV), utilizando el sensor IS-HM1 de PalmSens[®], permitieron cuantificar las concentraciones de plomo (Pb), cadmio (Cd) y arsénico (As) en las muestras de agua recolectadas de los ríos Villalobos y Contreras. Los resultados obtenidos (Cuadro 8.2) revelaron que el río Contreras presentó una concentración considerablemente mayor de plomo (29.19 ppb) en comparación con el río Villalobos (4.53 ppb). Asimismo, el cadmio fue detectado exclusivamente en el río Contreras, con un valor de 1.21

ppb, mientras que en el río Villalobos no se obtuvo una señal confiable. En contraste, el arsénico mostró una concentración más elevada en el río Villalobos (18.10 ppb), frente a un valor de 1.62 ppb en el río Contreras. Estos hallazgos evidencian la presencia de metales pesados en ambos cuerpos de agua, aunque con perfiles diferenciados, lo cual refuerza la hipótesis de una presión ambiental relevante para la selección de bacterias portadoras de mecanismos de resistencia a metales y antibióticos.

Considerando este contexto, se procedió a la detección de elementos genéticos móviles asociados a la resistencia a metales pesados mediante la amplificación por PCR del gen *ISCR1* (Insertion Sequence Common Region 1) de las ocho cepas. Este elemento pertenece a la familia de secuencias tipo IS91 y ha sido reconocido por su capacidad de movilizar genes de resistencia a antibióticos, incluyendo a los codificantes de carbapenemasas (Rui et al., 2018). Los resultados del presente estudio confirmaron la presencia de *ISCR1* en dos cepas de *Escherichia coli* aisladas de ríos urbanos: una procedente del río Villalobos, con detección simultánea de *blaNDM* e *ISCR1*; y otra del río Contreras, portadora de *blaKPC* e *ISCR1*. Este hallazgo se atribuye a la expresión y transferencia horizontal de los genes *NDM* en *ISCR1*, los cuales actúan en tándem para vehiculizar *blaNDM* en poblaciones bacterianas. La presencia concurrente de estos genes en una misma cepa sugiere la existencia de integrones de clase 1 complejos: estructuras genéticas en las que los integrones se asocian con *ISCR1*, facilitando la transferencia conjunta de genes de resistencia a antibióticos y metales pesados (Bae et al., 2007).

Es por esto que se evaluó la presencia del gen *intl1*, que codifica la integrasa del integrón de clase 1, mediante qPCR. Este análisis confirmó que siete de ocho cepas aisladas de los ríos Villalobos y Contreras mostraron expresión del gen *intl1*, lo que indica una distribución amplia de este integrón en ecosistemas acuáticos (Figura 8.9). Con el objetivo de establecer una asociación entre *intl1* y otros elementos genéticos de resistencia, se analizó su abundancia relativa en función de la presencia o ausencia de los genes *blaNDM*, *blaKPC* e *ISCR1* previamente identificados en ambos ríos. En la (Figura 8.11) se observa una mayor abundancia relativa del gen *intl1* en las muestras que presentaron el gen *ISCR1*. Esto permite establecer que las estructuras correspondientes al integrón de clase 1 están asociadas con uno o más elementos *ISCR1*, lo que les confiere la capacidad de capturar y movilizar genes fuera del repertorio típico de casetes integrónicos (Rui et al., 2018). Además, se ha documentado que estos integrones complejos, conformados por la combinación (*intl1* + *ISCR1*), pueden movilizar fragmentos grandes de ADN con múltiples genes de resistencia a alta frecuencia (Rui et al., 2018). Esta asociación explica la variabilidad observada en las muestras positivas para *ISCR1*, cuya abundancia relativa del gen *intl1* osciló desde rangos bajos (10^{-9}) hasta valores máximos (10^{-5}), a diferencia de las muestras sin la presencia de *ISCR1*, en donde la abundancia de *intl1* se mantuvo en niveles bajos. Esto indica una coocurrencia entre ambos elementos genéticos móviles.

Un estudio realizado por Gillings et al. (2015) seña-

ló que los integrones de clase 1 actúan como agentes potentes de resistencia. Asimismo, como se mencionó anteriormente, las cepas portadoras de *ISCR1* también presentaban el gen *blaNDM*, lo que permite establecer que la presencia simultánea de *intl1* e *ISCR1* en bacterias (ERC) funciona como un sistema genético combinado para la adquisición y propagación de genes de resistencia (Le-Vo et al., 2019.) En el caso de la presencia del gen *blaNDM* (Figura. 8.12), se observó un patrón similar al descrito anteriormente, con niveles elevados de abundancia relativa del gen *intl1*, alcanzando valores de hasta 10^{-5} . Mientras que en las muestras en las que el gen *blaNDM* no fue detectado, la abundancia de *intl1* se mantuvo en un rango más bajo. Esta correlación sugiere una fuerte asociación entre la presencia de integrones de clase 1 y la propagación del gen *blaNDM*. Estudios previos han señalado que la metalo-betalactamasa tipo New Delhi (NDM) se propaga a través de plataformas genéticas de ensamblaje que incluyen integrones de clase 1 e *ISCR1*. Se ha determinado que la presencia de integrones complejos en plásmidos que contienen *blaNDM* puede reducir su coste de aptitud y favorecer su diseminación exitosa (Tavares et al., 2022). Incluso se ha reportado que la adquisición de estos plásmidos puede incrementar la tasa de crecimiento bacteriano, lo cual representa una ventaja adaptativa adicional para las cepas portadoras.

Este resultado es relevante dado que los cuerpos de agua urbanos como los ríos Contreras y Villalobos son ecosistemas que actúan como reservorios ambientales con potencial para la diseminación de resistencia a

través de corrientes fluviales contaminadas. Asimismo, la diseminación de *blaNDM* no solo confiere resistencia a carbapenémicos, sino que también promueve la proliferación bacteriana incluso en ausencia de presión antibiótica directa (Ma et al., 2020). De manera similar, la presencia de *ISCR1* facilita la movilización de genes *blaNDM-1* hacia estructuras integrónicas, generando regiones integrón-transposón altamente multidrogorresistentes (Le-Vo et al., 2019). Por lo tanto, la detección conjunta de *blaNDM*, *intl1* e *ISCR1* en las muestras de ambos ríos permite establecer que las *Enterobacteriaceae* resistentes portan integrones de clase 1 complejos que han capturado y diseminado *NDM*, consolidando así estos cuerpos de agua como reservorios de resistencia a carbapenémicos.

En las muestras positivas para el gen *blaKPC* (Figura. 8.13), se observó una alta abundancia relativa del gen *intl1*, lo que indica una posible coocurrencia entre ambos elementos genéticos móviles. Esto concuerda con estudios previos que describen la participación conjunta de *ISCR1* e integrones clase 1 en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos a través de elementos genéticos móviles (Gillings et al., 2015; Toleman & Walsh, 2010). Tomando en cuenta que, en este estudio, tres cepas fueron positivas para *blaKPC* y también presentaron el gen *intl1*, y que una de ellas fue positiva para *ISCR1*, se sugiere que esta asociación está mediada por el gen *blaKPC*, dado que suele encontrarse en bacterias portadoras de integrones de clase 1. Estos integrones facilitan la captura de casetes génicos de resistencia, así como su propagación horizontal (Lima et al., 2014). Es

decir, existe un vínculo *intl1-blaKPC*, en el cual los genes *blaKPC* residen en elementos transposables como el transposón *Tn4401*, que puede estar insertado en plásmidos con integrones de clase 1, los cuales aportan genes accesorios de resistencia (Cuzon et al., 2010).

En conclusión, la identificación conjunta de los genes *intl1*, *blaNDM*, *blaKPC* e *ISCR1* en las muestras de los ríos Villalobos y Contreras indica la presencia de bacterias portadoras de elementos genéticos compuestos con un alto potencial para diseminar resistencia en ambientes acuáticos urbanos. Estos resultados permiten validar que los integrones de clase 1, tradicionalmente asociados a entornos clínicos, también están ampliamente distribuidos en ecosistemas impactados por la actividad humana. La coexistencia de estos elementos móviles en cuerpos de agua contaminados establece que actúan como filtros ecológicos, en los que la presión selectiva ejercida por residuos de antibióticos, metales pesados y otros contaminantes favorece la persistencia y proliferación de cepas multirresistentes. Por lo tanto, los integrones de clase 1, junto con genes como *blaNDM*, *blaKPC* e *ISCR1*, representan adaptaciones genéticas clave para la adquisición, movilización y expresión de múltiples determinantes de resistencia en reservorios ambientales.

Los descubrimientos de estas cepas (ERC) con mecanismos de coselección y transferencia conjunta de genes de resistencia a antibióticos y metales pesados en ambos ríos urbanos representan un hallazgo crítico que acentúa el papel de los cuerpos de agua como reservorios activos de resistencia antimicrobiana. Es

por esto que, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos mediante PCR y qPCR, se enviaron a MacroGene© nueve cepas seleccionadas descritas en el (Cuadro No. 7.3) para el análisis de secuenciación tipo tag bidireccional, con el fin de validar la presencia de los genes de interés: *blaKPC*, *blaNDM*, *intl1* e *ISCR1*.

Al analizar los datos de secuenciación, se observó que cuatro de las nueve muestras seleccionadas no obtuvieron lecturas válidas para los posteriores análisis bioinformáticos, por lo que se descartaron las siguientes cepas: RC10 y RCR para *blaKPC*, VNMX para *ISCR1*, y RCP2110 para *intl1*. Primero se generaron secuencias consensadas con el software *CodonCode Aligner* versión 12.0.1. Con estas secuencias se realizó una evaluación de calidad de cada muestra mediante el programa *FastQC*, el cual permite obtener estadísticas básicas para determinar si los resultados son apropiados para un análisis posterior (Andrews, 2010). Se determinó que todas las muestras cumplieran con los parámetros clave de calidad (estadísticas básicas, calidad por base, contenido de GC, bases N, longitud de secuencia y adaptadores), como se muestra en la (Figura.8.14). Es importante mencionar que los únicos parámetros no aprobados fueron el sesgo en el contenido de bases por posición, atribuible a la presencia de cebadores, y la detección de secuencias sobrerrepresentadas, correspondientes al propio amplicón, lo cual es común en enfoques dirigidos (*targeted sequencing*) (Tremblay et al., 2015; Zhou et al., 2011).

El análisis de calidad de las secuencias permitió establecer con confiabilidad el uso apto de los ar-

chivos para la identificación molecular de enterobacterias resistentes a carbapenémicos y metales pesados mediante un análisis con la herramienta NCBI-BLAST. En la (Figura.8.14) se muestra el *BLAST match* junto con su porcentaje de identidad. La identificación se realizó tomando en cuenta el porcentaje de identidad con la secuencia de referencia, el cual fue superior al 98 % en la mayoría de las cepas. Estos resultados permiten evaluar la diversidad genética presente en ambos ríos. En el río Contreras, dos cepas fueron identificadas: *RCMX_ISCR1* como *Escherichia coli* y *RCA_KPC* como *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Mientras tanto, el río Villa Lobos presentó tres cepas identificadas como *Escherichia coli*, dos de ellas portadoras del gen *blaNDM* identificado como cepas *NSC468 New Delhi metallo-beta-lactamase (blaNDM)* y una con el plásmido *p11A20008_A_NDM*. El análisis bioinformático para la comparación y confirmación de genes de resistencia a antibióticos, específicamente aquellos relacionados con los carbapenémicos, se realizó mediante la herramienta *ResFinder*, comparando con la base de datos de genes de resistencia (ARGs) utilizando *BLAST* (Bortolaia et al., 2020). El análisis destacó al gen *blaNDM-5* como el más recurrente entre las cepas de ambos ríos. Las muestras *RCMX_ISCR1*, *VN10RG_Intl1*, *VN100_NDM* y *VN10_NDM* presentaron identidades superiores al 99.8 % con genes *blaNDM*, lo cual respalda su relevancia en la resistencia a antibióticos β -lactámicos de amplio espectro. Además, la muestra *VN10RG_Intl1* mostró presencia del gen *blaTEM-1*, una β -lactamasa que ha sido asociada con resistencia a varios antibió-

ticos, incluyendo algunos carbapenémicos en ciertas cepas bacterianas (Yigit et al., 2001).

Se realizó un análisis bioinformático para comparar y confirmar la presencia de genes de resistencia a antibióticos (ARG), en específico aquellos que confieren resistencia a los carbapenémicos. Este análisis empleó la herramienta ResFinder y se validó mediante la comparación con la base de datos de genes de resistencia a antibióticos utilizando BLAST (Bortolaia et al., 2020). Asimismo, se empleó la base de datos bioinformática CARD, que incluye genes de resistencia, sus productos y fenotipos asociados. En la (Figura.8.16), los resultados revelaron que el gen *blaNDM-5* fue el más frecuente identificado en las cepas aisladas de ambos ríos. Las muestras *RCMX_ISCR1*, *VN10RG_Intl1*, *VN100_NDM* y *VN10_NDM* mostraron una identidad de secuencia superior al 99.8 % con las variantes conocidas de *blaNDM*, lo que confirma una fuerte asociación con la resistencia a antibióticos β -lactámicos de amplio espectro.

Es importante mencionar que la cepa *E. coli* con el código *VN10RG_Intl1* también presentó el gen *blaTEM-1B*, una β -lactamasa asociada con la resistencia a la penicilina. Aunque el gen *blaTEM-1B* no codifica una carbapenemasa en sentido estricto, su presencia se ha relacionado con una menor susceptibilidad a los carbapenémicos cuando se coexpresa con otros mecanismos de resistencia, en particular β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), pérdida de porinas o sobreexpresión de la bomba de flujo (Haque et al., 2012; Negrete-González et al., 2022). Esto se atribuye al hecho de que dicha cepa por-

taba los genes *ISCR1* e *Int11*, elementos genéticos que conforman integrones de clase 1 complejos. Estos integrones, conectados directamente con *ISCR1*, permiten la incorporación y expresión de genes de resistencia adicionales (Cheng et al., 2016; Okonkwo et al., 2023). Por lo que se determina que esta estructura funciona como una potente unidad de captura y movilización de genes, facilitando la cotransferencia de *blaNDM-5* y *blaTEM-1B* dentro de un mismo elemento genético móvil. Las secuencias de inserción (IS) desempeñan un papel clave en el ensamblaje de estos grupos de resistencia multigénicos. Un estudio realizado en Austria identificó que los segmentos del gen *blaNDM-5* suelen estar flanqueados por copias de *IS26*, formando transposones compuestos que facilitan la transferencia horizontal (Kerschner et al., 2025).

El gen *blaTEM-1* se asocia comúnmente a transposones de la familia Tn3 o con casetes integrónicos, lo que facilita su inserción en plásmidos que también portan genes codificantes de carbapenemasas. En resumen, la coexistencia de *NDM-5* y *TEM-1* en una misma cepa es posible gracias a la presencia de plásmidos de amplio espectro y a sistemas genéticos móviles como los integrones complejos de clase 1 asociados con *ISCR1*, que vinculan múltiples genes de resistencia en un solo elemento transferible (Cheng et al., 2016). Esto es precisamente lo observado en la cepa de *Escherichia coli* portadora del plásmido p11A20008, aislada del río Villa Lobos, la cual mostró resistencia a meropenem y contenía los genes *blaNDM*, *blaTEM-1B*, *ISCR1* e *Int11*. En esta cepa,

el gen *blaNDM-5* proporciona la principal actividad hidrolítica frente a carbapenémicos, confiriendo resistencia a concentraciones elevadas de meropenem (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que *blaTEM-1B* aporta resistencia adicional a β -lactámicas frente a otros antibióticos.

Estudios realizados en aguas residuales comunitarias de Asia y Europa han confirmado la detección conjunta de estos genes en cepas de *E. coli*, lo cual genera preocupación por la posible propagación de bacterias multirresistentes a través de sistemas hídricos contaminados (Kerschner et al., 2025; Sattar et al., 2024). Por lo que la presencia de *NDM-5*, *TEM-1*, *ISCR1* e *intl1* juntos en aislamientos de aguas residuales indica el papel de los reservorios ambientales en la evolución y diseminación de resistencia a los carbapenémicos. De igual manera, se identificaron otros genes como *blaNDM-20* en dos cepas del río Villa Lobos, las cuales están asociadas a la inactivación de carbapenémicos.

Por otro lado, la muestra *RCA_KPC* identificada como *K. pneumoniae*, no se logró identificar genes *bla* mediante la herramienta ResFinder, lo cual se atribuye a posibles limitaciones en la cobertura de la secuencia obtenida (Bortolaia et al., 2020). No obstante, el análisis realizado a través de la base de datos CARD reveló un perfil de resistencia complejo, en el que se identificaron genes como *LptD*, *KpnG*, *KpnH*, *marA* y *MdtQ*. Estos genes están relacionados principalmente con mecanismos de eflujo activo de antibióticos y con la reducción de la permeabilidad de la membrana externa, ambos considerados factores contribuyentes en la resistencia antimicrobiana,

particularmente frente a carbapenémicos.

Lo anterior se atribuye a que estudios han establecido que *marA* actúa como un regulador global que induce la expresión de bomba de eflujo como *AcrAB-TolC* y disminuye la porosidad de la membrana, reduciendo así la entrada de carbapenémicos en bacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae*. De forma similar, los genes *KpnG* y *KpnH* codifican componentes de sistemas de eflujo en *Klebsiella pneumoniae*, los cuales han sido asociados con una menor susceptibilidad a múltiples antibióticos, incluidos los carbapenémicos (Ramos et al., 2016). Por su parte, *MdtQ* forma parte de la familia de transportadores MFS, que facilita la expulsión de compuestos antibacterianos, mientras que *LptD*, aunque relacionado principalmente con la biosíntesis de lipopolisacáridos, puede alterar la estructura de la membrana externa y, en consecuencia, afectar la penetración de antibióticos como meropenem e imipenem (Aslam et al., 2020).

Finalmente, el análisis de secuencias mediante la herramienta ISFinder permitió identificar elementos genéticos móviles involucrados en la diseminación de genes de resistencia. En la muestra *RCMX_ISCR1*, procedente del río Contreras, se detectó una alineación significativa con el elemento *ISVsa3*, perteneciente a la familia *ISCR*, con un bit score de 58 y un valor p de $1.00E-08$, lo cual indica una asignación confiable. La presencia de *ISVsa3* en una cepa que también alberga los genes *blaNDM-5*, *intl1* e *ISCR1* sugiere la existencia de una arquitectura genética compuesta, posiblemente un integrón complejo de clase 1. Estos integrones, al asociarse con elementos ISCR como

ISCR1 o *ISVsa3*, son capaces de movilizar genes de resistencia no solo a través de cassettes integrónicos clásicos, sino también mediante mecanismos de transposición replicativa característicos de las secuencias IS91-like (He et al., 2021; Siguier et al., 2006; Toleman & Walsh, 2010). Este tipo de ensamblajes ha sido descrito como una unidad genética altamente versátil, con capacidad de incorporar múltiples determinantes de resistencia en un solo elemento móvil. A pesar de que la herramienta IntegronFinder no logró confirmar estructuralmente el integrón de clase 1 en esta muestra, la presencia confirmada de *intl1* mediante qPCR, junto con *ISCR1* e *ISVsa3*, respalda la existencia funcional de un integrón complejo capaz de facilitar la diseminación horizontal de *blaNDM-5* en ambientes acuáticos contaminados.

A pesar de los hallazgos de alto impacto obtenidos, este estudio presenta ciertas limitaciones. El muestreo se llevó a cabo en un único periodo estacional, lo que podría no reflejar la variabilidad temporal de la resistencia bacteriana en los ríos Villalobos y Contreras. Además, la caracterización bacteriana y la detección de genes de resistencia se enfocaron en un conjunto específico de marcadores (*blaNDM*, *blaKPC*, *blaOXA-48-like*, *blaIMP*, *blaVIM*) y elementos móviles (*intl1*, *ISCR1*), por lo que es posible que otros determinantes relevantes no hayan sido detectados. Aunque se logró confirmar la presencia y coocurrencia de genes críticos mediante qPCR y análisis bioinformático, el enfoque se limitó a secuenciación tipo *tag*, lo que restringe la resolución para caracterizar en profundidad el perfil genético y los elementos genéticos

móviles asociados.

Como siguiente paso, se propone fortalecer el análisis bioinformático mediante secuenciación de genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS) de las cepas ERC previamente identificadas, o incluso la secuenciación dirigida de plásmidos en aislamientos positivos como *RCMXR*, *VN10*, *RCA* y *VN100*. Esta estrategia permitirá ensamblar con mayor precisión los genes de resistencia, caracterizar la estructura y tipología de los plásmidos, y evaluar su potencial de transferencia horizontal, especialmente en relación con integrones complejos y otros MGEs. Estos avances serán esenciales para comprender de forma integral los mecanismos de persistencia y diseminación de resistencia en entornos acuáticos urbanos, y para sustentar el diseño de estrategias de vigilancia y control ambiental más efectivas a nivel nacional.

1. El presente estudio confirma que los ríos urbanos Villalobos y Contreras actúan como reservorios ambientales activos de bacterias multirresistentes, particularmente enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC). Se estableció la presencia de genes de resistencia críticos como *blaNDM*, *blaKPC*, *intl1* e *ISCR1*, los cuales se encuentran asociados con integrones de clase 1 complejos y plásmidos móviles. La coocurrencia de estos elementos sugiere mecanismos robustos de coselección y transferencia horizontal, favorecidos por la presión ambiental ejercida por antibióticos y metales pesados detectados en estos cuerpos de agua.
2. Se determina al gen *intl1* como potencial biomarcador que presenta alta confiabilidad con respecto a la contaminación ambiental en entornos acuáticos, así como un indicador potencial de diseminación de genes de resistencia a antibióticos.

3. Se evidenció una fuerte asociación entre los genes *blaNDM* e *intl1*, lo que indica que los integrones de clase 1 están involucrados activamente en la diseminación de resistencia a carbapenémicos. Asimismo, la detección de *ISCR1* y elementos como *ISVsa3* respalda la hipótesis de que estos integrones tienen la capacidad de movilizar genes adicionales fuera del repertorio clásico, aumentando la versatilidad y persistencia de estas bacterias en ambientes acuáticos contaminados.
4. Estos hallazgos son de alto impacto, y subrayan la necesidad de establecer sistemas de vigilancia microbiológica permanente en cuerpos de agua urbanos, así como la implementación de políticas de control ambiental y del uso responsable de antibióticos, con el fin de mitigar el riesgo de diseminación de genes de resistencia.
5. Este estudio representa una contribución clave para comprender la ecología de la resistencia a genes relacionados con carbapenémicos en Guatemala, y puede servir de base para el diseño de futuras estrategias de salud pública y ambiental en la región.

Primero, se recomienda fortalecer el análisis bioinformático de las cepas (ERC) evaluadas mediante secuenciación del genoma completo (WGS) de aquellas bacterias que, inicialmente, fueron analizadas con secuenciación tipo *tag*. Incluso, se podría enviar a secuenciar únicamente el plásmido de las cepas positivas, que son *RCMXR*, *VN10*, *RCA* y *VN100*.

Esta aproximación permitiría no solo ensamblar con mayor precisión los genes de resistencia presentes, sino también caracterizar de forma integral los plásmidos involucrados, incluyendo su estructura, tipología y elementos genéticos móviles (MGE) asociados. De esta forma, se obtendría un panorama más detallado y robusto sobre la arquitectura genética de las cepas resistentes, lo cual es esencial para comprender los complejos mecanismos de diseminación de la resistencia y proponer estrategias de control más eficaces.

De igual manera, se recomienda notificar los hallazgos al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) y al Departamento de Epidemiología, para que se encarguen de implementar políticas de control ambiental y del uso responsable de antibióticos, con el fin de mitigar el riesgo de diseminación de genes de resistencia.

- Acharya, K. P. y R. T. Wilson: *Antimicrobial Resistance in Nepal*. *Frontiers in Medicine*, 6:105, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00105>.
- Acman, M., R. Wang, L. van Dorp, L. P. Shaw, Q. Wang, N. Luhmann, Y. Yin, S. Sun, H. Chen, H. Wang y F. Balloux: *Role of mobile genetic elements in the global dissemination of the carbapenem resistance gene bla_{NDM}*. *Nature Communications*, 13(1):1131, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28819-2>.
- Ahmad, N., S. Khalid, S. M. Ali y A. U. Khan: *Occurrence of bla_{NDM} Variants Among Enterobacteriaceae From a Neonatal Intensive Care Unit in a Northern India Hospital*. *Frontiers in Microbiology*, 9:407, 2018.
- Al-Gheethi, A. A. S., E. A. Noman, R. M. S. Radin Mohamed y A. H. Mohd Kassim: *Determi-*

nation of Pathogens in Greywater. En Radin Mohamed, R. M. S., A. A. S. Al-Gheethi y A. H. Mohd Kassim (editores): *Management of Greywater in Developing Countries: Alternative Practices, Treatment and Potential for Reuse and Recycling*, páginas 51–72. Springer International Publishing, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90269-2_3.

Ambler, R. P., J. Baddiley y E. P. Abraham: *The structure of β -lactamases*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences, 289(1036):321–331, 1997. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>.

Andrews, S.: *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, 2010. Accessed 2025-08-12.

Angles-Yanqui, E., J. Huaranga-Marcelo, R. Sacsquispe-Contreras y L. Pampa-Espinoza: *Panorama de las carbapenemasas en Perú*. Revista Panamericana de Salud Pública, 44:e61, 2020. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.61>.

Aslam, B., M. Rasool, S. Muzammil, A. B. Siddique, Z. Nawaz, M. Shafique, M. A. Zahoor, R. Bin-yamin, M. Waseem, M. Khurshid, M. I. Arshad, M. A. Aslam, N. Shahzad, M. H. Rasool y Z. Baloch: *Carbapenem Resistance: Mechanisms and Drivers of Global Menace*. En *Pathogenic*

Bacteria. IntechOpen, 2020. Chapter in edited volume.

- Bae, I. K., Y. N. Lee, W. G. Lee, S. H. Lee y S. H. Jeong: *Novel Complex Class 1 Integron Bearing an ISCR1 Element in an Escherichia coli Isolate Carrying the blaCTX-M-14 Gene*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8):3017–3019, 2007.
- Bleichenbacher, S. A., M. J. A. Stevens, K. Zurfluh, V. Perreten, A. Endimiani, R. Stephan y M. Nüesch-Inderbinen: *Environmental dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rivers in Switzerland*. *Environmental Pollution*, 265:115081, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115081>.
- Bortolaia, V., R. S. Kaas, E. Ruppe, M. C. Roberts, S. Schwarz, V. Cattoir, A. Philippon, R. L. Allesoe, A. R. Rebelo, A. F. Florensa, L. Fagelhauer, T. Chakraborty, B. Neumann, G. Werner, J. K. Bender, K. Stingl, M. Nguyen, J. Coppens, B. B. Xavier y F. M. Aarestrup: *ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12):3491–3500, 2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
- Boyd, Steven E., David M. Livermore, David C. Hooper y William W. Hope: *Metallo- β -Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

64(10):e00397–20, 2020. <https://doi.org/10.1128/aac.00397-20>.

Bush, Karen, George A. Jacoby y Alex A. Medeiros: *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6):1211–1233, 1995. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>.

Cabrera Jérez, A. G.: *Evaluación de resistencia a Imipenem y Meropenem en enterobacterias aisladas del Río Villalobos, en Guatemala*. <https://repositorio.uvg.edu.gt/xmlui/handle/123456789/4898>, 2022. Repositorio UVG.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC): *Facility guidance for control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)*. *Enterobacterales (Carbapenem-Resistant)*. <https://www.cdc.gov/cre/about/index.html>, 2024. Accessed: 2025-08-19.

Chen, H., R. Chen, L. Jing, X. Bai y Y. Teng: *A metagenomic analysis framework for characterization of antibiotic resistomes in river environment: Application to an urban river in Beijing*. *Environmental Pollution*, 245:398–407, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.024>.

Chen, H., L. Jing, Z. Yao, F. Meng y Y. Teng: *Prevalence, source and risk of antibiotic resistance genes in the sediments of Lake Tai (China)*

deciphered by metagenomic assembly: A comparison with other global lakes. Environment International, 127:267–275, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.048>.

Cheng, C., J. Sun, F. Zheng, W. Lu, Q. Yang y Y. Rui: *New structures simultaneously harboring class 1 integron and ISCR1-linked resistance genes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria.* BMC Microbiology, 16(1):71, 2016.

Cuzon, G., T. Naas, H. Truong, M. V. Villegas, K. T. Wisell, Y. Carmeli, Ana C. Gales, S. Navon-Venezia, J. P. Quinn y P. Nordmann: *Worldwide Diversity of Klebsiella pneumoniae That Produce β -Lactamase blaKPC-2 Gene.* Emerging Infectious Diseases, 16(9):1349–1356, 2010.

Córdova Tercero, José Luis: *Estudio hidrológico y propuesta de estructura hidráulica para el manejo de avenidas de la cuenca del Río Villalobos, desde el puente El Frutal, Villa Nueva, hasta el puente La Unión, Villa Canales,* 2010.

Deleo, F. R., L. Chen, S. F. Porcella, C. A. Martens, S. D. Kobayashi, A. R. Porter, K. D. Chavda, M. R. Jacobs, B. Mathema, R. J. Olsen, R. A. Bonomo, J. M. Musser y B. N. Kreiswirth: *Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 Klebsiella pneumoniae.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(13):4988–4993, Abril 2014. <https://www.pnas.org/content/111/13/4988>, Epub 2014 Mar 17.

Docquier, Jean Denis, Valentina Calderone, Francesco De Luca, Marco Benvenuti, Fabrizio Giuliani, Laura Bellucci, Andrea Tafi, Patrice Nordmann, Marco Botta, Gian Maria Rossolini y Stefano Mangani: *Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases*. *Chemistry & Biology*, 16(5):540–547, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.04.010>.

Durante-Mangoni, E., R. Andini y R. Zampino: *Manejo de las infecciones por Enterobacteriaceae resistentes a los carbapenémicos*. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(8):943–950, 2019.

Elkady, Ahmed, Stephen Sweet, Terry Wade y Andrew Klein: *Distribution and assessment of heavy metals in the aquatic environment of Lake Manzala, Egypt*. *Ecological Indicators*, 58:445–457, Mayo 2015.

Evans, Benjamin A. y Sebastian G. B. Amyes: *OXA β -Lactamases*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2):241–263, 2014. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>.

Fuentes Montepeque, J.: *Generación de crecidas y su relación con la urbanización en la subcuenca del Río Villalobos*. Universidad de San Carlos de Guatemala, 2015.

FUNCAGUA: *PROYECTO MICROCUENCA PEDAGÓGICA DEL RÍO CONTRERAS - Funcagua*, 2024. <https://funcagua.org.gt/proyecto-microcuenca-pedagogica-del-rio-cont>
Accedido: 2025-08-12.

- Gillings, M. R., W. H. Gaze, A. Pruden, K. Smalla, J. M. Tiedje y Y. G. Zhu: *Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution*. The ISME Journal, 9(6):1269–1279, 2015. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>.
- Gillings, M. R., M. Westoby y T. M. Ghaly: *Pollutants That Replicate: Xenogenetic DNAs*. Trends in Microbiology, 26(12):975–977, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.003>.
- Goodwin, S., J. D. McPherson y W. R. McCombie: *Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies*. Nature Reviews Genetics, 17(6):333–351, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>.
- Gupta, S., D. W. Graham, T. R. Sreekrishnan y S. Z. Ahammad: *Effects of heavy metals pollution on the co-selection of metal and antibiotic resistance in urban rivers in UK and India*. Environmental Pollution, 306:119326, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119326>.
- Han, B., C. Feng, Y. Jiang, C. Ye, Y. Wei, J. Liu y Z. Zeng: *Mobile genetic elements encoding antibiotic resistance genes and virulence genes in Klebsiella pneumoniae: important pathways for the acquisition of virulence and resistance*. Frontiers in Microbiology, 16:1529157, 2025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1529157>.

- Haque, S. F., S. Z. Ali, M. Tpy y A. U. Khan: *Prevalence of plasmid mediated bla(TEM-1) and bla(CTX-M-15) type extended spectrum beta-lactamases in patients with sepsis*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 5(2):98–102, 2012.
- He, J., L. Sun, L. Zhang, S. Leptihn, Y. Yu y X. Hua: *A Novel SXT/R391 Integrative and Conjugative Element Carries Two Copies of the blaNDM-1 Gene in Proteus mirabilis*. mSphere, 6(4):e0058821, 2021.
- Hong, Tao, Ellen Smith Moland, Baha Abdalhamid, Nancy D. Hanson, Jie Wang, Cindy Sloan, Diane Fabian, Awny Farajallah, Jerome Levine y Kenneth S. Thomson: *Escherichia coli: Development of Carbapenem Resistance During Therapy*. Clinical Infectious Diseases, 40(10):e84–e86, Mayo 2005, ISSN 1058-4838. <https://doi.org/10.1086/429822>.
- Hughes, L. D., A. Aljawadi y A. Pillai: *An overview of carbapenemase producing enterobacteriaceae (CPE) in trauma and orthopaedics*. Journal of Orthopaedics, 16(6):455–458, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2019.06.026>.
- Imran, Md., K. R. Das y M. M. Naik: *Coselection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat*. Chemosphere, 215:846–857, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.114>.

- Instituto de Patología Tropical – UFG: *Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos y de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud—2014—OPS/OMS*, 2014. Vol. 1, No. 1, p. 108.
- Juang, Der Fong y Joe M. Morgan: *The applicability of the API 20E and API Rapid NPT systems for the identification of bacteria from activated sludge*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4(1):1–2, 2001. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582001000100002&lng=es&tlng=en, Accessed: 2025-08-12.
- Kaeppler, K., M. Armbercht y R. Kubasch: *Troubleshooting Guide for the Measurement of Nucleic Acids with Eppendorf BioPhotometer® D30 and Eppendorf BioSpectrometer®*, 2020.
- Kerschner, H., L. Jernej, A. Cabal, P. Hyden, S. Machherndl-Spandl, L. Berning, A. Blaimschein, W. Ruppitsch, P. Apfalter y R. Hartl: *Successful termination of a multi-year wastewater-associated outbreak of NDM-5-carrying E. coli in a hemato-oncological center*. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 14(1):27, 2025.
- Kholodii, G., S. Mindlin, M. Petrova y S. Minakhina: *Tn5060 from the Siberian permafrost is most closely related to the ancestor of Tn21 prior to integron acquisition*. *FEMS Microbiology Letters*, 226(2):251–255, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00559-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00559-7).

- Koditschek, L. K. y P. Guyre: *Resistance transfer fecal coliforms isolated from the Whippany River*. Water Research, 8:747–752, 1974.
- Kohler, P., N. Tijet, H. C. Kim, J. Johnstone, T. Edge, S. N. Patel, C. Seah, B. Willey, B. Coleman, K. Green, I. Armstrong, K. Katz, M. P. Muller, J. Powis, S. M. Poutanen, D. Richardson, A. Sarabia, A. Simor, A. McGeer y R. G. Melano: *Dissemination of Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase among clinical and environmental Enterobacteriaceae isolates in Ontario, Canada*. Scientific Reports, 10(1):18580, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75247-7>.
- Laganà, P., G. Caruso, I. Corsi, E. Bergami, V. Venuti, D. Majolino, R. La Ferla, M. Azzaro y S. Cappello: *Do plastics serve as a possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica)*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 222(1):89–100, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.08.009>.
- Lai, C. K. C., R. W. Y. Ng, S. S. Y. Leung, M. Hui y M. Ip: *Overcoming the rising incidence and evolving mechanisms of antibiotic resistance by novel drug delivery approaches – An overview*. Advanced Drug Delivery Reviews, 181:114078, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114078>.
- Lallement, C., C. Pasternak, M. C. Ploy y T. Jové: *The Role of ISCR1-Borne POUT Promoters*

in the Expression of Antibiotic Resistance Genes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02579>.

Laraki, N., N. Franceschini, G. M. Rossolini, P. Santucci, C. Meunier, E. De Pauw, G. Amicosante, J. M. Frère y M. Galleni: *Biochemical Characterization of the Pseudomonas aeruginosa 101/1477 Metallo- β -Lactamase IMP-1 Produced by Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4):902–906, 1999. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.902>.

Le-Vo, H. N., P. T. B. Tran, L. Le, Y. Matsumoto, D. Motooka, S. Nakamura, J. W. Jones, T. Iida y V. Cao: *Complex Class 1 Integron in a Clinical Escherichia coli Strain From Vietnam Carrying Both mcr-1 and blaNDM-1*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02472>.

Li, D. y S. Liu: *Water Quality Monitoring in Aquaculture*. En Li, D. y S. Liu (editores): *Water Quality Monitoring and Management*, páginas 303–328. Academic Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811330-1.00012-0>.

Lima, A. M. S., M. E. S. de Melo, L. C. Alves, F. A. Brayner y A. C. S. Lopes: *Investigation of class 1 integrons in Klebsiella pneumoniae clinical and microbiota isolates belonging to different phylogenetic groups in Recife, State of Pernambuco*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47:165–169, 2014. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0021-2014>.

Lupo, A., M. Haenni y J. Y. Madec: *Antimicrobial Resistance in Acinetobacter spp. and Pseudomonas spp.* Microbiology Spectrum, 6(3):6.3.01, 2018.

Mairi, Amal, Amina Pantel, Albert Sotto, Jean Philippe Lavigne y Aïcha Touati: *OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 37(4):587–604, 2018.

Marti, E. B., E. Variatza y J. L. Balcazar: *The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance.* Trends in Microbiology, 22(1):36–41, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>.

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS): *ALERTA EPIDEMIOLÓGICA POR PRIMER HALLAZGO DE CARBAPENEMASAS DE TIPO OXA-48 EN GUATEMALA*, 2020. <http://portal.lns.gob.gt/media/attachments/2021/09/14/circular-17-2020-alerta-carbapenemasas-oxa-48.pdf>, Accedido: 2025-08-12.

Mora, A., L. Lizama, G. Orellana, J. Overall, A. Callejas y A. Barrera: *Resistencia a carbapenémicos en unidad de cuidados intensivos de adultos. Carbapenemic resistance in Adult Intensive Care Units.* Informe técnico 4, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2017.

MSPAS: *ALERTA EPIDEMIOLÓGICA POR PRIMER HALLAZGO DE CARBA-*

PENEMASAS DE TIPO OXA-48 EN GUATEMALA, 2020. <http://portal.lns.gob.gt/media/attachments/2021/09/14/circular-17-2020-alerta-carbapenemasas-oxa-4.pdf>, Accedido el 19 de agosto de 2025.

National Center for Biotechnology Information (NCBI): *metallo-beta-lactamase NDM - Gene—NCBI*, 2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=metallo-beta-lactamase%20NDM>, Consultado el 12 de agosto de 2025.

Negrete-González, C., E. Turrubiarres-Martínez, M. Briano-Macias, D. Noyola, L. F. Pérez-González, R. González-Amaro y P. Niño-Moreno: *Plasmid Carrying blaCTX-M-15, blaPER-1, and blaTEM-1 Genes in Citrobacter spp. From Regional Hospital in Mexico*. *Infectious Diseases*, 15:11786337211065750, 2022.

Nordmann, Patrice, Thierry Naas y Laurent Poirel: *Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10):1791–1798, 2011. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>.

Ocampo, Ana M., Lingling Chen, Alexander V. Cienfuegos, Gloria Roncancio, Krunal D. Chavda, Bernard N. Kreiswirth y Juan N. Jiménez: *A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae with Distinct Clinical Characteristics*. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy, 60(1):332–342, 2015. <https://doi.org/10.1128/AAC.01775-15>.
- Okonkwo, V., F. Cholet, U. Z. Ijaz, T. Koottatep, T. Pussayanavin, C. Polprasert, W. T. Sloan, S. Connelly y C. J. Smith: *intI 1 primer selection for class 1 integron integrase gene and transcript quantification – validation and application for monitoring intl 1 gene abundance within septic tanks in Thailand*. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.06.19.545554>.
- Organización Mundial de la Salud: *La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana*, 2024. <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistance>. Consultado el 12 de agosto de 2025.
- Pal, C., K. Asiani, S. Arya, C. Rensing, D. J. Stekel, D. G. J. Larsson y J. L. Hobman: *Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance*. En *Advances in Microbial Physiology*, volumen 70, páginas 261–313. 2017. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.02.001>.
- Pasteran, F., E. Albornoz, D. Faccione, S. Gomez, C. Valenzuela, M. Morales, P. Estrada, L. Valenzuela, J. Matheu, L. Guerriero, E. Arbizú, Y. Calderón, P. Ramon-Pardo y A. Corso: *Emergence of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Guatemala*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7):1795–1797, 2012. <https://doi.org/10.1093/jac/dks101>.

- Patwardhan, R. B., P. K. Dhakephalkar, B. A. Chopade, D. D. Dhavale y R. R. Bhonde: *Purification and Characterization of an Active Principle, Lawsonia, Responsible for the Plasmid Curing Activity of Plumbago zeylanica Root Extracts*. *Frontiers in Microbiology*, 9:2618, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02618>.
- Piedra-Carrasco, N., A. Fàbrega, W. Calero-Cáceres, T. Cornejo-Sánchez, M. Brown-Jaque, A. Mir-Cros, M. Muniesa y J. J. González-López: *Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem*. *PLOS ONE*, 12(4):e0175246, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175246>.
- Pitout, Johann D. D., Patrice Nordmann y Laurent Poirel: *Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10):5873–5884, 2015. <https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>.
- Pongchaikul, Piyarat y Panadda Mongkolsuk: *Comprehensive Analysis of Imipenemase (IMP)-Type Metallo- β -Lactamase: A Global Distribution Threatening Asia*. *Antibiotics*, 11(2):236, 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020236>.
- Potter, Rachel F., Angela W. D'Souza y Gautam Dantas: *The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. *Drug Resistance Updates*, 29:30–46, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.09.002>.

- Rada, Adriana M., Carolina Hernández-Gómez, Erika Restrepo y María Virginia Villegas: *Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001–2016*. Biomédica, 39(1):199–220, 2018.
- Ramos, P. I. P., M. G. F. Custódio, G. D. R. Quispe Saji, T. Cardoso, G. L. da Silva, G. Braun, W. M. B. S. Martins, R. Girardello, A. T. R. de Vasconcelos, E. Fernández, A. C. Gales y M. F. Nicolás: *The polymyxin B-induced transcriptomic response of a clinical, multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae involves multiple regulatory elements and intracellular targets*. BMC Genomics, 17(Suppl 8):737, 2016.
- Reddy, S., K. Kaur, P. Barathe, V. Shriram, M. Govarthanan y V. Kumar: *Antimicrobial resistance in urban river ecosystems*. Microbiological Research, 263:127135, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127135>.
- Richmond, M. H. y M. John: *CO-TRANSDUCTION BY A STAPHYLOCOCCAL PHAGE OF THE GENES RESPONSIBLE FOR PENICILLINASE SYNTHESIS AND RESISTANCE TO MERCURY SALTS*. Nature, 202:1360–1361, 1964. <https://doi.org/10.1038/2021360a0>.
- Rui, Y., W. Lu, S. Li, C. Cheng, J. Sun y Q. Yang: *Integrons and insertion sequence common region 1 (ISCR1) of carbapenem-non-susceptible Gram-negative bacilli in fecal specimens from 5000 patients in southern China*. International

Journal of Antimicrobial Agents, 52(5):571–576, 2018.

Samra, Ziona, Miriam Heifetz, Jacob Talmor, Etyy Bain y Joseph Bahar: *Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens*. Journal of Clinical Microbiology, 36(4):990–994, 1998.

Sattar, F., X. Hu, A. Saxena, K. Mou, H. Shen, H. Ali, M. A. Ghauri, Y. Sarwar, A. Ali y G. Li: *Analyzing Antibiotic Resistance in Bacteria from Wastewater in Pakistan Using Whole-Genome Sequencing*. Antibiotics, 13(10):Article 10, 2024.

Schreiber, Christiane, Nicole Zacharias, Sarah M. Essert, Felix Wasser, Heike Müller, Esther Sib, Tabea Precht, Marijo Parcina, Gabriele Bierbaum, Ricarda M. Schmithausen, Thomas Kistemann y Martin Exner: *Clinically relevant antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments – An optimized culture-based approach*. Science of The Total Environment, 750:142265, 2021, ISSN 0048-9697. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720357946>.

Seiler, C. y T. U. Berendonk: *Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture*. Frontiers in Microbiology, 3:399, 2012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>.

- Siguier, P., J. Perochon, L. Lestrade, J. Mahillon y M. Chandler: *ISfinder: The reference centre for bacterial insertion sequences*. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_1):D32–D36, 2006. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>.
- Sobia, F., S. Niwazi, A. A. Alotaibi y H. A. Almaimani: *Class B-Type Beta-Lactamases: Treatment Strategies*. En Shahid, M., A. Singh y H. Sami (editores): *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Threats and Challenges*, páginas 81–92. Springer Nature, 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9097-6_5.
- Song, W., R. Qi, L. Zhao, N. Xue, L. Wang y Y. Yang: *Bacterial community rather than metals shaping metal resistance genes in water, sediment and biofilm in lakes from arid northwestern China*. *Environmental Pollution*, 254:113041, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113041>.
- Squadrone, Sebastiano: *Water environments: Metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(4):238, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8191-8>.
- Stefaniak, K., M. Kiedrzyński, E. Korzeniewska, E. Kiedrzyńska y M. Harnisz: *Preliminary insights on carbapenem resistance in Enterobacteriaceae in high-income and low-/middle-income countries*. *Science of The Total Environment*, 957:177593, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177593>.

- Tavares, R. D. S., M. Tacão, E. Ramalheira, S. Ferreira y I. Henriques: *Report and Comparative Genomics of an NDM-5-Producing Escherichia coli in a Portuguese Hospital: Complex Class 1 Integrons as Important Players in blaNDM Spread*. *Microorganisms*, 10(11):2243, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112243>.
- Thomson, J. M. y R. A. Bonomo: *The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril!* *Current Opinion in Microbiology*, 8(5):518–524, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.014>.
- Toleman, M. A., P. M. Bennett y T. R. Walsh: *ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century?* *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2):296–316, 2006. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00048-05>.
- Toleman, M. A. y T. R. Walsh: *ISCR Elements Are Key Players in IncA/C Plasmid Evolution*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8):3534, 2010. <https://doi.org/10.1128/AAC.00383-10>.
- Tremblay, J., K. Singh, A. Fern, E. S. Kirton, S. He, T. Woyke, J. Lee, F. Chen, J. L. Dangl y S. G. Tringe: *Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00771>.
- Urrutia, M.: *Elaboración de una propuesta para el plan de monitoreo de calidad del agua de los*

ríos del municipio de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, 2020. p. 170.

- Velásquez Porta, T. y D. Lau Bonilla: *Detection of carbapenemases genes blaKPC and blaNDM in Klebsiella pneumoniae isolates from the San Juan de Dios General Hospital at Guatemala City*. Revista Científica Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, 26:10, 2017.
- Venter, Helen: *Reversing resistance to counter antimicrobial resistance in the World Health Organisation's critical priority of most dangerous pathogens*. Bioscience Reports, 39(4):BSR20180474, 2019. <https://doi.org/10.1042/BSR20180474>.
- Walther-Rasmussen, J. y N. Høiby: *OXA-type carbapenemases*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(3):373–383, 2006. <https://doi.org/10.1093/jac/dki482>.
- Wang, Feng, Kai Wu, Jian Sun, Qi Wang, Qiang Chen, Sheng Yu y Yong Rui: *Novel ISCR1-linked resistance genes found in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China*. International Journal of Antimicrobial Agents, 40(5):404–408, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.016>.
- Wanger, Atis, Veronica Chavez, Richard S. P. Huang, Amer Wahed, Jeffrey K. Actor y Amitava Dasgupta: *Antibiotics, Antimicrobial Resistance, Antibiotic Susceptibility Testing, and Therapeutic Drug Monitoring for Selected Drugs*. En *Microbiology and Molecu-*

lar Diagnosis in Pathology, páginas 119–153. Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805351-5.00007-7>.

World Health Organization: *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*, 2024. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>.

Wozniak, Ronald A. F. y Matthew K. Waldor: *Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8):552–563, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>.

Yantuche Menchú, L. S.: *Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la metodología en placa con agar cromogénico contra amplificación por PCR, para la detección de carbapenemasas en muestras de heces humanas en Guatemala*. <https://repositorio.uvg.edu.gt/xmlui/handle/123456789/5467>, 2023. Repositorio UVG.

Yasmin, S., A. M. Karim, S. H. Lee y R. Zahra: *Temporal Variation of Meropenem Resistance in E. coli Isolated from Sewage Water in Islamabad, Pakistan*. *Antibiotics*, 11(5):635, 2022.

Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush y F. C. Tenover:

*Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(4):1151–1161, 2001. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.

Zhou, J., L. Wu, Y. Deng, X. Zhi, Y. H. Jiang, Q. Tu, J. Xie, J. D. Van Nostrand, Z. He y Y. Yang: *Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection.* The ISME Journal, 5(8):1303–1313, 2011. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.11>.

CAPÍTULO 13

Anexos

13.1. POE I

POE I: Análisis microbiológico de la microcuenca río Contreras.

| | |
|---|--|
| Procedimiento Normado de Operación | POE 1 Análisis de Microorganismos Acuáticos. |
| | Páginas Totales: 7 |
| Análisis microbiológico de microcuenca río Contreras | Autores: Samuel Rios, María Isabel Giróny Christa Contreras. |

1. Propósito

El documento describe el procedimiento para evaluar la presencia y abundancia de bacterias coliformes y enterobacterias fecales en la microcuenca del río Contreras, identificando especies potencialmente patógenas.

2. Aplicación

Los medios selectivos como el EMB, XLD y el agar verde brillante son esenciales para el aislamiento e identificación de bacterias potencialmente patógenas en muestras de agua. Usualmente se utilizan para la detección de bacterias fermentadoras de lactosa como *Escherichia coli*, coliformes y coliformes fecales. Así como bacterias fermentadoras de xilosa como especies de *Salmonella* y *Shigella*. (Al-Gheethi et al., 2019)

3. Referencias

1. Propósito

El documento describe el procedimiento para evaluar la presencia y abundancia de bacterias coliformes y enterobacterias fecales en la microcuenca del río Contreras, identificando especies potencialmente patógenas.

2. Aplicación

Los medios selectivos como el EMB, XLD y el agar verde brillante son esenciales para el aislamiento e identificación de bacterias potencialmente patógenas en muestras de agua. Usualmente se utilizan para la detección de bacterias fermentadoras de lactosa como *Escherichia coli*, coliformes y coliformes fecales. Así como bacterias fermentadoras de xilosa como especies de *Salmonella* y *Shigella*. (Al-Gheethi et al., 2019)

3. Referencias

- 3.1. Rios, S., Hoffens, A., Bianchi, F., Monzón, A.G., López, J.D. & Barrillas, M. (2023). Calidad del Agua y Resistencia Microbiana en el Estanque de Colecciones Biológicas UVG: Análisis de Microorganismos Acuáticos
- 3.2. Al-Gheethi, Adel Ali Saeed, Efaq Ali Noman, Radin Maya Saphira Radin Mohamed, y Amir Hashim Mohd Kassim. 2019. "Determination of Pathogens in Greywater". Pp. 51–72 en *Management of Greywater in Developing Countries: Alternative Practices, Treatment and Potential for Reuse and Recycling*, editado por R. M. S. Radin Mohamed, A. A. S. Al-Gheethi, y A. H. Mohd Kassim. Cham: Springer International Publishing.

4. Terminología

- 4.1. Número Más Probable (NMP): Es un método para estimar la cantidad de bacterias en una muestra de alimento o agua. (Williams & Busta, 1999)
- 4.2. Coliformes totales: Bacterias Gram negativas con forma de bastón, no formadoras de esporas y móviles o no móviles que pueden fermentar lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a 35-37°C. (Li & Liu, 2019)
- 4.3. Medio EMB: El agar eosina-azul de metileno es selectivo para las bacterias gramnegativas es útil para aislar y diferenciar los diversos bacilos gramnegativos y entéricos, coliformes y coliformes fecales. Las bacterias que fermentan lactosa en el medio forman colonias coloreadas, mientras que las que no fermentan lactosa son incoloras. (Lal & Cheeptham, 2007)
- 4.4. Medio XLD: El agar desoxicolato de xilosa y lisina se emplea para el aislamiento de salmonelas y shigelas. Mediante el uso del componente inhibidor selectivo desoxicolato de sodio y tres sistemas indicadores: xilosa, lactosa y sacarosa combinas con rojo fenol; clorhidrato de lisina; y tiosulfato de sodio y hierro. (Corry et al., 2003)

5. Documentos asociados

- 5.1. Rios, S., Hoffens, A., Bianchi, F., Monzón, A.G., López, J.D. & Barrillas, M. (2023). Calidad del Agua y Resistencia Microbiana en el Estanque de Colecciones Biológicas UVG: Análisis de Microorganismos Acuáticos.

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.

6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.

6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.

6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.

6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.

6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .

6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.

6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.

6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).

6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.

6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.

6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

19. Equipo, materiales y reactivos

19.1. Equipo

19.1.1. Autoclave

19.1.2. Incubadora

19.1.3. Centrifugadora

19.1.4. Balanza

19.2. Materiales/ Cristalería

19.2.1. Tubos de ensayo con campana de Durham

19.2.2. Placas Petri

19.2.3. Bolsas tipo whirpack

19.3. Reactivos

19.3.1. Chromocult

19.3.2. Medio EMB *eosin methylene blue*

19.3.3. Medio XLD *xylose lysine deoxycholate*

19.3.4. Medio Lauril Sulfato

19.3.5. Medio de bilis verde brillante

19.3.6. Medio Nutritivo

19.3.7. CHORMagar mSuperCARBA

19.3.8. Agua destilada

19.4. Medicamentos

19.4.1. No aplica

19.5. Material biológico

19.5.1. Bacterias

POE VI: Detección de metales pesados mediante voltamperometría de redisolución

| | |
|---|----------------------------|
| Procedimiento Normado de Operación | POE IV |
| | Páginas Totales: 4 |
| Detección de metales pesados mediante voltamperometría de redisolución | Autores: Gabriela Castillo |

1. Propósito

Establecer un procedimiento estandarizado para la detección y cuantificación de metales pesados, tales como plomo (Pb), cadmio (Cd), zinc (Zn) y cobre (Cu), en muestras acuosas mediante la técnica electroquímica de voltamperometría de redisolución anódica (ASV). Este método permite una determinación sensible y específica de metales traza en matrices ambientales, con límites de detección del orden de los microgramos por litro ($\mu\text{g/L}$), contribuyendo a la vigilancia de la calidad del agua y al cumplimiento de normativas ambientales. (Wang, 2006)

2. Aplicación

Este procedimiento se aplica en laboratorios de análisis ambiental, salud pública y control de calidad que requieran la determinación precisa de metales pesados en muestras de agua potable, aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas. Es especialmente útil en estudios de contaminación hídrica y evaluación del impacto de actividades industriales, agrícolas y mineras sobre cuerpos de agua. (Economou, 2005)

3. Referencias

- 3.1. Economou, A. (2005). Voltammetric análisis of trace metals in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 547(1), 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.026>
- 3.2. Wang, J. (2006). *Analytical electrochemistry* (3rd ed.). John Wiley & Sons.

4. Terminología

- 4.1. Metales pesados: Elementos metálicos con densidades superiores a 5 g/cm^3 , que pueden ser tóxicos en bajas concentraciones. Comúnmente incluyen Pb, Cd, Hg, As, Zn, Cu, entre otros. (Tchounwou et al., 2012)
- 4.2. Voltamperometría de redisolución anódica (ASV): Técnica electroanalítica que combina una etapa de preconcentración de metales en un electrodo de trabajo con una etapa de oxidación (redisolución) durante la cual se registra una señal de corriente proporcional a la concentración del metal en la muestra. (Wang, 2006)
- 4.3. Electrodo de trabajo: Electrodo sobre el cual ocurre la acumulación y posterior oxidación de los analitos metálicos. En ASV, suele ser un electrodo de mercurio, bismuto o carbono modificado (Honeychurch & Hart, 2003).

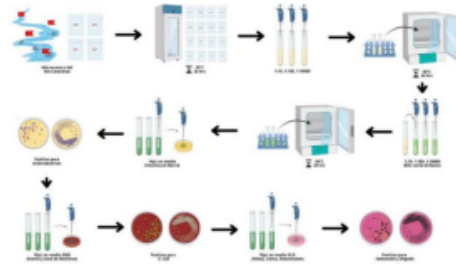


Figura 1. Diagrama de flujo para el análisis microbiológico de la microcuenca Río Contreras. (Ríos, Girón & Contreras; 2024)

Anexo II. Resultados esperados

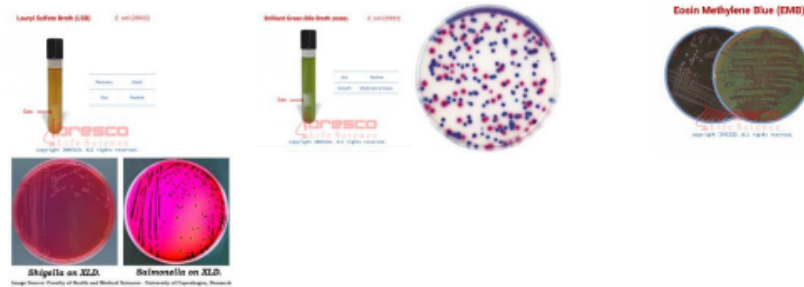


Figura 2. Resultados esperados para los ensayos de LSB, BGBB, Chromocult, EMB y XLD.

13.2. POE II

POE II: Detección de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{NDM}* por PCR múltiple

| | |
|--|-------------------------|
| Procedimiento Operativo Estandarizado | POE II |
| | Páginas Totales: 5 |
| Detección de los genes <i>bla_{KPC}</i>, <i>bla_{OXA-48-like}</i>, <i>bla_{VIM}</i>, <i>bla_{IMP}</i> y <i>bla_{NDM}</i> por PCR múltiple | Autores: Laura Yantuche |

1. Propósito

El documento describe el procedimiento para detectar, por medio de PCR múltiple, la presencia de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{NDM}* que codifican carbapenemasas asociadas a la resistencia a antibióticos en bacterias, específicamente a los carbapenémicos

2. Aplicación

La PCR múltiple permite la amplificación de múltiples genes en la misma reacción. En este caso, permite la identificación de bacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos presentes en muestras de heces humanas a través de la amplificación de los genes que codifican a las enzimas carbapenemasas que proporcionan esta resistencia. Los genes que permite identificar esta PCR múltiple son *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{NDM}*.

3. Referencias

3.1 Thermo Scientific. (2016). *Product Information DreamTaq PCR Master Mix (2X)*.

https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012702_DreamTaq_K1071_UG.pdf

3.2 Servicio Antimicrobianos. (2019). *Protocolo de PCR múltiple para la detección de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48-like}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{NDM}* en bacilos gram negativos*.
<http://antimicrobianos.com.ar/2019/?cat=52>

4. Terminología

4.1 ADN: Ácido desoxirribonucleico

4.2 *bla_{KPC}*: Gen que codifica a las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae*

4.3 *bla_{OXA-48-like}*: Gen que codifica a la β -lactamasa hidrolizante de oxacilina 48 y sus variantes

4.4 *bla_{VIM}*: Gen que codifica a las metalo- β -lactamasas de Verona codificadas por integrón

4.5 *bla_{IMP}*: Gen que codifica a las imipenemasas

4.6 *bla*_{NDM}: Gen que codifica las metalo- β -lactamasas de Nueva Delhi

4.7 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

5. Documentos asociados

5.1 Thermo Scientific. (2016). *Product Information DreamTaq PCR Master Mix (2X)*.

5.2 POE I: Extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de heces humanas

6. Seguridad

6.1 Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

6.1.1 Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.

6.1.2 Mantener la puerta cerrada mientras se trabaja.

6.1.3 Limitar el acceso al laboratorio.

6.1.4 Evitar la formación de salpicaduras y aerosoles.

6.1.5 Descontaminar superficies de trabajo antes y después de uso, y en caso de cualquier derrame.

6.1.6 Colocar los desechos del laboratorio en bolsa roja.

6.1.7 Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de nitrilo sin polvo).

6.1.8 Realizar el procedimiento dentro de una campana de flujo laminar.

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1 Equipo

7.1.1 Micropipetas de 10 y 200 μ L

7.1.2 Termociclador

7.1.3 Cámara de electrophoresis

7.1.4 Transiluminador UV

7.2 Materiales/ Cristalería

7.2.1 Puntas para micropipetas de 10 y 200 μ L

7.2.2 Tubos para PCR de 0.2 mL

7.2.3 Tubos de microcentrifuga 1.5 mL

7.2.4 Hielo

7.3 Reactivos

7.3.1 DreamTaq™ PCR Master Mix (2X)

7.3.2 Cebadores:

7.3.2.1 VIMF (5'-C-3') (10 μ M)

7.3.2.2 VIMR (5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3') (10 μ M)

7.3.2.3 IMP-UF1 (5'-GGYGTTTWTGTTTCATACWTCKTTYGA-3') (10 μ M)

7.3.2.4 IMP-UR1 (5'-GGYARCCAAACCACTASGTTATCT-3') (10 μ M)

7.3.2.5 NDM-F (5'-AGCACACTTCCTATCTCGAC-3') (10 μ M)

7.3.2.6 NDM-R (5'-GGCGTAGTGCTCAGTGTC-3') (10 μ M)

7.3.2.7 KPC-F (5'-AACAAGGAATATCGTTGATG-3') (10 μ M)

7.3.2.8 KPC-R (5'-AGATGATTTTCAGAGCCTTA-3') (10 μ M)

7.3.2.9 OXA48-F (5'-ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG-3') (10 μ M)

7.3.2.10 OXA48R2 (5'-TGAGCACTCTTTTGTGATG-3') (10 μ M)

7.3.3 Agarosa

7.3.4 Buffer TBE 1X

7.3.5 DNA Loading Dye 6X

7.3.6 Colorante de ADN

7.3.7 Estándar de peso molecular de ADN 1 kb

7.3.8 Agua libre de nucleasas

7.4 Material biológico

7.4.1 Extracto de ADN

8 Procedimiento

8.1 Preparar en hielo el máster mix en un tubo de 1.5 mL según la cantidad de reacciones necesarias para un volumen final de 50 μ L por reacción (Cuadro 1). Mezclar y centrifugar brevemente cada componente antes de utilizarlo.

Cuadro 1. Máster mix para PCR múltiplex de 15 μ L por reacción

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen para 1 reacción (μ L) |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------------|
| DreamTaq™ PCR Master Mix | 2X | 1X | 7.5 |
| Cebador VIMF | 10 μ M | 0.2 μ M | 0.3 |
| Cebador VIMR | 10 μ M | 0.2 μ M | 0.3 |
| Cebador NDM-F | 10 μ M | 0.2 μ M | 0.3 |
| Cebador NDM-R | 10 μ M | 0.2 μ M | 0.3 |
| Cebador OXA48F | 10 μ M | 0.2 μ M | 0.3 |
| Cebador OXA48R | 10 μ M | 0.2 μ M | 0.3 |
| Cebador KPC-F | 10 μ M | 0.4 μ M | 0.6 |
| Cebador KPC-R | 10 μ M | 0.4 μ M | 0.6 |
| Cebador IMP-UF1 | 10 μ M | 0.48 μ M | 0.72 |

| | | | |
|-------------------------|------------|--------------|------|
| Cebador IMP-UR1 | 10 μ M | 0.48 μ M | 0.72 |
| Agua libre de nucleasas | NA | NA | 1.56 |
| ADN muestra | NA | NA | 1.5 |

8.2 En tubos para PCR de 0.2 mL, para cada muestra agregar 13.5 μ L de máster mix y 1.5 μ L de ADN.

8.3 Como control negativo dejar un tubo con 13.5 μ L de máster mix sin ADN de muestra.

8.4 Colocar los tubos con las muestras y máster mix en el termociclador y correr el programa para la PCR múltiple (Cuadro 2).

Cuadro 2. Programa de ciclado para PCR múltiple

| Paso | Temperatura | Tiempo | Repeticiones |
|---------------------------|-------------|-------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 5 minutos | 1 |
| Amplificación | | | |
| Desnaturalización | 94 °C | 30 segundos | 35 |
| Annealing | 57 °C | 30 segundos | |
| Extensión | 72 °C | 60 segundos | |
| Extensión final | 72 °C | 10 minutos | 1 |
| Hold | 10 °C | Indefinido | |

8.5 Preparar gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X y colorante de ADN. Colocarlo en la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X.

8.6 Cargar 3 μ L de estándar de peso molecular de ADN 1 kb en el gel.

8.7 Mezclar 5 μ L de cada producto de PCR con 1 μ L de loading dye y cargar en el gel.

8.8 Correr la electroforesis a 100 V por 30 minutos.

9 Esterilización de material

No aplica

10 Cálculos

Cálculo 1. Volumen de reactivos según el número de reacciones

$$\text{Volumen de reacción} * x = \text{Volumen total para } x \text{ reacciones}$$

En donde:

x = número de reacciones requeridas

11 Control de calidad

- 11.1 Se esperan productos de amplificación de 261 pb para *blaVIM*, 404 pb para *blaIMP*, 512 pb para *blaNDM*, y 916 pb para *blaKPC*.
- 11.2 Para los genes *blaOXA-48-like* se espera una banda de 763 pb para *blaOXA-163*. Este gen tiene una deleción de 12 nucleótidos respecto a *blaOXA-48* dentro de la región amplificada. Por lo tanto, se espera un producto de amplificación de 775 pb para el gen *blaOXA-48*.
- 11.3 No se debe observar un producto de amplificación en el control negativo.

12 Resolución de problemas

- 12.1 En caso de bajo rendimiento o rendimiento nulo de la amplificación por PCR se puede:
 - 12.1.1 Reducir el volumen de ADN de las muestras o diluirlo antes de agregarlo al *master mix* con el fin de minimizar el efecto de inhibidores de la amplificación que pueden resultar del aislamiento de ADN. Para mejorar los resultados, las muestras se pueden diluir hasta 1:10,000 dependiendo de la concentración inicial.
 - 12.1.2 Incluir un paso adicional de precipitación y lavado con etanol antes de la amplificación para eliminar inhibidores que se pueden copurificar con el ADN y aumentar la pureza del ADN.
 - 12.1.3 Agregar agentes potenciadores de la PCR como DMSO o betaína
 - 12.1.4 Agregar estabilizadores generales como BSA al 0.16 mg/mL

13.3. POE III

POE III: Amplificación del gen 16s rRNA por PCR

| | |
|---|-------------------------|
| Procedimiento Operativo Estandarizado | POE III |
| | Páginas Totales: 4 |
| Amplificación del gen 16s rRNA por PCR | Autores: Laura Yantuche |

1. Propósito

El documento describe el procedimiento para la amplificación del gen 16s por medio de PCR como control interno de para descartar falsos negativos en la detección de genes de carbapenemasas por inhibidores de amplificación.

2. Aplicación

La amplificación por PCR del gen 16s rRNA se utilizará como control interno de amplificación en extractos de ADN obtenidos de muestras de heces humanas. Si la amplificación de este gen es exitosa, se puede suponer que la extracción de ADN fue eficiente y no cuenta con inhibidores de amplificación.

3. Referencias

3.1 Thermo Scientific. (2016). *Product Information DreamTaq PCR Master Mix (2X)*.

https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012702_DreamTaq_K1071_UG.pdf

4. Terminología

4.1 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

4.2 Control interno de amplificación: Procedimiento para confirmar la presencia de ADN amplificable y la ausencia de sustancias inhibitorias de amplificación

4.3 Gen 16s rRNA: Gen que codifica el ARN ribosómico de subunidad pequeña de los ribosomas en células procariotas.

5. Documentos asociados

5.1 Thermo Scientific. (2016). *Product Information DreamTaq PCR Master Mix (2X)*.

5.2 POE I: Extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de heces humanas

6. Seguridad

6.1 Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.1.1 Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.1.2 Mantener la puerta cerrada mientras se trabaja
- 6.1.3 Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.1.4 Evitar la formación de salpicaduras y aerosoles.
- 6.1.5 Descontaminar superficies de trabajo antes y después de uso, y en caso de cualquier derrame.
- 6.1.6 Colocar los desechos del laboratorio en bolsa roja.
- 6.1.7 Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de nitrilo sin polvo)
- 6.1.8 Realizar el procedimiento dentro de una campana de flujo laminar.

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1 Equipo

- 7.1.1 Micropipetas de 10 y 200 μ L
- 7.1.2 Termociclador
- 7.1.3 Cámara de electrophoresis
- 7.1.4 Transiluminador UV

7.2 Materiales/ Cristalería

- 7.2.1 Puntas para micropipetas de 10 y 200 μ L
- 7.2.2 Tubos para PCR de 0.2 mL
- 7.2.3 Tubos de microcentrifuga 1.5 mL
- 7.2.4 Hielo

7.3 Reactivos

- 7.3.1 DreamTaq™ PCR Master Mix
- 7.3.2 Cebadores:
- 7.3.3 27F (10 μ M) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- 7.3.4 1492R (10 μ M): 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'
- 7.3.5 Agarosa
- 7.3.6 Buffer TBE 1X
- 7.3.7 DNA Loading Dye 6X
- 7.3.8 Colorante de ADN
- 7.3.9 Estándar de peso molecular de ADN 1 kb

7.3.10 Agua libre de nucleasas

7.4 Material biológico

7.4.1 Extracto de ADN

8 Procedimiento

- 8.1 Preparar en hielo el máster mix en un tubo eppendorf de 1.5 mL según la cantidad de reacciones necesarias para un volumen final de 15 μ L por reacción (Cuadro 1). Mezclar y centrifugar brevemente cada componente antes de utilizarlo.

Cuadro 1. Máster mix para PCR de 15 μ L por reacción

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen para 1 reacción (μ L) |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------------|
| DreamTaq™ PCR Master Mix | 2X | 1X | 7.5 |
| Cebador 27f | 10 μ M | 1 μ M | 1.5 |
| Cebador 1492r | 10 μ M | 1 μ M | 1.5 |
| Agua libre de nucleasas | NA | NA | 1.5 |
| ADN muestra | NA | NA | 3 |

- 8.2 En tubos para PCR de 0.2 mL, para cada muestra agregar 12 μ L de máster mix y 3 μ L de ADN.
 8.3 Como control negativo dejar un tubo con 12 μ L de máster mix sin ADN de muestra.
 8.4 Colocar los tubos en el termociclador y correr el programa para PCR (Cuadro 2).
 8.5 Preparar gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X y colorante de ADN. Colocarlo en la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X.
 8.6 Cargar 3 μ L de estándar de peso molecular de ADN 1 kb en el gel.
 8.7 Mezclar 5 μ L de cada producto de PCR con 1 μ L de loading dye y cargar en el gel.
 8.8 Correr la electroforesis a 100 V por 30 minutos.

Cuadro 2. Programa de ciclado para PCR múltiple

| Paso | Temperatura | Tiempo | Repeticiones |
|---------------------------|-------------|-----------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 3 minutos | 1 |
| Amplificación | | | |

| | | | |
|-------------------|-------|-------------|----|
| Desnaturalización | 94 °C | 45 segundos | 35 |
| Annealing | 57 °C | 1 minuto | |
| Extensión | 72 °C | 1 min 30 s | |
| Extensión final | 72 °C | 10 minutos | 1 |
| Hold | 10 °C | Indefinido | |

9 Esterilización de material

No aplica

10 Cálculos

Cálculo 1. Volumen de reactivos según el número de reacciones

$$\text{Volumen de reacción} * x = \text{Volumen total para } x \text{ reacciones}$$

En donde:

x = número de reacciones requeridas

11 Control de calidad

11.1 Se espera un producto de amplificación de ~1400 pb.

11.2 El control negativo no debe presentar bandas de amplificación.

12 Resolución de problemas

12.1 En caso de bajo rendimiento o rendimiento nulo de la amplificación por PCR se puede:

12.1.1 Reducir el volumen de ADN de las muestras o diluirlo antes de agregarlo al master mix con el fin de minimizar el efecto de inhibidores de la amplificación que pueden resultar del aislamiento de ADN. Para mejorar los resultados, las muestras se pueden diluir hasta 1:10,000 dependiendo de la concentración inicial.

12.1.2 Incluir un paso adicional de precipitación y lavado con etanol antes de la amplificación para eliminar inhibidores que se pueden copurificar con el ADN y aumentar la pureza del ADN.

12.1.3 Agregar agentes potenciadores de la PCR como DMSO o betaína

12.1.4 Agregar estabilizadores generales como BSA al 0.16 mg/mL

Anexo III:

Ejemplos de geles de electroforesis para la detección de genes de carbapenemasas

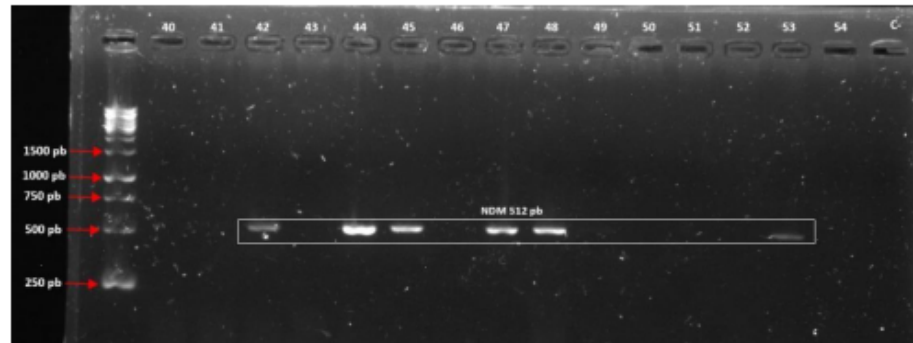


Figura 3. Ejemplo de geles de electroforesis para la detección de genes de carbapenemasas
En este gel se señala la detección del gen *bla_{NDM}* en múltiples muestras.

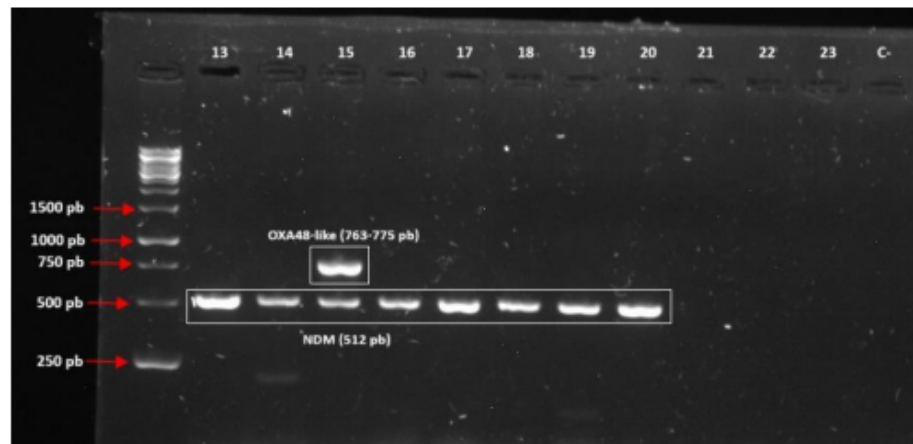


Figura 4. Ejemplo de geles de electroforesis para la detección de genes de carbapenemasas

En este gel se señala la detección del gen *bla_{NDM}* en múltiples muestras, además de la detección de la combinación de genes *bla_{NDM}* y *bla_{OXA48-like}*

Anexo VI:

Ejemplos de geles de electroforesis para la detección del gen 16S rRNA

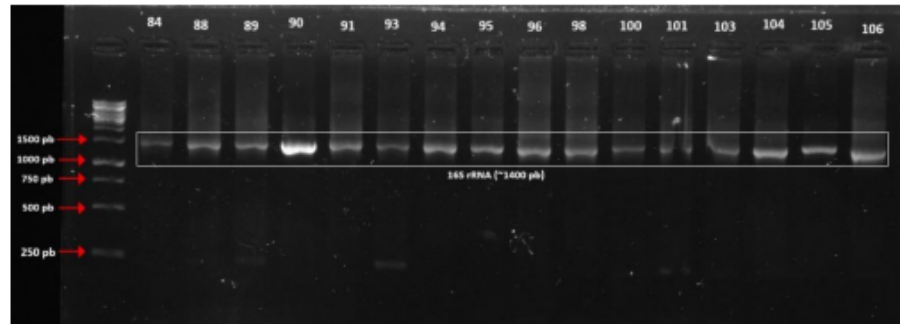


Figura 5. Primer ejemplo de geles de electroforesis para la detección del gen 16S rRNA
En este gel se señala la detección del gen 16S rRNA en múltiples muestras.

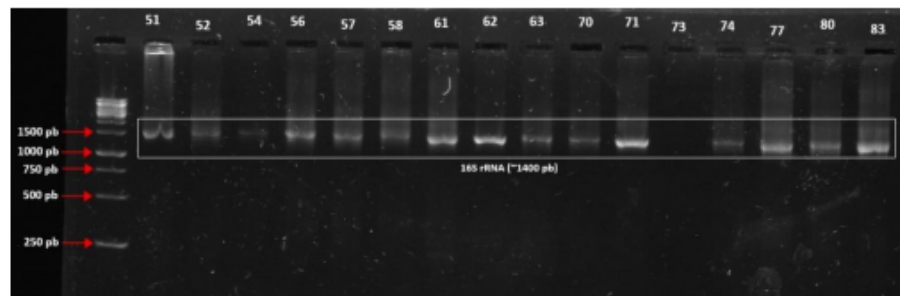


Figura 6. Segundo ejemplo de geles de electroforesis para la detección del gen 16S rRNA
En este gel se señala la detección del gen 16S rRNA en múltiples muestras.

13.4. POE IV

POE VI: Detección de Metales Pesados mediante Voltamperometría de Redisolución

| | |
|---|----------------------------|
| Procedimiento Normado de Operación | POE IV |
| | Páginas Totales: 4 |
| Detección de Metales Pesados mediante Voltamperometría de Redisolución | Autores: Gabriela Castillo |

1. Propósito

Establecer un procedimiento estandarizado para la detección y cuantificación de metales pesados, tales como plomo (Pb), cadmio (Cd), zinc (Zn) y cobre (Cu), en muestras acuosas mediante la técnica electroquímica de voltamperometría de redisolución anódica (ASV). Este método permite una determinación sensible y específica de metales traza en matrices ambientales, con límites de detección del orden de los microgramos por litro ($\mu\text{g/L}$), contribuyendo a la vigilancia de la calidad del agua y al cumplimiento de normativas ambientales. (Wang, 2006)

2. Aplicación

Este procedimiento se aplica en laboratorios de análisis ambiental, salud pública y control de calidad que requieran la determinación precisa de metales pesados en muestras de agua potable, aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas. Es especialmente útil en estudios de contaminación hídrica y evaluación del impacto de actividades industriales, agrícolas y mineras sobre cuerpos de agua. (Economou, 2005)

3. Referencias

- 3.1. Economou, A. (2005). Voltammetric análisis of trace metals in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 547(1), 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.026>
- 3.2. Wang, J. (2006). *Analytical electrochemistry* (3rd ed.). John Wiley & Sons.

4. Terminología

- 4.1. Metales pesados: Elementos metálicos con densidades superiores a 5 g/cm³, que pueden ser tóxicos en bajas concentraciones. Comúnmente incluyen Pb, Cd, Hg, As, Zn, Cu, entre otros. (Tchounwou et al., 2012)
- 4.2. Voltamperometría de redisolución anódica (ASV): Técnica electroanalítica que combina una etapa de preconcentración de metales en un electrodo de trabajo con una etapa de oxidación (redisolución) durante la cual se registra una señal de corriente proporcional a la concentración del metal en la muestra. (Wang, 2006)
- 4.3. Electrodo de trabajo: Electrodo sobre el cual ocurre la acumulación y posterior oxidación de los analitos metálicos. En ASV, suele ser un electrodo de mercurio, bismuto o carbono modificado (Honeychurch & Hart, 2003).

5. Documentos asociados

- 5.1. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *EXS*, 101, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- 5.2. Honeychurch, K. C., & Hart, J. P. (2003). Voltammetric behaviour and trace determination of lead at a mercury-free screen-printed carbon electrode. *Talanta*, 60(5), 1037–1046. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00174-5)
- 5.3. Wang, J. (2006). *Analytical electrochemistry* (3rd ed.). John Wiley & Sons.

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Potenciostato
- 7.1.2. Conector para sensor y electrodos ItalSens IS-HM
- Agitador magnético con barra de agitación
- Célula electroquímica
- Software PSTrace o PSTouch

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Erlenmeyer de 1000mL

7.3. Reactivos

- 7.3.1. HCl
- 7.3.2. Soluciones estándar de metales (Pb, Cu, Cd)
- 7.3.3. Agua desionizada

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. Antibióticos carbapenemasas

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Muestras de agua de la microcuenca Río Contreras y río Villalobos

8. Procedimiento

8.1. Preparación de las muestras

8.1.1. Acidificación, se ajusta el pH de la muestra de agua a ~2.5 agregando 33 μ L de HCl 6M por cada 10mL de muestra. Evitando que los iones metálicos precipiten como hidróxidos.

- 8.1.1.1. Si es necesario considerar realizar diluciones de las muestras con altas concentraciones de metales para que estén dentro del rango de detección lineal (1-1000ppb)

8.2. Preparación del electrodo

8.2.1. Condicionamiento del electrodo

8.2.1.1. Sumergir el electrodo ItalSens IS-HM en una solución de HCl 100mM. Posteriormente aplicar las siguientes condiciones con el potenciostato:

- E de acondicionamiento: -0.18V durante 30 segundos
- E de deposición: -1.1V durante 300 segundos
- E en reposo: -0.2V

8.2.1.2. Enjuagar el electrodo con agua desionizada asegurándose que no se queden residuos.

8.3. Activación de la película de mercurio

8.3.1. Durante el acondicionamiento, se forma una delgada película de mercurio en la superficie del electrodo, mejorando la sensibilidad y la estabilidad para la detección de metales.

8.4. Parámetros experimentales para voltamperometría de redisolución

8.4.1. Paso de deposición

8.4.1.1. Agitar suavemente la muestra utilizando el agitador magnético. Luego ajustar el potencial de deposición a -1.15V durante 120 segundos para reducir los iones metálicos en la superficie del electrodo.

8.4.2. Para la fase de equilibrio, detener la agitación y dejar reposar la solución durante 10 segundos. Posteriormente realizar el análisis de redisolución mediante la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) con los siguientes parámetros:

- E inicio: -1.1V
- E final: -0.1V
- E paso: 0.005V
- Amplitud: 0.025V
- Frecuencia: 25Hz

8.4.1. Medir las corrientes de redisolución para cada metal a medida que se oxiden en el electrodo.

8.5. Calibración y adiciones estándar

8.5.1. Preparación de soluciones estándar de metales (Pb, y Cu) a 5mg/L pro lo que se diluyen las soluciones madre con agua desionizada y luego se acidifican con HCl.

8.5.1.1 Adiciones estándar, se agregó un volumen conocido de solución estándar de metales (50 μ L) a la muestra. Para luego medir la muestra nuevamente y registrar la respuesta de corriente. Este procedimiento se realizó para tres adiciones con volúmenes crecientes.

8.6. Análisis de datos

8.6.1. Se trazó la respuesta de corriente en función de la concentración de metal agregado. Se emplotó la regresión lineal para calcular la concentración de metales en la muestra original.

8.6.2. Mediante el procesamiento con software se analizaron las curvas SWV registradas utilizando el PSTrace. Identificando y cuantificando los picos correspondientes a los diferentes metales (pico Pb \sim -0.55 V, pico de Cu en \sim -0.25 V).

8.6.2. Se normalizaron los datos asegurándose que las corrientes de pico estén dentro del rango lineal, así como ajustando el tiempo de deposición si es necesario para evitar la sobresaturación.

9. Esterilización de material

No aplica.

10. Cálculos

Los cálculos se realizan mediante el software PSTrace.

11. Control de calidad

11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios

11.2. Entre mediciones enjuagar el electrodo y la célula con HCl 20mM y agua desionizada.

11.3. Después de utilizar el equipo guardar el electrodo seco y repetir el acondicionamiento antes del próximo uso.

12. Conflict solution policy

12.1. Evite posibles interferencias como surfactantes y aceites en las muestras, ya que pueden afectar el rendimiento del electrodo.

12.2. Diluir las muestras si es necesario para minimizar los efectos de la matriz.

Anexos IV. Ejemplo análisis completo típico para metales pesados

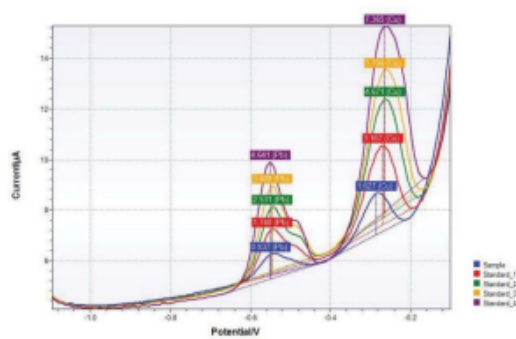


Figura 7. Escaneos analíticos finales para la curva de metales pesados

Rango de medición LOD típico para las concentraciones de metales.

| Metal | LOD (ppb) | ~Slope (nA/ppb) | Linear range (ppb) |
|-------|-----------|-----------------|--------------------|
| Cu | <1 | 30 | 1-1000 |
| Pb | <1 | 115 | 1-1000 |
| Cd | <1 | 60 | 1-1000 |

13.5. POE V

POE V: Extracción de ADN mediante el método de PCI, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

| | |
|--|----------------------------|
| Procedimiento Normado de Operación | POE V |
| | Páginas Totales: 3 |
| Extracción de ADN mediante el método de PCI, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico | Autores: Gabriela Castillo |

1. Propósito

Extracción de ADN genómico a partir de muestras ambientales de agua, utilizando el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI). Este protocolo permite obtener ADN de alta pureza y calidad, adecuado para aplicaciones posteriores como PCR, qPCR, clonación o secuenciación. (Sambrook, 2001)

2. Aplicación

Este procedimiento se aplica en laboratorios de microbiología molecular, biotecnología ambiental y análisis de calidad de agua, con el fin de recuperar ADN microbiano presente en matrices acuosas como agua potable, aguas residuales, aguas superficiales o subterráneas. Permite observar la diversidad microbiana, vigilancia de patógenos y análisis metagenómicos en ambientes acuáticos. (Griffiths et al., 2000)

3. Referencias

- 3.1. Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5488–5491. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000>
- 3.2. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

4. Terminología

- 4.1. Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI): Mezcla orgánica utilizada para desnaturalizar y remover proteínas, lípidos y otros contaminantes del ADN. El fenol desnaturaliza proteínas, el cloroformo mejora la separación de fases y el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la centrifugación. (Green & Sambrook, 2017)

5. Documentos asociados

- 5.1. Green, M. R., & Sambrook, J. (2017). *Phenol-chloroform extraction of DNA*. Cold Spring Harbor Protocols, 2017(4), pdb.prot093385. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093385>
- 5.2. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1999). *Current protocols in molecular biology*. Wiley.

6. Seguridad**6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**

- 6.1.1. Trabajar en campana de extracción para evitar la exposición directa a vapores nocivos de los solventes orgánicos tóxicos y volátiles como el fenol y el cloroformo.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Campana de flujo laminar
- 7.1.2. Campana de extracción

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Micropipetas
- 7.2.2. Puntas estériles
- 7.2.3. Tubos eppendorf 1.5mL estériles

7.3. Reactivos

- 7.3.1. PCI
- 7.3.2. Buffer TE
- 7.3.3. Etanol 70%
- 7.3.4. Isopropanol 99%
- 7.3.5. RNase
- 7.3.6. Proteinasa K

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Muestras de agua de la microcuenca Río Contreras y río Villalobos

8. Procedimiento

- 8.1. Tomar 1mL del cultivo de bacterias overnight y depositarlos en tubos eppendorf 1.5mL estéril, posteriormente centrifugarlo para obtener un pellet.
- 8.2. Descartar el sobrenadante y recolectar el pellet.
- 8.3. Añadir 500µL de Buffer TE, 10 µL RNase y 1 µL de proteinasa K al pellet
- 8.4. Mezclar suave por pipeteo
- 8.5. Incubar a 37°C por 30 minutos
- 8.6. En campana de extracción, añadir 500 µL PCI a la resuspensión y mezclar por vortex 15 segundos
- 8.7. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos
- 8.8. Recolectar la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf de 1.5mL estéril
- 8.9. Agregar un volumen igual a la fase acuosa de isopropanol al 99% frío y mezclar por inmersión 5 veces
- 8.10. Incubar a -20°C por 30 minutos
- 8.11. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos
- 8.12. Descartar el sobrenadante

- 8.13. Lavar con 500 μ L de etanol al 70%
- 8.14. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto
- 8.15. Descartar el etanol y dejar el pellet secar a temperatura ambiente por 30 minutos
- 8.15. Resuspender el pellet en buffer TE y almacenar a -4°C

9. Esterilización de material

Material necesario para llevar a cabo la extracción de ADN.

10. Cálculos

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios

12. Conflict solution policy

- 12.1. Evite posibles interferencias como surfactantes y aceites en las muestras, ya que pueden afectar el rendimiento del electrodo.
- 12.2. Diluir las muestras si es necesario para minimizar los efectos de la matriz.