



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*
 Y *Enterococcus faecalis* MULTIRESISTENTES PROCEDENTES DE AGUAS
 RESIDUALES DE LA PTAR, CSS Y ESTACIÓN DE BOMBEO DE PANAMÁ.

DAYANA I. ACEVEDO A.

Ec-21-14338

YETSENIA Y. FRUTO M.

3-746-1236

ASESORES DE TESIS:

Dr. ALEX O. MARTÍNEZ-TORRES

Mgtr. CARMEN I. ESPINO

Mgtr. FERMÍN MEJÍA

TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO A
CONSIDERACIÓN DE LA ESCUELA DE
BIOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS
NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA,
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

2025



TRIBUNAL EXAMINADOR

Aislamiento y caracterización de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* multirresistentes procedentes de aguas residuales de la PTAR, CSS y Estación de Bombeo de Panamá.

Por:

Dayana I. Acevedo A.
Ec-21-14338

Yetsenia Y. Fruto
3-746-1236

Trabajo de Graduación sometido a consideración de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

Prof. Dr. Alex O. Martínez-Torres

Profa. Mgtr. Carmen I. Espino

Prof. Mgtr. Fermín Mejía

DEDICATORIA

Para mi madre, que con cansancio en sus ojos nunca se rindió para que yo pudiera cumplir mis sueños. Eres parte de cada uno de mis logros y todos te los dedico a ti, con amor, para mi más grande amor.

~ Dayana Acevedo

A Dios por darme la bendición de despertar cada día y la fortaleza para cumplir este objetivo y a mi madre Xenia Martínez, mi motor para seguir a delante de quien nunca me faltó apoyo incondicional, te amo mamá.

~ Yetsenia Fruto

AGRADECIMIENTO

Ante todo, gracias a Dios por la vida misma, por cada amanecer. Gracias a mis cuatro pilares: Karla Acevedo, el ejemplo vivo de rendirse no es una opción; Jeniffer Acevedo, con amor todo es posible; Sr. Gato, mi amigo fiel en cada noche de desvelo. Pero mi mayor agradecimiento es para mi mejor amiga, la brillante mujer de quien recibí el nombre y la vida: Verónica Alvarez, mi ejemplo a seguir de fortaleza. Los amo.

Gracias a esas amistades que han estado conmigo en este largo camino de la vida (Sara, Naydu y Ana) y aquellas amistades que me regaló esta hermosa carrera, mi mejor amiga Erika Figueroa, hiciste que mis días en la U fueran más llevaderos, gracias por tu apoyo y las tardes de estudio.

Un especial agradecimiento al Ing. Sebastián Reyes, por las noches en vela, por las enseñanzas de física, por el apoyo incondicional, por construir peldaños para que pudiera subir y llegar a la cima, por su aporte en mi crecimiento personal y profesional.

~ **Dayana Acevedo**

Quiero agradecer primero a Dios y a mi familia en especial a mis padres Xenia y Eustacio por permitirme cumplir mis sueños sin cuestionarme aun sin entender este ámbito, y a mi abuela Eulalia, Ustedes fueron mi motor y me impulsaron a dar siempre lo mejor de mí.

A mi hermano Williams por motivarme a ser mejor para ser su ejemplo a futuro, a mi primo César por preocuparse por mí y buscarme en las noches oscuras, a Simba por acostarse a mi lado en cada trabajo y transmitirme su tranquilidad.

A la profesora Dabelis Acosta, por ser mi motivación para entrar en el mundo de la ciencia y ser mi ejemplo para seguir, al profesor Terry Vega quien me motivó por este camino y a mi tía Ida por siempre estar pendiente de mí y alegrarse con cada uno de mis logros.

A la hermana que me regaló la Universidad Nayelhi Mojica por hacer más llevadera la carrera y ayudarme en cada materia difícil que se presentó. A mis amigos Carolin, Kevin, Joznely, Anayansi, Raúl, Astrid, Ana Leah y Yihtsel por siempre creer en mí, y comprenderme cuando me encontraba ocupada y a Abdiel Tamayo por escucharme cuando me encontraba angustiada y motivarme a seguir adelante.

~ **Yetsenia Fruto**

Agradecemos a nuestro director de tesis y coordinador de los laboratorios de LAMEXA y LAMA el Dr. Alex O. Martínez Torres, por habernos brindado la invaluable oportunidad de realizar esta investigación y ser parte de esta prestigiosa comunidad científica. Además, de la dedicación brindada y enseñarnos a ir más allá para entender el porqué de las cosas, y también, de formarnos con esfuerzo para convertirnos en profesionales competitivos para el campo laboral.

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento al Mgtr. Fermín Mejía, Profesor de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología y al Dr. Jordi Querol-Audi (LAMEXA y LAMA/SNI Nacional I), por sus enseñanzas, por su invaluable asesoría científica. Su dedicación, tiempo y compromiso con esta investigación. Apreciamos profundamente su constante apoyo.

A la Mgtr. Carmen Indira Espino, por ser un pilar fundamental aportando su experiencia y consejo, para salir adelante en los momentos difíciles. Además, de ser nuestro enlace con el Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, permitiendo el uso de equipos y poniendo a disposición a los señores José, Jaime y Eusebio, quienes fueron de gran ayuda en la preparación de medios y reactivos cuando más lo necesitábamos, brindándonos su apoyo incondicional.

Gracias al Mgtr. José Moreno, jefe de la Sección de Bacteriología del ICGES y responsable en el país de indicar la resistencia bacteriana a la OPS, por habernos brindado su valiosa ayuda con la resistencia de nuestras bacterias y en la interpretación de nuestros resultados, dedicando parte de su valioso tiempo para apoyarnos.

Un especial agradecimiento al Profesor Sean Romaña y a la Mgtr. Indira Ramírez, profesores del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, e Investigadores de LAMEXA-LAMA, por dedicarnos generosamente su tiempo y enseñarnos con tanta paciencia y claridad, ayudándonos a comprender mejor los procesos de biología molecular. Su apoyo y guía fueron fundamentales para la culminación exitosa de esta tesis, apreciamos profundamente su contribución y compromiso.

Además, agradecemos a la Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado-VIP, de la Universidad de Panamá, por haber financiado parte de los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación, permitiéndonos realizar compras claves para su desarrollo.

Agradecemos al programa de Saneamiento de Panamá y al equipo de mantenimiento de la CSS Dr. Arnulfo Arias Madrid, ya que, sin su valioso apoyo y cooperación, esta investigación no habría sido posible. Un agradecimiento especial a la Ing. Carmen M. Herrera C. y al Ing. Arnaldo F. Bramwell R., por habernos brindado su tiempo, apoyo y amabilidad.

En especial, agradecemos a la Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (SENACYT), por habernos brindado los fondos necesarios a través de la Convocatoria Pública de Nuevos Investigadores e Innovadores 2024, Ronda II (APY-NI-2024B-58), del programa de apoyo a las actividades de Ciencia y Tecnología, para ejecutar y finalizar este trabajo.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO	IV
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES	6
JUSTIFICACIÓN	10
MARCO TEÓRICO	12
I. AGUAS RESIDUALES.....	12
A. Definición	12
B. Clasificación de las aguas residuales.	12
C. Aguas residuales de origen hospitalario.	13
II. RESISTENCIA BACTERIANA.....	13
A. Resistencia antimicrobiana (RAM).....	13
B. Clasificación de los Antibióticos y los genes de resistencia.....	15
C. Microorganismos multirresistentes o multidrogorresistentes (MDR)	19
D. Mecanismos de resistencia.....	20
E. Impacto en la salud pública	22
III. BACTERIAS	24
A. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1. Generalidades.....	24
2. Mecanismo de transmisión y patogenicidad.....	24
3. Factores de virulencia.....	25
4. Resistencia antimicrobiana (RAM)	28
4.1. Resistencia a la meticilina.....	29

4.2.	Resistencia a la Vancomicina	29
5.	Identificación.....	30
5.1.	CHROMagar™ Staph aureus	30
5.2.	Agar Manitol Salado.....	30
5.3.	Agar Baird Parker	31
6.	<i>S. aureus</i> en aguas residuales	31
B.	<i>Enterococcus</i> spp.....	32
1.	Generalidades	32
2.	Mecanismo de transmisión y patogenicidad	32
2.1.	Factor de virulencia	32
3.	Resistencia antimicrobiana (RAM)	33
Resistencia intrínseca.....		34
Resistencia adquirida		34
4.	Identificación.....	34
4.1.	Agar Bilis Esculina	34
5.	Pruebas bioquímicas.....	34
5.1.	Caldo Rojo fenol con Arabinosa.....	34
5.2.	Caldo Nutritivo con NaCl al 6,5%.....	35
5.3.	Agar Nutritivo con Telurito al 0.04%.....	35
6.	<i>Enterococcus</i> spp. en aguas residuales	35
OBJETIVOS.....		37
I.	OBJETIVO GENERAL.....	37
II.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
HIPÓTESIS		37
METODOLOGÍA		39
I.	ÁREA DE ESTUDIO	39
II.	COLECTA DE MUESTRA.....	39
III.	ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	39
A.	Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas	39
1.	Aislamiento de <i>S. aureus</i>	40
2.	Aislamiento de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> en agar Bilis Esculina	41
3.	Identificación.....	41
B.	Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas.	42

1.	Preparación de la suspensión.....	43
2.	Conservación en glicerol	44
C.	Extracción del ADN.....	44
D.	Identificación mediante la detección molecular de los genes <i>nucA</i> (<i>S. aureus</i>), <i>ddlE</i> (<i>E. faecium</i>) y <i>N. 14</i> (<i>E. faecalis</i>) por el método de PCR.....	45
1.	Detección del gen <i>nucA</i> en aislamiento de <i>S. aureus</i>	45
2.	Detección del gen <i>ddlE</i> en aislamiento de <i>E. faecium</i>	45
3.	Detección del gen <i>N. 14</i> en aislamiento de <i>E. faecalis</i>	46
E.	Detección molecular del gen <i>mecA</i> por el método de PCR	46
1.	Detección del gen <i>mecA</i> en aislamientos de <i>S. aureus</i>	46
F.	Visualización de los resultados de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa	46
RESULTADOS.....		49
I.	IDENTIFICACIÓN CLÁSICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR.....	49
	Identificación Clásica.....	49
A.	Cepas aisladas en la PTAR de Juan Díaz.....	49
1.	Identificación Bioquímica (Vitek 2).....	49
1.	Identificación Molecular (PCR)	51
B.	Cepas aisladas en la CSS	53
1.	Identificación Bioquímica (Vitek 2).....	53
2.	Identificación Molecular (PCR)	53
C.	Cepas aisladas en la EB3	54
1.	Identificación Bioquímica (Vitek 2).....	54
2.	Identificación Molecular (PCR)	54
A.	Cepas de <i>S. aureus</i>	55
1.	Cepas de <i>S. aureus</i> aisladas en la PTAR de Juan Díaz.....	55
2.	Cepas de <i>S. aureus</i> aisladas en CSS	55
3.	Cepas de <i>S. aureus</i> aisladas en EB3	55
III.	TABLA 6. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE CEPAS DE <i>S. AUREUS</i>	56
B.	Cepas de <i>Enterococcus</i> spp.....	57
1.	Cepas de <i>Enterococcus</i> spp. de la PTAR	57
2.	Cepas de <i>Enterococcus</i> spp. de la CSS.....	57
3.	Cepas de <i>Enterococcus</i> spp. de la EB3.....	57
DISCUSIÓN.....		63

CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS	87

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. (A). Niveles de Resistencia Antimicrobiana en aguas residuales. (B). Estimaciones de las muertes causadas por la RAM para el año 2050. Modificado de Albarracin (2019) y Hendriksen et al. (2019).	9
Figura 2. Línea de tiempo que ilustra el descubrimiento de los antibióticos y la evolución de las resistencias que surgen como resultado (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).	10
Figura 3. Origen de la resistencia bacteriana en aguas residuales y su diseminación en el ambiente (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).	14
Figura 4. Los factores de virulencia secretados de <i>S. aureus</i> . (A) la proteína de superficie y secretada. La mayoría de estas proteínas se pueden crear durante la fase de crecimiento. (B) y (C) muestran una sección transversal en la envoltura (Gordon y Lowy, 2008; Cervantes et al., 2014).	26
Figura 5. Resistencia de <i>S. aureus</i> a la oxacilina (SARM) (One Health Trust, 2025).	29
Figura 6. CHROMagar Staph aureus para el aislamiento y diferenciación directa de <i>S. aureus</i> (The Chromogenic Media Pioneer, 2021).	30
Figura 7. Agar Manitol Salado para la detección y aislamiento de <i>S. aureus</i> (Fisherscientific, 2020).	30
Figura 8. Agar Baird Parker para la detección y aislamiento de <i>S. aureus</i> (MDM, 2020).	31
Figura 9. Aislamiento en Agar Bilis Esculina (Microbiosh, 2021).	34
Figura 10. Los tres sitios de muestreo georeferenciados (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).	39
Figura 11. Metodología para el aislamiento de <i>S. aureus</i> proveniente de agua residual (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).	40
Figura 12. Metodología para el aislamiento de <i>Enterococcus spp.</i> proveniente de agua residual (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).	42
Figura 13. Protocolo establecido en MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK ® 2 SYSTEM (bioMérieux, Francia) (Pincus, 2011) (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).	44

Figura 14. Procedimiento del método molecular para la Identificación de las cepas mediante la detección de los genes <i>nucA</i> , <i>ddlE</i> y <i>N.14</i> , y la detección del gen <i>mecA</i> en cepas de <i>S. aureus</i> . (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).	47
Figura 15. Producto de PCR para la detección del gen <i>nucA</i> (270 pb) en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de la PTAR-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2: Control positivo (cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538). Carril 3: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 4-11: Producto amplificado de las cepas de <i>S. aureus</i>	52
Figura 16. Producto de PCR para la detección del gen <i>ddlE</i> (658 pb) en cepas de <i>E. faecium</i> aisladas de la PTAR, CSS y EB3-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 3-4: Producto amplificado de las cepas de <i>E. faecium</i> aisladas en la PTAR. Carril 5-6: Producto amplificado de las cepas de <i>E. faecium</i> aisladas de la CSS. Carril 7-9: Producto amplificado de las cepas de <i>E. faecium</i> aisladas de la EB3.	52
Figura 17. Producto de PCR para la detección del gen <i>N.14</i> (533 pb) en cepas de <i>E. faecalis</i> aisladas de la PTAR, CSS y EB3-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2: Control positivo (cepa de <i>E. faecalis</i> ATCC 29212). Carril 3: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 4-7: Producto amplificado de las cepas de <i>E. faecalis</i> aisladas en la PTAR. Carril 8-12: Producto amplificado de las cepas de <i>E. faecalis</i> aisladas de la CSS. Carril 13-17: Producto amplificado de las cepas de <i>E. faecalis</i> aisladas de la EB3.....	53
Figura 18. Producto de PCR para la detección del gen <i>nucA</i> (270 pb) en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de la CSS-Panamá. Carril 1: Control positivo (cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538). Carril 2: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 3-16: Producto amplificado de las cepas de <i>S. aureus</i> . Carril 17: Marcador de peso molecular (100 pb).	54
Figura 19. Producto de PCR para la detección del gen <i>nucA</i> (270 pb) en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de la EB3-Panamá. Carril 1: Control positivo (cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538). Carril 2: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 3-15: Producto amplificado de las cepas de <i>S. aureus</i> . Carril 17: Marcador de peso molecular (100 pb).	55
Figura 20. Resistencia a antibióticos en las 45 cepas de <i>Enterococcus</i> spp. Por medio del Vitek 2 (bioMérieux, Francia). Antibióticos: Bencilpenicilina (DCI), Ampicilina (AMP), Gentamicina (GEN), Estreptomicina (S), Ciprofloxacino (CIP), Levofloxacino (LEV), Eritromicina €, Linezolid (LNZ), Daptomicina (DAP), Vancomicina (VAN), Tetraciclina (TE), Nitrofurantoina (NIT).	59
Figura 21. Resistencia a antibióticos en las 50 cepas de <i>S. aureus</i> por medio del Vitek 2 (bioMérieux, Francia). Antibióticos: Bencilpenicilina (DCI), Oxacilina (OXA), Ceftarolina (CPT), Ciprofloxacino (CIP), Levofloxacino (LEV), Clindamicina (DA), Eritromicina €, Linezolid (LNZ), Daptomicina (DAP),	

Vancomicina (VAN), Tetraciclina (TE), Nitrofurantoina (NIT), Rifampicina (RD), Sulfametoxazol (SMX).	60
Figura 22. Producto de PCR para la detección del gen <i>mecA</i> (310 pb) en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de la PTAR, CSS y EB3-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100pb). Carril 2: Control positivo (cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 43300). Carril 3: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 4-19: Producto amplificado de las cepas de <i>S. aureus</i> . Carril 20: Marcador de peso molecular (100 pb).	61
Figura 23. Producto de PCR para la detección del gen <i>mecA</i> (310 pb) en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de la EB3-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2: Control positivo (cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 43300). Carril 3: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 4-10: producto amplificado de las cepas de <i>S. aureus</i>	61
Figura 24. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos (PCR y Vitek 2) (bioMérieux, Francia) utilizados para la detección del gen <i>mecA</i> en muestras de <i>S. aureus</i> , donde se obtuvo por PCR 20% (10/50) muestras positivas al gen <i>mecA</i> , mientras que por el sistema Vitek 2 se obtuvo el 32% (16/50) cepas positivas.	62
Figura 25. Muestreo en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Juan Díaz.....	88
Figura 26. Muestreo en el Complejo Hospitalario Caja del Seguro Social Dr. Arnulfo Arias Madrid.	88
Figura 27. Muestreo en la Estación de Bombeo de la Cinta Costera 3.	88
Figura 28. Aislamiento de <i>S. aureus</i> en medios de cultivos selectivos y preservación de cepas en viales de agar nutritivo y glicérados.	89
Figura 29. Aislamiento de <i>Enterococcus</i> spp. en agar sangre e identificación en Vitek 2.	89
Figura 30. A. Colonia en Caldo nutritivo. B. Colonia preservada en vial de agar nutritivo aforado con aceite mineral estéril. C. Cepas glicéradas.....	90
Figura 31. Identificación y Perfil de susceptibilidad con Vitek. A. Preparación de la suspensión. B. Registro de las muestras en el software de Vitek 2. C. Resultados de Vitek 2. D. Materiales.	90
Figura 32. A. Transferencia de 100 µL de sobrenadante a tubos Eppendorf. B. Cuantificación del ADN con ayuda del NanoDrop Lite Plus. C. Pureza del ADN.	91
Figura 33. A. Preparación de la mezcla de reacción para PCR. B. Termociclador con las condiciones utilizadas para identificación, C – D. Preparación de la electroforesis.....	91
Figura 34. A. Corrida de la electroforesis a 80V por 40 min. B. Fotodocumentador con tansiluminador de luz UV. C. Visualización de los resultados de PCR.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las aguas residuales y su procedencia (García et al., 2019).....	12
Tabla 2. Lista de antibióticos y mecanismo de acción (Rodrigo, 2005; Leopardo, 2020).	15
Tabla 3. Informes de casos de infecciones adquiridas en la comunidad causadas por los patógenos del grupo ESKAPE (Denissen et al., 2022).	23
Tabla 4. Tipos de toxinas y sus efectos (Gordon y Lowy, 2008).	27
Tabla 5. Resultados de Identificación Bioquímica y Molecular de las cepas aisladas en la PTAR, CSS y EB3.....	50
Tabla 6. Perfil de susceptibilidad de cepas de <i>S. aureus</i>	56
Tabla 7. Perfil de susceptibilidad de cepas de <i>Enterococcus</i> spp.....	58
Tabla 8. Aislamiento de <i>S. aureus</i> en medios diferenciales.	87
Tabla 9. Aislamiento de <i>Enterococcus</i> spp. con sus Pruebas Bioquímicas.....	87

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

1	IDAAN	Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacionales
2	MLSB	Macrolide-lincosamide-streptogramin B
3	PTAR	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
4	ITS	Infecciones en el torrente circulatorio
5	EVR	<i>Enterococcus</i> resistente a la vancomicina
6	MDR	Resistencia a múltiples medicamentos
7	OMS	Organización Mundial de la Salud
8	SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
9	BRA	Bacterias resistentes a los antibióticos
10	ARGs	Genes de resistencia a los antibióticos
11	iARGs	Genes de resistencia a los antibióticos intracelular
12	eARGs	Genes de resistencia a los antibióticos extracelular
13	HGT	Transferencia horizontal de genes
14	IH	Infecciones hospitalarias
15	RAM	Resistencia antimicrobiana
16	ADN	Ácido desoxirribonucleico
17	LPS	Lipopolisacárido
18	ESKAPE	<i>Enterococcus</i> spp, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i> spp, <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> spp.
19	MSCRAMMs	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
20	IgG	Inmunoglobulina
21	PVL	Leucocidina Panton-Valentine
22	HlgA	Gamma-hemolysin component A
23	TSST-1	Toxina de síndrome de shock tóxico 1
24	PBP_s	Proteínas fijadoras de penicilinas
25	SCC_{mec}	Cromosoma en casete estafilocócico mec
26	ITU	Infección del tracto urinario
27	UFC	Unidades formadoras de colonia
28	FIB	Bacterias indicadoras de contaminación fecal
29	HST	Hospital Santo Tomás
30	CSS	Caja del Seguro Social
31	ReLAVRA+	Red Latinoamericana y del Caribe para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos
32	ALN	Agua Libre de Nucleasas
33	IAAS	Infecciones asociadas a la atención en salud

RESUMEN
ABSTRACT

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza creciente para la salud pública mundial. Las aguas residuales se vierten en ambientes acuáticos sin el tratamiento adecuado, convirtiéndose en puntos para la diseminación de bacterias resistentes. La OMS elaboró una lista de bacterias resistentes prioritarias entre ellas destaca *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina (SARM) y *Enterococcus* causante de infecciones relacionadas con la atención sanitaria. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* y determinar la resistencia antimicrobiana en cepas de provenientes de efluentes hospitalarios y la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de la ciudad de Panamá. El aislamiento se realizó a partir de muestras de aguas residuales (PTAR, CSS y EB3). Para la identificación se emplearon medios selectivos y diferenciales, y se confirmó con el sistema automatizado Vitek 2. Adicionalmente, se realizó el antibiograma, se llevó a cabo una identificación molecular mediante PCR para detectar los genes *nucA* (*S. aureus*), *ddlE* (*E. faecium*) y *N. 14* (*E. faecalis*), y se amplificó el gen *mecA* para detectar la presencia de resistencia a Meticilina (SARM). Se confirmaron por PCR un total de 50 cepas de *S. aureus* (20 PTAR, 15 EB3, 15 CSS) y 45 cepas de *Enterococcus* spp. (15 por cada sitio). En el análisis de susceptibilidad de *S. aureus* se detectó resistencia a: Cefoxitina (PTAR 35%, CSS 13%, EB3 47%) Bencilpenicilina (PTAR 70%, CSS 13%, EB3 80%) Oxacilina (PTAR 35%, CSS 13%, EB3 47%) Clindamicina (PTAR 25%) Tetraciclina (PTAR 20%, CSS 7%, EB3 47%). Además, el 56% de las cepas fueron positivas al gen *mecA*. Para *Enterococcus* spp. destacan las resistencias a estreptomicina (PTAR 7% CSS 13%), Tetraciclina (PTAR 20%, CSS 20%, EB3 26%), Gentamicina (EB3 6%), Ciprofloxacina (EB3 6%), nitrofurantoina (EB3 6%). Los resultados por PCR confirmaron de manera consistente las identificaciones realizadas con el sistema automatizado Vitek 2. Se observó una alta resistencia a β -lactámicos en las cepas de *S. aureus*, asociado a la presencia del gen *mecA*. En *Enterococcus* spp. predominó *E. faecalis* y no se detectó resistencia a vancomicina, a diferencia de otros países. Solo las cepas de *S. aureus* provenientes de la PTAR, mostraron multirresistencia. Estos hallazgos evidencian la presencia de *S. aureus* y *Enterococcus* spp. en aguas residuales de Panamá. Evidenciado la presencia de cepas resistentes a antibióticos de gran importancia para la salud pública del país.

Palabras clave: *Staphylococcus*, *Enterococcus* spp., susceptibilidad, resistencia, genes.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is an increasing threat to global public health. Wastewater is discharged into aquatic environments without proper treatment, becoming hotspots for the dissemination of resistant bacteria. The WHO has developed a list of priority resistant bacteria, among which methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterococcus*, a cause of healthcare-associated infections, are highlighted. The objective of this study was to detect the presence of *S. aureus*, *E. faecalis*, and *E. faecium* and to determine antimicrobial resistance in strains obtained from hospital effluents and the Wastewater Treatment Plant (WWTP) in Panama City. Isolation was carried out from wastewater samples (WWTP, CSS, and EB3). Selective and differential media were used for identification, which was confirmed with the automated Vitek 2 system. Additionally, antibiotic susceptibility testing was performed, and molecular identification was carried out using PCR to detect the genes *nucA* (*S. aureus*), *ddlE* (*E. faecium*), and *N.14* (*E. faecalis*). The *mecA* gene was also amplified to detect methicillin resistance (MRSA). PCR confirmed 50 *S. aureus* strains (20 from WWTP, 15 from EB3, 15 from CSS), along with 45 strains of *Enterococcus* spp. (15 from each site). In the susceptibility analysis of *S. aureus*, resistance was detected to: Cefoxitin (WWTP 35%, CSS 13%, EB3 47%) Benzylpenicillin (WWTP 70%, CSS 13%, EB3 80%) Oxacillin (WWTP 35%, CSS 13%, EB3 47%) Clindamycin (WWTP 25%) Tetracycline (WWTP 20%, CSS 7%, EB3 47%) Furthermore, 56% of the strains were positive for the *mecA* gene. For *Enterococcus* spp., notable resistances included: Streptomycin (WWTP 7%, CSS 13%) Tetracycline (WWTP 20%, CSS 20%, EB3 26%) Gentamicin (EB3 6%) Ciprofloxacin (EB3 6%) Nitrofurantoin (EB3 6%). PCR results consistently confirmed the identifications made with the Vitek 2 system. A high level of β -lactam resistance was observed in *S. aureus* strains, associated with the presence of the *mecA* gene. In *Enterococcus* spp., *E. faecalis* was predominant, and no vancomycin-resistant was detected, in contrast to findings from other countries. Only *S. aureus* strains from the WWTP showed multidrug resistance. These findings demonstrate the presence of *S. aureus* and *Enterococcus* spp. in wastewater in Panama, highlighting the presence of strains resistant to antibiotics of significant public health importance.

Keywords: *Staphylococcus*, *Enterococcus* spp., susceptibility, resistance, genes.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN Y
MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial, requiriendo medidas por parte de todos los sectores gubernamentales y sociales (OPS, 2020). La RAM se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) experimentan cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, por ejemplo), lo que genera microorganismos multirresistentes (OMS, 2022). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas, aumentando el costo de la atención médica prolongando las estadías en los hospitales (OPS, 2020).

En muchos casos, el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en personas, animales y plantas, a menudo sin supervisión profesional, contribuye al desarrollo de la RAM (OMS, 2022). La preocupación se extiende también al ambiente, debido que, en los países de ingresos medianos bajos, las aguas residuales clínicas y domésticas se vierten en ambientes acuáticos sin el tratamiento adecuado, y pueden contener genes de resistencia (Blasco et al., 2018)

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) se convierten en puntos críticos de interacción entre bacterias ambientales, bacterias fecales y bacterias clínicamente patógenas. Considerándose estos lugares como focos de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) y residuos de antimicrobianos, y por lo tanto, pueden desempeñar un papel importante en la diseminación ambiental (Raza et al., 2022).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una lista de prioridades globales de importantes BRA para orientar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos (Savin et al., 2020). Ejemplos notables incluyen *S. aureus*, causante común de infecciones graves tanto en centro de salud como en la comunidad, con pacientes infectados por *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) enfrentando un 64% más de riesgo de mortalidad en comparación con aquellos infectados por cepas no resistentes (OPS, 2020). Por otro parte, los *Enterococcus* se destacan como una causa importante de infecciones relacionadas con la atención sanitaria, con linajes hospitalarios que muestran una creciente resistencia a la vancomicina (Oliveira et al., 2020).

En respuesta a esta crisis, se ha establecido una vigilancia sistemática de la RAM en Latinoamérica a través de la Red Latinoamericana y del Caribe para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA+), inicialmente centrada en patógenos adquiridos en la comunidad y extendida a patógenos nosocomiales (OPS, 2020).

ANTECEDENTES

Las bacterias pueden presentar resistencia intrínseca a ciertos antimicrobianos debido a características genéticas inherentes a su especie, las cuales están relacionadas con genes cromosómicos. Además, pueden adquirir resistencia mediante mutaciones cromosómicas o transferencia horizontal de genes, procesos que ocurren en ambientes diversos como agua, suelo, alimentos y sistema digestivo de los animales y seres humanos (Silva et al., 2017).

La presencia de estas resistencias complica el tratamiento de las infecciones, forzando el uso de antimicrobianos de amplio espectro. Sin embargo, la velocidad de desarrollo y aprobación de nuevos tratamientos es insuficiente frente a la rápida aparición de resistencias bacterianas, lo que contribuye a un aumento en los costos médicos y en la mortalidad. Las infecciones bacterianas actualmente causan alrededor de 700 mil muertes anuales a nivel mundial, y se estima que esta cifra podría alcanzar los 10 millones de muertos para el año 2050, superando incluso las muertes causadas por el cáncer. Por lo tanto, resulta esencial evaluar el riesgo de estas bacterias en entornos como las aguas residuales para comprender mejor su impacto y desarrollar nuevas estrategias (Armenta, 2017).

La descarga de aguas residuales de origen industrial, doméstico, hospitalario, agrícola y pecuario sin previo tratamiento, provocan la contaminación de los cuerpos de agua receptores, lo cual disminuye la calidad de las aguas superficiales y subterráneas, comprometiendo así la salud pública y la integridad de los ecosistemas (SEMARNAT, 2014).

Según Quirós (2019), del Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacionales (IDAAN), el área metropolitana de la ciudad de Panamá produce un caudal de aguas residuales que excede los 120 millones de galones por día. Este caudal contiene un alto contenido bacteriológico, que es vertido al sistema de recolección del alcantarillado sanitario, al sistema de drenaje pluvial o a los cursos de agua que cruzan la ciudad con un bajo o ningún nivel de tratamiento.

Ante esta problemática, Hall y Ramírez (2020), llevaron a cabo un estudio en el que aislaron y caracterizaron bacteriófagos competentes contra cepas ATCC de *E. coli*, y *Salmonella* spp. a partir de muestras procedentes de la PTAR de la Ciudad de Panamá. Los 5 fagos evaluados eran sensibles al cloroformo y tenían reducción significativa de su actividad tras la exposición a la luz UV. También, se identificaron cepas ambientales de *Salmonella* spp. y *E. coli* de la misma muestra de agua residual, casi todas resistentes y multirresistentes a diversos antibióticos.

Siguiendo esta línea de investigación, Rodríguez y Michelangelli (2023), aislaron y caracterizaron filogrupos y patotipos de *E. coli* de muestras de aguas residual proveniente del Río Matasnillo, de la Ciudad Panamá y compararon sus hallazgos con las cepas de *E. coli* aisladas por Hall y Ramírez (2020), de la PTAR. Encontraron que el 11% de las cepas del río Matasnillo eran resistentes a antibióticos, mientras que el 100% de las cepas de la PTAR mostraron resistencia a múltiples antibióticos. El 100% de las cepas del río Matasnillo pertenecían al filogrupo A, que son comensales, en contraste de las cepas de la PTAR que presentaron una distribución diversa. Además, encontraron que, en la PTAR, el 12% corresponden a *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), el 18% a *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) y el 70% a otros patotipos.

Ramírez et al. (2023), analizaron 150 aislados de *E. coli* de muestras ambientales, animales y humanas, y encontraron que 116 mostraron resistencia a al menos uno de los nueve antibióticos evaluados, y casi el 100% demostraron resistencia a la tetraciclina. Detectaron genes *tetA* y *tetB* en el 42,86% de los aislados, siendo el *tetA* el más prevalente.

La creciente preocupación por la resistencia bacteria se extiende también a otros patógenos como es el caso de la subespecie *S. aureus*, reconocida como un patógeno que persiste en el ambiente, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en el aire, agua, y superficies de la industria alimentaria (García et al., 2019). Su capacidad para resistir condiciones adversas y su presencia en diversas fuentes hacen de este patógeno un importante foco de atención en la investigación sobre la resistencia. Asimismo, en el caso de *Enterococcus* spp., diversos estudios han sugerido que el ambiente, incluidos los animales y el agua, pueden actuar como fuente significativa de cepas resistentes a los antibióticos, ya que las poblaciones humanas, las poblaciones animales y el ambiente están todos interconectados (Diane et al., 2017).

Un estudio realizado por Ramessar y Olaniran (2019), investigó la presencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (SAMR) en efluentes de aguas residuales y superficiales en Durban, Sudáfrica. Los investigadores identificaron 80 aislamientos de SAMR con alta resistencia a la ampicilina (96%), cefoxitina y penicilina (97%), oxacilina (98,7%) y lincomicina (100%). Además de resistencia a cefazolina (72,5%), azitromicina (66%), eritromicina (40%) y vancomicina (33,7%).

En otra investigación, Oliveira et al. (2020), demostraron que este patógeno presentaba una prevalencia baja en este tipo de ambiente en comparación con entornos clínicos. No obstante, cabe destacar que las PTAR's pueden ser un importante reservorio y fuente de esta bacteria, que es resistente a macrolide-lincosamida-streptogramin B (MLSB). Por ende, es pertinente considerar, la posibilidad de intercambio bacteriano entre el entorno clínico y el ambiental. El estudio evidenció que la presencia de cepas de *S. aureus* resistentes en las PTAR es relevante, ya que pueden contribuir a la propagación de estos microorganismos patógenos portadores de genes de resistencia (por ejemplo, los genes *erm*, *blaampc*, *norA*, *acrABC*, *tetK*, *mecA* y *blaZ*).

Por el contrario, *Enterococcus* spp. se encuentran entre las principales causas de infecciones nosocomiales en todo el mundo, y la prevalencia de la resistencia a la vancomicina, ha aumentado en las últimas décadas, la cual está asociada a la adquisición de genes como *vanA*, *vanB* y *vanC* (Jaramillo, 2022), presumiblemente debido a la alta presión antimicrobiana en los hospitales. Se ha encontrado que las concentraciones de enterococos en las aguas residuales urbanas y hospitalarias son similares (Hocquet et al., 2016).

Monteiro y Santos (2020), estudiaron aguas residuales en Portugal, para determinar si había organismos resistentes a los antibióticos en las PTAR's. Hallaron que el 53% de los 98 aislamientos eran *E. faecium*, con alta resistencia a linezolid (41%), tetraciclina (40%) y ciprofloxacino (34%), y baja resistencia a gentamicina (1%). Además, se detectaron *Enterococcus* vancomicina resistente (EVR), con genes *vanA* y *vanB*. A pesar de la eficacia de las PTAR's, el 72% de las muestras tratadas contenían *Enterococcus* resistentes y el 6% era EVR.

Estudios anteriores han detectado ERV en diferentes etapas del proceso de tratamiento de aguas residuales, incluido el efluente tratado, lo que sugiere que el ERV presente en el efluente de

aguas residuales podría ser parcialmente responsable de la diseminación de ERV en el ambiente y las comunidades humanas (Rosenberg et al., 2014).

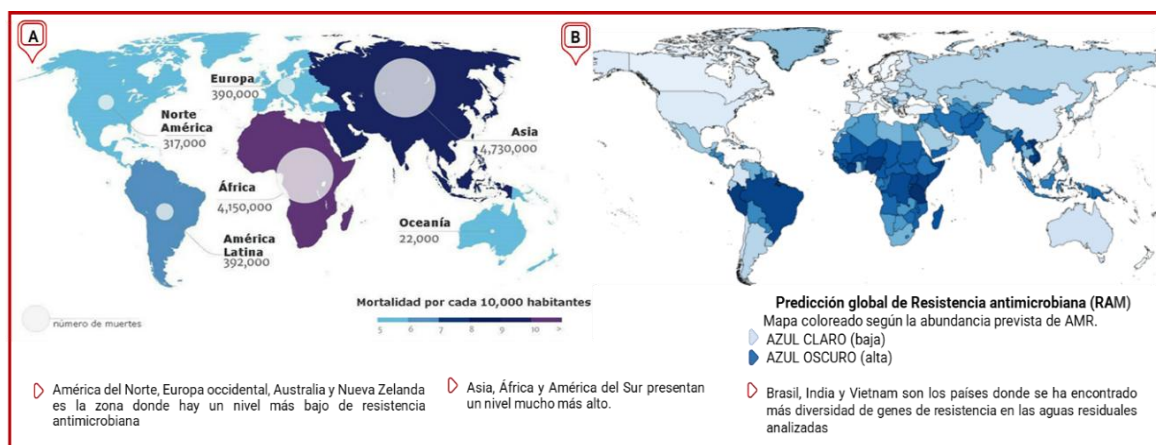


Figura 1. (A). Niveles de Resistencia Antimicrobiana en aguas residuales. (B). Estimaciones de las muertes causadas por la RAM para el año 2050. Modificado de Albarracín (2019) y Hendriksen et al. (2019).

Actualmente, el tratamiento de infecciones bacterianas es un desafío para la comunidad médica debido a la resistencia adquirida por los microorganismos, producto del uso excesivo e indebido de estos fármacos. Como respuesta a esta problemática, se han desarrollado nuevas estrategias para el tratamiento de infecciones provocadas por organismos resistentes a múltiples medicamentos (MDR). En los últimos 30 años, apenas han aparecido nuevas clases de antibióticos, debido a factores económicos, científicos y reguladores. El proceso de desarrollo de un nuevo antibiótico puede tardar alrededor de 14 años y costar entre 802 y 1700 millones de dólares, lo que limita la participación a grandes multinacionales farmacéuticas (Blasco et al., 2018).

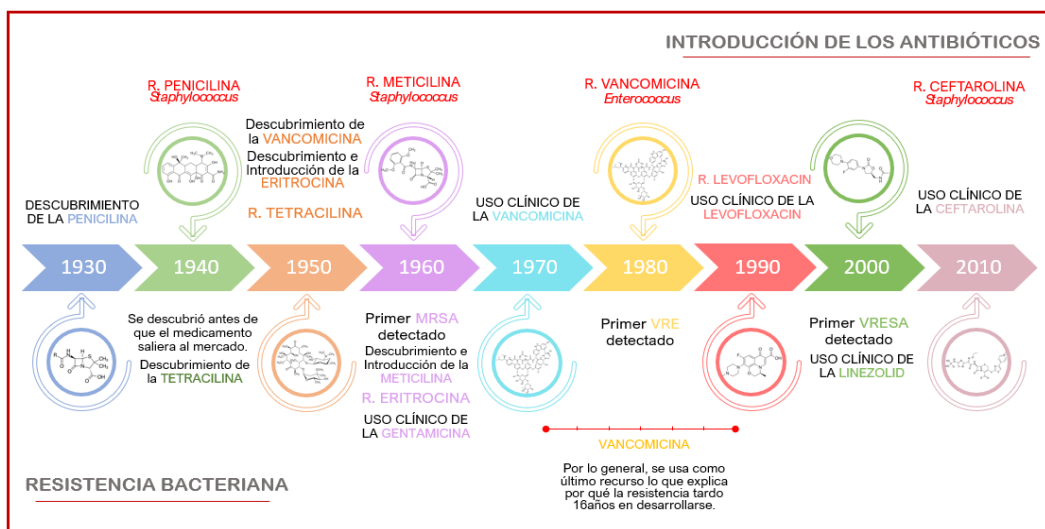


Figura 2. Línea de tiempo que ilustra el descubrimiento de los antibióticos y la evolución de las resistencias que surgen como resultado (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).

JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas sanitarios relativos a la contaminación ambiental, es el vertido de las aguas residuales con poco o ningún tipo de tratamiento previo. Por lo tanto, es importante evaluar los riesgos que representan las bacterias en las aguas residuales de los centros de salud para los ecosistemas (Ramos, 2013).

El agua residual que proviene de los hospitales contiene bacterias altamente resistentes y virulentas que pueden propagarse al ambiente (Akya et al., 2020) y el uso incontrolado de medicamentos puede tener muchas consecuencias negativas, como la emergencia y transmisión de genes de resistencia (Ramos, 2013).

En Panamá, la evolución de la resistencia bacteriana a nivel hospitalario ha destacado la presencia de *S. aureus* y *Enterococcus* spp., como patógenos relevantes. *S. aureus* representa el 16% de las infecciones reportadas, mientras que *Enterococcus* spp. contribuyen con el 14.4% (Victoria, 2021). La resistencia a antibióticos es un desafío creciente en el país, siendo *S. aureus* uno de los principales agentes de preocupación. Según Silvio Vega, presidente de la Asociación Panamericana de Infectología, esta bacteria afecta a unos 20 a 25 pacientes al mes, aunque menos del 1% desarrolla enfermedades graves. Además, señaló que esta bacteria causa

infecciones en la piel y que algunas cepas ya no pueden ser tratadas con meticilina, una penicilina de acción reducida.

En la actualidad, los antibióticos se utilizan en numerosas actividades humanas, como resultado, estos son descargados involuntariamente en el ambiente. Esta práctica de larga duración ha llevado a la evolución de las BRA y genes de resistencia a los antibióticos (GRA) (Li et al, 2022). Alrededor del 10 al 90% de los antibióticos utilizados se excretan en la orina y/o las heces de los pacientes en forma inalterada o como metabolitos. Las concentraciones de antibióticos son mucho mayores en las aguas residuales hospitalarias que en los efluentes domésticos, debido a su uso generalizado en los hospitales (Akya et al., 2020).

Los GRA se consideran contaminantes emergentes debido a su naturaleza ubicua y persistente (Guo y Kong, 2019), lo que permite su difusión más amplia a través de diversos microbios ambientales y patógenos humanos a través de la transferencia horizontal de genes (HGT) (Li et al., 2022). La mayoría de las PTAR's pueden manejar miles de m³ de aguas residuales al día, lo que significa, que estas plantas tratan regularmente grandes cantidades de contaminantes (Osińska et al., 2020). Sin embargo, incluso después de la desinfección de las PTAR que contienen altas concentraciones de BRA y GRA, los efluentes finalmente se descargan en ambientes acuáticos (Li et al., 2022).

La OMS ha desarrollado una lista global de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos para facilitar la investigación y el desarrollo de antibióticos nuevos y eficaces (OMS, 2017). La lista se creó mediante muchas pruebas y se dividió en tres niveles de prioridad: media, alta y crítica. Dentro del grupo de patógenos “Prioridad 2: Alta” contiene los patógenos Gram positivos del grupo ESKAPE; *E. faecium* y *E. faecalis* (resistente a vancomicina) y *S. aureus* (resistente a meticilina) (OMS, 2017). Estos patógenos contribuyen significativamente a la carga de morbilidad en los países desarrollados y en desarrollo, y con frecuencia se aíslan de entornos clínicos donde se asocian con varias infecciones hospitalarias (IH) potencialmente mortales (Denissen et al., 2022).

Este estudio se realizará con el fin de analizar la presencia de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* en muestras de aguas residuales provenientes de efluentes hospitalarios y de la PTAR con el objetivo de determinar el antibiograma o patrón de resistencia a antibióticos y la caracterización clásica y molecular de estas cepas ambientales.

MARCO TEÓRICO

I. Aguas Residuales

A. Definición

Las aguas residuales comprenden aquellas que han sido utilizadas en entornos domésticos y urbanos, o en las industrias y la ganadería, también las aguas naturales que, por accidente o mala praxis, se hayan mezclado con las anteriores. Estas aguas pueden categorizarse según su cantidad y el tipo de sustancias químicas que contienen, sus características bacteriológicas, la relación entre agua y materia en suspensión y materia disuelta; o según su origen (Ferrovial, 2024).

B. Clasificación de las aguas residuales.

Tabla 1. Clasificación de las aguas residuales y su procedencia (García et al., 2019).

TIPO DE AGUA RESIDUAL	PROCEDENCIA
Aguas residuales domésticas o aguas negras	Heces y orina humana, higiene personal, cocina y limpieza. A menudo contienen muchas sustancias orgánicas y microorganismos, incluidos jabones, detergentes, lejías y aceites.
Aguas blancas	Pueden provenir de condiciones climáticas (lluvia, nieve o hielo) o del riego y limpieza de caminos, parques y espacios públicos. En lugares donde llueve mucho se puede verter por separado para evitar la saturación del sistema de tratamiento.
Aguas residuales industriales	Resultantes de procesos en fábricas y fábricas, que contienen aceites, detergentes, desinfectantes, ácidos y grasas, así como otros productos y subproductos de origen mineral, químico, vegetal o animal. Su composición es muy diversa y depende de diferentes actividades.

Aguas residuales agrícolas	Proviene de la agricultura en zonas rurales. Considerando su historia, estas aguas se utilizan frecuentemente en usos urbanos y se utilizan para riego agrícola en muchos lugares, con o sin pretratamiento.
-----------------------------------	--

C. Aguas residuales de origen hospitalario.

El agua residual de un establecimiento hospitalario es una mezcla compleja que constituye un riesgo potencial para los ecosistemas, capaz de generar serios problemas ambientales, pudiendo llegar a ser de cinco a quince veces más tóxica que las aguas residuales domésticas (Ramos, 2013), debido a la presencia de compuestos tóxicos y genotóxicos que pueden generar posibles efectos patogénicos de numerosos microorganismos. Ya que posee una gran cantidad de carga microbiana, que puede generar problemas a la salud de las personas, las cuales al ponerse en contacto con los compuestos y sustancias de otras áreas de los hospitales pueden poseer la capacidad de producir mutaciones en los patógenos presentes en el agua y cambios genéticos en el ecosistema acuático con efectos genotóxicos (Emmanuel, 2004). Las aguas residuales de origen hospitalario son una de las principales fuentes de contaminación emergente, esto es debido a las actividades que se llevan a cabo en los establecimientos de salud (Grisales et al., 2012).

Mientras que el consumo internacional de agua es de aproximadamente 100 L por persona por día, el consumo de agua más comúnmente aceptado en los hospitales es de aproximadamente 400 a 1200 L por cama por día (Ramos, 2013).

En la Ciudad de Panamá, las aguas residuales hospitalarias son vertidas a las instalaciones receptoras del país sin tratamiento previo, y como resultado, causa contaminación directa a los ríos y arroyos que desembocan en el Golfo de Panamá (Programa de Saneamiento de Panamá, 2022).

II. Resistencia bacteriana

A. Resistencia antimicrobiana (RAM)

Los antibióticos han sido cruciales para salvar innumerables vidas, además han supuesto una revolución en la medicina. No obstante, enfrentamos una creciente amenaza que afecta la

efectividad de estos fármacos. La resistencia bacteriana a los antibióticos, que se define en como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie (Gotkowska-Płachta, 2021).

La RAM presenta uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI. El uso excesivo e inadecuado de antimicrobianos es el principal impulsor de la propagación de la resistencia a los antibióticos. La presión selectiva antimicrobiana es particularmente alta en los hospitales de cuidados intensivos, por ejemplo, entre el 20 y 30% de los pacientes hospitalizados europeos, reciben un tratamiento antibiótico durante su hospitalización (Hocquet et al., 2016).

Estos patógenos se propagan en los hospitales a través de las manos de los trabajadores de la salud, en consecuencia, los hospitales se convierten en nichos ecológicos para las BRA y desempeñan un papel importante en la aparición y propagación de estas, conocidas como infecciones nosocomiales. Las BRA salen de los hospitales con pacientes colonizados, pero también, a través de los sistemas de aguas residuales. Esta situación puede agravarse cuando los efluentes de los centros sanitarios se vierten directamente sin tratamiento previo en la red de aguas residuales como se ha mencionado antes. Como consecuencia, grandes cantidades de antimicrobianos se descargan en las aguas residuales y ejercen una presión selectiva continua sobre las BRA (Hocquet et al., 2016).

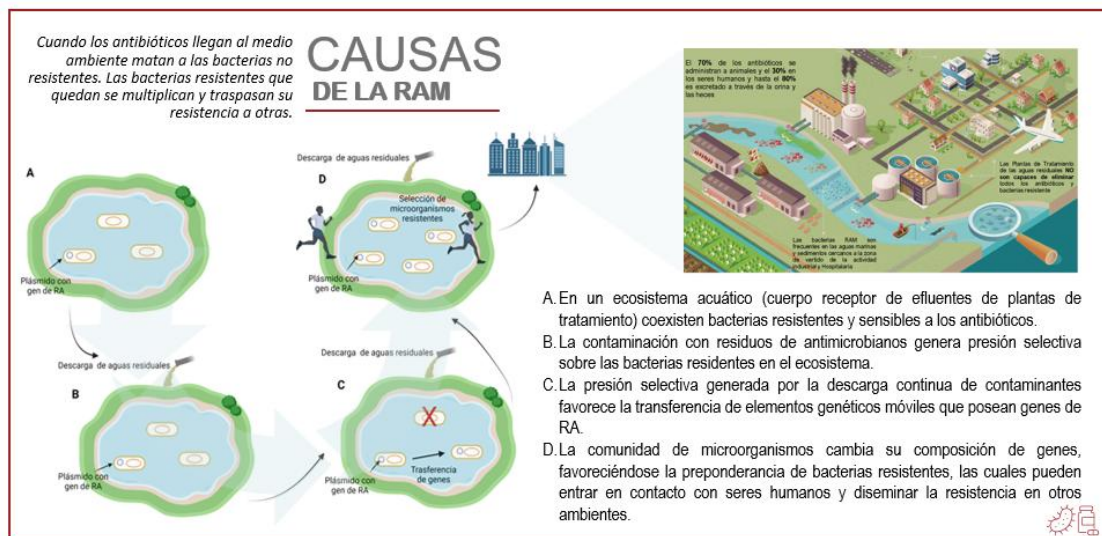


Figura 3. Origen de la resistencia bacteriana en aguas residuales y su diseminación en el ambiente (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).

B. Clasificación de los Antibióticos y los genes de resistencia

Tabla 2. Lista de antibióticos y mecanismo de acción (Rodrigo, 2005; Leopardo, 2020).

GRUPO		ANTIBIÓTICO	MECANISMO DE ACCIÓN
β -LACTAMICOS	Penicilina	Naturales	
		Penicilina G,	
		Penicilina V	
		Isoxazólicas	
		Cloxacilina v	
		Aminopenicilinas	
		Ampicilina,	
		Amoxicilina	
		Becampicina	
		Antipseudomónicas	
	Cefalosporinas	Carbemicilina,	
		Ticarcilina	
		Mezolicilina,	
		Piperacilina	
		1ra. Generación	
		Cefalexina,	
		Cefadroxilo	
		Cefapirina, Cefalotina	Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana. Su mecanismo de acción implica la unión a proteínas involucradas en la biosíntesis de la pared celular como las transpeptidasas y carboxipeptidasas.
		Cefazolina, Cefradina	
		2da. Generación	
		Cefaclor, Cefprozil	
		Axetilcefuroxima	
		Cefamandol, Cefonicid	
		Cefuroxima,	
		Cefoxitina	
		Cefmatozol, Cefminox	
		3ra. Generación	

			Cefixima, Cefibuteno Cefdinir, Cefpodoxima Proxetilo, Cefotaxima Ceftizoxima, Ceftriaxona Ceftazidima	
			4ta. Generación Cefpiroma, Cefepime	
		Monobactámicos	Aztreonam	
		Carbapenem	Imipenem, Meropenem Ertapenem, Doripenem	
MACRÓLIDOS	Y	14 átomos	Eritromicina, Claritromicina Roxitromicina	Actúan inhibiendo la síntesis proteica (traducción) en el paso de elongación de la cadena por unión a la subunidad ribosomal 50S.
LINCOSAMINAS		15 átomos	Azitromicina (azálido)	
		16 átomos	Diacetildimecamicina Espiramicina, Josamicina	
		Lincosaminas	Clindamicina	
AMINOGLUCÓSIDOS		Aminoglucósidos	Gentamicina, Tobramicina Netilmicina, Amikacina	Inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión al sitio A en el ARN ribosomal 16S del ribosoma 30S.
		Aminociclitoles	Espectinomina	
		1er. Generación	Ácido nalidíxico Ácido pipemídico Cinoxacino Rosoxacino	
QUINOLONAS		Fluoroquinolonas	Norfloxacina, Ofloxacina,	Inhiben la síntesis del ADN, fenómeno al

		Ciprofloxacina, Enoxacino Pefloxacina, Levofloxacino Gatifloxacino, Moxifloxacino	que sigue la muerte rápida de la célula bacteriana.
	Sulfonamidas	Sulfadiazina Sulfametoxazol Cotrimoxazol	
OTROS	Tetraciclinas	Tetraciclina ClH Clortetraciclina, Oxitetraciclina Demeclociclina, Minociclina, Doxiciclina	Interfiere en el metabolismo del ácido fólico, por lo que combinadas producen un efecto sinérgico.
	Nitrofuranos	Nitrofurantoína	Actúan inhibiendo la biosíntesis de proteínas a nivel de la traducción (elongación). Se unen a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, e impiden la unión del aminoacil tARN a dicha subunidad.
	Nitroimidazoles	Metronidazol	Impedir la síntesis de ADN, ARN, proteínas y posiblemente de carbohidratos e interferir con la formación de la pared celular.

Polipéptidos	Bacitracina, Colistina Polimixina B	Ejerce su acción antibacteriana y anti protozoaria por desestructuración del ADN
Glucopéptidos	Vancomicina, Teicoplanina Fosfomicina	Penetra las membranas celulares externas de las bacterias y la rompen con rapidez.
Oxazolidinona	Linezolid	Actúan sobre la síntesis de la pared bacteriana uniéndose a las terminaciones D-alanil-D-alanina de los precursores del peptidoglucano inhibiendo su elongación.
		Son inhibidores de la síntesis proteica, interactúa con la subunidad 23S del ARNr e impide de este modo la unión o la disposición adecuada del aminoacil-ARNt en el centro de la peptidiltransferasa (CPT).

Los genes de resistencia a los antimicrobianos (GRA) en el ambiente

Los GRA en los ambientes naturales están presentes en el estado intracelular (GRA_i) y en el estado extracelular (GRA_e). Los GRA_e pueden infectar bacterias no resistentes a través de la transformación natural, lo que conduce a una mayor propagación de la resistencia a los antibióticos, mientras que los GRA_i pueden entregarse a la siguiente generación por autorreplicación (transferencia vertical de genes) o transmitirse a otras especies bacterianas por transducción o conjugación (Li et al., 2022).

Transferencia horizontal de genes (HGT)

La HGT puede ocurrir a través de tres vías: (1) transformación a través de plásmidos, ADN cromosómico y otro ADN de organismos moribundos en cromosomas; (2) transducción a través de bacteriófagos; (3) conjugación a través de integrones, plásmidos y transposones (Li et al., 2022).

C. Microorganismos multirresistentes o multidrogorresistentes (MDR)

No existe una definición universalmente aceptada de resistencia a múltiples fármacos que se aplique a todos los microorganismos y el concepto puede diferir según el enfoque (clínico, microbiológico o epidemiológico). En términos generales, la definición debería incluir al menos dos criterios: la resistencia a más de una familia o grupo de antibióticos de uso común y que esa resistencia tenga relevancia clínica y epidemiológica (Lapenta, 2015).

Los antibióticos son fármacos diseñados para inhibir el crecimiento de las bacterias que causan infecciones. Sin embargo, algunos antibióticos no son efectivos para tratar las infecciones producidas por organismos MDR. Debido a esto, las infecciones causadas por MDR presentan un desafío considerable en términos de tratamiento y curación (St. Jude Children's Research Hospital, 2017).

La multirresistencia puede ser causada por mecanismos bioquímicos codificados a nivel cromosómico o por diversos elementos móviles. Los plásmidos y los transposones son elementos genéticos móviles que portan genes resistentes. Los plásmidos son fragmentos de ADN circulares extra cromosómicos de diferentes longitudes, algunos de los cuales pueden replicarse independientemente de la maquinaria genética presente en la célula. Los

transposones, por otro lado, son secuencias de ADN que pueden transferirse entre cromosomas o de cromosomas a plásmidos o entre plásmidos, gracias a sus propios sistemas de recombinación. Esto, unido a la capacidad de los plásmidos de pasar de una célula a otra durante la conjugación, permite obtener genes resistentes entre bacterias de la misma especie o de diferentes especies, dando como resultado la expansión epidémica de la resistencia (Lapenta, 2015).

Existen algunas bacterias y casos especiales que vale la pena mencionar por su importancia clínica (OMS, 2020):

- *S. aureus* (SARM): es una bacteria resistente a muchos antibióticos, sobre todo a la meticilina. SARM puede causar diversos problemas, como infecciones de la piel, sepsis, neumonía e infecciones en el torrente sanguíneo.
- *Enterococcus* (EVR): un tipo de bacterias llamadas enterococci, las cuales han adquirido resistencia a numerosos antibióticos, sobre todo a la vancomicina. El EVR puede causar infecciones graves en los intestinos, en las vías urinarias y en las heridas.

Los organismos MDR, aumentan el número de infecciones haciendo que cada vez sean más difíciles y a veces imposibles de tratar. Esta carencia de antibióticos eficaces para prevenir y tratar las infecciones puede generar que los trasplantes de órganos, la quimioterapia y las intervenciones quirúrgicas se vuelvan más peligrosas (OMS, 2020).

D. Mecanismos de resistencia

Para evadir los efectos de los antibióticos, los mecanismos utilizados por los patógenos del grupo de ESKAPE pueden incluir p. ej.: modificación de las enzimas topoisomerasas o subunidades ribosómicas, disminución de la absorción del fármaco [p. ej., mutaciones en las proteínas de la membrana externa], producción de biopelículas o una matriz protectora de exopolisacáridos, la producción de enzimas degradantes [p. ej., beta (β) -Lactamasas], la sobreexpresión de bombas de eflujo o la adaptación de vías metabólicas alternativas (p. ej., metabolismo del ácido fólico) (Denissen et al., 2022).

Desde una perspectiva molecular y bioquímica, existen mecanismos mediante los cuales una bacteria puede desarrollar resistencia al efecto de los antibióticos, los más importantes son (Boehringer Ingelheim Espana, 2021):

1. **Pérdida de porina:** son canales de difusión presentes en la membrana externa de las bacterias, una modificación por mutación de estas proteínas puede llevar a una reducción en el paso de los antibióticos a través de la membrana. *Ej. Resistencia a los carbapenems.*
2. **Betalactamasas:** son proteínas con actividad enzimática que poseen la capacidad de romper el enlace amida del anillo betalactámico. Es el principal mecanismo de resistencia en bacterias Gram negativas. *Ej. Resistencia a todas las cefalosporinas excepto la cefoxitina.*
3. **Bombas de eflujo activo:** son proteínas transmembrana que facilitan la expulsión activa del antibiótico fuera de la célula con gasto energético, en este caso, se altera la producción de energía y se disminuye no solamente la entrada de antibiótico, sino que, a su vez, las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo. *Ej. Resistencia a tetraciclina, fluorquinolonas, cloranfenicol y betalactámicos.*
4. **Mutaciones en la diana específica del antibiótico:** los antibióticos son moléculas capaces de interaccionar con su célula diana, por ejemplo, la diana de las quinolonas son enzimas encargadas de mantener el correcto plegamiento del ADN, la girasa y la topoisomerasa. Mutaciones en esas enzimas permiten que algunas bacterias se vuelvan resistentes a las quinolonas.
5. **Mutaciones en los ribosomas:** estructuras complejas compuestas por ARN y proteínas, pueden afectar la eficacia de ciertos antibióticos como la tetraciclina. Estos antibióticos actúan interfiriendo con el funcionamiento normal de los ribosomas, esenciales para la síntesis proteica vital en las bacterias. Algunas cepas han desarrollado mutaciones en las regiones donde el antibiótico interactúa con el ribosoma, lo que resulta en la inactivación de estos compuestos.
6. **Mutaciones en la estructura del lipopolisacárido (LPS):** los lipopolisacáridos son un conjunto de polímeros complejos que constituyen una parte de la membrana externa de las bacterias. Algunos antibióticos como la polimixina son capaces de interaccionar con el LPS para desestabilizarlo e impedir su correcta síntesis. Mutaciones en la estructura del LPS impiden la unión de la polimixina, lo que resulta en la inhibición de su acción.

E. Impacto en la salud pública

Es fundamental conocer el impacto ya que hoy en día estas bacterias multirresistentes son consideradas un riesgo para la salud pública. Las bacterias desarrollan mutaciones en respuesta al efecto del antibiótico para volver a las bacterias fármaco resistentes. Algunas de las infecciones que habían sido controladas en el pasado ahora son más difíciles de tratar, aumentando los costos médicos por estancias más prolongadas en hospitales e incluso aumentando la mortalidad en pacientes (OMS, 2020).

Debido a que dicha resistencia a los antibióticos es generada por bacterias que pueden mutar en respuesta al uso de fármacos, generando así un incremento en los costos médicos y la mortalidad, provocando alrededor de 700 mil muertes cada año a nivel mundial, con una estimación de aproximadamente 10 millones de muertos para el año 2050 por causa de infecciones bacterianas, siendo esta cifra mayor a las muertes atribuidas por cáncer (Armenta, 2017).

Tabla 3. Informes de casos de infecciones adquiridas en la comunidad causadas por los patógenos del grupo ESKAPE (Denissen, et al., 2022).

Patógeno causante de ESKAPE	Diagnóstico de enfermedades	Factores de riesgo/ruta de exposición	Resistencia/susceptibilidad a los antibióticos del aislado	Referencia
<i>E. faecium</i>	Infección de mejilla/herida por quemadura	Se planteó la hipótesis de que <i>E. faecium</i> había contaminado las hojas de las hierbas que se aplicaban como remedio a la herida.	Resistente a clindamicina, eritromicina, ampicilina, teicoplanina y vancomicina.	Raja et al. (2005)
	Infecciones de la piel y tejidos blandos e infecciones invasivas.		Aislados resistentes a meticilina: resistencia a clindamicina (2 a 6%) y eritromicina (94 a 97%); Aislados sensibles a meticilina: resistencia a clindamicina (3–11%) y eritromicina (44–50%)	Kaplan et al. (2005)
<i>S. aureus</i>	Neumonía	Enfermedades subyacentes, influenza o factores de riesgo de <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina	Todos (n = 11) resistentes a oxacilina y eritromicina; Todos susceptibles a linezolid, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol y vancomicina; Susceptible a clindamicina (91%) y vancomicina (55%)	Hageman et al. (2006)
	Neumonía necrotizante y trombosis venosa profunda.	Historia clínica sana y sin comorbilidades subyacentes por lo que se desconocía la causa.	Sensible a la vancomicina	Lu et al. (2022)

III. Bacterias

A. *Staphylococcus aureus*

1. Generalidades

S. aureus pertenece a la familia Staphylococcaceae, es una bacteria Gram positiva, que como su nombre lo sugiere, tiene forma de coco y puede aparecer en parejas, en cadenas o en racimos. Su tamaño oscila entre 0,8 y 1,5 micrómetros (μm) de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección. En cuanto a su metabolismo, es anaerobio facultativo, coagulasa y catalasa positivas, pero da negativo en la prueba de oxidasa (INSST, 2021).

Descubierto por el cirujano escocés Alexander Ogston en 1882, fue observado por primera vez al microscopio en un absceso de un paciente, encontrando que la pus producida en las heridas quirúrgicas, era generado por esta bacteria. Dándole el nombre de “*Staphylococcus*”, del griego “Staphylo” que significa “racimo de uvas”. No fue hasta después que, en el año 1884, el cirujano alemán Anton J. Rosenbach, identificó dos cepas de *Staphylococcus*, nombrándolas de acuerdo con las pigmentaciones que producían: *S. aureus*, del latín “*aurum*” por su pigmento color oro (Pasachova et al., 2019).

Este género posee una gran capacidad de adaptación, por lo que afecta a todas las especies conocidas de mamíferos y es gracias a su fácil propagación que puede transmitirse de una especie a otra, por lo cual, son frecuentes los casos humano-animales y viceversa. Esta bacteria la encontramos principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas, ya que hace parte de la flora microbiana de los seres humanos (Pasachova et al., 2019).

2. Mecanismo de transmisión y patogenicidad

La transmisión se produce principalmente por ingesta de alimentos contaminados con la bacteria o sus toxinas, a través del contacto con personas infectadas, animales (zoonosis) o elementos contaminados, ocurriendo principalmente por la contaminación de heridas y mucosas, por la inoculación accidental a través de pinchazos o cortes con objetos contaminados y por mordeduras de animales. El período de transmisión o contagio ocurre mientras persista una lesión purulenta o la persona siga siendo portadora (INSST, 2021).

Esta bacteria es capaz de invadir y colonizar las células de su hospedador, imposibilitando su tratamiento debido a su fisiopatología, ya que presenta mecanismos de resistencia como lo es la formación de biopelícula la cual crea una matriz extracelular que está conformada principalmente por proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Generando fallas en los tratamientos, debido a que la interacción de los antibióticos con las bacterias no se da de manera adecuada (Pasachova et al., 2019).

Su patogenicidad está relacionada con diversos componentes de la superficie bacteriana, ya que esta, está formada por peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de la proteína A. Así pues, la patogenicidad provocada por este microorganismo surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped. Estas condiciones propician que *S. aureus* posea características de virulencia y daño bastante particulares y aunado a esto, la situación se ve agravada debido a que el patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia (Manzo et al., 2014).

3. Factores de virulencia

S. aureus despliega un arsenal de factores de virulencia (Figura 4), estructurales y de secreción, los cuales juegan distintos roles en la patogenicidad. Es importante destacar que no todas las cepas poseen los mismos factores de virulencia y muchas veces, la presencia de éstos se encuentra asociada a un determinado tipo clonal. Los distintos factores de virulencia pueden agruparse en componentes de pared celular, proteínas de superficie, enzimas y toxinas. Su expresión se encuentra regulada según la etapa de infección, y así, en el establecimiento del proceso infeccioso, cuando *S. aureus* se encuentra en fase de crecimiento exponencial, se expresan los factores asociados a la adhesión y durante la infección se expresan enzimas y toxinas que permiten la invasión, la destrucción de los tejidos y la formación de metástasis en otros sitios del organismo. Las toxinas son producidas en la fase estacionaria (Gordon y Lowy, 2008).

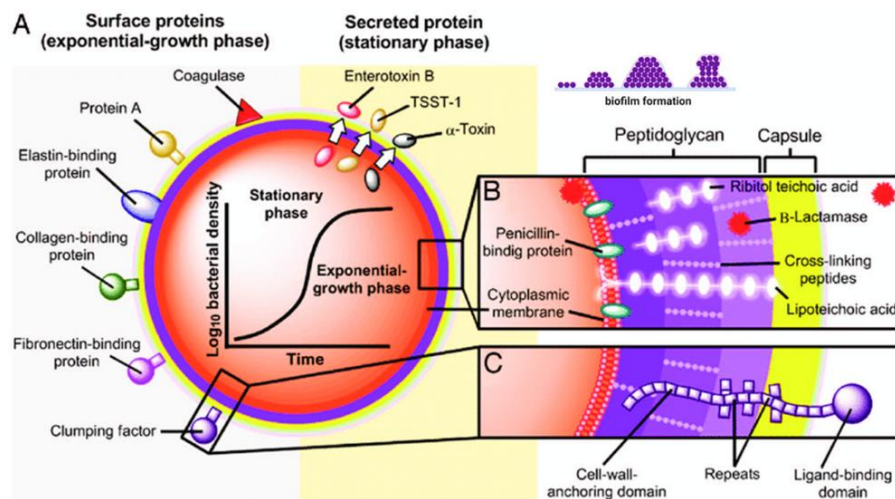


Figura 4. Los factores de virulencia secretados de *S. aureus*. (A) la proteína de superficie y secretada. La mayoría de estas proteínas se pueden crear durante la fase de crecimiento. (B) y (C) muestran una sección transversal en la envoltura (Gordon y Lowy, 2008; Cervantes et al., 2014).

Componentes de la pared celular

La pared celular está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano que mantiene la rigidez de esta, estimula la quimiotaxis, induce la formación de anticuerpos opsonizantes y participa en la activación del complemento, desencadenando la inflamación. Los ácidos teicoicos unidos al peptidoglicano o a la membrana citoplasmática, y además, tienen función antifagocítica. La presencia de cápsula polisacáridas es variable y se asocia a la evasión del sistema inmune del huésped por su acción antifagocítica (principalmente serotipos 5 y 8) (Gordon y Lowy, 2008).

Proteínas de superficie, MSCRAMMs (del inglés, “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”)

Estas proteínas median la adhesión a los tejidos del huésped. La proteína A se une a la porción Fc de inmunoglobulinas (IgG) y previene la opsonización. Otras proteínas de superficie involucradas en la adhesión y agregación bacteriana son: la proteína de unión al colágeno, la proteína de unión a la fibronectina y el factor de aglutinación (coagulasa ligada) (Gordon y Lowy, 2008).

Enzimas

Proteasas, lipasas, nucleasas, fofolipasa C y hialuronidasa se encuentran asociadas a la invasión y destrucción de los tejidos. La coagulasa libre, al igual que el factor de aglutinación, participa en la agregación bacteriana con formación de coágulos (Gordon y Lowy, 2008).

Toxinas

Tabla 4. Tipos de toxinas y sus efectos (Gordon y Lowy, 2008).

TOXINA	EFEECTO
Las hemolisinas (α, β, γ y δ)	Poseen acción citolítica sobre variedad de células (leucocitos, eritrocitos, fibroblastos) participando así en la destrucción de los tejidos del huésped.
Las enterotoxinas (SEA a SEQ, no F)	Están relacionadas con la intoxicación alimentaria.
Las exfoliatinas A y B	Causan lesión a la epidermis y son responsables del síndrome de la piel escaldada.
La leucocidina Panton-Valentine	Es una citotoxina que daña las membranas de los leucocitos, formando poros (también genera necrosis de piel), por la acción sinérgica de dos proteínas, designadas S y F (LukS-PV y LukF-PV, respectivamente).

Todas las cepas PVL positivas, producen ambas proteínas S y F, así como también tres proteínas para la γ hemolisina (HlgA, HlgB y HlgC) (Prevost et al., 1994). Las proteínas LukS-PV y LukF-PV son codificadas por dos genes (*lukS-PV* y *lukF-PV*, respectivamente), separados por una timina, que se cotranscriben, y están ubicados en un bacteriófago. La PVL ha sido detectada en menos del 5% de *S. aureus* aisladas de hospitales. En contraste, ha sido detectada en 93% de cepas asociadas a forunculosis, 85% de cepas asociadas a neumonía necrosante adquirida en la comunidad, 55% de cepas asociadas a celulitis, 50% de cepas de abscesos cutáneos, 23% de cepas de osteomielitis y en 13% de panadizos. La PVL no ha sido identificada en cepas asociadas a endocarditis, mediastinitis, neumonía hospitalaria,

infección urinaria ni al síndrome de shock tóxico. Los aislamientos de SAMR de origen comunitario comúnmente poseen los genes para PVL, raramente detectados en las cepas de SAMR hospitalarias (Cervantes et al., 2014).

- La toxina del síndrome de shock tóxico 1 (TSST-1)

Codificada por el gen cromosómico *tst*, está clínicamente asociada con el síndrome de shock tóxico. Primariamente se le ha denominado enterotoxina F, porque está sintomáticamente relacionada a las enterotoxinas, pero existe poca homología de aminoácidos entre éstas. Tanto las enterotoxinas, como las exfoliatinas y la TSST-1 actúan como superantígenos activando directamente a los linfocitos T, provocando una “tormenta de citoquinas”, lo que puede conducir a un shock séptico (Gordon y Lowy, 2008).

4. Resistencia antimicrobiana (RAM)

S. aureus ha demostrado una notable capacidad de adaptación a los agentes antimicrobianos, adquiriendo paso a paso resistencia a todos los antibióticos disponibles para el tratamiento de las infecciones que ocasionan (Castellano et al., 2010).

Existen tres mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en *S. aureus* (Castellano et al., 2010):

- Resistencia mediada por enzimas (penicilinasas o β -lactamasas) que desactivan el antibiótico.
- Resistencia intrínseca, que no se debe a la inactivación de medicamentos y es responsable de la resistencia a meticilina.
- Modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs).

Adicionalmente, *S. aureus* puede exhibir el fenómeno de tolerancia, donde se observa una disociación de las acciones inhibitoria y bactericida de los antibióticos β -lactámicos. De éstos, el mecanismo más importante, es la resistencia intrínseca que es probablemente más compleja, debido a que varios factores pueden afectar también su expresión (González, y Perozo, 2010).

4.1. Resistencia a la meticilina

La resistencia del *S. aureus* a la penicilina es mediada por la producción de β -lactamasas. La resistencia a la meticilina se adquiere mediante la adquisición horizontal del gen *mecA*, localizado en el casete cromosomal estafilocócico *mec* (“staphylococcal cassette chromosome *mec*”, SCCmec), del cual se han determinado diferentes tipos desde el I-V. Los SCCmec tipo II y III, contienen determinantes específicos que confieren resistencia a antibióticos diferentes a los β -lactámicos como eritromicina, espectinomicina, tetraciclina y kanamicina, además son los que están presentes en las cepas nosocomiales o cepas adquiridas en el medio hospitalario (SARM-IH). El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP) conocida como PBP2a (González, y Perozo, 2010).

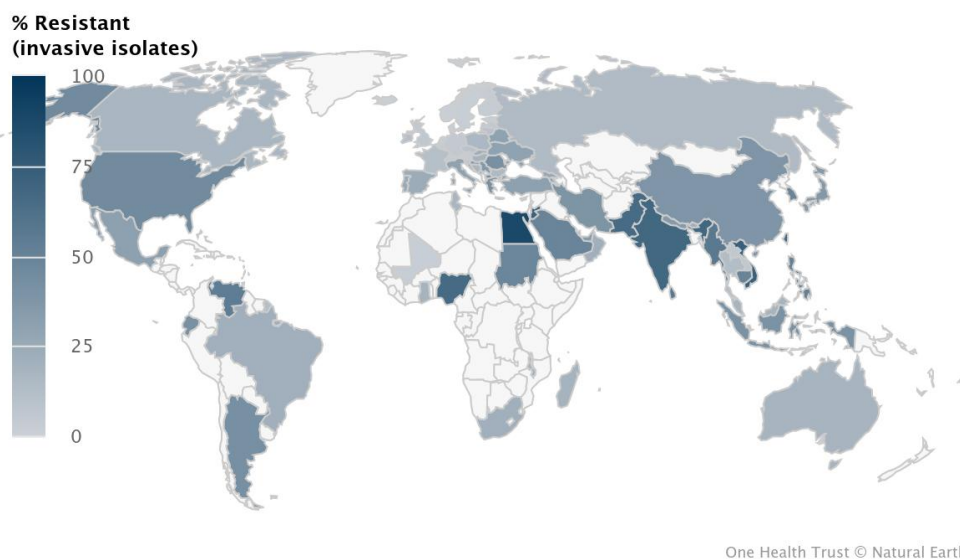


Figura 5. Resistencia de *S. aureus* a la oxacilina (SARM) (One Health Trust, 2025).

4.2. Resistencia a la Vancomicina

La resistencia está determinada por la adquisición de genes de resistencia a la vancomicina, como el gen *vanA*, que permiten a la bacteria modificar su pared celular para evitar la acción del antibiótico. La transferencia de dicho gen se realiza a partir de un plásmido (González y Perozo, 2010). Esta resistencia puede ocurrir por transferencia horizontal de genes entre bacterias, como entre *Enterococcus* y *S. aureus*, o por mutaciones en el genoma de la bacteria (Rodríguez y Vesga, 2005).

5. Identificación

5.1. CHROMagar™ *Staph aureus*

Es un medio de cultivo cromogénico selectivo, destinado a la detección cualitativa directa, la diferenciación y la identificación presuntiva de *S. aureus* para ayudar al diagnóstico de la colonización por *S. aureus* (The Chromogenic Media Pioneer, 2021). Los resultados pueden interpretarse tras 18-24 h de incubación aeróbica a 35-37°C. Para el *S. aureus*, la sensibilidad es del 95,5% y la especificidad es del 99,4% (Figura 5) (Gaillot et al., 2000; Wendt et al., 2010).

En contraste con el Agar Sangre o el Agar Manitol Salado. CHROMagar™ *Staph aureus* permite una mejor diferenciación de las unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus*, realzadas por un color malva, y es de considerable ayuda en la identificación de UFC sospechosas. Por lo tanto, se reduce la carga de trabajo de confirmación (Figura 5) (The Chromogenic Media Pioneer, 2021).



Figura 6. CHROMagar *Staph aureus* para el aislamiento y diferenciación directa de *S. aureus* (The Chromogenic Media Pioneer, 2021).

5.2. Agar Manitol Salado

Este medio de cultivo es tanto selectivo como diferencial, diseñado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Compuesto de extracto de carne, peptona de carne y tripteína, que constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales que promueven el desarrollo microbiano. El manitol sirve como la fuente de carbohidrato fermentable. El alto contenido de cloruro de sodio actúa como el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, mientras que el rojo fenol es el indicador de pH y el agente solidificante es el agar (Figura 6).



Figura 7. Agar Manitol Salado para la detección y aislamiento de *S. aureus* (Fisherscientific, 2020).

Las bacterias que crecen en un medio con alta salinidad y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y haciendo que el indicador de pH pase de rojo a amarillo. Los estafilococos son capaces de crecer en condiciones de alta salinidad y pueden o no fermentar el manitol. Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y forman colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color (Figura 6) (BritaniaLab, 2021).

5.3. Agar Baird Parker

Este medio de cultivo tiene una alta especificidad diagnóstica, siendo selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de estafilococos coagulasa positiva. Compuesto por peptona de caseína y extracto de carne que constituyen la fuente de carbono y nitrógeno, el extracto de levadura que proporciona vitaminas del complejo B, la glicina y el piruvato estimulan el crecimiento de los estafilococos, el agar que se utiliza como el agente solidificante (Figura 7) (Britania, 2021).

Este medio permite el crecimiento selectivo de estafilococos al incluir el telurito de potasio y el cloruro de litio, los cuales inhiben el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra. La yema de huevo permite detectar la actividad lecitinásica de los microorganismos. Los estafilococos coagulasa positiva reducen el telurito a telurio y forman colonias de color grisáceo-negro, y tienen actividad lecitinásica, por eso actúan sobre la yema de huevo produciendo un halo claro alrededor de la UFC (Figura 7) (Britania, 2021).



Figura 8. Agar Baird Parker para la detección y aislamiento de *S. aureus* (MDM, 2020).

6. *S. aureus* en aguas residuales

Las PTAR constituyen la principal fuente antropogénica de determinantes de resistencia. Sin embargo, la ocurrencia de *S. aureus* y SARM en entornos no clínicos, como las aguas residuales, rara vez se han estudiado, ya que la mayoría de los estudios de aguas residuales se centran en indicadores microbianos de contaminación fecal y los estudios realizados, han

informado la baja presencia de *S. aureus* en aguas residuales hospitalarias y municipales (Schwartz et al., 2003).

B. *Enterococcus* spp.

1. Generalidades

Enterococcus son bacterias cocoideas, Gram positivas, anaerobias facultativas, comensales que se presentan principalmente en pares o cadenas cortas y comparten algunos atributos fenotípicos con los estreptococos (Adegoke et al., 2022).

El género *Enterococcus* está compuesto por 38 especies, de las cuales las más importantes son *E. faecalis* y *E. faecium*, ambos colonizadores intestinales humanos capaces de desarrollar monoinfecciones sin el apoyo de otras especies. Además, habitan en la cavidad oral y genitourinario. Muchas especies de enterococos son patógenos oportunistas y causan algunas infecciones potencialmente mortales, como bacteriemia nosocomial, infección del tracto urinario e infección de heridas, etc. Es reportado que entre el 65-80% de infecciones de *Enterococcus* son atribuidas a diferentes factores como resistencia antibiótica o al rápido desarrollo de resistencia, por medio de mutación o por la adquisición de plásmidos o transposones que contienen codificación genética, también por su capacidad de formar una biopelícula, presencia de proteínas de superficie y enzimas sintetizadas (García, et al., 2019).

2. Mecanismo de transmisión y patogenicidad

Los *Enterococcus* se encuentran entre los principales patógenos nosocomiales, pueden transmitirse de persona a persona y también, a través de alimentos o ambientes contaminados, además, causan infecciones de tejidos blandos o heridas, bacteriemia, endocarditis y especialmente infecciones del tracto urinario (Golob et al., 2019).

2.1. Factor de virulencia

Los *Entococcus* presenta diferentes elementos de virulencia que, en su conjunto, expresan la capacidad patogénica de esta bacteria. Entre los más recurrentes factores citados en infecciones humanas se encuentran (Padilla et al., 2012):

- La proteína de superficie extracelular (Esp), la cual facilita la adhesión, colonización y evasión del sistema inmune, también participa en la generación de biopelícula y aparentemente cumple un rol en la RAM.
- La citolisina (Cyl), también conocida como hemolisina, que posee propiedades β -hemolíticas en humanos y es bactericida contra bacterias Gram positivas.
- Gelatinasa (Gel), que proporciona nutrientes a la bacteria degradando el tejido del hospedero, y además, desempeña algún papel en la formación de biopelículas; hialuronidasa que actúa despolimerizando la molécula de mucopolisacárido del tejido conectivo, lo que facilita la diseminación de la bacteria.
- Determinantes de feromonas (Eep), capaces de modular de modo importante la respuesta inflamatoria *in vivo*.
- Antígeno A (EfaA) que se asocia a la adherencia de la bacteria tanto a células bióticas y superficies abióticas, además de participar en ciertas etapas de la formación de biopelícula; proteína de superficie celular (Ace) que exhibe una fuerte similitud con la proteína del mismo nombre producida por *S. aureus*, la cual posee la capacidad de unirse al colágeno y presentaría un rol en la patogénesis de la endocarditis.
- Sustancia de agregación (Agg) que actúa mediando la unión específica de la bacteria al epitelio intestinal, células del epitelio renal, neutrófilos humanos y macrófagos, además de aumentar la internalización y vida intracelular del microorganismo.
- La existencia de un pilus de *E. faecalis* juega un papel importante en la formación de la biopelícula, la cual se sustenta en la proteína Bps.

Aunque *E. faecalis* y *E. faecium* son las 2 especies clínicamente más relevantes, *E. faecalis* representa aproximadamente el 97% de todos los casos de endocarditis infecciosa, afectando predominantemente a los ancianos y pacientes con comorbilidades (Rojas y Arias, 2020).

3. Resistencia antimicrobiana (RAM)

El desafío de la enfermedad causada por los enterococos se agrava por su limitada susceptibilidad a los antibióticos, debido a las resistencias antibióticas tanto intrínsecas como adquiridas (Cavalieri et al., 2005).

La resistencia en Enterococos puede ocurrir de dos formas que son (Byappanahalli et al., 2012):

Resistencia intrínseca

- Cefalosporinas
- Clindamicina
- Penicilinas penicilinasa-estables (v.g.oxacilina)
- Trimethoprim-sulfametoxazol
- Concentraciones bajas o terapéuticas de aminoglucósidos

Resistencia adquirida

Los enterococos podrían adquirir resistencia a muchos agentes antimicrobianos. Entre estos los más importantes son:

- Ampicilina, penicilina y vancomicina
- Alto nivel a gentamicina y estreptomycinina

4. Identificación

4.1. Agar Bilis Esculina

Es un medio de cultivo nutritivo que contiene extracto de carne y peptona de carne, proporcionando los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano. Los estreptococos del grupo D crecen rápidamente en el agar bilis esculina e hidrolizan la esculina, que en presencia de iones de hierro, forman un compuesto de color verde oliva hasta negro. La bilis de buey tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de la flora acompañante. El agar es el agente solidificante (Figura 8) (Laboratorios Britania S.A., 2021).



Figura 9. Aislamiento en Agar Bilis Esculina (Microbiosh, 2021).

5. Pruebas bioquímicas

5.1. Caldo Rojo fenol con Arabinosa

Las reacciones de fermentación producen ácidos, a veces acompañados de gas, lo cual se evidencia por un cambio de color de rojo a amarillo, debido a la disminución del pH. La

combinación de diferentes sustratos fermentables, y el uso de otras pruebas complementarias, pueden ser de utilidad para la identificación del género y la especie bacteriana (Valtek, 2017). En el caso de *Enterococcus*, el uso del Caldo Rojo Fenol con Arabinosa, facilita la diferenciación de especies cuando se complementan con pruebas como tolerancia al NaCl, la reacción en Agar Bilis-esculina, la reducción del telurito de K y la fermentación del sorbitol (Valtek, 2017).

5.2. Caldo Nutritivo con NaCl al 6,5%

La aparición de turbidez en el medio indica crecimiento de microorganismos. Si se trata de un coco Gram positivo y catalasa negativa, se trata de *Enterococcus* spp. En ausencia de crecimiento de microorganismos y sin alteración de turbiedad, se trata de *Streptococcus* spp. (RenyLab, 2013).

5.3. Agar Nutritivo con Telurito al 0.04%

Este medio de cultivo se emplea para diferenciar bacterias tolerantes al telurito y capaces de reducirlo. Aquellas bacterias que toleran y reducen el telurito, producen UFC de color negro, mientras que la mayoría de los Gram negativos resulta inhibido debido al efecto toxico de este aditivo (Porte et al., 2007).

6. *Enterococcus* spp. en aguas residuales

Algunos miembros del género, como *E. faecalis* y *E. faecium*, son patógenos oportunistas que forman parte de la flora intestinal natural de animales y humanos con una concentración típica en las heces humanas de 10^4 – 10^7 UFC/g (Adegoke et al., 2022) y se usan con mayor frecuencia como bacterias indicadoras de heces (FIB), o indicadores generales de contaminación fecal (Núñez et al., 2016).

Los enterococos, que forman parte de la flora intestinal natural de animales y humanos, pueden liberarse al ambiente a través de aguas residuales. Sin embargo, existen investigaciones que han demostrado que estas bacterias están ampliamente distribuidas en una variedad de hábitats ambientales, incluso cuando hay poco o ningún aporte de fuentes fecales humanas y/o animales. Estos hábitats pueden ser suelo, sedimentos, arena de playa,

vegetación acuática y terrestre, y aguas ambientales incluyendo las aguas residuales (Byappanahalli et al., 2012).

Los *Enterococcus* pueden tolerar factores estresantes ambientales como la temperatura (5–50°C), pH variable (4,5–9,9), 40% de sales biliares y 6,5% de NaCl, desecación y estrés oxidativo. La capacidad de resiliencia de los enterococos puede ayudarlos a resistir algunos procesos de la PTAR menos estrictos. Esto es evidente a partir de la detección de enterococos en muestras de efluentes clorados analizadas por Rosenberg-Goldstein et al. (2014).

En aguas residuales municipales no tratadas, la abundancia de enterococos fecales y bacterias de la familia Enterobacteriaceae, se determinó en el rango de 4 a 8 log UFC/mL (Gotkowska-Płachta, 2021).

OBJETIVOS

I. Objetivo general

Determinar la resistencia antimicrobiana en cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* provenientes de efluentes hospitalarios y la PTAR de la ciudad de Panamá.

II. Objetivos específicos

- Aislar y confirmar la presencia de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* a partir de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR de Panamá con la ayuda de un sistema automatizado de identificación bacteriana, VITEK 2.
- Estandarizar una metodología molecular que funcione para próximas investigaciones para confirmar las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium*.
- Comparar los perfiles de resistencia de las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de las aguas residuales hospitalarias y de la PTAR de Panamá mediante el sistema automatizado VITEK.
- Identificar molecularmente los genes causantes de resistencia más relevantes en las cepas identificadas.

HIPÓTESIS

Ha: Se encuentran patrones de multirresistencia en las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR de Panamá.

Ho: No se encuentran patrones de multirresistencia en las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR de Panamá.

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

METODOLOGÍA

I. Área de estudio

Las áreas de estudio están ubicadas en la provincia Panamá, distrito de Panamá en el área metropolitana del país. Las muestras se tomarán en 3 lugares distintos que son: la planta de tratamiento de aguas residuales en Juan Diaz (PTAR) (9.0169489, -79.4484055), Estación de Bombeo de la Cinta Costera (EB3) (8.967133, -79.532688) y el Complejo Hospitalario de la Caja del Seguro Social Arnulfo Arias Madrid (CSS) (8.980566, -79.536175) (Figura 9). Los muestreos se realizaron cada 2 semanas por sitio, obteniendo de esta manera 2 muestras con parámetros diferentes.

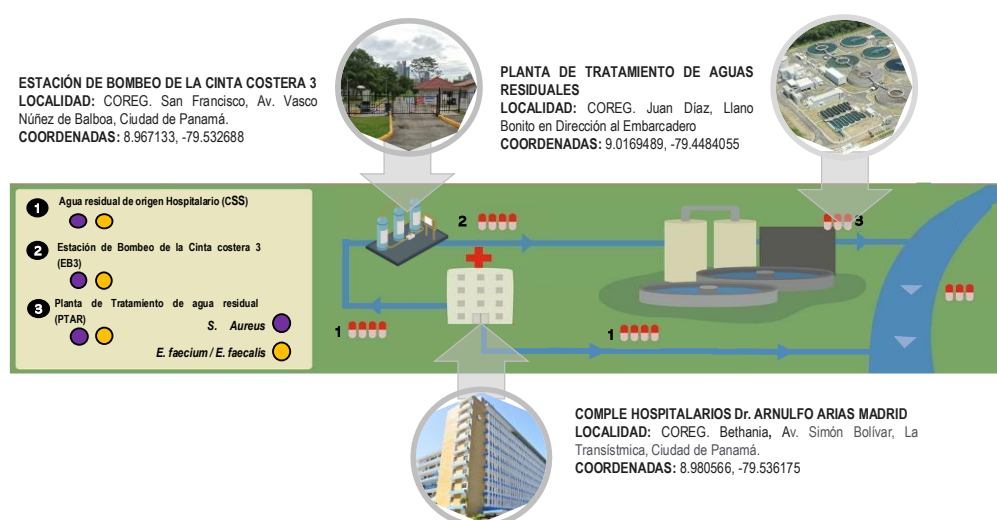


Figura 10. Los tres sitios de muestreo georeferenciados (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).

II. Colecta de muestra

Se colectaron 125 mL de agua en envases estériles de boca ancha y tapa rosca, por sitio de muestreo, utilizando las medidas de bioseguridad durante el proceso, como el uso de guantes, mascarilla y alcohol al 70%, y se transportaron en cadena de frío a los laboratorios de LAMEXA y LAMA de la VIP, Universidad de Panamá.

III. Análisis de muestras

A. Aislamiento e identificación de las cepas bacterianas

Para el aislamiento de *S. aureus*, *E. faecium* y *E. faecalis* se procedió a homogeneizar la muestra de agua residual sin filtrar.

1. Aislamiento de *S. aureus*

Se tomaron 100 µL de la muestra directa y se sembraron cinco platos de CHROMagar™ por esparcido, se incubaron a 37.0°C durante 18 a 24 h. Posteriormente, se identificaron las UFC aisladas en los platos, cuyas morfologías fueron gomosas, circulares y de color malva con una coloración más intensa en el centro (CHROMagar™, París, Francia) (The Chromogenic Media Pioneer, 2021). Después, se seleccionaron cuatro UFC por platos, teniendo un total de 25 UFC aisladas con su debida nomenclatura. Luego, se sembraron por estriado en platos de Baird Parker y se incubaron a 37.0°C durante 18 a 24 h. Se tomaron en cuenta aquellas UFC cuyas morfologías fueron estrelladas y de color grisáceo-negro con halo de opacidad (HiMedia, Maharashtra, India) (Laboratorios Britania S.A., 2021). Finalmente, se realizó un tercer pase de las UFC en platos de Manitol salado y se incubaron a 37.0°C durante 18 a 24 h. Se tomaron en cuenta aquellas UFC que fermentaron el manitol y cuya morfología fue redonda, amarilla, rodeada de una zona del mismo color (HiMedia, Maharashtra, India) (BritaniaLab, 2021) (Figura 10).

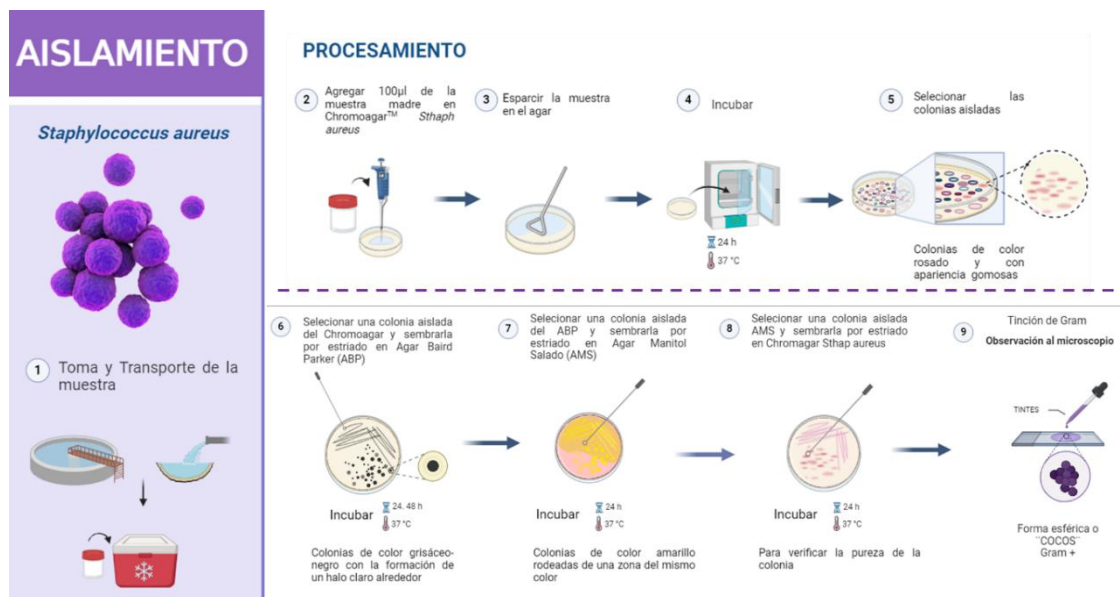


Figura 11. Metodología para el aislamiento de *S. aureus* proveniente de agua residual (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).

2. Aislamiento de *E. faecalis* y *E. faecium* en agar Bilis Esculina

Se sumergió el asa bacteriológica en la muestra de agua residual, revolviendo el sedimento y se sembraron cinco platos de agar Bilis Esculina por estriado, se incubaron a 37.0°C durante 18 a 24 h. Posteriormente, se tomaron en cuenta los platos donde se observó un oscurecimiento o ennegrecimiento del medio de cultivo y las UFC aisladas cuyas morfologías fueron pequeñas, grisáceas y circulares (HiMedia. Maharashtra, India) (Laboratorios Britania S.A., 2021). Se seleccionaron cinco UFC por platos y se sembraron por estriado en platos nuevos de Bilis Esculina, y se incubaron a 37.0°C durante 18 a 24 h, con un total de tres pases. Teniendo un total de 25 UFC aisladas con su debida nomenclatura.

3. Identificación

Se realizó la tinción de Gram a las UFC aisladas para confirmar la morfología y criterio de Gram, y adicional, se les realizó la prueba de catalasa.

A las UFC de *Enterococcus* se les realizaron pruebas bioquímicas para verificar que fueran las especies que se necesitaban: *E. faecium* o *E. faecalis* (Figura 11).

- NaCl: se agregó una UFC en 4 mL de caldo nutritivo con NaCl al 6.5%.
- Arabinosa: se agregó una UFC en 4 mL de caldo rojo fenol con arabinosa 5g/1000 mL.
- Telurito: se sembró una UFC en un plato de agar nutritivo con telurito al 0.04%.

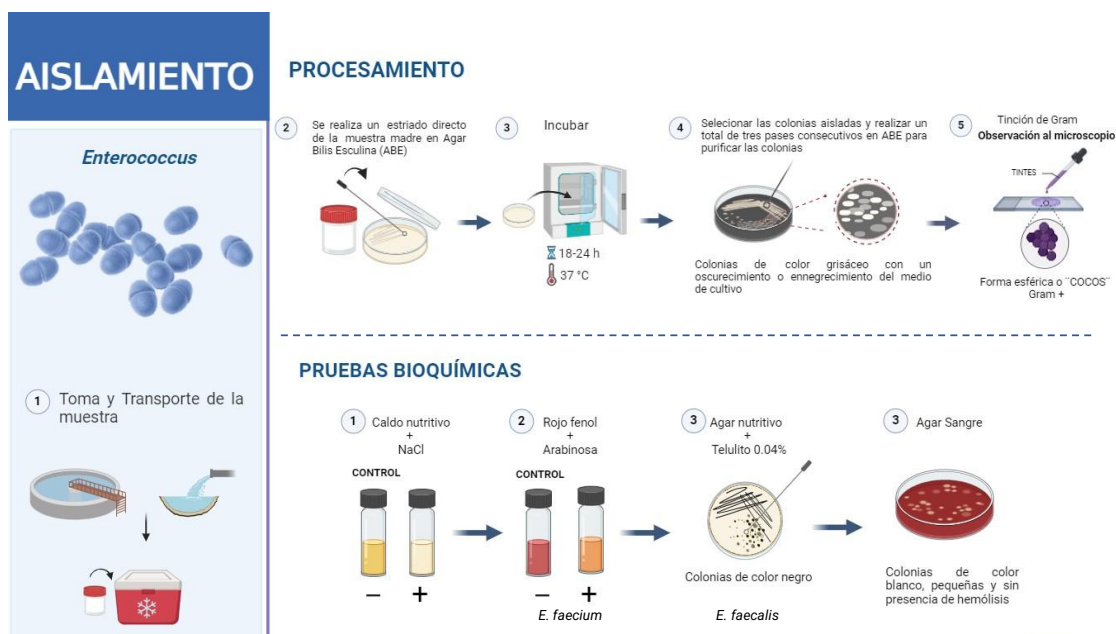


Figura 12. Metodología para el aislamiento de *Enterococcus* spp. proveniente de agua residual (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).

Luego que las cepas fueron confirmadas con las pruebas bioquímicas y la tinción de Gram, se tomó una UFC y se transfirió a un tubo inclinado con 4 mL de agar nutritivo, posteriormente, se aforó con aceite mineral estéril hasta que el agar quedará totalmente cubierto y se almacenó a temperatura ambiente (TA) para su posterior análisis en el VITEK 2 (bioMérieux, Francia).

B. Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas.

Se utilizó el sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux, Francia) para la identificación bacteriana y sensibilidad antimicrobiana de nuestros aislamientos bacterianos puros, siguiendo el protocolo establecido en MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK ® 2 SYSTEM (Pincus, 2011). Previo a la identificación, se reactivaron las cepas ambientales preservadas en viales, estriándolas en Agar Nutritivo e incubándolas a 37°C durante 18 h. La identificación en VITEK 2 se basa en un sistema óptico de transmitancia inoculando una suspensión de un cultivo puro microbiano.

1. Preparación de la suspensión

Utilizando un hisopo estéril, se tomaron suficientes UFC aisladas provenientes del cultivo puro de Agar nutritivo y se transfirieron a un tubo de poliestireno transparente (12 x 75 mm) con 3 mL de solución salina estéril (Sol. Acuosa de NaCl 0.45%, pH 4.5 a 7.0), hasta alcanzar una densidad óptica de 0.50 – 0.63 McFarland, la cual fue medida con ayuda de un densitómetro "DensiChek". Para la prueba de sensibilidad a los antibióticos, se realizó una dilución en donde se toman 280 µL de la suspensión inicial, previamente preparada y luego vertida en 3 mL de solución salina. El tubo de ensayo que contenía la suspensión bacteriana se colocó dentro de la gradilla especial (cassette), y se puso en contacto con las tarjetas correspondientes (para identificación bacteriana y/o para perfiles de resistencia). Al completar esta parte, se colocó el cassette con las muestras en el sistema VITEK 2 (bioMérieux, Francia). Finalmente, las tarjetas fueron registradas en el software de análisis del VITEK 2, junto al identificador de muestra suministrado. Una vez dentro del equipo, las muestras se sometieron a los siguientes procesos de forma automática: inoculación, sellado e incubación de las tarjetas (todos los tipos de tarjetas se incuban en línea a $35.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$), y por último, se realizó la lectura de las reacciones generando un resultado concluyente y las tarjetas fueron descartadas de forma inmediata (Figura 12).

Las tarjetas utilizadas para identificación fueron GP, mientras que para el perfil de susceptibilidad se utilizaron las tarjetas AST-P663 que trabajaban con los siguientes antibióticos para *S. aureus*: β -Lactámicos (Cefoxitina, Bencilpenicilina, Ceftarolina, Oxacilina), Quinolonas (Ciprofloxacino, Levofloxacino), Lincosamidas (Clindamicina), Macrólidos (Eritromicina), Oxazolidinona (Linezolid), Lipopeptídico (Daptomicina), Glucopéptidos (Vancomicina), Tetraciclinas (Tetraciclina), Nitrofuranos (Nitrofurantoína), Rifamicinas (Rifampicina), Sulfonamida (Sulfametoxazol).

Para *Enterococcus* spp: β -Lactámicos (Bencilpenicilina, Ampicilina), Aminoglucósidos (Gentamicina, Estreptomicina), Quinolonas (ciprofloxacino, Levofloxacino), Macrólidos (Eritromicina), Oxazolidinona (linezolid), Lipopeptídico, Daptomicina, Glucopéptidos (Vancomicina), Tetraciclinas (Tetraciclina), Nitrofuranos (Nitrofurantoína).

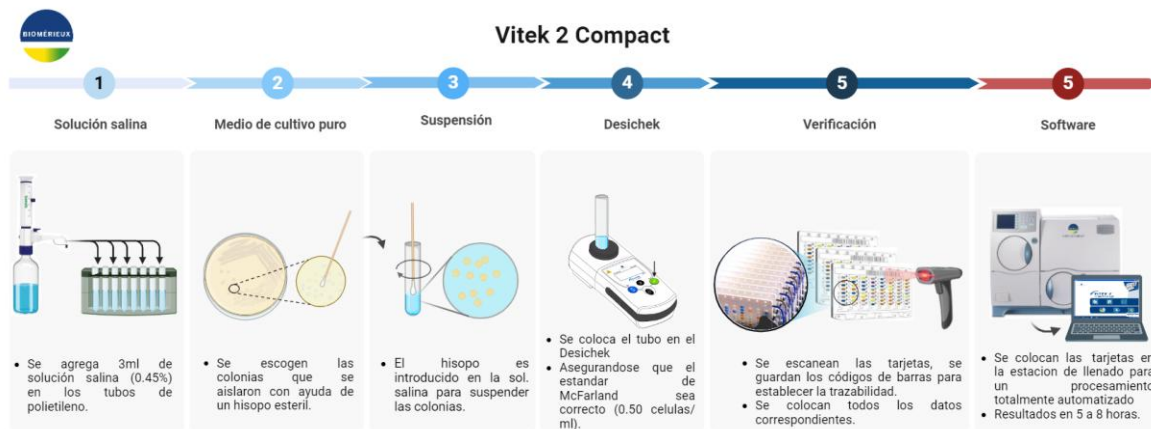


Figura 13. Protocolo establecido en MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM (bioMérieux, Francia) (Pincus, 2011) (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).

2. Conservación en glicerol

Se tomó 1 UFC proveniente del cultivo puro de Agar nutritivo, se transfirió a un tubo con 4 mL de Caldo nutritivo, incubándola a 37°C durante 24 h. Luego, se procedió a inocular la cepa identificada en tubos tipo Eppendorf (1.5 mL), con 500 µL de caldo nutritivo y 500 µL de glicerol al 40%, para finalmente conservarlas congeladas a -20°C hasta su posterior uso.

C. Extracción del ADN

La extracción de ácidos nucleicos de las 95 cepas se llevó a cabo utilizando el Método de Extracción Térmica (Hamer et al., 2019). Las cepas de *E. faecalis* se cultivaron en agar nutritivo a 37°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, las cepas de *S. aureus*, *E. faecium* y *E. faecalis*, fueron transferidas a caldo nutritivo y se incubaron 37°C durante 24 h. Posteriormente, se preparó la suspensión de las cepas de *S. aureus* y *E. faecium*. Para estas dos bacterias, se sirvieron 200 µL de caldo nutritivo y 500 µL de agua libre de nucleasas (ALN) en un tubo Eppendorf, en el caso de *E. faecalis*, se necesitaron 300 µL de caldo nutritivo y 500 µL de ALN. Los tubos tipos Eppendorf fueron colocados en el bloque térmico a 95°C durante 10 min. Finalmente, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min y se transfirieron 100 µL del sobrenadante a nuevos tubos cónicos estériles de 1.5 mL.

El proceso de cuantificación se realizó por medio de espectrofotometría, con ayuda del NanoDrop Lite Plus (Thermo Scientific, EEUU) con la finalidad de ver la concentración (260 nm) y pureza del ADN (260/280 nm).

D. Identificación mediante la detección molecular de los genes *nucA* (*S. aureus*), *ddlE* (*E. faecium*) y *N. 14* (*E. faecalis*) por el método de PCR

Para llevar a cabo las PCR se utilizó el Master Mix 2X (M7505 PROMEGA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se realizó con una mezcla final de 25 µL 1X (Figura 13).

1. Detección del gen *nucA* en aislamiento de *S. aureus*

Los cebadores para el gen *nucA*, de acuerdo con Brakstad et al. (1992) fueron: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' y 5'-AGC CAA GCCTTG ACG AAC TAA AGC-3', obteniéndose un amplicón de 270 pb. El control positivo fue la cepa de *S. aureus* ATCC 6538 (Donada por el Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá) y como control negativo la mezcla de Master Mix con los cebadores sin la muestra.

Se usó el termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio Rad, EEUU) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C por 5 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 7 min.

2. Detección del gen *ddlE* en aislamiento de *E. faecium*.

Los cebadores para el gen *ddlE*, de acuerdo con Hosseini et al. (2016) fueron: 5'-TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG- 3' y 5'-TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC- 3', obteniéndose un amplicón de 658 pb.

Se usó el termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio Rad, EEUU) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C por 5 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 7 min.

3. Detección del gen *N. 14* en aislamiento de *E. faecalis*

La amplificación del gen *N.14*, de acuerdo con Xiang et al. (2023) fueron: 5'-TGT ACA TCC AAA ACA CCT AC- 3' y 5'- TGA GCA TCG ATT TTT ACC TC- 3', obteniéndose un amplicón de 533 pb. El control positivo fue la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 (Donada por el Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá) y como control negativo la mezcla del master mix con los cebadores sin la muestra.

Se usó el termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio Rad, EEUU) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C por 5 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 7 min.

E. Detección molecular del gen *mecA* por el método de PCR

1. Detección del gen *mecA* en aislamientos de *S. aureus*.

Para llevar a cabo las PCR se utilizó el Master Mix 2X (M7505 PROMEGA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se realizó con una mezcla final de 25µL 1X (Figura 13).

Los cebadores para el gen *mecA*, de acuerdo con Vannuffel et al. (1995) fueron: 5'-TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG-3' y 5'-CTG GAA CTT GTTGAG CAG AG-3', con una mezcla final de 25µL 1X, obteniéndose un amplicón de 310 pb. El control positivo fue la cepa de *S. aureus* ATCC 43300 (Donada por el Mgter. José Moreno, Departamento de Bacteriología, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud-ICGES, Panamá).

Se usó el termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio Rad, EEUU) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C por 5 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 30 s y 72°C por 30 s, y una extensión final de 72°C por 5 min.

F. Visualización de los resultados de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa

Para la preparación de la cámara de electroforesis, primero se instalaron los peines en la bandeja, se procedió con el pesaje de la agarosa y se disolvió en el tampón Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE a 0.5X) utilizando un microondas hasta que se disolviera completamente,

obteniendo una concentración del 2% (p/v). Luego de atemperar la solución (45 a 50°C), se agregó Sybr Safe 0.5 µg/mL (4 – 8 µL según el tamaño de la cubeta que se utilizó).

La mezcla se vertió en la bandeja de electroforesis y se dejó solidificar. Posteriormente, se extrajo el peine y se llenó con el tampón TBE a una concentración de 0.5 X. Luego se tomó 8 µL de cada muestra y se mezclaron con 2 µL de loading buffers (Promega, EEUU) y se depositaron en cada pocillo. Los controles positivos para cada gen se agregaron en el primer pocillo, el control negativo en el segundo pocillo, se agregó 3 µL del marcador de peso molecular (100 pb) y se corrió a 80 V durante 40 min.

Finalmente, se observaron en el fotodocumentador con transiluminador de luz ultravioleta (UV) (UVP, BioDoc-It 220 Imaging System M-26V Transilluminator, Reino Unido), para la toma de imágenes y se registraron de los resultados (Figura 13).

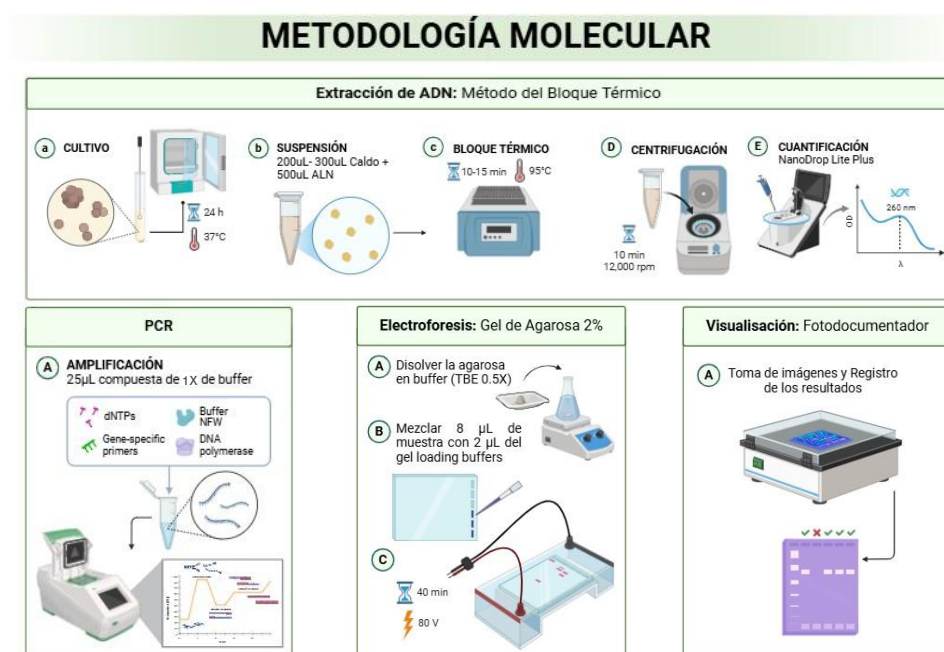


Figura 14. Procedimiento del método molecular para la Identificación de las cepas mediante la detección de los genes *nucA*, *ddlE* y *N.14*, y la detección del gen *mecA* en cepas de *S. aureus*. (Elaborado por Dayana Acevedo y Yetsenia Fruto).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

RESULTADOS

I. Identificación Clásica, Bioquímica y Molecular

Identificación Clásica

Se analizaron diversos aislados, los cuales fueron identificados presuntivamente como *S. aureus*, mediante cultivos microbiológicos utilizando CHROMagar™, agar Baird Parker y agar Manitol salado. La identificación se complementó con la observación morfológica con Tinción de Gram, junto con el resultado positivo en la prueba de catalasa.

Para la identificación presuntiva de *Enterococcus* spp., se emplearon medios de cultivos microbiológicos selectivos, como el agar Bilis Esculina, además de la Tinción de Gram y pruebas bioquímicas. Estas pruebas bioquímicas incluyeron el uso de caldo nutritivo con NaCl al 6.5%, caldo rojo fenol con arabinosa 5g/1000 mL y agar nutritivo con telurito al 0.04% para diferenciar *E. faecium* y *E. faecalis*.

En la planificación del estudio se contempló la obtención de un total de 25 cepas bacterias de cada sitio de muestreo. Sin embargo, debido a la naturaleza fastidiosa de estas bacterias y a la variabilidad propia del ambiente, no fue posible identificar el número planificado de cepas. A pesar de esta limitante, se trabajó con las 15 cepas obtenidas, que representan un conjunto significativo y representativo para el análisis en el marco de nuestra investigación.

Las identificaciones Bioquímicas realizadas con el sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux, Francia), con porcentajes de confianza $\geq 90\%$ son confiables, mientras que los porcentajes $<90\%$ son razonablemente confiables, aunque se sugiere confirmar con pruebas adicionales, si es necesario según el software de análisis de *Biomérieux Inc.*

A. Cepas aisladas en la PTAR de Juan Díaz

1. Identificación Bioquímica (Vitek 2)

De los aislamientos en la PTAR, se logró obtener un total de (n=25) cepas presuntivas de *S. aureus*. Al realizar la identificación por método automatizado (VITEK 2), se confirmaron el 80% de las mismas (20/25) (Tabla 5).

Por otro lado, se aislaron (n=25) cepas presuntivas de *Enterococcus* spp., logrando confirmar el 60% (15/25). En total se obtuvieron 10 (40%) cepas de *E. faecium* y 5 (20%) de *E. faecalis* (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de Identificación Bioquímica y Molecular de las cepas aisladas en la PTAR, CSS y EB3.

Lugar	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR)																																		
N°	1	2	R1	R2	3	4	R3	5	6	7	R4	8	9	R5	10	R6	11	12	13	R7	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
ID de Muestra	SAM1P1C1	SAM1P1C2	SAM1P1C3	SAM1P2C4	SAM1P2C5	SAM1P2C6	SAM1P3C7	SAM1P9C10	SAM1P7C16	SAM1P9C17	SAM1P9C21	SAM2P3C9	SAM2P3C10	SAM2P4C13	SAM2P4C14	SAM2P4C15	SAM2P4C16	SAM2P5C18	SAM2P5C20	SAM3P4C15	EFM1P1C2	EFM1P4C7	EFM1P7C13	EFM2P1C1	EFM2P1C3	EFM2P2C5	EFM2P2C8	EFM2P2C9	EFM2P3C10	EFM2P3C13	EFM2P4C14	EFM2P4C15	EFM2P4C16	EFM2P4C18	EFM3P4C13
ID Bioquímica (Vitek) %	95% <i>S. aureus</i>	91% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	87% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	95% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	95% <i>S. aureus</i>	91% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	91% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecium</i>	91% <i>E. faecium</i>	91% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecalis</i>	99% <i>E. faecalis</i>	95% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecium</i>	95% <i>E. faecalis</i>	91% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	85% <i>E. faecium</i>	91% <i>E. faecium</i>
ID Molecular (PCR)	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑
Lugar	Caja del Seguro Social (CSS)																																		
N°	R8	1	2	3	4	R9	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28					
ID de Muestra	CSSSAM4P2C1	CSSSAM4P3C2	CSSSAM4P3C3	CSSSAM4P5C13	CSSSAM4P6C14	CSSSAM4P6C15	CSSSAM4P6C17	CSSSAM4P6C20	CSSSAM4P6C23	CSSSAM4P6C24	CSSSAM4P6C26	CSSSAM4P6C18	CSSSAM4P6C19	CSSSAM5P6C27	CSSSAM5P6C28	CSSEFM1P1C1	CSSEFM2P1C1	CSSEFM2P1C2	CSSEFM2P1C3	CSSEFM2P1C4	CSSEFM2P1C5	CSSEFM2P2C7	CSSEFM2P2C8	CSSEFM2P2C9	CSSEFM2P3C14	CSSEFM2P4C16	CSSEFM2P4C17	CSSEFM2P4C18	CSSEFM2P4C19	CSSEFM2P3C13					
ID Bioquímica (Vitek) %	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	95% <i>S. aureus</i>	87% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	95% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	95% <i>S. aureus</i>	91% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	91% <i>S. aureus</i>	87% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	99% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	96% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecalis</i>	96% <i>E. faecium</i>	99% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	99% <i>E. faecalis</i>	99% <i>E. faecalis</i>	99% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>			
ID Molecular (PCR)	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	

Lugar	Estación de Bombeo de la Cinta Costera 3 (EB3)																													
N°	1	2	R10	3	4	5	R11	6	R12	R13	7	R14	R15	R16	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
ID de Muestra	EB3SAM2P4C1	EB3SAM2P4C3	EB3SAM3P2C2	EB3SAM3P2C3	EB3SAM3P3C5	EB3SAM3P4C7	EB3SAM3P5C8	EB3SAM3P5C9	EB3SAM3P6C10	EB3SAM3P7C12	EB3SAM3P7C13	EB3SAM3P9C15	EB3SAM3P12C23	EB3SAM3P14C24	EB3SAM3P15C27	EB3EFM1P1C1	EB3EFM1P2C5	EB3EFM1P2C6	EB3EFM1P3C11	EB3EFM1P3C12	EB3EFM1P2C16	EB3EFM1P2C18	EB3EFM2P1C1	EB3EFM2P2C6	EB3EFM2P1C8	EB3EFM2P1C9	EB3EFM2P2C10	EB3EFM2P5C17	EB3EFM2P5C18	EB3EFM2P3C13
ID Bioquímica (Vitek) %	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	95% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	95% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	95% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	99% <i>S. aureus</i>	91% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecium</i>	91% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecium</i>	91% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	91% <i>E. faecium</i>	91% <i>E. faecium</i>	87% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecium</i>	99% <i>E. faecalis</i>	91% <i>E. faecalis</i>	87% <i>E. faecalis</i>	91% <i>E. faecium</i>
ID Molecular (PCR)																														

1. Identificación Molecular (PCR)

En la Tabla 5, se muestra que en el 100% (20/20) de las muestras de *S. aureus* analizadas, provenientes de la PTAR, se detectó la presencia del gen *nucA*, con una banda de 270 pb (Figura 14). En el caso de *E. faecium*, se observó la presencia del gen *ddlE* en el 100% (10/10) de las cepas analizadas, mostrando un tamaño de 658 pb (Figura 15).

Por último, en los aislados de *E. faecalis* se detectó la presencia del gen *N.14* en el 100% (5/5) de las muestras, con un amplicón de 533 pb (Figura 16).

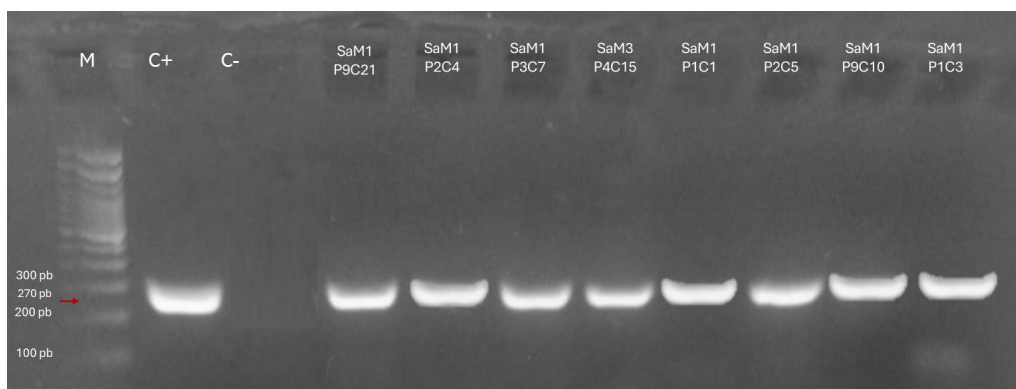


Figura 15. Producto de PCR para la detección del gen *nucA* (270 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de la PTAR-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2: Control positivo (cepa de *S. aureus* ATCC 6538). Carril 3: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 4-11: Producto amplificado de las cepas de *S. aureus*.

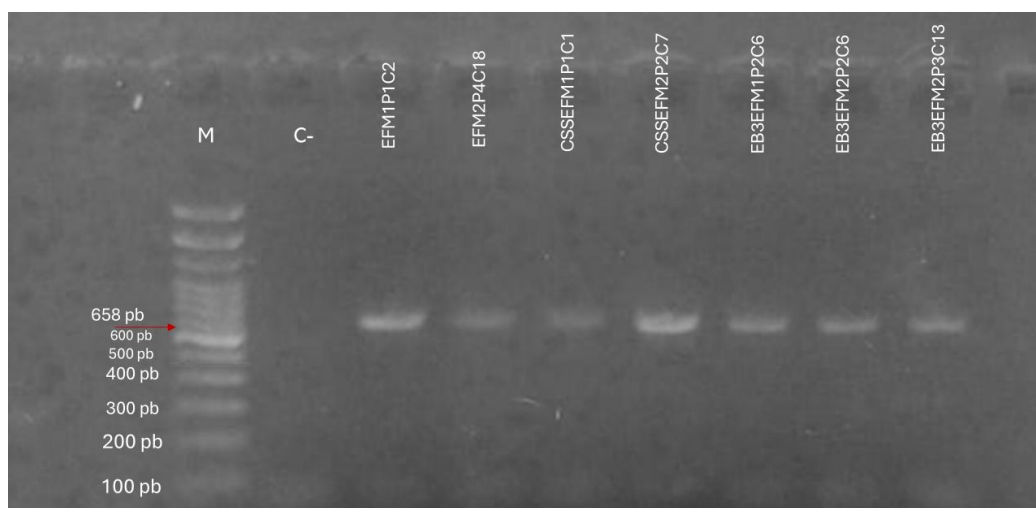


Figura 16. Producto de PCR para la detección del gen *ddIE* (658 pb) en cepas de *E. faecium* aisladas de la PTAR, CSS y EB3-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 3-4: Producto amplificado de las cepas de *E. faecium* aisladas en la PTAR. Carril 5-6: Producto amplificado de las cepas de *E. faecium* aisladas de la CSS. Carril 7-9: Producto amplificado de las cepas de *E. faecium* aisladas de la EB3.

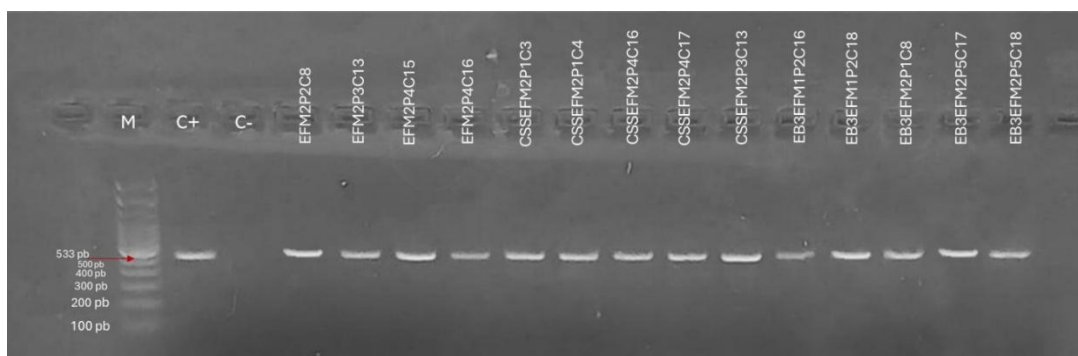


Figura 17. Producto de PCR para la detección del gen *N.14* (533 pb) en cepas de *E. faecalis* aisladas de la PTAR, CSS y EB3-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2: Control positivo (cepa de *E. faecalis* ATCC 29212). Carril 3: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 4-7: Producto amplificado de las cepas de *E. faecalis* aisladas en la PTAR. Carril 8-12: Producto amplificado de las cepas de *E. faecalis* aisladas de la CSS. Carril 13-17: Producto amplificado de las cepas de *E. faecalis* aisladas de la EB3.

B. Cepas aisladas en la CSS

1. Identificación Bioquímica (Vitek 2)

En los aislamientos realizados en la CSS, se obtuvieron un total de (n=25) aislados presuntivos de *S. aureus*. A través de la prueba confirmatoria por VITEK 2, se confirmó el 60% (15/25). De manera similar, se aislaron un total de (n=25) cepas presuntivas de *Enterococcus* spp., las cuales 60% fueron confirmadas (15/25). De estas, 3 (12%) corresponden a *E. faecium* y 12 (48%) a *E. faecalis* (Tabla 5).

2. Identificación Molecular (PCR)

En la Tabla 5, se muestra que en el 100% (15/15) de las muestras de *S. aureus* analizadas, provenientes de la CSS, se detectó la presencia del gen *nucA*, con una banda de 270 pb (Figura 17). En el caso de *E. faecium*, se observó la presencia del gen *ddlE* en el 100% (3/3) de las cepas analizadas, mostrando un patrón de banda de 658 pb (figura 15). Por último, en los aislados de *E. faecalis* se detectó la presencia del gen *N.14* en el 100% (12/12) de las muestras, con un amplicón de 533 pb (Figura 16).

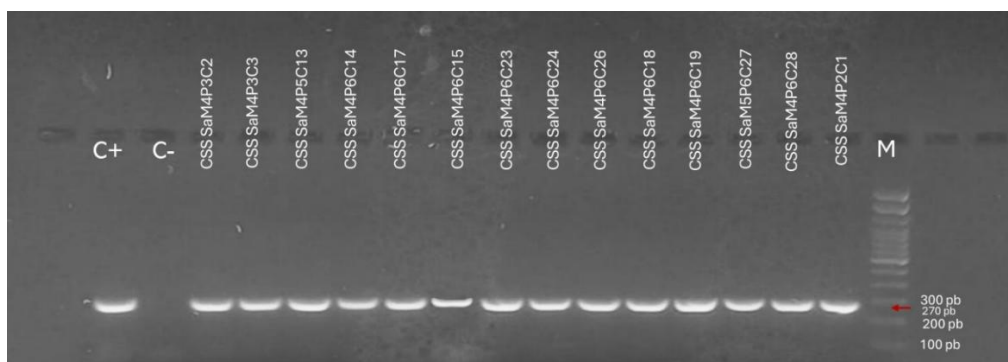


Figura 18. Producto de PCR para la detección del gen *nucA* (270 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de la CSS-Panamá. Carril 1: Control positivo (cepa de *S. aureus* ATCC 6538). Carril 2: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 3-16: Producto amplificado de las cepas de *S. aureus*. Carril 17: Marcador de peso molecular (100 pb).

C. Cepas aisladas en la EB3

1. Identificación Bioquímica (Vitek 2)

Se logró obtener un total de (n=25) cepas presuntivas de *S. aureus*, en la fase de aislamiento de UFC. Estas cepas fueron analizadas con el sistema Vitek 2 (bioMérieux, Francia), logrando una confirmación del 60% (15/25). En paralelo, se aislaron un total de (n=25) cepas presuntivamente de *Enterococcus* spp., de las cuales solo el 56% (14/25) fueron confirmadas. De estas cepas, 7 (28%) cepas correspondían a *E. faecium* y 7 (28%) a *E. faecalis* (Tabla 5).

2. Identificación Molecular (PCR)

En la Tabla 5, se muestra que en el 100% (15/15) de las muestras de *S. aureus* analizadas, provenientes de la EB3, se detectó la presencia del gen *nucA*, con una banda de 270 pb (Figura 18). En el caso de *E. faecium*, se observó la presencia del gen *ddlE* en el 100% (8/8) de las cepas analizadas, mostrando un patrón de bandas de 658 pb (figura 15). Por último, en los aislados de *E. faecalis* se detectó la presencia del gen *N.14* en el 100% (7/7) de las muestras, con una banda de 533 pb (Figura 16).

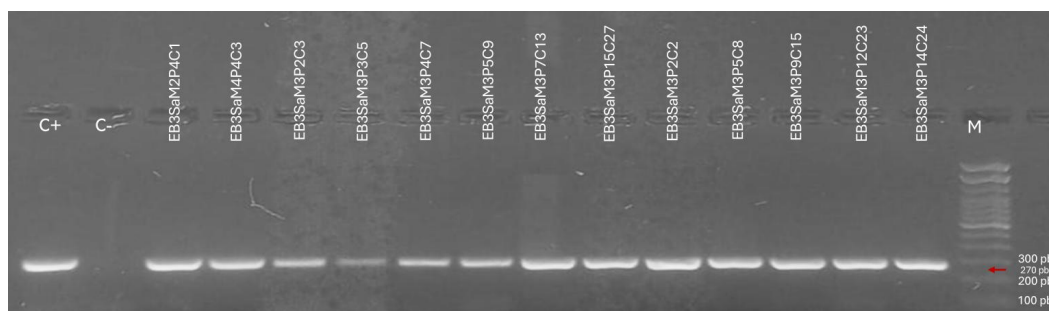


Figura 19. Producto de PCR para la detección del gen *nucA* (270 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de la EB3-Panamá. Carril 1: Control positivo (cepa de *S. aureus* ATCC 6538). Carril 2: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 3-15: Producto amplificado de las cepas de *S. aureus*. Carril 17: Marcador de peso molecular (100 pb).

II. Perfil de susceptibilidad mediante el sistema Vitek 2 y PCR

A. Cepas de *S. aureus*

1. Cepas de *S. aureus* aisladas en la PTAR de Juan Díaz

De un total (n=20) aislados analizados, se obtuvo que el 70% (14/20) de las cepas presentaron resistencia a uno o más antibióticos, entre estos: 35% (7/20) a Cefoxitina, 70% (14/20) a Bencilpenicilina, 35% (7/20) a Oxacilina, 25% (5/20) a Clindamicina, 25% (5/20) a Eritromicina y un 20% (4/20) a Tetraciclina (Tabla 6).

2. Cepas de *S. aureus* aisladas en CSS

En el análisis del perfil de susceptibilidad de un total (n=15) aislados analizados, se obtuvo que el 13% (2/15) de las cepas presentaron resistencia a uno o más antibióticos, entre estos: 13% (2/15) a Cefoxitina, 13% (2/15) a Bencilpenicilina, 13% (2/15) a Oxacilina, y un 7% (1/15) a Tetraciclina (Tabla 6).

3. Cepas de *S. aureus* aisladas en EB3

En el análisis del perfil de susceptibilidad de un total (n=15) aislados analizados, se obtuvo que el 80% (12/15) de las cepas presentaron resistencia a uno o más antibióticos, entre estos: 47% (7/15) a Cefoxitina, 80% (12/15) a Bencilpenicilina, 47% (7/15) a Oxacilina, y de igual manera un 47% (7/15) a Tetraciclina, además, debemos mencionar, que solo un aislado presentó resistencia intermedia a la ceftarolina (Tabla 6).

III. Tabla 6. Perfil de susceptibilidad de cepas de *S. aureus*.

Antibiótico Colonias	β-Lactámicos				Quinolonas		Lin- cosamidas	Macrólidos	Oxa- zolidinona	Lipo- peptídico	Glucó- péptidos	Tetra- ciclinas	Nitrofuranos	Rifamicinas	Sulfonamida
	Cefoxitina	Bencilpenicilina	Oxacilina	Ceftarolina	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Clindamicina	Eritromicina	Linezolid	Daptomicina	Vancomicina	Tetraciclina	Nitrofurantoina	Rifampicina	Sulfametoxazol
MUESTRAS PTAR															
SAM1P1C1	-														
SAM1P1C2	-														
SAM1P1C3	+														
SAM1P2C4	+														
SAM1P2C5	-														
SAM1P2C6	-														
SAM1P3C7	+														
SAM1P9C10	-														
SAM1P7C16	-														
SAM1P9C17	-														
SAM1P9C21	+														
SAM2P3C9	-														
SAM2P3C10	-														
SAM2P4C13	+														
SAM2P4C14	-														
SAM2P4C15	+														
SAM2P4C16	-														
SAM2P5C18	-														
SAM2P5C20	-														
SAM3P4C15	+														
MUESTRAS CSS															
CSSSAM4P2C1	+														
CSSSAM4P3C2	-														
CSSSAM4P3C3	-														
CSSSAM4P5C13	-														
CSSSAM4P6C14	-														
CSSSAM4P6C15	+														
CSSSAM4P6C17	-														
CSSSAM4P6C20	-														
CSSSAM4P6C23	-														
CSSSAM4P6C24	-														
CSSSAM4P6C26	-														
CSSSAM4P6C18	-														
CSSSAM4P6C19	-														
CSSSAM5P6C27	-														
CSSSAM5P6C28	-														
MUESTRAS EB3															
EB3SAM2P4C1	-														
EB3SAM2P4C3	-														
EB3SAM3P2C2	+														
EB3SAM3P2C3	-														
EB3SAM3P3C5	-														
EB3SAM3P4C7	-														
EB3SAM3P5C8	+														
EB3SAM3P5C9	-														
EB3SAM3P6C10	+														
EB3SAM3P7C12	+														
EB3SAM3P7C13	-														
EB3SAM3P9C15	+														
EB3SAM3P12C23	+														
EB3SAM3P14C24	+														
EB3SAM3P15C27	-														

Resultados No determinados (ND): Ampicilina / Gentamicina / Estreptomicina

susceptible intermedio resistente

B. Cepas de *Enterococcus* spp.

1. Cepas de *Enterococcus* spp. de la PTAR

En el análisis del perfil de susceptibilidad de un total (n=15) aislados analizados, se obtuvo que el 40% (6/15) de las cepas presentaron resistencia a uno o más antibióticos, entre estos: 7% (1/15) a Estreptomicina, 27% (4/15) a Eritromicina y un 20% (3/15) a Tetraciclina, mientras que otros aislados evidenciaron resistencias intermedias: 27% (4/15) a Eritromicina, 13% (2/15) a Daptomicina y por último un 33% (5/15) a Nitrofurantoína (Tabla 7).

2. Cepas de *Enterococcus* spp. de la CSS

En el análisis del perfil de susceptibilidad de un total (n=15) aislados analizados, se obtuvo que el 20% (3/15) de las cepas presentaron resistencia a uno o más antibióticos, entre estos: 13% (2/15) a Estreptomicina, 13% (2/15) a Eritromicina y un 20% (3/15) a Tetraciclina, mientras que otros aislados evidenciaron resistencias intermedias: 85% (12/15) a Eritromicina, 20% (3/15) a Daptomicina y por último un 6.6% (1/15) a Nitrofurantoina (Tabla 7).

3. Cepas de *Enterococcus* spp. de la EB3

En el análisis del perfil de susceptibilidad de un total (n=15) aislados analizados, se obtuvo que el 33% (5/15) de las cepas presentaron resistencia a uno o más antibióticos, entre estos: 6% (1/15) a Gentamicina, 6% (1/15) a Ciprofloxacino, 6% (1/15) a Levofloxacino, 20% (3/15), a Eritromicina, 26% (4/15) a Tetraciclina y un 6% (1/15) a Nitrofurantoina, mientras que otros aislados evidenciaron resistencias intermedias: 73% (11/15) a Eritromicina y 6% (1/15) a Daptomicina (Tabla 7).

Tabla 7. Perfil de susceptibilidad de cepas de *Enterococcus* spp.

		β-Lactámicos		Aminoglucósidos		Quinolonas		Macrólidos	Oxa-zolidinona	Lipo-peptídico	Gluco-péptidos	Tetra-ciclina	Nitrofuranos
Especie	Antibiótico	Bencilpenicilina	Ampicilina	Gentamicina (Sinergia)	Estreptomicina (sinergia)	ciprofloxacino	Levofloxacino	Eritromicina	linezolid	Daptomicina	Vancomicina	Tetraciclina	Nitrofurantoina
	Colonia												
Muestras PTAR													
<i>E. faecium</i>	EFM1P1C2												
<i>E. faecium</i>	EFM1P4C7												
<i>E. faecium</i>	EFM1P7C13												
<i>E. faecium</i>	EFM2P1C1												
<i>E. faecium</i>	EFM2P1C3												
<i>E. faecalis</i>	EFM2P2C5												
<i>E. faecalis</i>	EFM2P2C8												
<i>E. faecium</i>	EFM2P2C9												
<i>E. faecium</i>	EFM2P3C10												
<i>E. faecalis</i>	EFM2P3C13												
<i>E. faecium</i>	EFM2P4C14												
<i>E. faecalis</i>	EFM2P4C15												
<i>E. faecalis</i>	EFM2P4C16												
<i>E. faecium</i>	EFM2P4C18												
<i>E. faecium</i>	EFM3P4C13												
Muestras CSS													
<i>E. faecium</i>	CSSEFM1P1C1												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P1C1												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P1C2												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P1C3												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P1C4												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P1C5												
<i>E. faecium</i>	CSSEFM2P2C7												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P2C8												
<i>E. faecium</i>	CSSEFM2P2C9												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P3C13												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P3C14												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P4C16												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P4C17												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P4C18												
<i>E. faecalis</i>	CSSEFM2P4C19												
Muestras EB3													
<i>E. faecium</i>	EB3EFM1P1C1												
<i>E. faecalis</i>	EB3EFM1P2C5												
<i>E. faecium</i>	EB3EFM1P2C6												
<i>E. faecium</i>	EB3EFM1P3C11												
<i>E. faecium</i>	EB3EFM1P3C12												
<i>E. faecalis</i>	EB3EFM1P2C16												
<i>E. faecalis</i>	EB3EFM1P2C18												
<i>E. faecium</i>	EB3EFM2P1C1												
<i>E. faecium</i>	EB3EFM2P2C6												
<i>E. faecalis</i>	EB3EFM2P1C8												
<i>E. faecium</i>	EB3EFM2P1C9												
<i>E. faecalis</i>	EB3EFM2P2C10												
<i>E. faecalis</i>	EB3EFM2P5C17												
<i>E. faecalis</i>	EB3EFM2P5C18												
<i>E. faecium</i>	EB3EFM2P3C13												
Resultados No determinados (ND): Cefoxitina/ Ceftarolina/ Clindamicina/ Rifampicina/ Sulfametoxazol													
susceptible intermedio resistente													

susceptible intermedio resistente

Como se logra observar en las tablas, las cepas evaluadas presentaron diversos patrones de resistencia; el más frecuente en *S. aureus*, fue el de la resistencia a β-lactámicos con un 56%, (28/50), para la PTAR 70% (14/20), CSS 13% (2/15) y EB3 80% (12/15). En *Enterococcus* spp., fue el de resistencia a Tetraciclina con un 22% (10/45), para la PTAR 20% (3/15), CSS 20% (3/15) y EB3 26% (4/15) (Figura 19 y 20).

Además, se identificó que el 20% (4/20) de las cepas de *S. aureus* de la PTAR mostraron multirresistencia. Por otro lado, se observó que el 10% (3/30) de las cepas de *Enterococcus* spp. También presentaron multirresistencia, con un 13% (2/15) en la CSS y un 6% (1/15) en la EB3 (Figura 19 y 20).

Asimismo, de las 50 cepas de *S. aureus* evaluadas, solo el 32% (16/50), mostró resistencia a cefoxitina y oxacilina. Este resultado se distribuyó de la siguiente manera: PTAR 35% (7/20), CSS 14% (2/14) y EB3 50% (7/14).

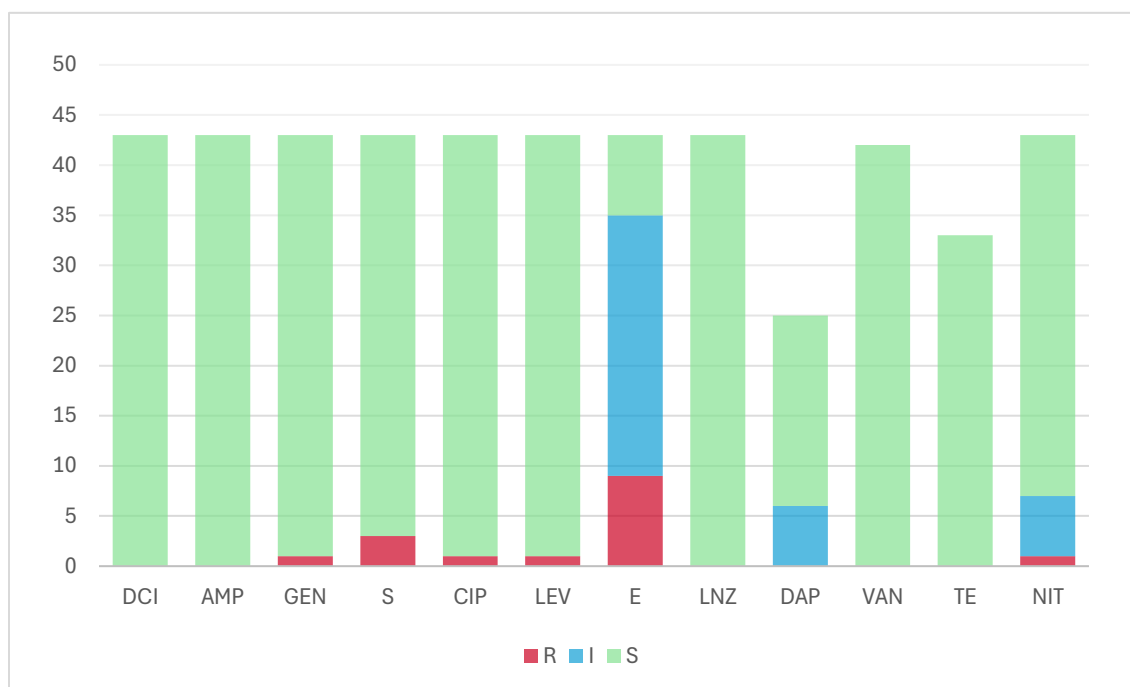


Figura 20. Resistencia a antibióticos en las 45 cepas de *Enterococcus* spp. Por medio del Vitek 2 (bioMérieux, Francia). Antibióticos: Bencilpenicilina (DCI), Ampicilina (AMP), Gentamicina (GEN), Estreptomicina (S), Ciprofloxacino (CIP), Levofloxacino (LEV), Eritromicina €, Linezolid (LNZ), Daptomicina (DAP), Vancomicina (VAN), Tetraciclina (TE), Nitrofurantoina (NIT).

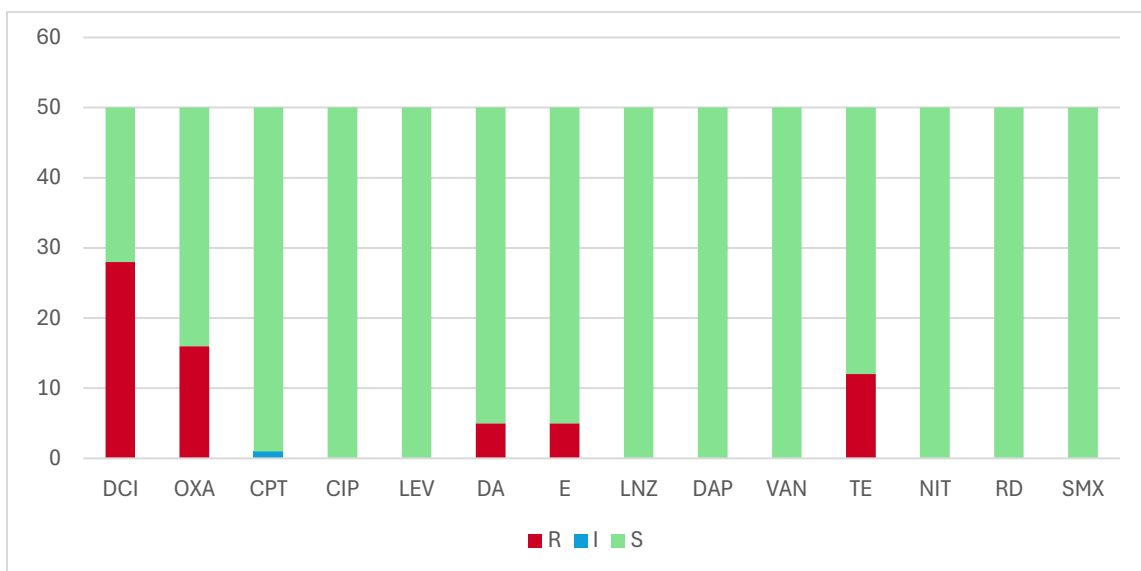


Figura 21. Resistencia a antibióticos en las 50 cepas de *S. aureus* por medio del Vitek 2 (bioMérieux, Francia). Antibióticos: Bencilpenicilina (DCI), Oxacilina (OXA), Ceftarolina (CPT), Ciprofloxacino (CIP), Levofloxacino (LEV), Clindamicina (DA), Eritromicina €, Linezolid (LNZ), Daptomicina (DAP), Vancomicina (VAN), Tetraciclina (TE), Nitrofurantoina (NIT), Rifampicina (RD), Sulfametoxazol (SMX).

La resistencia observada sugiere la posible presencia del gen *mecA*, asociado a la resistencia mediada por la proteína de unión a penicilina (PBP2a) o, alternativamente, a la resistencia a meticilina.

Para confirmar los resultados obtenidos por el sistema Vitek 2 (bioMérieux, Francia), se realizó la detección del gen *mecA* mediante PCR en las 16 cepas que mostraron resistencia a los β -lactámicos (cefotaxima y oxacilina). De estas, el 56% (9/16) resultaron positivas para la presencia del gen *mecA*, evidenciado por la amplificación de un fragmento de 310 pb (Figura 21).

Adicionalmente, se realizó la prueba de PCR en las 34 cepas que no presentaron resistencia a cefotaxima y oxacilina en el sistema Vitek 2 (bioMérieux, Francia). Solo el 3% (1/34) resultó positiva para la detección del gen *mecA* (EB3SAM3P2C3) y también con un patrón de banda de 310 (Figura 22).

Mediante PCR se obtuvo 20% (10/50) de muestras positivas al gen *mecA*, mientras que por el sistema Vitek 2 se obtuvo el 32% (16/50) cepas positivas (Figura 23).

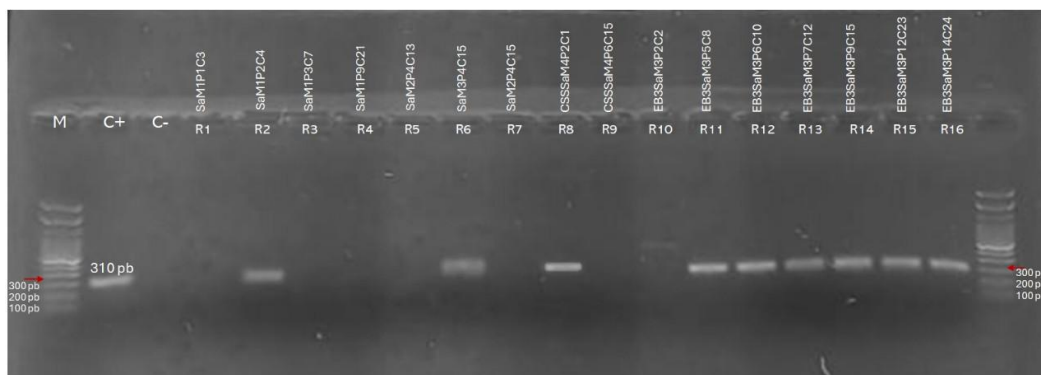


Figura 22. Producto de PCR para la detección del gen *mecA* (310 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de la PTAR, CSS y EB3-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100pb). Carril 2: Control positivo (cepa de *S. aureus* ATCC 43300). Carril 3: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 4-19: Producto amplificado de las cepas de *S. aureus*. Carril 20: Marcador de peso molecular (100 pb).

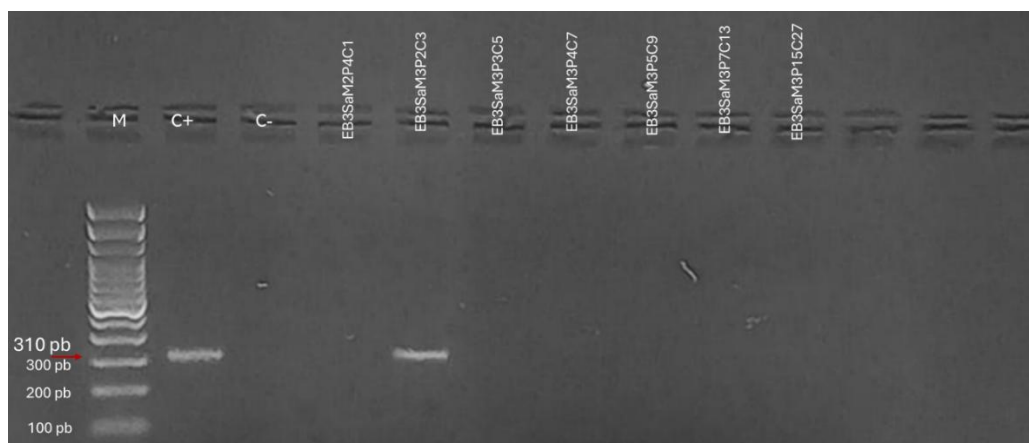


Figura 23. Producto de PCR para la detección del gen *mecA* (310 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de la EB3-Panamá. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 2: Control positivo (cepa de *S. aureus* ATCC 43300). Carril 3: Control negativo (Mezcla del master mix con cebadores sin la muestra). Carril 4-10: Producto amplificado de las cepas de *S. aureus*.

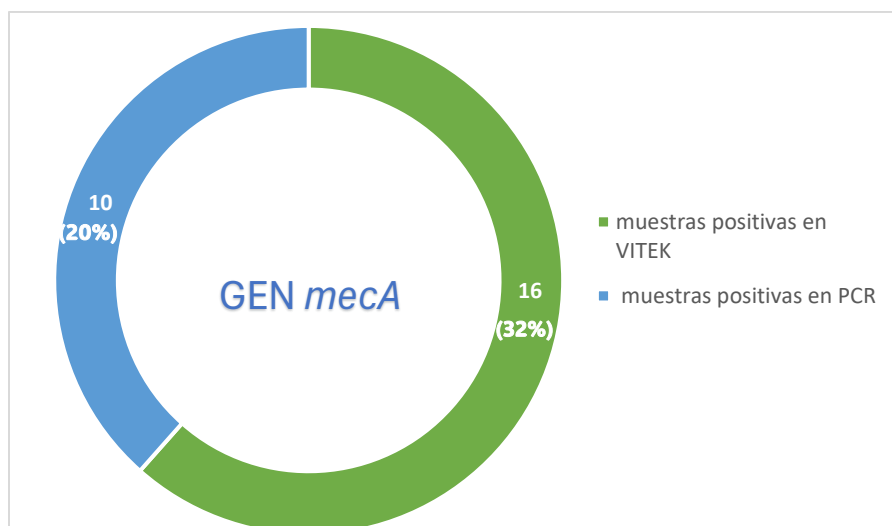


Figura 24. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos (PCR y Vitek 2) (bioMérieux, Francia) utilizados para la detección del gen *mecA* en muestras de *S. aureus*, donde se obtuvo por PCR 20% (10/50) muestras positivas al gen *mecA*, mientras que por el sistema Vitek 2 se obtuvo el 32% (16/50) cepas positivas.

DISCUSIÓN

En este estudio investigamos la presencia de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* en efluentes hospitalarios y la PTAR, utilizando el sistema automatizado de Vitek 2 para identificación bioquímica de las especies (bioMérieux, Francia) y la prueba de PCR para su confirmación. Los resultados obtenidos permitieron identificar 50 cepas de *S. aureus* y 45 cepas de *Enterococcus* spp. (21 *E. faecium* y 24 *E. faecalis*) en diferentes efluentes de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR de la Ciudad, lo que resalta la presencia de estas bacterias y evidencia claramente la falta de un tratamiento adecuado en los hospitales. Esto pone de manifiesto la necesidad urgente de mejorar los protocolos para la eliminación de residuos hospitalarios, con el fin de evitar los riesgos de contaminación y propagación de estas bacterias (Bhujbal, 2024; Amin et al., 2024).

El análisis de estudios previos a nivel mundial ha mostrado que las PTAR podrían ser una de las principales rutas de diseminación de BRA hacia el ambiente, tal como sugirieron Girijan y Pillai (2021).

En cuanto a la variabilidad en los porcentajes en la identificación de *S. aureus* en la PTAR, se observó una tasa de confirmación del 80%, mientras que en la CSS y EB3 las tasas fueron más bajas, alcanzando solo el 60%. Estos resultados pueden atribuirse a factores como la diferencia en las condiciones ambientales y disponibilidad de nutrientes. Además, dado que la PTAR es un entorno más controlado, podría favorecer la proliferación y persistencia de este patógeno.

Estos hallazgos concuerdan con estudios previos sobre la prevalencia de *S. aureus* en aguas residuales realizados por Oliveira et al. (2020); Rosenberg et al. (2012); Amirsoleimani et al. (2019). En dichos estudios se detectó la presencia de *S. aureus* resistente, incluidas cepas multirresistentes, en un alto porcentaje de aguas residuales crudas y en un porcentaje reducido del efluente tratado.

En particular, el estudio de Amirsoleimani et al. reportó la persistencia de clones hospitalarios (CC5) y comunitarios (CC8) de *S. aureus* a lo largo del tratamiento, así como una notable diversidad genética, lo que sugiere que las PTARs pueden funcionar como reservorios y puntos de evolución para cepas patógenas. En conjunto, estos estudios destacan no solo la

prevalencia de *S. aureus* en aguas residuales, sino también el riesgo de exposición a bacterias resistentes incluso después del tratamiento.

Por último, los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR confirmaron de manera consistente las identificaciones obtenidas con el sistema Vitek 2 (bioMérieux, Francia), al detectar la presencia del gen *nucA* en todas las cepas de *S. aureus*. Este método ha sido validado previamente por diversos autores como Hamdan et al. (2015) y Brakstad et al. (1992), lo que refuerza su fiabilidad como herramienta diagnóstica. Ambos estudios se centraron en la detección del gen *nucA* en cepas de *S. aureus* mediante PCR, confirmando su presencia en la gran mayoría de los aislados coagulasa positivos. Asimismo, se confirmó la presencia del gen *ddlE* Faecium en todas las cepas de *E. faecium* (Ünal et al., 2017; Jahansepa et al., 2018) y la presencia del gen *N.14* en todas las cepas de *E. faecalis*, Xiang et al. (2023). Estos resultados evidencian la alta especificidad de la técnica empleada para la identificación de estas especies bacterianas.

Las aguas residuales de los hospitales pueden ser una fuente peligrosa para la propagación de cepas bacterianas resistentes, ya que son uno de los principales contribuyentes a la aparición y diseminación de estas, incluyendo la mayoría de los *S. aureus* patógenos y *Enterococcus* spp. Diversos estudios han demostrado que el análisis de bacterias resistentes a los antibióticos en aguas residuales hospitalarias podrían ser una manera práctica de vigilar la resistencia antimicrobiana en bacterias provenientes de muestras clínicas (Kwak et al., 2015; Girijan y Pillai, 2021).

No se encontraron estudios locales ni nacionales, que hayan evaluado la presencia de *S. aureus* y *Enterococcus* spp. en efluentes de aguas residuales hospitalarias, ni en la PTAR. Tampoco se hallaron investigaciones relacionadas con la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas. Sin embargo, sí existen investigaciones a nivel internacional que respaldan nuestros hallazgos.

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana obtenido en el presente estudio reveló que el 56% (28/50) de los aislados de *S. aureus* fueron resistentes a β -lactámicos, destacando particularmente las muestras provenientes de la PTAR (28%) y EB3 (24%). Los estafilococos cuentan con dos principales mecanismos de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos. El primero consiste en la producción de β -lactamasas, que son enzimas capaces de

descomponer los antibióticos β -lactámicos mediante un proceso de hidrólisis. El segundo mecanismo se basa en la presencia de la proteína fijadora de penicilina 2a (PBP 2a), la cual no es alterada por estos antibióticos. Las cepas de *S. aureus* que presentan resistencia a través de β -lactamasas, PBP 2a, o incluso ambos mecanismos, han logrado adaptarse al entorno patógeno humano. La aparición y proliferación de cepas SARM desde los años 60 ha representado un desafío significativo para el tratamiento de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) a nivel mundial (Fuda et al., 2005). Estos resultados concuerdan con investigaciones internacionales que también reportan la presencia de cepas resistentes a β -lactámicos, especialmente aquellas que portan el gen *mecA*, asociado con SARM. Un ejemplo de ello es el primer informe realizado en EEUU por Rosenberg et al. (2012), quienes detectaron SARM en todas las PTARs incluidas en su estudio, con una prevalencia total del 50% (22/44), siendo el 60% (12/20) en el Atlántico Medio y el 42% (10/24) en el Medio Oeste. Además, al igual que nuestros resultados, estos aislados mostraron alta resistencia a eritromicina (82%), clindamicina (22%) y tetraciclina (14%), lo cual concuerda con lo observado en nuestro estudio: 25% de resistencia a eritromicina, 25% a clindamicina y 36% a Tetraciclina. Es importante mencionar que los genes responsables de la resistencia a las tetraciclinas se clasifican en cuatro categorías según su mecanismo: eflujo activo, protección ribosomal, inactivación enzimática y modificación de la permeabilidad celular (Akya et al., 2020).

Investigaciones previas en Suecia, como el de Börjesson et al. (2009), ya habían demostrado el efecto de los procesos de tratamiento de aguas residuales sobre las concentraciones del gen *mecA* y la prevalencia de SARM a lo largo del tiempo, utilizando la PCR en tiempo real. Estos resultados también coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, en el que se detectó SARM en las cepas de la PTAR, CSS y EB3, con mayor prevalencia en la PTAR y la EB3 (46% en ambos sitios). Mientras que los resultados del gen *mecA* fueron distintos, ya que se detectó mayor prevalencia en la EB3 (14%), con respecto a la PTAR (4%).

En Irán, Akya et al. (2020), reportaron que el 11% y 8% de los aislados obtenidos en la PTAR del Hospital Imam Reza fueron positivos para SAMR en muestras de aguas residuales crudas y tratadas, respectivamente. De un total de 60 aislados, 59 (98%) fueron MDR. El gen de *mecA* fue uno de los más prevalentes, detectado en el 100% de las muestras tanto crudas

como tratadas, mientras que ninguno de los aislados ($n = 60$) fue positivo para el gen *vanB*. Además, los aislados de SARM ($n=40$) mostraron altos niveles de resistencia a la penicilina (100%), oxacilina (100%), clindamicina (85%) y tetraciclina (45%), lo que refleja la notable capacidad de *S. aureus* para desarrollar mecanismo de resistencia frente nuevos antibióticos, desde la penicilina hasta la meticilina (Girijan y Pillai, 2021).

Algunos estudios también sugieren que el tamaño de los hospitales puede tener un impacto en la presencia de SARM en las aguas residuales y el tratamiento de aguas residuales podría reducir su concentración (Akya et al., 2020). Estos estudios observaron una reducción de SARM conforme avanzaban las etapas del tratamiento. Estos hallazgos sugieren que la implementación integral del tratamiento de aguas residuales en entornos hospitalarios podría contribuir a la reducción en las concentraciones de SARM.

La clindamicina es un antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis proteica bacteriana al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma. En *S. aureus*, la resistencia más común se debe al gen *erm*, que codifica una metiltransferasa capaz de dimetilar la adenina 2028 del ARNr 23S (Fernández et al., 2004). Esta modificación altera el sitio de unión ribosomal, reduciendo la afinidad de la clindamicina y otros con el mismo blanco, como los macrólidos, las lincosamidas y las streptogramina B (MLSB), generando resistencia del tipo MLSB. La expresión del gen puede ser constitutiva (MLSB-c), donde las cepas presentan resistencia a todos los MLSB o inducible (MLSB-i), en cuyo caso la resistencia se manifiesta en presencia de antibióticos inductores de la síntesis de metilasa (Bonikowska et al., 2022).

En este estudio se detectó la presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos del grupo MLSB, con un 2% de resistencia MLSB-i y un 8% de resistencia MLSB-c. Estas cifras son similares a la informada por Fernández et al. (2004) en un estudio realizado en el Centro Médico Docente La Trinidad, en Venezuela, donde analizaron 74 cepas clínicas y encontraron un 14,86% de resistencia MLSB-c y un 4,05% de MLSB-i. Asimismo, los datos concuerdan parcialmente con el estudio de Pardo et al. (2020) en Uruguay, en el que se evaluaron 100 aislamientos clínicos de *S. aureus* (53 SAMS y 47 SARM), observando una prevalencia del 32% de resistencia MLSB (22% MLSB-c y 10% MLSB-i).

En las últimas décadas, el Enterococcus ha surgido como un patógeno importante en infecciones nosocomiales, como bacteriemias e infecciones urinarias, ya que ha desarrollado

resistencia a numerosos agentes antimicrobianos. Esto limita las opciones terapéuticas y representa un problema de salud pública. Su presencia en aguas residuales que constituyen un reservorio importante de estas cepas es preocupante, ya que estos microorganismos pueden sobrevivir, multiplicarse y contaminar otras fuentes de agua, propagando infecciones entre la población (Fonseca et al., 2012).

En las últimas décadas, el *Enterococcus* ha surgido como un patógeno importante en infecciones nosocomiales, como bacteriemias e infecciones urinarias, ya que ha desarrollado resistencia a numerosos agentes antimicrobianos. Esto limita las opciones terapéuticas y representa un problema de salud pública. Su presencia en aguas residuales constituye un reservorio importante de estas cepas, y es preocupante ya que, estos microorganismos pueden sobrevivir, multiplicarse y contaminar otras fuentes de agua, propagando infecciones entre la población (Fonseca et al., 2012).

En este estudio, se logró aislar 45 cepas de *Enterococcus* spp. (44% *E. faecium* y 55% *E. faecalis*) lo que coincide con estudios realizados por Fonseca et al. (2012), donde obtuvieron 21 aislados de *E. faecalis* y 5 de *E. faecium* en plantas de tratamiento de aguas residuales de León, Nicaragua. Además de un trabajo realizado en aguas servidas del colector del Hospital de Antofagasta y de las PTAR de Cascal Norte y Cascal Sur Chile donde la especie más frecuentemente aislada fue *E. faecalis* (65%), y en menor proporción *E. faecium* (14%) (Silva et al., 2005).

Al analizar el perfil de susceptibilidad de las cepas de *Enterococcus* spp. no se detectaron cepas resistentes a β -lactámicos, específicamente a bencilpenicilina y ampicilina. Estos resultados son aceptables para las cepas de *E. faecalis*, ya que, según en la literatura, rara vez se observa una resistencia significativa a la ampicilina en comparación con los aislados clínicos, principalmente los de *E. faecium* (Cercenado, 2011).

Sin embargo, los resultados obtenidos para *E. faecium* no coinciden con lo descrito en la literatura, que indica que los enterococos, principalmente *E. faecium*, poseen resistencia natural intrínseca a los β -lactámicos. Esta resistencia se debe a la baja afinidad de sus proteínas de unión a penicilinas (PBP o penicillin-binding proteins) por estos antibióticos (Silva et al., 2006). Estudios realizados en Chile por Fonseca et al. (2012), reportaron cepas de *E. faecium* con resistencia a penicilina y ampicilina. La ausencia de resistencia a β -

lactámicos en nuestro estudio podría explicarse, ya que, se ha descrito que *E. faecium* se ha dividido en dos clados principales: A y B. Se ha demostrado que el clado B está principalmente asociado con infecciones adquiridas en la comunidad y las cepas de este clado no presentan la resistencia a β -lactámicos típica de las del clado A (Faury et al., 2023).

En cuanto a la resistencia presentada a aminoglucósidos (8%), se debe a que los enterococos presentan resistencia intrínseca de bajo a moderado grado a estos antibióticos, lo que limita su eficiencia en monoterapia. Sin embargo, cuando se asocia un aminoglucósido con otro antibiótico que actúe sobre la pared celular, como un β -lactámico o un glucopéptido, se produce un efecto sinérgico bactericida, necesario para el tratamiento de infecciones graves (Cercenado et al., 2011; Calderón-Parra et al., 2022).

En el caso de los macrólidos y las lincosamidas, estos antibióticos no se utilizan para el tratamiento de las infecciones enterocócicas debido a que los enterococos son intrínsecamente resistentes a la clindamicina y frecuentemente, resistentes a los macrólidos (Cercenado et al., 2011). De manera similar, la resistencia a tetraciclina es común en los enterococos y se atribuye a la presencia de los genes *tet(M)* y *tet(L)* (Wiśniewski et al., 2024).

Se detectó un 13% de las cepas de *Enterococcus* spp. con resistencia intermedia a Daptomicina, lo cual resulta interesante, ya que las infecciones complicadas causadas por ERV están limitadas a muy pocos antibióticos, como daptomicina y linezolid (Cercenado, 2011; Caicedo-Ochoa et al., 2017). En Panamá, la GUÍA TERAPÉUTICA DEL PROGRAMA DE OPTIMIZACIÓN DEL USO DE ANTIMICROBIANOS del Hospital Santo Tomás, establece que la vancomicina no debe utilizarse para tratar infecciones causadas por *Enterococcus* spp. cuyo valor de MIC >1.5-2 mcg/mL. En tales casos, se deben usar agentes alternativos como linezolid o daptomicina. Esto es de gran interés, ya que es posible que en un corto tiempo surjan cepas de *Enterococcus* que alcancen valores más altos de resistencia a este antibiótico.

Por otro lado, no se detectaron cepas resistentes a vancomicina, lo que contrasta con los estudios realizados por Fonseca et al. (2012) y Torres et al. (1994), quienes detectaron cepas resistentes a vancomicina en aguas residuales de Chile y España, respectivamente. Esto podría deberse a que estudios publicados han demostrado que los efluentes hospitalarios contienen BRA y la carga de estas bacterias varían según su prevalencia local (Hocquet et al.,

2016). Esto sugiere que, actualmente, estas cepas no circulan a gran escala en las aguas residuales de Panamá.

En cuanto a la nitrofurantoína, se detectó un 13% de cepas con resistencia intermedia y un 2% con resistencia a este antibiótico. La nitrofurantoína es efectiva en infecciones urinarias no complicadas, incluyendo aquellas causadas por ERV. Aunque no se encontraron reportes sobre su presencia en aguas residuales, pero en Chile se han documentado estudios en animales de consumo humano que muestran resistencia a esta droga. La presencia de resistencia a nitrofurantoína dentro de los perfiles de RAM más frecuentes es preocupante, ya que la adquisición de esta resistencia es poco frecuente debido a su complejo mecanismo de acción. No obstante, se ha registrado un aumento en la resistencia a esta droga en *E. faecium*, debido a que se está utilizando con mayor frecuencia (Ramírez, 2023).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Se aisló y confirmó la presencia de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* a partir de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR mediante el sistema VITEK 2.
2. Se logró estandarizar una metodología práctica y reproducible para la identificación molecular de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium*, con el fin de confirmar las cepas identificadas por métodos bioquímicos. Además, se emplearon las mismas condiciones de PCR para las tres especies, lo que hace posible procesarlas simultáneamente en el termociclador, optimizando recursos y tiempo.
3. En *S. aureus*, se obtuvo una mayor cantidad de cepas resistentes en las muestras de la PTAR identificando un 8% con multirresistencia y para *Enterococcus* la distribución de las cepas resistentes fue similar en ambos puntos de muestreo y no se identificaron cepas multirresistentes.
4. Se determinó por primera vez en Panamá, la presencia del gen *mecA* asociado al SARM en cepas de *S. aureus* provenientes de aguas residuales de efluentes hospitalarios y de la PTAR, confirmando su presencia en un porcentaje significativo de las cepas resistentes. Además, evidenciamos la presencia de cepas de *S. aureus* con patrones de multirresistencia en la PTAR, mientras que las cepas de *Enterococcus* spp. no presentaron multirresistencia.

RECOMENDACIONES

1. Ampliar el estudio comparando los resultados obtenidos con muestras de ríos y aguas ya tratadas que son vertidas a los ríos y utilizadas para actividades humanas.
2. Realizar detección molecular de genes de resistencia de antibióticos de importancia clínica como la vancomicina para verificar la presencia de genes no expresados.
3. Se recomienda estandarizar una PCR múltiple para la detección molecular de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. faecium* debido a que las condiciones de amplificación de las tres bacterias fueron similares.
4. Se recomienda implementar estrategias de vigilancia y monitoreo en estos sitios, con el fin de evaluar la posibilidad de que ante la exposición continua a antibióticos y otras presiones selectivas, las bacterias desarrollen o adquieran nuevas resistencias.
5. Es necesario llevar a cabo más estudios que evalúen la exposición de los trabajadores a estas bacterias, con el objetivo de identificar riesgos específicos y proponer medidas de protección adecuada.
6. Fomentar el lavado frecuente de manos y establecer el uso obligatorio de mascarilla dentro de las instalaciones para todos los trabajadores de la PTAR.
7. Es fundamental mejorar los protocolos para la eliminación de residuos hospitalarios, a fin de reducir los riesgos de contaminación y propagación de bacterias resistentes. Asimismo, se recomienda la implementación de PTAR en hospitales de alta capacidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Adegoke, A. A., Madu, C. E., Reddy, P., A., S. T., & I., O. A. (2022). Prevalence of Vancomycin Resistant Enterococcus in Wastewater Treatment Plants and Their Recipients for Reuse Using PCR and MALDI-ToF MS. *Frontiers in Environmental Science*, 9. doi:<https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.797992>
- Akya, A., Chegenelorestani, R., Shahvaisi-Zadeh, J., & Bozorgomid, A. (2020). Antimicrobial Resistance of Staphylococcus aureus Isolated from Hospital Wastewater in Kermanshah, Iran. *Dovepress*, 13, 1035-1042 <https://doi.org/10.2147/RMHP.S261311>.
- Amin, N., Foster, T., Shimki, N. T., & Willetts, J. (2024). Hospital wastewater (HWW) treatment in low- and middle-income countries: A systematic review of microbial treatment efficacy. *ELSEVIER*, 921, 170994 doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170994.
- Amirsoleimani, A., Brion, G., Diene, S., François, P., & Richard, E. (2019). Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus in wastewater treatment plants by whole genomic sequencing. *ELSEVIER*, 158, 193-202 doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.035.
- Armenta, E. (2017). Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con actividad lítica específica contra cepas hospitalarias de Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM). *Universidad Autónoma de Baja California*, 1-83.
- Bhujbal, P. (2024). *Sewage Treatment Plant for Hospitals*. Obtenido de mywastesolution: https://blog-mywastesolution-com.translate.goog/sewage-treatment-for-hospitals/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=sge#Author
- Blanco, E. E., Gómez, J. P., Sánchez, J. R., Martínez, A. A., Campo, N. C., Quiroz, C. C., . . . Torres, A. O. (2024). Characterization of Enterobacter phage vB_EcRAM-01, a new Pseudotevenvirus against Enterobacter cloacae, isolated in an urban river in Panama. *PLoS ONE*, 19(12): e0310824 doi.org/10.1371/journal.pone.0310824.

- Blasco, L., Fernández, L., López, M., Bou, G., & Tomás, M. (2018). Aplicación de los Bacteriófagos en la Terapia de Infecciones. *Dialnet*, 48-57.
- Boehringer Ingelheim Espana, S. (2021). *Las resistencias bacterianas a los antibióticos, el desafío "One Health" más importante de la medicina*. Obtenido de Solomamitis: <https://www.solomamitis.com/las-resistencias-bacterianas-los-antibioticos-el-desafio-one-health-mas-importante-de-la-medicina>
- Bolocan, A., Upadrasta, A., Almeida, P. d., Clooney, A., Draper, L., Ross, P., & Hill, C. (2019). Evaluation of Phage Therapy in the Context of *Enterococcus faecalis* and Its Associated Diseases. *Viruses*, 11 (4), 366 doi: 10.3390/v11040366.
- Bonikowska, B. M., Kowalewski, C., Ulinska, A. K., & Marusza2, W. (2022). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (15), 8088. doi: 10.3390/ijms23158088.
- Börjesson, S., Melin, S., Matussek, A., & Lindgren, P.-E. (2009). A seasonal study of the *mecA* gene and *Staphylococcus aureus* including methicillin-resistant *S. aureus* in a municipal wastewater treatment plant. *ELSEVIER*, 43(4) 925-932 doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.036.
- Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (7), 1654-1660.
- Britania. (marzo de 2021). *BritaniaLab*. Recuperado el 18 de julio de 2024, de https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607073c954fa9.pdf
- Britania. (marzo de 2021). *BritaniaLab*. Recuperado el 18 de julio de 2024, de https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607060f71db9b.pdf
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 76(4), 685–706.
- Caicedo Ochoa, E., Urrutia Gómez, J., Fernández Niño, D., Guío Guerra, S., & Méndez Fandiño, Y. (2017). Tratamiento de la bacteriemia por enterococo resistente a

- vancomicina con daptomicina versus linezolid. *revisión sistemática y metanálisis. IATREIA*, 30(1), 5-20 doi.org/10.17533/udea.iatreia.v30n1a01.
- Calderón Parra, J., De Santiago, A. D., & Díaz, A. C. (2022). Infecciones por enterococos. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(50), 2909-2918 doi.org/10.1016/j.med.2022.02.020.
- Castellano, M., & Perozo, A. (2010). Mechanisms of Resistance To β -Lactam Antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Scielo*, 38(1), 18-35.
- Cavalieri, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., & Spiegel, C. A. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. *University of Whashington*.
- Cercenado, E. (2011). Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(S5), 59-65 DOI: 10.1016/S0213-005X(11)70045-3 .
- Cervantes, E., Garcia-González, R., & Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología clínica y Medicina de laboratorio*.
- Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., & Khan, W. (2022). Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *Hygiene and Environmental Health*, 244, 114006 doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114006.
- Diane, D., Sui, L., Han, G., Gary, D., & Sadequr, R. (2017). Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. *Infection and Public Health*, 10(5), 617-623 doi.org/10.1016/j.jiph.2017.02.006.
- Emmanuel, E. (2004). Evaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. *ResearchGate*, 246.

- Faury, H. G. (2023). Ampicillin-susceptible *Enterococcus faecium* infections: clinical features, causal clades, and contribution of MALDI-TOF to early detection. *Microbiology Spectrum*, 11(5) doi.org/10.1128/spectrum.04545-22 .
- Fernández, S., Cárdenas, M., & Elster, C. (2004). Incidencia de resistencia constitutiva e inducible a clindamicina en *Staphylococcus* spp. aislados en un centro ambulatorio. *Scielo*, 35(2), 10-13.
- Ferrovial. (25 de 02 de 2024). Recuperado el 15 de Febrero de 2024, de <https://www.ferrovial.com/es/recursos/aguas-residuales/#:~:text=%C2%BFC%C3%B3mo%20se%20clasifican%20las%20aguas,disuelta%3B%20o%20seg%C3%BA%20su%20procedencia.>
- Fisherscientific. (2020). *Fishersci*. Recuperado el 18 de julio de 2024, de <https://www.fishersci.es/shop/products/prepared-mannitol-salt-agar-plated-media/11775175>
- Fonseca Andino, M. K. (2012). Fenotipificación bioquímica y susceptibilidad antibacteriana en *Enterococos* spp aislados de aguas residuales de León junio-septiembre 2012. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León junio.septiembre. *Repositorio Institucional, UNAN-León*, <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872005001000009> .
- Fuda, C., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2005). Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *PubMed*, 62(22), 2617-33 doi: 10.1007/s00018-005-5148-6.
- Gaillot, O., Wetsch, M., Fortineau, N., & Berche, P. (2000). Evaluation of CHROMagar Staph. aureus, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *Clinical Microbiology*, 38(4), 1587-91. doi: 10.1128/JCM.38.4.1587-1591.
- García, A., Martínez, C., Juárez, R., Téllez, R., Paredes, M., Rocío, M. d., & Giono, S. (2019). Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* en México. *Biomédica*, 39(3), 513–523 doi: 10.7705/biomedica.4131.

- García, M. E., López, J. A., & Vargas, R. G. (1986). *Dialnet*. Recuperado el 19 de marzo de 2024, de https://cida.usal.es/cursos/edar/modulos/edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/Aguas_Residuales_composicion.pdf
- García, N., Sánchez, M., Díez, H., Rodríguez, A., & Méndez, C. (2019). Aislamiento de bacteriófagos líticos de *Enterococcus faecalis* en muestras de aguas residuales. *Pontificia Universidad Javeriana*, 2-17.
- Girijan, S. K., & Pillai, D. (2021). Identification and characterization of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital wastewaters: evidence of horizontal spread of antimicrobial resistance. *Water Health*, 19 (5), 785–795 doi.org/10.2166/wh.2021.117.
- Golob, M., Mateja, P. d., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papic, B., & Zdovc, I. (2019). Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat. *Biomed Res Int.*, doi: 10.1155/2019/2815279.
- Goldstein, R. R., Micallef, S., Gibbs, S., Davis, J., He, X., George, A., . . . Sapkota, A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detected at four U.S. wastewater treatment plants. *Environmental Health Perspectives*, 20(11):1551-8 doi: 10.1289/ehp.1205436.
- González, C., J., M., & Perozo-Mena, A. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Karsmera* , 38(1), 18-35.
- Gordon, R., & Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *PudMed*, 46(5), S350–S359 doi.org/10.1086/533591.
- Gotkowska-Płachta, A. (2021). The Prevalence of Virulent and Multidrug-Resistant Enterococci in River Water and in Treated and Untreated Municipal and Hospital Wastewater. *Int J Environ Res Public Health*, 8(2).
- Grisales, D., Ortega, J., & Rodriguez, T. (2012). Remoción de la materia organica y Toxicidad en aguas residuales hospitalarias aplicando ozono. *Revista Unal*, 79(173), 109–115.

- Guo, M.-T., & Kong, C. (2019). Antibiotic resistant bacteria survived from UV disinfection: Safety concerns on genes dissemination. *Chemosphere*, 224, 827-832 doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.035.
- Hall, G., & Ramírez, A. (2020). Aislamiento y Caracterización de Bacteriófagos específicos para cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* sp a partir de aguas residuales. Panamá: Universidad de Panamá.
- Hamdan, A., González, S., & Bustos, J. (2015). Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. *Ciencias Clínicas*, 16(2), 37-41 doi: 10.1016/j.cc.2016.02.002.
- Hamer, M., Saraullo, V., Brihuega, B., Watanabe, O., Martinez, M., & Grune Löffler, S. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 18 (2), 68-73.
- Hocquet, D., Müller, U., & Bertrand, X. (2016). What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J Hosp Infect*, 3(4), 395-402 doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.010.
- Hosseini, S. M., B. Z., Jafari, R., Shamloo, F., Tabar, Z. k., & Arabestani, M. R. (2016). Presence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp collected from dairy products and meat. *Scholars Research*, 8 (4), 138-145.
- INSST. (25 de 05 de 2021). *Instituto Nacional de seguridad y salud en el trabajo*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2023, de <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/staphylococcus-aureus#:~:text=Tiene%20forma%20de%20coco%20y,su%20capacidad%20para%20producir%20infecci%C3%B3n>.
- Jahansepar, A., Rezaee, M. A., Hasani, A., Sharifi, Y., Farzami, M. R., Dolatyar, A., & Aghazadeh, M. (2018). Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens in the Northwest of Iran. *Microbial Drug Resistance*, 24(8), 1165-1173. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0380>.

- Jaramillo, E. (2022). Caracterización de la resistencia a Linezolid y Vancomicina mediada por plásmidos en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Universidad Técnica de Ambato*, 5-79.
- Kwak, Y.-K., Colque, P., Byfors, S., Giske, C. G., Möllby, R., & Kühn, I. (2015). Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* in wastewater in Stockholm during 1 year: does it reflect the resistance trends in the society? *ELSEVIER*, 45(1), 25-32 doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.09.016.
- Laboratorios Britania s.a. (2021). Recuperado el 24 de Marzo de 2024, de https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60706277ab572.pdf
- Lapenta, D. G. (2015). *Instituto de Bioquímica Clínica*. Recuperado el 24 de Marzo de 2024, de [https://www.ibcrosario.com.ar/articulos/multirresistentes_2015.html#:~:text=Desde%20un%20punto%20general%2C%20la,de%20resistencia%2C%20etc.\)](https://www.ibcrosario.com.ar/articulos/multirresistentes_2015.html#:~:text=Desde%20un%20punto%20general%2C%20la,de%20resistencia%2C%20etc.)).
- Leopardo, H. Á. (2020). *Antibióticos: Clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia* (primera ed.). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Li, S., Ondon, B. S., Ho, S.-H., Jiang, J., & Li, F. (2022). Antibiotic resistant bacteria and genes in wastewater treatment plants: From occurrence to treatment strategies. *Science of The Total Environment*, 838(4), 156544 doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156544.
- Matus Ramírez, S. (2023). Caracterización fenotípica de la resistencia a antibióticos críticos en cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* aisladas desde perros con dueño de la Región Metropolitana. [Tesis de licenciatura, Universidad de Chile]. *Repositorio Académico de la Universidad de Chile*, <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/201217> .
- Manzo, G. S., Flores, H., & Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25, 129-143.

- MDM. (21 de agosto de 2020). *Medios de diagnóstico microbiológico* . Recuperado el 18 de julio de 2024, de <https://mdmcientifica.com/producto/agar-baird-parker-x-9-ml/>
- Microbiosh. (2021). *Twitter*. Recuperado el 24 de Marzo de 2024, de <https://twitter.com/mICROBIOsh/status/1228325594326237184>
- Monteiro, S., & Santos, R. (2020). Incidence of enterococci resistant to clinically relevant antibiotics in environmental waters and in reclaimed waters used for irrigation. *Scopus*, 18(6): 911-924 doi: 10.2166/wh.2020.020.
- Naciones Unidas. (22 de 06 de 2022). Recuperado el 20 de Febrero de 2024, de <https://news.un.org/es/story/2022/06/1510742>
- Núñez, L., Tornello, C., Puentes, N., Espigares, E., Elena, M., Espigares, M., & Juan, M. (2016). El efluente hospitalario como fuente de enterococos vancomicina resistentes. *Ars Pharmaceutica*, 57(3), 121-126. doi:<https://dx.doi.org/10.30827/ars.v57i3.5329>
- Oliveira, D. D., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P., Schembri, M. A., Beatson, S. A., . . . Walke, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), 00181-19 <https://doi.org/10.1128/cmr.00181-19>.
- Oliveira, S., Silveira, R., Rodrigues, I., Lima, W., Rodrigues, L., & Paiva, M. (2020). Domestic wastewater treatment plants as sources of macrolide-lincosamide-streptogramin B- and penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 49(2), 267-279 doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n2.88854.
- OMS. (2017). *World Health Organization*. Recuperado el 23 de enero de 2024, de https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25%20Feb-ET_NM_WHO.pdf
- OMS. (31 de 07 de 2020). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 10 de Octubre de 2023, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%3%b3ticos>
- OMS. (2022). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 1 de Abril de 2024, de <https://www.who.int/es/health-topics/antimicrobial-resistance>

- One Health Trust. (4 de may de 2025). *ResistanceMap*. Obtenido de Antibiotic resistance: <https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php>
- OPS. (2020). *Paho*. Recuperado el 1 de Abril de 2024, de <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>
- Organización Panamericana de la Salud. (19 de junio de 2009). *PAHO*. Obtenido de https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1527:workers-health-resources&Itemid=1349&limitstart=2&lang=es#gsc.tab=0
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., . . . Konopka, I. (2020). Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Hazardous Materials*, 381, 121221 doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121221.
- Padilla, C., Núñez, M., Padilla, A., & Lobos, O. (2012). Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile. *Scielo*, 29(1), 55-61.
- Pardo, L., Machado, V., Cuello, D., Aguerrebere, P., Seija, V., Braga, V., & Varela, G. (2020). Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and their associated genotypes in *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary level public hospital of Uruguay. *Asociación Argentina de microbiología*, 52(3), 202-210 doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.004.
- Pasachova, J., Ramirez, S., & Molina, M. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Desconocido*, 17(32), 25-38.
- Pincus, D. H. (2011). MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*.
- Porte, L., Hérve, B., Prat, S., & Chanqueo, L. (junio de 2007). *Scielo*. Recuperado el 18 de julio de 2024, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v24n4/art09.pdf>
- Programa de Saneamiento de Panamá. (2022). Recuperado el 18 de marzo de 2024, de <https://www.saneamientodepanama.gob.pa/index.php/redes-y-colectoras/>

- Promega Corporation. (octubre de 2017). *Promega*. Recuperado el 18 de julio de 2024, de https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/maxwell-16-mdx-instrument-protocol.pdf?rev=d3f16cbb8615424fbf65905a60a66b98&sc_lang=en
- Quirós, F. (03 de 08 de 2019). *Acueductos y Alcantarillados Nacionales (IDAAN)*. Obtenido de https://cidta.usal.es/cursos/edar/modulos/edar/unidades/LIBROS/documentos_nuevos/quiros_manejoar.pdf
- Ramessar, K., & O'Olaniran, A. (2019). Antibigram and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. *Revista mundial de microbiología y biotecnología*, 35(9), 142 doi: 10.1007/s11274-019-2715-9.
- Ramírez, I. E., Mejía, F., Medina, J. R., Cornejo, H., Castillo, M., Querol-Audi, J., & Martínez, A. O. (2023). Prevalence of Plasmid-Associated Tetracycline Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Environmental, Animal and Human Samples in Panama. *Antibiotics*, 280(12), doi.org/10.3390/antibiotics12020280.
- Ramos, C. (2013). Behavioral Health and Ecotoxicological Indicators of Sewage with Traces of drugs. *Revista Cuabana de Química*, 15(2), 180-205.
- Raza, S., Shin, H., Hur, H.-G., & Unno, T. (2022). Higher abundance of core antimicrobial resistant genes in effluent from wastewater treatment plants. *Water Research*, 208, 117882 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117882>.
- RenyLab. (mayo de 2013). *RenyLab Química e Farmacéutica*. Recuperado el 18 de julio de 2024, de <https://es.renylab.ind.br/wp-content/uploads/2018/05/Caldo-BHI-NaCL-65.pdf>
- Rodrigo, C. (2005). Antibioterapia. *An Pediatr Contin*, 3(1), 1-9.
- Rodríguez, C. A., & Vesga, O. (2005). *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biomédica*, 25(4), 575. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i4.1384>.

- Rodríguez, G. A., & Michelangelli, E. J. (2023). Caracterización de Patotipos de E. Coli circulantes en aguas sin tratar en la Ciudad de Panamá. Panamá: Universidad de Panamá.
- Rojas, S., & Vergel Arias, L. C. (2020). Resistencia Antimicrobiana de Enterococcus faecalis. Revisión de la Literatura. *Universidad Antonio Nariño*, 1-77.
- Rosenberg Goldstein, R. E., Micallef, S., Gibbs, S., George, A., clay, E., Sapkota, A., . . . Sapkota, A. R. (2014). Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four U.S. wastewater treatment plants that provide effluent for reuse,. *Science of The Total Environment*, 466-467, 404-411. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.039>.
- Rosenberg, R., Micallef, S., Gibbs, S., Davis, J., He, X., George, A., . . . Sapkota, A. (2012). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Detected at Four U.S. Wastewater Treatment Plants. *Environmental Health Perspectives*, 120 (11), 1551-1558 doi.org/10.1289/ehp.1205436.
- Salud, O. M. (2020). Resistencia a los antibióticos. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Salud, O. P. (2020). PAHO. Obtenido de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/manual-manipuladores-alimentos-2014.pdf>
- Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., . . . Kreyenschmidt, J. (2020). Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 727, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138788>.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., & Obst, Ú. (2003). Detección de bacterias resistentes a los antibióticos y sus genes de resistencia en aguas residuales, aguas superficiales y biopelículas de agua potable. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 325–335.
- SEMARNAT. (2014). SEMARNAT-SINAT. Recuperado el 7 de agosto de 2024, de https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_resumen14/06_agua/6_2_3.html#:~:text=La%20descarga%20de%20aguas%20residuales,la%20integridad%20de%20los%20ecosistemas.

- Silva, D., Menezes, E., Silva, E., & Lamounier., T. (2017). Prevalencia y perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los patógenos ESKAPE del Distrito Federal, Brasil. *Scielo*, 53(4): doi.org/10.5935/1676-2444.20170037 .
- Silva, J. L., Galleguillos, J. R., Navarro, C., & M. R. (2005). Prevalencia de Enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Revista médica de Chile*, 133(10), 1201-1210 doi.org/10.4067/S0034-98872005001000009 .
- St. Jude Children's Research Hospital. (2017). *St.jude.org*. Recuperado el 19 de marzo de 2024, de https://www.stjude.org/content/dam/es_LA/shared/www/do-you-know-spanish/infection-mdro-spa.pdf
- The Chromogenic Media Pioneer. (2021). *CHROMagar*. Recuperado el 24 de Marzo de 2024, de <https://www.chromagar.com/wp-content/uploads/2021/11/LF-EXT-005-V8.0.pdf>
- Torres, C., Reguera, J. A., Sanmartin, M. J., Pérez Díaz, M. C., & Baquero, F. (1994). Van A-Mediated vancomycin-resistant Enterococcus spp. in sewage. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(3), 553-561 doi.org/10.1093/jac/33.3.553.
- Ünal, N., Aşkar, Ş., & Yildirim, M. (2017). Antibiotic resistance profile of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolated from broiler cloacal samples. *TURKISH JOURNAL OF VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES*, 41, 199-203 doi.org/10.3906/vet-1607-26.
- Valtek. (2 de julio de 2017). *Valtekdiagnostics*. Recuperado el 18 de julio de 2024, de <https://www.valtek.cl/wp-content/uploads/2020/02/Caldo-Rojo-de-Fenol-con-Arabinosa-Valtek-versi%C3%B3n-2-1.pdf>
- Vega, Silvio. (2023). Comunicación Personal. Médico especialista en microbiología clínica, Caja del Seguro Social (CSS).
- Victoria, E. E. (2021). Caracterización de bacteriófagos provenientes de aguas residuales de Río Abajo, Ciudad de Panamá, con actividad antimicrobiana contra e complejo Enterobacter cloacae. *Rev Universidad de Panamá*. 1-127.

- Wendt, C., Havill, N. L., Chapin, K. C., Boyce, J. M., Dickenson, R., Eigner, U., . . . Fahr, A. M. (2010). Evaluation of a New Selective Medium, BD BBL CHROMagar MRSA II, for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Different Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2223-2227 doi:10.1128/JCM.02374-09.
- Wiśniewski, P. Z.-W. (2024). Possibility of transfer and activation of silent tetracycline resistance genes among *Enterococcus faecalis* under high-pressure processing. *Food Microbiology*, 120, 104481.
- Xiang, X., Lu, J., Xu, X., Hou, X., Diao, E., Qian, S., . . . Shang, Y. (2023). Rapid identification of novel specific molecular targets for PCR detection of four *Enterococcus* species. *ELSEVIER*, 173 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114356>

ANEXOS

ANEXOS

Tabla 8. Aislamiento de *S. aureus* en medios diferenciales.

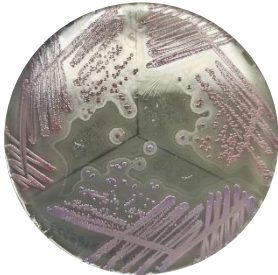
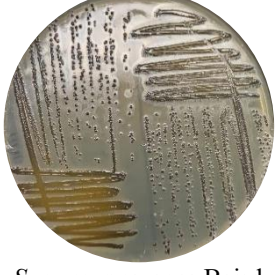
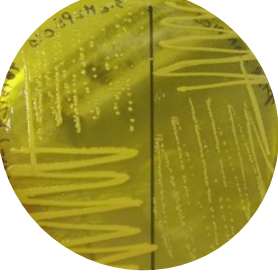
Colonias puras de <i>S. aureus</i> aisladas en medios de cultivos selectivos			
			
<i>S. aureus</i> en Chromoagar™	<i>S. aureus</i> en agar Baird Parker	<i>S. aureus</i> en agar Manitol Salado	<i>S. aureus</i> en agar Sangre
Morfología de las Colonias			
			
Colonias gomosas de color rosado con un tono más intenso en el centro.	Colonias estrelladas de color grisáceo con un halo claro alrededor.	Colonias de color amarillo rodeadas de una zona del mismo color.	Colonias amarillas con presencia de hemolisis.

Tabla 9. Aislamiento de *Enterococcus* spp. con sus Pruebas Bioquímicas.

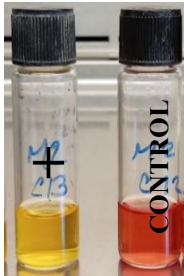
Colonias de <i>Enterococcus</i> aisladas en medio de cultivo selectivo y Pruebas Bioquímicas			
			
<i>Enterococcus</i> spp. en agar Bilis Esculina	<i>Enterococcus</i> spp. en agar Nutritivo	<i>Enterococcus</i> spp. en agar Sangre	<i>Enterococcus</i> spp. en Caldo Rojo fenol + Arabinosa



Figura 25. Muestreo en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Juan Díaz.



Figura 26. Muestreo en el Complejo Hospitalario Caja del Seguro Social Dr. Arnulfo Arias Madrid.



Figura 27. Muestreo en la Estación de Bombeo de la Cinta Costera 3.

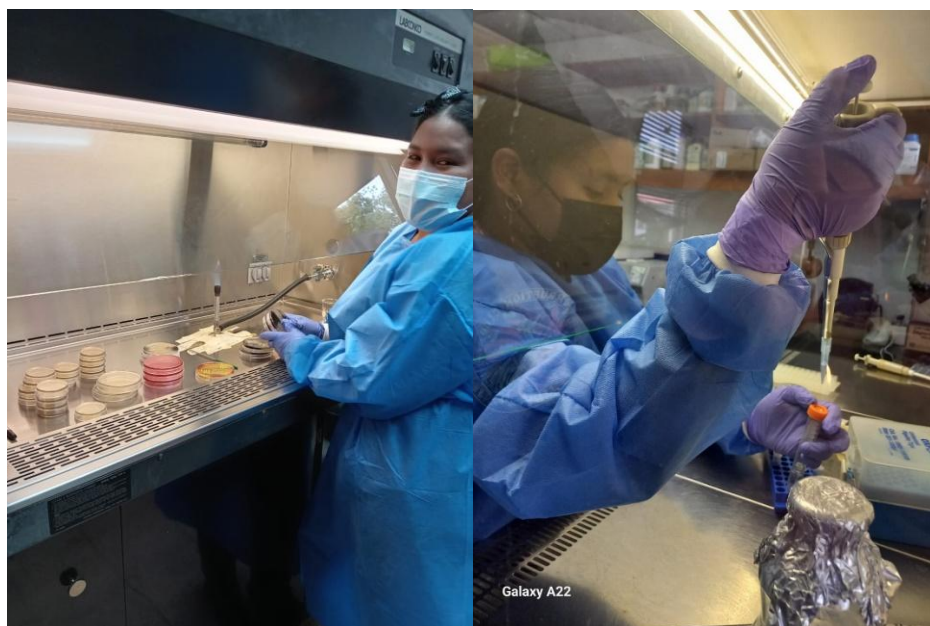


Figura 28. Aislamiento de *S. aureus* en medios de cultivos selectivos y preservación de cepas en viales de agar nutritivo y glicérados.



Figura 29. Aislamiento de *Enterococcus* spp. en agar sangre e identificación en Vitek 2.

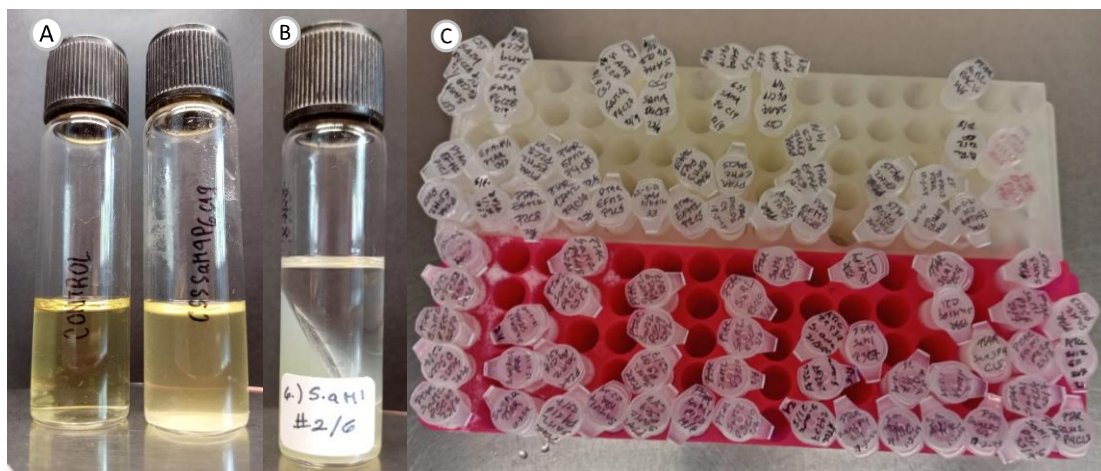


Figura 30. A. Colonia en Caldo nutritivo. B. Colonia preservada en vial de agar nutritivo aforado con aceite mineral estéril. C. Cepas glicéras.

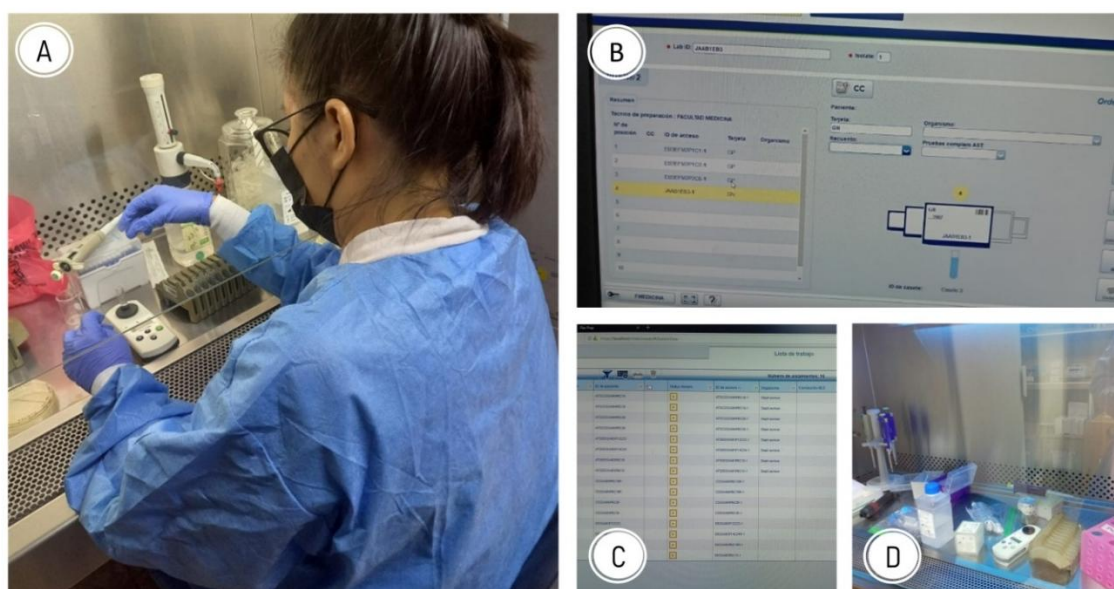


Figura 31. Identificación y Perfil de susceptibilidad con Vitek. A. Preparación de la suspensión. B. Registro de las muestras en el software de Vitek 2. C. Resultados de Vitek 2. D. Materiales.

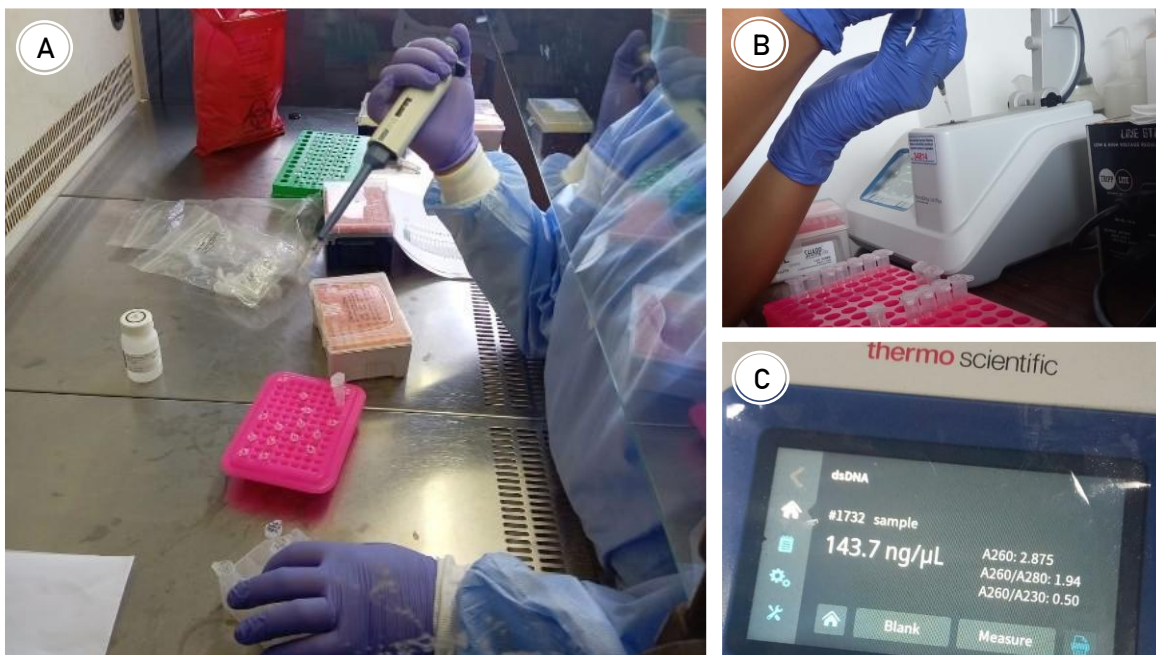


Figura 32. A. Transferencia de 100 μ L de sobrenadante a tubos Eppendorf. B. Cuantificación del ADN con ayuda del NanoDrop Lite Plus. C. Pureza del ADN.

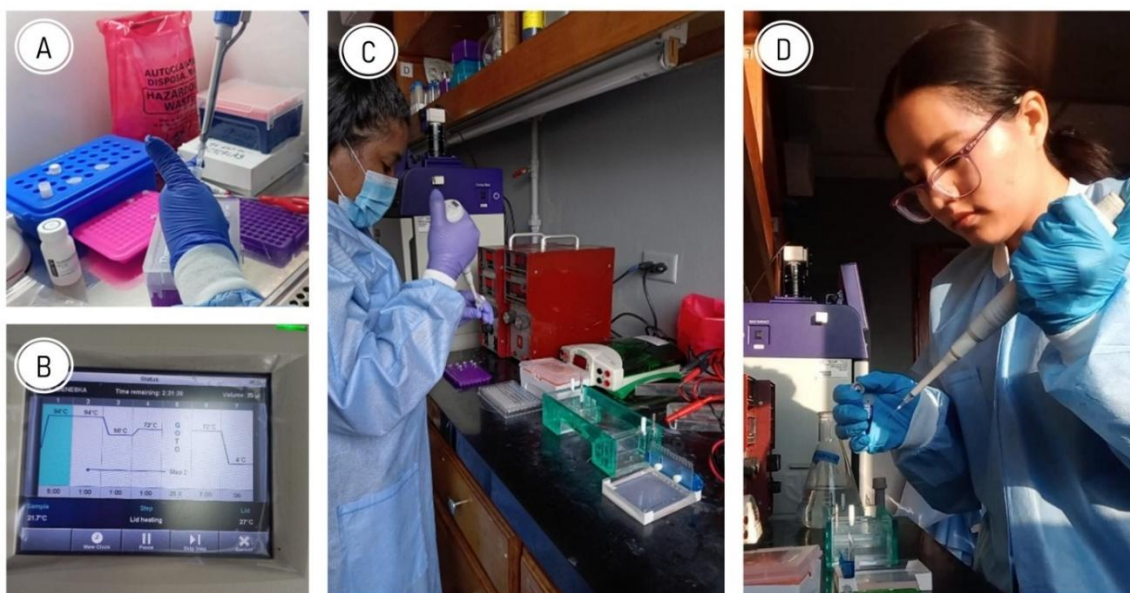


Figura 33. A. Preparación de la mezcla de reacción para PCR. B. Termociclador con las condiciones utilizadas para identificación, C – D. Preparación de la electroforesis.

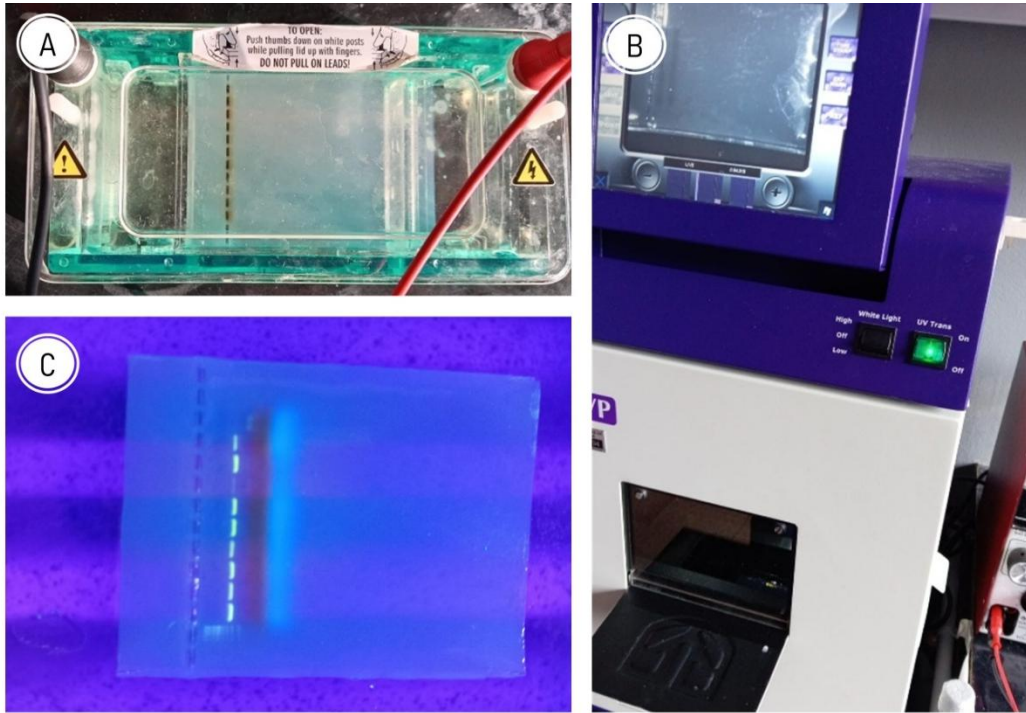


Figura 34. A. Corrida de la electroforesis a 80V por 40 min. B. Fotodocumentador con tansiluminador de luz UV. C. Visualización de los resultados de PCR.