



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
PROYECTO DE GRADUACIÓN

TÍTULO

Aislamiento y caracterización de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes a antimicrobianos a partir de aguas residuales de efluentes hospitalarios y de la PTAR de la Ciudad de Panamá.

ELABORADO POR

Jeemy Vega

8-951-2479

Alejandra Adames

8-972-6

ASESORES:

Mgtr. Fermín Mejía

Mgtr. José Moreno

Dr. Alex O. Martínez Torres

Trabajo de graduación presentado a consideración por la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025

COMITÉ ASESOR

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

Ciudad universitaria ____ de _____ del 20____.

Por este medio se hace constar que el proyecto de Trabajo de Graduación, titulado: Aislamiento y caracterización de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes a antimicrobianos a partir de aguas residuales de efluentes hospitalarios y de la PTAR de la Ciudad de Panamá, ha sido realizado en su totalidad por las estudiantes Jeemy Y. Vega H. y Alejandra C. Adames R. bajo la supervisión de sus asesores.

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado:

Mgtr. Fermín Mejía
Asesor Principal

Dr. Alex O. Martínez Torres
Asesor

Mgtr. José Moreno
Asesor

Aprobado por: _____ Fecha: _____

Yolanda Aguila S., Ph.D.
Directora de la Escuela de Biología

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por ser mi guía y compañero durante este proceso, por brindarme salud para lograr mis objetivos y culminar exitosamente esta tesis. A mi madre Zuleika Herrera y mi padre Gilberto Vega por su dedicación y apoyo incondicional que han sido fundamentales en mi formación profesional, y a Zoe, por su constante compañía. A mi compañera de tesis por su apoyo y compromiso. Asimismo, expreso mi agradecimiento a mis asesores por el tiempo dedicado a proporcionar sus conocimientos y a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo para alcanzar esta nueva meta. ¡Muchas gracias!

Jeemy Y. Vega H.

Dedico este trabajo primeramente a Dios por ser el principal motor de mi vida y por orientarme en este proceso de conseguir una de las metas más deseadas, a mis queridos padres Betsy Real, Alexander Adames y hermana Alexandra Adames por siempre estar allí para mí, por su dedicación, amor y sacrificios en todos estos años, a mis profesores y asesores por compartir sus conocimientos conmigo; quiero agradecer también a mi compañera de tesis quién deposito su confianza en mí para realizar este trabajo juntas y a todos los que colaboraron con nosotros. Un millón de gracias.

Alejandra C. Adames R.

AGRADECIMIENTOS

Queremos brindar nuestro profundo agradecimiento a la Universidad de Panamá, específicamente a la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, por permitirnos llevar a cabo esta investigación, y al Departamento de Microbiología y Parasitología y a sus docentes por contribuir a nuestra formación académica.

A nuestros asesores y tutores Fermín Mejía, Alex O. Martínez Torres, Jordi Querol, Carmen Indira Espino, José Moreno, Indira Ramírez y Sean Romaña, por dirigir este proyecto y tomarnos en cuenta para ser parte de este estudio con el que realizamos nuestra tesis de grado, les agradecemos por su orientación, sugerencias y correcciones realizadas a nuestro trabajo. Además, por su disposición para enseñarnos y ayudarnos a adquirir nuevos conocimientos y desarrollar habilidades prácticas que han sido fundamentales para lograr este proyecto.

A nuestros compañeros del proyecto ESKAPE por su colaboración en este proyecto.

A los colaboradores de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Juan Diaz, el Complejo Hospitalario de la Caja de Seguro Social (CSS) Doctor Arnulfo Arias Madrid y la Estación de Bombeo 3 (EB3) de la Cinta Costera 2 por el apoyo en los muestreos realizados durante este proyecto.

Agradecemos a los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y de Microbiología de Aguas (LAMA), y al Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina, por ofrecernos las instalaciones y equipos para llevar a cabo la metodología experimental de este estudio.

Agradecemos a la Vicerrectoría de Investigación y Post-Grado (VIP) y a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) por el financiamiento económico de este estudio, 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.

Por último, gracias a todos los que contribuyeron ya sea de forma directa o indirecta con el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
ANTECEDENTES.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	12
HIPÓTESIS	13
CAPÍTULO I.....	14
MARCO TEÓRICO	14
1. Aguas residuales.....	15
1.1. Fuentes de contaminación de las aguas residuales con microorganismos resistentes	15
1.2. Riesgos asociados a la presencia de microorganismos resistentes en aguas residuales .	16
2. Resistencia bacteriana	17
2.1. Adquisición de resistencia bacteriana:	18
2.2. Mecanismos de resistencia bacteriana.....	18
2.3. Genes de resistencia bacteriana	19
3. Resistencia antimicrobiana del Grupo ESKAPE	20
3.1. <i>P. aeruginosa</i>	20
3.1.1. Características generales	20
3.1.2. Patogenicidad.....	21
3.1.3. En el ambiente.....	24
3.1.4. Mecanismos de resistencia.....	25
3.1.5. Genes de resistencia.....	29
3.2. <i>A. baumannii</i>	30
3.2.1. Características generales	30
3.2.2. Patogenicidad.....	30
3.2.3. En el ambiente.....	34
3.2.4. Mecanismos de resistencia.....	35

3.2.5. Genes de resistencia.....	37
4. Métodos de detección, aislamiento y caracterización de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i>	38
4.1. Detección y aislamiento.....	39
4.2. Identificación por métodos bioquímicos	40
4.3. Identificación por métodos moleculares.....	41
5. Medidas de prevención y control de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i>	42
CAPÍTULO II	45
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Áreas de estudio	46
2. Colecta de muestras.....	47
3. Análisis en Laboratorio	47
3.1. Aislamiento e identificación presuntiva	47
3.2. Identificación bioquímica	48
3.3. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana	48
3.4. Extracción de ADN	48
3.5. Cuantificación de ADN	49
3.6. Identificación molecular	49
3.7. Detección de genes de resistencia a antimicrobianos	50
3.8. Electroforesis	51
CAPÍTULO III.....	52
RESULTADOS	53
1. Aislamiento, identificación y resistencia antimicrobiana de <i>P. aeruginosa</i>	53
2. Aislamiento, identificación y resistencia antimicrobiana de <i>A. baumannii</i>	58
DISCUSIÓN	62
1. Aislamiento e identificación de <i>P. aeruginosa</i>	62
2. Aislamiento e identificación de <i>A. baumannii</i>	63
3. Resistencia antimicrobiana de <i>P. aeruginosa</i>	64
4. Resistencia antimicrobiana de <i>A. baumannii</i>	67
CAPÍTULO IV	70
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES	72
REFERENCIAS.....	73
ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores de patogenicidad en <i>P. aeruginosa</i>	22
Cuadro 2. Enzimas que hidrolizan antibióticos en <i>P. aeruginosa</i>	26
Cuadro 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>P. aeruginosa</i>	28
Cuadro 4. Factores de virulencia junto con sus roles en la patogenia de <i>A. baumannii</i>	33
Cuadro 5. Primers utilizados en la identificación molecular de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i> . .	49
Cuadro 6. Primers utilizados en la detección de genes de resistencia de <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i>	50
Cuadro 7. Resultados de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas e identificadas de la PTAR.....	54
Cuadro 8. Resultados de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas e identificadas de la CSS.....	54
Cuadro 9. Resultados de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas e identificadas de la EB3.....	55
Cuadro 10. Resultados de las cepas de <i>A. baumannii</i> aisladas e identificadas de la PTAR.....	59
Cuadro 11. Resultados de las cepas de <i>A. baumannii</i> aisladas e identificadas de la CSS.....	59
Cuadro 12. Resultados de las cepas de <i>A. baumannii</i> aisladas e identificadas de la EB3.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colección de muestras en aguas residuales. A) Muestreo en la PTAR. B) Muestreo en la CSS. C) Muestreo en la EB3.....	46
Figura 2. Comparación de la multirresistencia entre las cepas de los diferentes sitios de muestreo.	55
Figura 3. Resultados de las PCR en tiempo final para la identificación de <i>P. aeruginosa</i> . Patrones de amplificación de las cepas de: A) PTAR. B) CSS. C) EB3.....	56
Figura 4. Resultados positivos de las PCR Multiplex para detección de genes de resistencia en <i>P. aeruginosa</i>	57
Figura 5. Resultados positivos de las PCR para detección del gen <i>blaOXA-48</i> en <i>P. aeruginosa</i> . .	57
Figura 6. Resultados de las PCR en tiempo final para la identificación de <i>A. baumannii</i> . Patrones de amplificación de las cepas de: A) PTAR. B) CSS. C) EB3.....	60
Figura 7. Toma de muestras. A y B) Muestreo en la PTAR. C y D) Muestreo en la EB3. E, F y G) Muestreo en la CSS.....	91
Figura 8. Aislamiento de cepas de <i>P. aeruginosa</i> en agar selectivo. A) Enriquecimiento en Pseudalert. B y C) Proceso de aislamiento. C) Resultado de aislado en agar Cetrinida. E) Resultado de aislado en agar cromogénico.....	91
Figura 9. Aislamiento de cepas de <i>A. baumannii</i> en agar selectivo. A y B) Proceso de esparcido. C) Resultado de esparcido en agar cromogénico. D y E) Proceso de aislamiento. F) Resultado de aislado en agar cromogénico.....	92
Figura 10. Proceso de identificación bioquímica y perfil de susceptibilidad microbiana con el Vitek 2. A) Llenado de tubos con agua salina. B y C) Toma de colonias con hisopos estériles. D) Suspensión. E) Llenado de datos de tarjetas. F) Vitek 2.	92
Figura 11. Preparación de glicerados para criopreservación de muestras confirmadas. A y B) Inoculación de caldos nutritivos. B) Cepas positivas crecidas en caldo nutritivo. C, E y F) Conservación en glicerol al 40 %..	93
Figura 12. Prueba de Calidad realizada a las cepas positivas. A) Bacilos de <i>P. aeruginosa</i> . B) Cocobacilos de <i>A. baumannii</i>	93
Figura 13. Procedimiento de extracción y cuantificación de ADN. A y B) Preparación de suspensión. C) Calendado en bloque térmico. D) Centrifugación. E) Extracción del Ácido nucleico. F) Cuantificación del ADN	94
Figura 14. Proceso de identificación molecular y detección de genes de resistencia con la PCR. A, B y C) Preparación de la PCR. D y F) Preparación de la electroforesis. F) Observación de los resultados en el fotodocumentador.	94
Figura 15. Resultados de las PCR Multiplex para detección de genes de resistencia en <i>P. aeruginosa</i> . A) Resultados de las cepas de la PTAR. B) Resultados de las cepas de la CSS. C) Resultados de las cepas de la EB3.	95
Figura 16. Resultados de las PCR Multiplex para detección de genes de resistencia en <i>A. baumannii</i> . A) Resultados de las cepas de la PTAR. B) Resultados de las cepas de la CSS. C) Resultados de las cepas de la EB3.	95
Figura 17. Resultados de las PCR para detección del gen <i>blaOXA-48</i> en <i>A. baumannii</i> . A) Resultados de las cepas de la PTAR. B) Resultados de las cepas de la CSS. C) Resultados de las cepas de la EB3.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

3OC12-HSL	N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona
AAC	Acetilación de la aminoglucósido acetiltransferasa
acil-HSL	Homoserina lactona N-acilada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp-C	Adenosín monofosfato cíclico
ANT	Adenilación de la aminoglucósido nucleotidil transferasa
APH	Aminoglucósido fosforiltransferasa
ARG	Genes de resistencia a antibióticos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Prueba de susceptibilidad antibiótica
ATP	Adenosín trifosfato
BAP	Proteínas asociadas a biopelículas
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
C4-LGS	N-butanoil-homoserina lactona
cdPCR	PCR digital de cristal
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPS	Polisacáridos capsulares bacterianos
CSS	Caja de Seguro Social
EB3	Estación de Bombeo 3
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GN	Gram negativo
ID	Identificación microbiana
LPS	Lipopolisacárido
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OMP	Proteínas de la membrana bacteriana
OmpA	Proteína A de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMVs	Vesículas de membrana externa
Opr	Proteína de la membrana externa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLC	Fosfolipasa C

PLD	Fosfolipasa D
PmrAB	Sistema regulador de dos componentes
PTAR	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
QS	Quórum sensing
RND	División de nodulación de resistencia
RPP	Proteínas ribosómicas protectoras
SST3	Sistemas de secreción tipo tres
TCS	Sistema regulador de dos componentes
TPS	Sistema de secreción de dos parejas
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

Las bacterias del grupo ESKAPE representan uno de los mayores problemas para la salud pública a nivel mundial, dentro de este grupo, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* son especialmente peligrosas al presentar mecanismos de resistencia a casi todos los antibióticos disponibles. Cuando estas bacterias son descargadas a través de las aguas residuales, pueden persistir y multiplicarse durante muchísimo tiempo, convirtiéndose así en reservorio y vehículo de transmisión de genes de resistencia entre bacterias clínicas y bacterias ambientales. Esta investigación tuvo como objetivo aislar e identificar cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* con perfiles de multirresistencia a antimicrobianos y detectar los genes que causan dicha resistencia, a partir de muestras obtenidas de la Caja de Seguro Social (CSS), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) y la Estación de Bombeo 3 (EB3), a fin de comparar el comportamiento bacteriano entre los tres sitios de muestreo y a nivel internacional. Para abordar este objetivo, se colectaron muestras periódicas de aguas residuales de la CSS, la EB3 y la PTAR, se emplearon técnicas de aislamiento selectivo y diferencial para obtener 75 cepas presuntivas de cada especie. La identificación se confirmó mediante pruebas bioquímicas (VITEK®2) y moleculares (PCR). Se determinó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a un panel de antibióticos de importancia clínica y se detectaron genes de resistencia a antibióticos de amplio espectro. Los resultados principales revelaron la presencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a penicilinas (2,6 %), cefalosporinas (100 %), carbapenémicos (2,6 %) y fluoroquinolonas (1,3 %); con genes de resistencia *blaVIM* (2,6 %) y *blaOXA-48* (97,3 %). En *A. baumannii* se evidenció resistencia a penicilinas (9,3 %) y cefalosporinas (100 %), sin presencia de genes de resistencia. Por último, la presencia de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en efluentes hospitalarios de la Ciudad de Panamá enfatiza el potencial de estas aguas residuales como reservorio y vía de diseminación de resistencia antimicrobiana al ambiente, lo que representa un riesgo significativo para la salud pública.

Palabras Claves: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, aguas residuales, genes de resistencia, resistencia a antimicrobianos.

ABSTRACT

ESKAPE bacteria represent one of the biggest public health problems worldwide. Within this group, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* are particularly dangerous because they are resistant to almost all available antibiotics. When these bacteria are discharged through wastewater, they can persist and multiply for a very long time, thus becoming a reservoir and vehicle for the transmission of resistance genes between clinical and environmental bacteria. The aim of this research was to isolate and identify strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* strains with multidrug resistance profiles and to detect the genes that cause such resistance, based on samples obtained from the Social Security Fund (CSS), the Wastewater Treatment Plant (WWTP), and Pumping Station 3 (EB3), in order to compare bacterial behavior between the three sampling sites and at the international level. To address this objective, periodic wastewater samples were collected from the CSS, EB3 and PTAR, and selective and differential isolation techniques were used to obtain 75 presumptive strains of each species. Identification was confirmed by biochemical (VITEK®2) and molecular (PCR) tests. The antimicrobial susceptibility profile of the isolated strains was determined against a panel of clinically important antibiotics, and broad-spectrum antibiotic resistance genes were detected. The main results revealed the presence of *P. aeruginosa* strains resistant to penicillins (2.6 %), cephalosporins (100 %), carbapenems (2.6 %), and fluoroquinolones (1.3 %), with *blaVIM* (2.6 %) and *blaOXA-48* (97.3 %) resistance genes. In *A. baumannii*, resistance to penicillins (9.3 %) and cephalosporins (100 %) was evident, with no presence of resistance genes. Finally, the presence of multidrug-resistant strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* in hospital effluents in Panama City emphasizes the potential of these wastewater streams as a reservoir and route of dissemination of antimicrobial resistance to the environment, posing a significant risk to public health.

Key words: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, wastewater, resistance genes, antimicrobials resistance.

INTRODUCCIÓN

Millones de muertes en todo el mundo son causadas por bacterias patógenas que son capaces de producir una gran cantidad de factores de virulencia que les permiten persistir y prosperar en el ambiente, y en diferentes huéspedes durante periodos prolongados, a causa de esto, representan un problema de salud mundial, causando graves infecciones en seres humanos, animales y plantas (GBD, 2022). En los últimos años, esta problemática se ha agravado debido a que estos microorganismos han adquirido resistencia a un gran número de antibióticos a causa del empleo inapropiado de los fármacos por el hombre y la mala utilización en la medicina veterinaria e industrias de producción de alimentos, y además, de la diseminación de genes de resistencia a otras bacterias de la misma o diferente especie, por el mal manejo de las aguas residuales provenientes principalmente de origen hospitalarios, generando así, mayores probabilidades de adquirir multiresistencia y que se puedan diseminar en el ambiente, los alimentos e incluso colonizar a los seres humanos y animales (Saldarriaga et al., 2015; Jiménez et al., 2019).

La resistencia a antimicrobianos es catalogada por la OMS como uno de los problemas críticos a nivel mundial por su rápida propagación y lo difícil de tratar tanto en los seres vivos como en el ambiente (Escolà et al., 2020), más cuando se trata del grupo de bacterias denominadas ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) que exponen una amenaza considerable para la salud pública global, puesto que su eliminación no es eficaz en la actualidad debido a los complejos mecanismos de multiresistencia que exhiben estas especies (Chávez, 2020; Guevara et al., 2021). *P. aeruginosa* y *A. baumannii* son bacterias Gram negativas perteneciente a este grupo que representan dos de los patógenos asociados a la mayor cantidad de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Ferrer et al., 2021), la capacidad de producción de una gran cantidad de factores de virulencia sumado a su facultad para obtener múltiples mecanismos de resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, su capacidad para sobrevivir en superficies y en el ambiente durante meses, y su facilidad de transmitirse y diseminarse rápidamente, agrava el problema (Medell et al., 2012), pues, se dificulta su eliminación en el ambiente y establecer un tratamiento adecuado para tratar la infección, por eso, cada vez se dispone de menos opciones terapéuticas y de control biológico para estas especies (Fariñas et al., 2013).

Pese a que existen a nivel internacional un gran número de estudios orientados en este tema, los mecanismos de resistencia y los perfiles de sensibilidad difieren en diferentes lugares (Saldarriaga et al., 2015), por esto, esta investigación representa el primer estudio en Panamá donde se estará evaluando las aguas residuales como reservorio de bacterias del grupo ESKAPE: *P. aeruginosa* y *A. baumannii* con el objetivo de aislar bacterias resistentes, comprobar el perfil de resistencia a los antibióticos e identificar los genes que causan resistencia a partir de muestras obtenidas de la Caja de Seguro Social (CSS), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) y la Estación de Bombeo 3 (EB3), a fin de comparar el comportamiento bacteriano entre los tres sitios de muestreo y a nivel internacional.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bacterias del grupo ESKAPE representan uno de los mayores problemas para la salud pública a nivel mundial, debido a que han adquirido múltiples mecanismos de resistencia a los antibióticos por el uso excesivo de estos fármacos principalmente en hospitales, lo que dificulta su tratamiento, control y eliminación de forma eficaz. Dentro de este grupo, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* son especialmente peligrosas al ser resistentes a casi todos los antibióticos disponibles, por consiguiente, son dos de las especies que mayor morbilidad y mortalidad causan a nivel mundial. Dicho problema de multiresistencia bacteriana se agrava cuando estos microorganismos son descargados a través de las aguas residuales donde pueden persistir y multiplicarse durante muchísimo tiempo, convirtiéndose así en reservorio y vehículo de transmisión de resistencia a antibióticos. Si estas aguas servidas son liberadas directamente al ambiente o no se les realiza un saneamiento o tratamiento adecuado en las PTAR, pueden propagar microorganismos patógenos multiresistentes y contaminar fuentes de aguas naturales como ríos, lagos, quebradas y playas, además, las cepas poseen genes de resistencia que pueden diseminar a otras bacterias y aumentar la propagación de resistencia a los antimicrobianos. Esto representa un riesgo para la salud mundial al causar muchísimas enfermedades infecciosas en plantas, animales y seres humanos pudiendo generar brotes difíciles de controlar, y también, es un grave problema para el ambiente afectando negativamente la flora, riqueza y diversidad microbiológica de los ecosistemas acuáticos.

En este sentido, es fundamental determinar la presencia, distribución y características asociadas a la resistencia de bacterias multiresistentes como *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en aguas residuales, así como identificar medidas de prevención y control efectivas para mitigar su impacto en la salud pública y el ambiente.

Lo anterior nos lleva a formular nuestras preguntas de investigación:

1. ¿Cuál es la prevalencia de bacterias resistentes como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en aguas residuales de origen hospitalario y de la PTAR?
2. ¿Cuál es el nivel de resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en las muestras de aguas residuales estudiadas?
3. ¿Cuáles son los genes de resistencia bacteriana presentes en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*?

ANTECEDENTES

El estudio de bacterias resistentes a antimicrobianos en Panamá es un tema poco estudiado, se han realizado investigaciones muy parecidas donde también se evalúa la presencia de algunas especies resistentes en aguas residuales. Sin embargo, para *P. aeruginosa* y *A. baumannii* no se logró encontrar ningún estudio donde se aíslen estas cepas, evalúen el perfil de resistencia o detecten genes de multiresistencia en aguas residuales. A nivel internacional, este tema ha sido más estudiado, existen una gran cantidad de estudios orientados a evaluar la presencia de bacterias multiresistentes en aguas residuales, la identificación de los genes causantes de dicha resistencia y el perfil de resistencia a los antibióticos (Miranda et al., 2015; Hrenovic et al., 2016; Mapipa et al., 2022; Okafor y Nwodo, 2023).

Un estudio realizado por Okafor y Nwodo (2023), tuvo como objetivo evaluar los perfiles de resistencia y los genes de multiresistencia de *P. aeruginosa* en efluentes de aguas residuales de un hospital en Sudáfrica. En el mismo, lograron aislar e identificar 81 cepas positivas, las cuales, mostraron una alta resistencia a meropenem (47 %), gentamicina (40 %), levofloxacina (43 %), ceftazidima (34 %) y amikacina (24 %). Del total de aislados, se detectaron 61 (75 %) cepas con genes de resistencia, identificándose 21 genes que confieren resistencia a tres o más clases de antibióticos, entre estos se encontraron los genes *blaSHV* (2,4 %) y *bla_{oxa}-* (3,7 %) resistentes a β-lactámicos, los *strA* (8,6 %) y *aadA* (11,5 %) resistentes a aminoglucósidos, el gen *qnrA* (4,9 %) contra quinolonas y los *blaIMP* (6,6 %), *blaVIM* (2,2 %), *blaKPC* (6,6 %) y *blaNDM-1* (2,2 %) resistentes a carbapenémicos.

De igual forma, en el estudio de Miranda et al. (2015) se obtuvieron aislados de *P. aeruginosa* a partir de una PTAR hospitalaria en Brasil, con el objetivo de investigar los mecanismos enzimáticos de resistencia y los genes productores de multiresistencia en esta especie. De 60 aislamientos, se obtuvieron 41 (68,3 %) cepas identificadas como *P. aeruginosa*, las cuales mostraron una alta tasa de resistencia a fosfomicina (88 %), ácido clavulánico/ticarcilina (71 %), ceftriaxona (63 %), aztreonam (59 %) y cefotaxima (54 %). De esos aislados, el 83 % presentaron multiresistencia a los antibióticos, demostrando que el 76,3 % exhibían mecanismos de resistencia de fenotipo BLEE y albergaban genes *blaTEM* (45 %), *blaSHV* (24 %) y *blaCTX-M-1* (3,5 %); y el otro 93 %, mostraron mecanismos con síntesis de β-lactamasas y portaban genes *blaKPC* (37 %), *blaVIM* (37 %) y *blaSPM* (18 %).

Por otra parte, el estudio de Mapipa et al. (2022) tuvo como objetivo la caracterización molecular y evaluación del perfil de resistencia de *A. baumannii* aislados de efluentes de aguas residuales hospitalarias en Sudáfrica. La caracterización molecular de este patógeno multirresistente se llevó a cabo mediante la amplificación de los genes *recA* y *blaOXA-51*, con los que lograron confirmar un total de 53 aislados de *A. baumannii* positivos y realizarles la prueba de susceptibilidad contra varios antibióticos. Los resultados mostraron un alto nivel de resistencia al antibiótico piperacilina (93 %), tetraciclinas (70 %) y β -lactámicos (92 %). Además, determinaron la presencia de genes como *tetA* y *AmpC* en los aislados resistentes a los antibióticos tetraciclina.

El nivel de resistencia de *A. baumannii* en aguas residuales también se pudo evidenciar en otro estudio de Hrenovic et al. (2016), en el cual, se realizaron pruebas de sensibilidad para determinar genes de resistencia a carbapenémicos en muestras de aguas residuales municipales en Croacia, y para esto, se aislaron un total de 21 cepas de *A. baumannii*, las cuales se dividieron en 15 de aguas residuales de afluentes y 6 de efluentes. También, como parte de sus resultados, se comprobó cierto grado de sensibilidad a los antibióticos trimetoprim-sulfametoxazol y colistina. Evidenciando que los aislados de *A. baumannii* de aguas residuales fueron resistentes al menos a cinco de los nueve antibióticos carbapenémicos analizados y dicha resistencia se determinó por la presencia de genes constitutivos o intrínsecos similares a *blaOXA-51* en 14 de los 21 aislados. Los autores concluyeron con que las aguas residuales municipales, pueden actuar como potencial reservorio epidemiológico de genes resistentes a carbapenémicos y que, si bien estos patógenos pueden llegar hacer sensibles a algunos antibióticos, esto no limita que puedan adquirir genes que les confieran resistencia total.

JUSTIFICACIÓN

La presencia de microorganismos multirresistentes en aguas residuales de origen hospitalario y otras fuentes, representan un problema de gran importancia para la salud pública y el ambiente, principalmente las bacterias del grupo ESKAPE que son las que con mayor frecuencia causan infecciones y exhiben múltiples mecanismos de resistencia que dificulta su tratamiento y control. Debido a esto, surgió la necesidad de realizar el aislamiento de dos de estas cepas (*P. aeruginosa* y *A. baumannii*) en Panamá, para determinar su presencia en aguas residuales procedentes de efluentes de la PTAR, la CSS y el EB3; además, comprobar el perfil de resistencia a antibióticos e identificar genes de resistencia a diferentes antimicrobianos.

Las aguas residuales provenientes de la PTAR, la CSS y la EB3 son ambientes propicios para la adquisición de resistencia, por eso, son considerados reservorios de bacterias multirresistentes y causantes de la propagación de agentes antimicrobianos a patógenos, cuando se vierten a ecosistemas acuáticos cercanos sin un tratamiento o un procedimiento eficaz para su eliminación. Por esto, se consideró realizar el estudio en estos puntos, al haber concentraciones elevadas de microorganismos multirresistentes, había mayor probabilidad de encontrar las cepas bacterianas que evaluamos en este estudio. Si estos microorganismos se detectan en aguas residuales, existe la probabilidad que propaguen genes de resistencia entre bacterias de esta u otras especies y contaminen cuerpos de agua, alimentos o provoquen infecciones que serán difíciles de tratar. Por esto, los resultados que se obtuvieron en este estudio son importantes para proporcionar información acerca de la contaminación microbiana resistente en estos efluentes.

Al ser este el primer estudio sobre el aislamiento y detección de cepas resistentes de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en aguas residuales en la Ciudad de Panamá, se pudo conocer el grado de resistencia a los antibióticos de estas especies, el nivel de sensibilidad a algunos antimicrobianos, los genes causantes de dicha resistencia y el comportamiento en aguas servidas de la región. Al disponer de estos datos en nuestro país, los resultados serán valiosos para comparar la multirresistencia y el comportamiento bacteriano entre los sitios de muestreo y a nivel internacional, además, de recomendar metodologías para detectar, aislar e identificar genes que pueden causar multirresistencia en estas especies y ayudar a que las autoridades sanitarias desarrollen estrategias para prevenir, reducir o eliminar la carga microbiana multirresistente en el ambiente.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar y caracterizar bioquímica y molecularmente cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* para evaluar su resistencia antimicrobiana en muestras de aguas residuales obtenidas de efluentes hospitalarios (CSS y EB3) y de la PTAR.

Objetivos Específicos

1. Aislar cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en muestras de aguas residuales mediante el uso de técnicas de esparcido y estriado en plato utilizando medios de cultivos selectivos y diferenciales.
2. Confirmar bioquímicamente cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* a través de la plataforma automatizada VITEK 2 Compact para la identificación bacteriana.
3. Comprobar el perfil de resistencia a los antibióticos de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* mediante test de sensibilidad antimicrobiana del VITEK 2 Compact.
4. Identificar molecularmente las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* mediante la detección de los genes *oafA* y *blaOXA-51* respectivamente, utilizando una PCR en tiempo final.
5. Detectar genes de resistencia *blaVIM*, *blaIMP*, *blaDNM*, *blaKPC* y *blaOXA-48* mediante una PCR múltiple.

HIPÓTESIS

HI1: Se detecta la presencia de cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes en las muestras de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR.

HO1: No se detecta la presencia de cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes en las muestras de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR.

HI2: Se identifican genes específicos de resistencia en las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* de muestras de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR.

HO2: No se identifican genes específicos de resistencia en las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* de muestras de aguas residuales hospitalarias y de la PTAR.

HI3: El comportamiento y resistencia bacteriana de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* entre los tres sitios de muestreo y a nivel internacional es similar.

HO3: El comportamiento y resistencia bacteriana de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* entre los tres sitios de muestreo y a nivel internacional no es similar.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Aguas residuales

Las aguas residuales se definen como agua en la que ha ocurrido cambios en su composición natural a causa de la actividad humana, provocando la contaminación del recurso (Bendicho y Lavilla, 2005). Estas pueden proceder de vertederos domésticos, agrícolas, ganaderos, industriales u hospitalarios y generalmente, contienen contaminantes que incluyen químicos, materia orgánica, sólidos suspendidos y una gran cantidad de microorganismos patógenos (Ambulkar y Nathanson, 2023).

Las aguas residuales son un entorno rico en nutrientes, considerándose un nicho ideal para la proliferación de todo tipo de bacterias. Contienen gran variedad de agentes antimicrobianos como antibióticos que pueden ejercer una presión selectiva para que proliferen bacterias resistentes, suprimir bacterias susceptibles e inducir nuevas resistencias (Tiwari et al., 2020). Por lo tanto, los sistemas de aguas residuales son considerados reservorios de bacterias resistentes a antimicrobianos (Steintún et al., 2024).

1.1. Fuentes de contaminación de las aguas residuales con microorganismos resistentes

Las aguas residuales son fuentes importantes de microorganismo resistentes a antimicrobianos, siendo un fenómeno que surge como resultado de prácticas inadecuadas en el uso excesivo y descarga incontrolada de productos farmacéuticos, contribuyendo a la propagación de bacterias y genes de resistencia en el ambiente (Sundayi y Naicker, 2023).

Las aguas residuales de origen doméstico pueden ser una fuente de bacterias resistentes, dado que, contienen restos de antimicrobianos y sus metabolitos, generalmente, tanto los humanos como sus mascotas metabolizan solo pequeñas porciones de antibióticos y el resto (20 % - 90 %) son excretados a través de sus heces y orina, contribuyendo a la aparición de organismos resistentes a fármacos (Karungamye et al., 2023; Samrot et al., 2023). De igual forma, las aguas residuales de origen ganadero son otra fuente importante de bacterias resistentes, pues, el uso inadecuado y constante de antibióticos ejerce una presión selectiva para que los microorganismos en el sistema digestivo de los animales adquieran resistencia, además, provoca la diseminación de grandes volúmenes de antibióticos. Aproximadamente entre el 30 % - 90 % de los antibióticos y entre 10^6 - 10^{12} ARG/mL se descargan a través del estiércol del ganado y de las aves de corral al sistema de aguas residuales (He et al., 2020; Wang et al., 2023).

Las aguas residuales de origen hospitalario son la fuente más importante de bacterias resistentes, pues, existen múltiples vías para que estos microorganismos adquieran resistencia a los antibióticos (Samrot et al., 2023). En los hospitales se trata con antibióticos a una gran cantidad de pacientes (Puljko et al., 2023), por lo tanto, hay mayor porcentaje que las cepas de la propia flora del paciente muten adquiriendo resistencia, de igual forma, el uso de equipos contaminados durante procedimientos invasivos produce la transferencia de genes de resistencia a bacterias susceptibles (Salam et al., 2023). En consecuencia, en los hospitales se secreta la mayor cantidad de bacterias y genes de resistencia a los antibióticos, y concentraciones altas de antimicrobianos en las aguas residuales (Puljko et al., 2023). A diferencia de aguas residuales de otras procedencias, las de origen hospitalario contienen más del 25 % de antibióticos, con concentraciones de genes de resistencia que oscilan entre 0,4 log y 1,8 log aproximadamente (Samrot et al., 2023).

Las PTAR recogen estas aguas residuales provenientes de vertederos clínicos y de otras procedencias donde el número de microorganismos disminuye aproximadamente un 90 % empleando diversos tratamientos físicos, químicos y biológicos; sin embargo, para bacterias que son resistentes a los antibióticos es conveniente realizar otros tratamientos que no sean los convencionales, porque pueden sobrevivir e incluso aumentar su concentración si no se realiza adecuadamente (Baghal et al., 2021; Sundayi y Naicker, 2023). Ese incremento de la carga bacteriana sucede a causa de que las bacterias ambientales, bacterias resistentes, genes de resistencia y diversos tipos de antibióticos interactúan, aumentando la probabilidad de que ocurra transmisión genética entre bacterias, se generen nuevas resistencias y se aumente la virulencia bacteriana (Sundayi y Naicker, 2023).

1.2. Riesgos asociados a la presencia de microorganismos resistentes en aguas residuales

La mayoría de las aguas residuales son vertidas a ríos, quebradas, lagos y mares sin ser tratadas o sin un correcto tratamiento (Bendicho y Lavilla, 2005), causando condiciones ambientales desfavorables y graves problemas para la salud pública (Kaushal y Singh, 2017).

Los vertederos de aguas residuales sin tratamiento o con un tratamiento ineficiente que son descargadas en cuerpos de aguas naturales son peligrosos, debido a que muchos microorganismos patógenos han adquirido resistencia a diversos antimicrobianos y dada su capacidad de transmitir genes de resistencia a otras cepas, produce la propagación de microorganismos multirresistentes

en el ambiente (Kaushal y Singh, 2017; Roulová et al., 2022). De igual modo, al ser fuentes potenciales de antibióticos y sus metabolitos provoca la aparición de nuevas bacterias resistentes en el ambiente (Steintún et al., 2024).

Como consecuencia de esto, desde el punto de vista epidemiológico, puede afectar la salud humana y animal al entrar en contacto directo o indirecto con las aguas residuales o con cuerpos de aguas naturales y alimentos que han sido contaminados, y causar infecciones bacterianas que sean difíciles o casi imposibles de tratar, aumentando la morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Kumar y Pal, 2018; Prakash et al., 2023; Wang et al., 2023). Desde la perspectiva ambiental, provoca transferencia de genes a las bacterias ambientales y surgimiento de nuevas resistencias en la flora microbiana propia del lugar, causando daños al medio acuático, ya que, cambia la composición, estructura y función de la flora dominante del área, de la misma manera, altera la riqueza y diversidad microbiana del lugar, como resultado, perturba el equilibrio ecológico en general (Karungamye et al., 2023; Jimenez y Rodríguez, 2023).

2. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se puede definir como la capacidad de los microorganismos de resistir a los efectos de los antibióticos y a otros métodos de eliminación antimicrobianos para sobrevivir y ser viables (Abushaheen et al., 2020), cuando esta resistencia se produce para tres o más familias de antibióticos se conocen como multirresistencia bacteriana (Oteo et al., 2017).

La resistencia bacteriana es un proceso de adaptación que comenzó naturalmente como una estrategia de los microorganismos para defenderse de los antimicrobianos naturales que se encuentran en el ambiente, sin embargo, con la utilización de los fármacos sintéticos, esto se incrementó, las bacterias evolucionaron y produjeron cambios genéticos para evadir el efecto de los antibióticos y adquirieron múltiples mecanismos para resistir a un gran número de antimicrobianos (Durán, 2018; Habboush y Guzman, 2023).

2.1. Adquisición de resistencia bacteriana:

Existen varias formas de adquirir resistencia:

- **Natural:** es un tipo de resistencia que fue adquirida por las bacterias como una ventaja de supervivencia contra los antimicrobianos encontrados en la naturaleza, y como un método competitivo contra otras especies (Riverón et al., 2003).
- **Adquirida:** es un tipo de resistencia donde la bacteria está en contacto directo con los fármacos, esto provoca cambios genéticos o mutacionales, es decir, cambios en la secuencia de bases del cromosoma bacteriano que le otorga la resistencia a los antimicrobianos (Riverón et al., 2003).
- **Transmitida:** es un tipo de resistencia donde algunas bacterias poseen genes de resistencia a los antibióticos presentes en el genoma o en los plásmidos, integrones y transposones, y diseminan y transmiten esos genes de resistencia tanto de forma vertical entre bacterias de la misma especie u horizontalmente a otras bacterias de la misma o distinta especie a través de los elementos genéticos móviles, de esta forma, adquieren resistencia sin estar en contacto directo con los antimicrobianos (Riverón et al., 2003; Durán, 2018; Jiménez et al., 2019).

2.2. Mecanismos de resistencia bacteriana

La acción de los antimicrobianos para eliminar o inhibir a las bacterias, se basa principalmente en fijarse sobre alguna de sus estructuras o maquinaria bioquímicas necesarias para el crecimiento, multiplicación o supervivencia de la bacteria, por ejemplo, alteran la membrana celular bacteriana, impiden la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos o la pared celular (Pérez, 1998). Sin embargo, las bacterias multirresistentes han desarrollado multitudes de mecanismos para evadir la acción de los antibióticos, pudiendo presentar varios de estos en una misma cepa, por ejemplo, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* poseen varios de estos mecanismos simultáneamente, convirtiéndolas en especies resistente a un gran número de antimicrobianos (Hernández y Leiva, 2005; Durán, 2018; Jiménez et al., 2019).

Las bacterias Gram negativas poseen artesanalmente estos mecanismos, y a continuación se estará mencionando los más prevalentes:

- **Sistema de expulsión activa:** es un tipo de mecanismo de resistencia donde la bacteria por medio de una bomba expulsa los antibióticos del espacio periplásmico evitando que ejerza su modo de acción (Riverón et al., 2003).
- **Reducción de la permeabilidad de la membrana:** es un tipo de mecanismo de resistencia donde la bacteria disminuye la permeabilidad de la pared bacteriana, pues, produce cambios en el tamaño de las porinas para bloquear la entrada del antimicrobiano (Riverón et al., 2003).
- **Inactivación enzimática:** es un tipo de mecanismo de resistencia donde la bacteria produce enzimas capaces de cambiar la estructura del antibiótico, de esta forma, pierde su funcionalidad y se inactiva (Riverón et al., 2003; Tafur et al., 2008).
- **Modificación de la diana:** es un tipo de mecanismo de resistencia donde la proteína diana es modificada para disminuir la afinidad por el antimicrobiano (Riverón et al., 2003).

2.3. Genes de resistencia bacteriana

Las bacterias son resistentes a los antibióticos debido a la expresión de genes de resistencia en su genoma (Silva y Martínez, 2009) los cuales pueden ser adquiridos de forma natural, por mutaciones o transmitidos en plásmidos, transposones o integrones de una bacteria a otra (López et al., 2015).

Los genes de resistencia natural surgen a causa de la impermeabilidad de la especie a un antibiótico o por falta del sitio objetivo de susceptibilidad (Jacoby y Brooks, 1980). Los genes de resistencia por mutaciones en los plásmidos se producen por variaciones puntuales en genes objetivos del fármaco o en genes de protección de las bacterias, en los transposones e integrones se dan por cambios en las secuencias nucleotídicas del gen (López et al., 2015), además, estos genes pueden ser heredados a otras generaciones (Jacoby y Brooks, 1980).

La adquisición de genes por transferencia horizontal se da de una bacteria a otra por conjugación, transformación o transducción (Coleman y Smith, 2014), ya sean, entre cepas de la misma o diferente especie. En bacilos Gram negativos es ocasionado mayormente por ADN extracromosómico (plásmidos) y en menor transmisión por transposones (cromosomal o integrado

en plásmidos) o integrones que no son móviles, pero, que se pueden insertar a los transposones o plásmidos conjugativos para asegurar la movilidad horizontal (Sabaté, 2002; Di Conza et al., 2013).

3. Resistencia antimicrobiana del Grupo ESKAPE

3.1. *P. aeruginosa*

3.1.1. Características generales

P. aeruginosa es una bacteria de la familia *Pseudomonaceae* (Ruiz, 2007), se trata de un bacilo Gram negativo, con un tamaño aproximado de 0,5 - 1 μm de diámetro y de 1,5 - 5 μm de largo; posee un flagelo polar que le permite tener motilidad y pili tipo IV que también sirve para desplazarse y adherirse a superficies (Paz et al., 2019).

Esta especie es considerada aerobia, no obstante, algunas cepas crecen anaeróbicamente por desnitrificación o fermentación de piruvato o arginina (Ruiz, 2007), es catalasa y oxidasa positiva (García, 2022) y sus requerimientos nutricionales son poco exigentes, pudiendo crecer en casi todos los medios de cultivos a una temperatura óptima de crecimiento entre 30 °C y 37 °C (Luján, 2014).

Se distingue por ser una bacteria no fermentadora de lactosa que puede utilizar acetato y amoníaco como fuente de carbono y nitrógeno mediante el metabolismo de oxidación de azúcares, además, produce proteasas (proteasa IV y alcalina) y elastasas que le permiten degradar proteínas inmunorreguladoras como inmunoglobulinas, péptidos antibacterianos y proteínas surfactantes A y D (Paz et al., 2019). Tiene la capacidad de producir sideróforos para capturar el hierro en el ambiente, la pioverdina es un ejemplo de sideróforos y pigmento verde-amarillento en esta especie. También, secreta otros pigmentos como piocianina (azul-verdoso), piorubina (rojo) y piomelanina (marrón) (García, 2022).

Al ser una bacteria Gram negativa, su pared está formada por dos membranas lipídicas con una capa delgada de peptidoglicano en el medio, en la membrana externa posee proteínas y fosfolípidos que tienen fijado el lipopolisacárido (LPS) y una proteína llamada Proteína F (OprF) que mantienen la estructura de la bacteria y se encarga de la permeabilidad de la misma (García, 2022; Killough et al., 2022).

3.1.2. Patogenicidad

P. aeruginosa es una bacteria patógena causante de múltiples enfermedades en animales, plantas y seres humanos (Azam y Khan, 2018), es considerada una de las especies con mayor porcentaje de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, a causa principalmente de su resistencia a diversos antibióticos y la capacidad de adquirir y diseminar genes que portan nuevos mecanismos de resistencia (Luján, 2014). Su patogenicidad se debe a la producción de una gran cantidad de factores de virulencia que le permiten subsistir en el ambiente, en diversos huéspedes y resistir a tratamientos con diversos fármacos (Akremi et al., 2022), a esto hay que sumarle que su genoma es versátil y flexible conteniendo una alta tasa de estos factores (Sousa et al., 2021). Las características de virulencia abarcan producción de enzimas, sideróforos, flagelos, pili, biofilm, entre otros y se encuentran regulados estrictamente por el sistema de señalización bacteriano que controla la expresión de estas características para asegurar su persistencia y supervivencia (Chadha et al., 2022).

Los factores de virulencia que determinan la patogenicidad de *P. aeruginosa* pueden ser asociados a la célula bacteriana o secretados por la bacteria:

→ Los factores de virulencia asociados a la célula bacteriana incluyen el flagelo polar que se encarga de dar movilidad de natación a la célula (Chadha et al., 2022). También, el pili tipo IV le brinda otro tipo de movilidad y la capacidad de adherirse a superficies (Paz et al., 2019). Las proteínas de la membrana bacteriana (OMP) tienen función igualmente de adhesión y de intercambio de nutrientes y genes de resistencia a los antibióticos (Qin et al., 2022).

Otro componente de la estructura de la superficie de la bacteria es el LPS que protege el exterior de la bacteria y ayuda a la unión a superficies, asimismo, se relacionan con genes de resistencia a antibióticos y formación de biopelículas (Qin et al., 2022).

→ Los factores de virulencia secretados por la bacteria incluyen una cápsula de alginato producida por el microorganismo, protegiéndola de la acción de antimicrobianos y condiciones ambientales (Paz et al., 2019). Las adhesinas, el alginato y los polisacáridos Pel y Psl tienen relación con la formación de biopelículas (Qin et al., 2022).

La bacteria posee V sistemas que secreta tóxicos, siendo el III (SST3) el encargado de la patogenicidad, pues, posee un mecanismo que elimina toxinas como los antibióticos para

evitar la muerte celular. En cuanto a los pigmentos, produce piocianina que es tóxica para la mayoría de los seres vivos huéspedes, pues, estropea los tejidos y daña las células (Paz et al., 2019). Finalmente, los sideróforos (pioquelina y pioverdina) excretados, también ayudan a la captación de hierro en el ambiente para ampliar la fuerza de la virulencia (Qin et al., 2022).

Todos estos factores de patogenicidad mencionados permiten que la bacteria sobreviva a condiciones adversas como la resistencia a antibióticos tanto en los huéspedes como en el ambiente (Akremi et al., 2022).

Cuadro 1. Factores de patogenicidad en *P. aeruginosa*.

Factores	Genes o proteínas involucradas
Asociados a célula bacteriana	
Flagelo	FliC, FliD
Pili (Tipo IV)	PilA, PilB, PilT, PilU
Proteínas de membrana	LecA, LecB, LPS
Lipopolisacarido (LPS)	Psl, Pel
Asociados a la formación de biopelícula	
Efectores SST3	ExoA, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY
Pigmentos	Piocianina
Sideróforos	Pioquelina y pioverdina
Factores asociados a la formación de biopelícula	PelA-PelG, Psl, alginato, adhesinas

Tomado de Paz et al. (2019) con modificaciones.

P. aeruginosa posee la capacidad de formar biopelículas o biofilm que son un conjunto de sustancias extracelulares producidas por las propias bacterias para encerrarse juntas sobre superficies y protegerse de cambios ambientales, fagocitosis o resistir a los tratamientos de los antibióticos (Thi et al., 2020). La matriz de la biopelícula se forma cuando las bacterias se asocian a superficies bióticas o abióticas (por ejemplo, catéteres, duchas, respiradores, entre otros) y secretan sustancias extracelulares como polisacáridos (Psl, Pel y alginato), proteínas, lípidos y ADN extracelular. La matriz que fabrican funciona como un armazón sólido que se adhiere a las superficies dejando las colonias viables encerradas y protegidas de condiciones desfavorables (Chang, 2018), dado esto, los biofilms presentan una alta resistencia a los antibióticos (Ruiz, 2007)

debido a que adquieren genes de resistencia dentro del tapiz bacteriano. Se dice que la resistencia es mil veces mayor dentro de estas biopelículas comparadas con las formas planctónicas (Herrera, 2004).

La formación de estos biofilm involucra señales de comunicación entre las bacterias, en *P. aeruginosa* generalmente ocurre mediante el quórum sensing (Wei y Ma, 2013).

El sistema de quórum sensing (QS) es muy importante dentro del proceso de patogenicidad de *P. aeruginosa*, principalmente cuando se trata de densidad bacteriana, ya que, actúa regulando de forma directa o indirecta la coordinación de la expresión de los genes que reflejan estos factores (Qin et al., 2022). En esta cepa bacteriana existen tres sistemas QS que se interconectan para producir la señal de comunicación (Rhl, Las y Pqs), el sistema Las y Rhl regulan la expresión de genes durante la fase exponencial temprana de crecimiento bacteriano, mientras que, Pqs durante la fase exponencial tardía (Chadha et al., 2021). Los tres sistemas se corregulan unos a otros, el Rhl y Pqs son regulados por el sistema Las, mientras que, el Rhl reprime al Pqs y el Pqs aumenta a Rhl, todo depende de la situación de la bacteria (Qin et al., 2022).

Los dos primeros sistemas (Las y Pqs) regulan la síntesis de señales por medio de homoserina lactona N-acilada (acil-HSL), en el caso del sistema Las, consiste en un autoinductor sintasa (LasI) que produce N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (3OC12-HSL). Al contrario, el sistema Rhl es una sintasa autoinductora (RhII) que forma N-butanoil-homoserina lactona (C4-LGS) (Azam y Khan, 2018; Chadha et al., 2021). El 3-O-C12-HSL sintetizado por el sistema Las, activa el receptor LasR, encargado de la regulación de la expresión de genes que tiene que ver con que se formen biopelículas, proteasas, hemolisinas elastasas y exotoxinas. De forma similar, el C4-LGS, se une al receptor RhlR para impulsar la expresión de los genes encargados de formar piocianina, sideróforos, proteasa alcalina, elastasas y la motilidad bacteriana (Azam y Khan, 2018; Chadha et al., 2021). Por último, el siguiente sistema (Pqs), regula la síntesis de señales a través de una sintasa autoinductora (PqsABCDH) que forma 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona que activa el receptor PqsR que regula la expresión de genes relacionados con la motilidad, biopelículas, proteasas, piocianina, ramnolípidos, elastasas, pioquelina, pioverdina y sideróforos (Azam y Khan, 2018; Chadha et al., 2021).

Para que se dé el QS, las bacterias secretan moléculas de señalización específicas (autoinductor) que se liberan y se difunden en el medio para comunicarse entre sí, la densidad de la población debe alcanzar el quórum o umbral crítico para producir una concentración alta del autoinductor que induce la activación de los receptores que desatan que se expresen diversos genes y se induzca la expresión génica de los factores de patogenicidad para fortificar su supervivencia (Paz et al., 2019; Qin et al., 2022).

3.1.3. En el ambiente

P. aeruginosa es una bacteria ubicua de vida libre considerada un microorganismo aerobio facultativo, dado que, presenta afinidad a ambientes con oxígeno, pero, en ausencia de este, tiene la capacidad de crecer en ambientes anaerobios utilizando nitrógeno como aceptor terminal alternativo (Paz et al., 2019). Su versatilidad le permite tolerar ambientes pobres en nutrientes confiriéndole una vasta distribución, puede crecer en el ambiente a temperaturas entre 20 °C y 42 °C (Ruiz, 2007; Paz et al., 2019), incluso, se han encontrado crecimiento de esta especie a temperaturas superiores a los 42 °C (Luján, 2014). Es decir, que puede ser encontrada en diferentes lugares como suelo, agua, plantas e incluso animales, seres humanos y superficies inanimadas (Marei, 2020).

Esta especie bacteriana se inclina a desarrollarse en áreas húmedas, por lo que se considera el agua como su reservorio natural (Mena y Gerba, 2009). Se han encontrado presentes en ríos, lagos, agua de mar, aguas residuales e incluso en agua potable, también, se ha evidenciado su presencia en lugares húmedos como grifos, plomería, bañeras, piscinas, fregaderos, utensilios médicos, entre otros (Zahra'a, 2022). En aguas naturales (ríos y lagos) su concentración suele ser entre 10 a 1000 bacterias por cada 100 mL de agua, siendo las áreas más cercanas a escorrentía urbana donde se encuentran mayor número de bacterias (100 a 1000/100 mL) (Mena y Gerba, 2009). En agua potable (para consumo humano, piscinas, spas, entre otros) esta concentración es mucho menor y de estar presentes suele deberse principalmente a biopelículas que se encuentran colonizando los grifos, tuberías y recipientes, puesto que, en el agua tratada muy pocas ocasiones se desarrollan (Mena y Gerba, 2009), aunque hay algunas cepas que pueden resistir <1 mg/L de cloro libre residual (Kauppinen et al., 2021). Tanto en aguas naturales como en potable las cepas de *P. aeruginosa* no suelen ser resistentes a los antibióticos (Mena y Gerba, 2009).

En aguas residuales la concentración de *P. aeruginosa* suele ser entre 1 a 10000 células por cada 100 mL de agua, estas suelen venir principalmente de origen doméstico, clínicos y ganadero (Mena y Gerba, 2009). En el caso de escurrientías de aguas residuales de origen hospitalarios, representan una amenaza para la salud, visto que, la mayoría de estas cepas son resistentes a varios antibióticos y dado la rapidez con que pueden diseminar genes de resistencia a otras bacterias podrían propagar enfermedades sino se le da un tratamiento adecuado (Roulová et al., 2022).

Debido a que el agua es el reservorio ambiental de *P. aeruginosa* puede persistir allí durante muchísimo tiempo, más que la mayoría de los patógenos bacterianos, se ha demostrado que puede permanecer hasta 145 días viables. Esa supervivencia a largo plazo es gracias a que la especie muestra varias adaptaciones para entrar en periodos de latencia que le permite perdurar por mucho más tiempo (Lewenza et al., 2018).

Algunas de esas adaptaciones son:

- Las células bacterianas disminuyen su actividad metabólica para reducir la producción de ATP y reprimir la expresión genética de los procesos transcripcionales.
- Cambia su forma de bacilo a una forma cocoide.
- El contenido de fosfolípidos varía.
- Menor permeabilidad de la membrana externa (Lewenza et al., 2018).

3.1.4. Mecanismos de resistencia

P. aeruginosa es una bacteria que posee múltiples mecanismos de resistencia los cuales pueden ser obtenidos de forma natural, adquiridos o transmitidos, posee la capacidad de combinarlos aumentando la probabilidad de soportar su acción (Panga et al., 2019), los principales son:

→ Síntesis de β -lactamasa

Esta bacteria posee la capacidad de producir enzimas β -lactamasas que rompen el puente amida del anillo β -lactámico de los antimicrobianos destruyendo el sitio activo del antibiótico y, por consiguiente, le imposibilita realizar su función de impedir la síntesis de la pared celular. Generalmente, inhibe antibióticos como penicilinasas, carbapenemasas, cefalosporinasas, sulbactam, tazobactam, clavulanato, entre otros (Gómez et al., 2005; Zambrano, 2018). Existen varias clases de β -lactamasas: las Amp-C y las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

(Gómez et al., 2005). Las β -lactamasas son codificadas por el cromosoma bacteriano y pueden dividirse en cuatro tipos (A, B, C y D), las enzimas A, B y C hidrolizan los β -lactámicos mediante una serina en el sitio activo del antibiótico, al contrario, las enzimas B requieren la presencia de iones de zinc divalentes para que se dé la hidrólisis (Panga et al., 2019). En el caso de las BLEE y a diferencia de las anteriores, estas son codificadas por los plásmidos, las más frecuentes en *P. aeruginosa* son *blaTEM* y *blaPER*, mientras que las carbapenemasas de tipo B y D son *blaIMP* y *blaOXA* respectivamente (Cuadro 2) (Gómez et al., 2005).

Cuadro 2. Enzimas que hidrolizan antibióticos en *P. aeruginosa*.

Enzima	Antibiótico que hidroliza
AmpC cromosomal	Penicilina, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos.
AmpC de espectro extendido	Penicilina, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos, carbapenémicos.
PER	Penicilina, cefalosporinas de primera generación, cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos.
OXA	Penicilina, cefalosporinas, monobactámicos, cefalosporinas de amplio espectro, carbapenémicos.
TEM	Penicilina, cefalosporinas de primera generación, cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos.
IMP	Penicilina, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos.
VIM	Penicilina, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos.

Tomado de Gómez et al. (2005) y Espinoza y Esparza (2021) con modificaciones.

→ Bomba de flujo

La bomba de expulsión es un mecanismo utilizado por esta especie para eliminar compuestos tóxicos (como los antibióticos) de la célula bacteriana (Panga et al., 2019) y consiste de un sistema formado por una proteína formadora de canales de la membrana externa (OMF), una división de nodulación de resistencia (RND) que ayuda en el proceso antipuerto de la proteína del fármaco y una proteína de fusión de la membrana que actúa como un enlace periplásmico entre la OMF y RND (Mohanty et al., 2020). La bomba en la membrana citoplasmática emplea energía de fuerza motriz de protones bombeando el antimicrobiano y expulsándolo por la proteína formadora de canales de la membrana externa, una vez se encuentre abierta la proteína ligadora (Gómez et al., 2005).

En *P. aeruginosa* se han identificado cuatro sistemas de expulsión de antimicrobianos: MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ y MexXY-OprM, donde el MexAB-OprM es el encargado de la expulsión de quinolonas y β -lactámicos, el MexCD-OprJ elimina β -lactámicos, el MexEF-OprN produce la salida de quinolonas, mientras que, MexXY-OprM bombea hacia afuera los aminoglucósidos (Panga et al., 2019). Todos estos sistemas de expulsión les confieren resistencia a los antibióticos, dado que, los elimina de la bacteria (Gómez et al., 2005).

→ Disminución de los canales de porinas

Los antimicrobianos para cumplir su función necesitan ingresar por la membrana celular de la bacteria, sin embargo, muchas especies como *P. aeruginosa* poseen una membrana externa diseñada para solamente la entrada de pequeñas moléculas hidrofílicas e inhibir la entrada de moléculas más grandes como los antibióticos (Mohanty et al., 2020). Esto lo logra gracias a porinas que tiene en la membrana externa (*OprP*, *OprD*, *OprF*, *OprB*, *OprC*, *OprE*) que, al entrar en contacto con los antimicrobianos, disminuye su afinidad y el transporte a través de esta proteína hacia el interior de la bacteria, también, pueden ocurrir mutaciones espontáneas que inhiben la síntesis de porinas y, por consiguiente, la entrada del antibiótico al espacio periplásmico de la bacteria (Panga et al., 2019).

→ Modificación enzimática

P. aeruginosa posee la capacidad de modificar las enzimas de los antibióticos para evitar su acción, esto lo logra gracias a elementos generalmente denominados transposones que producen mutaciones que cambian la estructura de las dianas de los antimicrobianos disminuyendo su afinidad. Esta especie posee tres cambios conformacionales enzimáticos que produce resistencia a los antibióticos: fosforilación del aminoglucósido fosforiltransferasa (APH), acetilación del aminoglucósido acetiltransferasa (AAC) y adenilación del aminoglucósido nucleotidil transferasa (ANT) (Mohanty et al., 2020). Se ha demostrado que los APH transfieren un grupo fosforilo al 3'-hidroxilo de los antibióticos como kanamicina, estreptomycin y neomicina inactivando así el antimicrobiano. Las AAC cambian un grupo acetilo al amino en la posición 3' y 6' inactivando a gentamicina, netilmicina, tobramicina, amikacina y kanamicina, mientras que, la resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina es debido a las ANT que mueven un grupo adenililo al amino o hidroxilo de los antibióticos (Panga et al., 2019).

→ Formación de biopelículas

P. aeruginosa posee la capacidad de formar agregados encapsulados en una matriz de polisacárido proteico sobre la superficie del agua, esto aumenta la capacidad de protección contra antimicrobianos, dado que generalmente los antibióticos son eficaces ante bacterias individuales, sin embargo, cuando forman biopelículas, éstas son 1000 veces más resistentes (Mohanty et al., 2020).

→ Otros mecanismos

Otros mecanismos de resistencia pocos frecuentes son resistencia a quinolonas asociadas a mutaciones de los sitios blanco, es debida a mutaciones en topoisomerasas (ADN girasa y topoisomerasa I, II y IV) provocando pérdida del sitio donde se une el antibiótico y, por consiguiente, evita la acción de los antimicrobianos. Este mecanismo está mediado por plásmidos y asociado a enzimas modificadoras (Ruiz, 2007; Lepe y Martínez, 2022). Otro mecanismo poco común es la modificación del lipopolisacárido de la membrana externa de *P. aeruginosa* asociado a mutaciones en los sistemas de dos componentes provocando resistencia a la colistina (Lepe y Martínez, 2022).

Cuadro 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*.

Mecanismo	Gen/proteína/sistemas	Antibiótico resistente
Síntesis de β -lactamasa	Amp-C y β -lactamasa Amp-C de espectro extendido (BLEE).	Penicilinasas, carbapenemasas, cefalosporinas, sulbactam, tazobactam, clavulanato, cefamicinas, monobactámicos.
Bomba de flujo	MexA-MexB-OprM, MexE-MexF-OprN, MexC-MexD-OprJ y MexX-MexY-OprM	Fluoroquinolonas, β -lactámicos y aminoglucósidos.
Porinas	OprP, oprD, oprF, oprB, oprC, oprE.	Imipenem, meropenem, quinolonas y aminoglucósidos.
Modificación enzimática	APH, AAC y ANT.	kanamicina, streptomycin, neomicina, gentamicina, netilmicina, tobramicina y amikacina.
Modificación del sitio blanco	ADN girasa y topoisomerasa I y IV. Modificación del lipopolisacárido	Fluoroquinonas. Colistina.

Tomado de Paz et al. (2019) con modificaciones.

3.1.5. Genes de resistencia

P. aeruginosa es una bacteria con creciente resistencia a los antibióticos en las aguas residuales, principalmente hospitalarias, presenta varios genes involucrados en la resistencia a antimicrobianos (Reem et al., 2024).

En esta especie, la resistencia a múltiples antibióticos está asociado principalmente a genes que codifican enzimas BLEE, que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo β -lactámico presente en los antibióticos y causar resistencia (Reem et al., 2024). Entre los genes más prevalentes y relevantes se pueden incluir:

- El gen *blaAIM-1* codifica una β -lactamasa AIM-1 que confiere resistencia a carbapenémicos (Reem et al., 2024).
- El gen *blaVIM* (codifica para la β -lactamasa VIM) están asociados a la resistencia de imipenémicos (Okafor y Nwodo, 2023).
- Los genes *blaCTX* y *blaTEM* codifican β -lactamasa tipo CTX-M y TEM respectivamente, encargadas de inactivar penicilinas y cefalosporinas (Reem et al., 2024).
- Los genes *blaVIM*, *blaIMP*, *blaSPM*, *blaGIM* y *blaNDM* codifican enzimas metalo- β -lactamasa que hidrolizan una gama amplia de antibióticos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (Joji et al., 2019). Dentro de este grupo, los genes *blaVIM* y *blaIMP* son los más frecuentes y problemáticos desde el punto de vista de resistencia antimicrobiana (Rada et al., 2021).

Entre otros genes no asociados a BLEE, se encuentran aquellos que codifican porinas, bombas de eflujo, proteínas de unión a los antibióticos y enzimas modificadoras de antibióticos (Pachori et al., 2019):

- El gen *qnrs* está implicado en la codificación de una proteína que actúa como bomba de eflujo que expulsa antibióticos como Carbapenémicos y fluoroquinolonas hacia el exterior de la bacteria, contribuyendo a la resistencia de esos fármacos (Pachori et al., 2019; Reem et al., 2024).
- El gen *AME* está asociado a la codificación de enzimas modificadoras de aminoglucósidos transferibles que inactivan aminoglucósidos (Pachori et al., 2019).
- Los genes *nalB*, *nfxB* y *nfxC* pueden mutar y ocasionar una sobreexpresión de los eflujos MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN (Pachori et al., 2019).

- El gen *oprD* puede sufrir mutaciones espontáneas que afecta la función o expresión del mismo, aumentando la resistencia a carbapenémicos, especialmente al imipenem (Pang et al., 2019).

Es importante destacar que *P. aeruginosa* puede adquirir la gran mayoría de estos genes de resistencia a antimicrobianos por medio de la transferencia horizontal de genes entre bacterias de la misma especie o de especies diferentes a través de elementos genéticos como plásmidos e integrones por mecanismo como transformación, transducción y conjugación (Pang et al., 2019).

3.2. *A. baumannii*

3.2.1. Características generales

A. baumannii pertenece a la familia *Moraxellaceae* (Kyriakidis et al., 2021), es una bacteria Gram negativa cuyo tamaño oscila entre 1 a 1,5 por 1,5 a 2,5 μm en su fase exponencial, pero, que en su fase estacionaria normalmente adopta una forma más cocoide (Pérez, 2018).

El género incluye cocobacilos aerobios, no fermentadores de lactosa, inmóviles, catalasa positivos, oxidasa negativos y no fastidiosos (Raut et al., 2020), pese a que carecen de motilidad, son capaces de desplazarse por medios semisólidos, aun sin poseer flagelos (Pérez, 2018). Su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra entre los 20 °C a 30 °C, y es capaz de crecer en los medios de cultivo usuales sin requerimientos adicionales, además, en la mayoría de pruebas bacteriológicas se comporta como inactivo y posee la capacidad de oxidar la glucosa y otras aldosas (López y López, 2000). La capacidad de esta especie para sobrevivir a la desecación hace que su viabilidad en objetos inanimados dure meses, por consiguiente, facilita su propagación en hospitales (Raut et al., 2020).

3.2.2. Patogenicidad

A. baumannii es una bacteria clínicamente muy significativa debido a que está relacionada con un gran número de infecciones y es resistente a diversas clases de antibióticos con una alta inclinación a desarrollar multirresistencia (Raut et al., 2020; Sisakhtpour et al., 2022; Hu et al., 2023). La patogenicidad en esta especie es básicamente baja, aunque cabe recalcar, que cuando llega a desarrollarse la infección en el huésped puede ser grave (Pérez, 2018). Habitualmente, esta bacteria es considerada un patógeno de virulencia baja, pero de desarrollo abrupto y terminal, debido a que

infecta a pacientes con una condición clínica encubierta o subyacente (Pérez, 2018). No obstante, con el aumento de infecciones causadas por cepas resistentes de esta bacteria en el sector hospitalario, ha generado un impacto clínico, constituyendo una amenaza significativa para el sistema de atención médica mundial (Mea et al., 2021; Reina et al., 2022).

La mayoría de los patógenos como *P. aeruginosa*, tienen toxinas que son los principales agentes causales de su virulencia, esto no ocurre de igual manera con *A. baumannii*. Sin embargo, se presume que la patogenia bacteriana en el caso de este patógeno es el resultado de un arsenal de factores de virulencia y combinación de componentes que operan juntos para causar la infección (Mea et al., 2021).

Los factores de virulencia que contribuyen a la patogenia se centran en su capacidad para moverse y adaptarse, adhiriéndose y colonizando cualquier entorno a través de formación de biopelículas (Mea et al., 2021).

Dentro de los factores de virulencia que se observan en *A. baumannii* se incluyen:

- **LPS:** considerado un factor de virulencia cuya localización se encuentra en la superficie celular, funciona en la interacción entre la bacteria y el entorno, y también, brindan integridad estructural y actúa como una barrera de permeabilidad para moléculas pequeñas hidrofóbicas (Pérez, 2018; Mea et al., 2021; Shadan et al., 2023).
- **Pili:** son apéndices antigénicos cortos similares a pelos que se encuentran en la superficie de esta especie, cumplen una función muy importante en la unión a superficies bióticas y abióticas, la motilidad, la conjugación y formación de biofilm. En *A. baumannii*, se han identificado cuatro clases de pili de tipo I acompañante-usher, que se clasifican de acuerdo a su ruta de ensamblaje en: pili ensamblados mediante la ruta acompañante-usher (biofilm), pili de tipo IV (motilidad), curli pili y pili ensamblados mediante una ruta alternativa a la ruta acompañante-usher (Pérez, 2018; Shadan et al., 2023).
- **OMP:** como OmpA, ayudan en el ensamble y la internalización en las células epiteliales del huésped, inducen también la secreción de factores apoptóticos internamente en el huésped que inicia el proceso de apoptosis que lleva a la muerte celular y determinan la resistencia a diversas clases de antibióticos (Zhang et al., 2022; Shadan et al., 2023).

- **Exopolisacárido capsular o cápsula (CPS):** es también otro factor de virulencia importante que se basa en subunidades de oligosacáridos repetitivos (unidades K) estrechamente empaquetadas y que forman una envoltura protectora en la superficie bacteriana, también ayuda a esta bacteria a evadir el sistema inmunitario del huésped, a resistir la desecación prolongada y mejorar la resistencia a los compuestos antimicrobianos como los antibióticos (Shadan et al., 2023).
- **Sistema de secreción:** es el encargado del transporte de proteínas y otras macromoléculas fuera del espacio extracelular (T2SS, T6SS y T5SS), el sistema de secreción T5SS es la proteína autotransportadora trimérica (Ata) la cual actúa como adhesina facilitando la adhesión de la bacteria a los tejidos del hospedador y colaborando en la formación del biofilm. Otro sistema de secreción que tiene este patógeno es el sistema de dos componentes (TPS) denominado AbFhaB/FhaC, involucrado en la virulencia y adhesión de *A. baumannii* (Pérez, 2018).
- De manera similar, este patógeno posee un sistema de absorción de iones metálicos para contrarrestar la quelación de iones mediados por el huésped a la cual se le denomina inmunidad nutricional (Shadan et al., 2023).
- **Biofilm:** la elaboración de biopelículas se ha observado en *A. baumannii* y se considera un elemento importante en su supervivencia y persistencia, en consecuencia, se han encontrado biopelículas de *A. baumannii* en una gran cantidad de dispositivos médicos, como catéteres, respiradores, tubos endotraqueales, entre otros. A su vez, estas biopelículas proporcionan un medio para que la bacteria sobreviva en ambientes hostiles y asimismo para prevalecer frente a ataques de varios antibióticos (Mea et al., 2021). Además, es un nido para intercambiar genes asociados a la resistencia bacteriana (Bejarano et al., 2021).

Para la formación de biofilm y adherencia es importante mencionar:

- **Operón *csuA/BABCDE*:** se agrupan en clústeres de genes (grupo de dos o más genes) formados por un usher (guía), un acompañante y un gen que codifica la subunidad del pili, donde el sistema acompañante-usher más estudiado es el complejo operón *csuA/BABCDE* acompañante-usher, su capacidad de formar pili se relaciona con el gen *csuE*, la producción de los pilis es un factor importante en la formación de biofilm o biopelículas en *A. baumannii* (Pérez, 2018).

- **Proteína asociada a biopelícula (BAP):** es una proteína implicada en la adhesión primaria para la formación del biofilm maduro, tanto en superficies bióticas como abióticas (Pérez, 2018; Mea et al., 2021).
- **Quorum sensing (QS):** corresponde a un sistema de estímulos y respuestas asociados con la densidad poblacional, relacionado a multitud de procesos bacterianos de *A. baumannii* como la formación de biofilm, adhesión o motilidad. Esta bacteria consta de dos componentes, la sintetasa Abal y la proteína de unión a las AHLs y AbaR (Pérez, 2018).

Cuadro 4. Factores de virulencia junto con sus roles en la patogenia de *A. baumannii*.

Factores de virulencia	Rol en la patogénesis
Autotransportador (Ata)	Apoyar la adherencia y el desarrollo de biopelículas.
AbeD	Matar células huésped.
AdeRS	Regulador de virulencia.
BaeSR	Regulador de virulencia.
BfmRS	Regulador de virulencia/Expresión Csu pili.
Proteínas asociadas al biofilm	Adherencia y desarrollo biofilm.
BAP como proteínas (BAP)	Mejorar la adherencia.
Polisacáridos capsulares	Mejorar la supervivencia bacteriana en los tejidos y la formación de biofilm.
CipA	Mejorar la resistencia del suero y promover la invasión tisular.
CheAY	Regulador de virulencia/Expresión Csu pili.
FhaBC	Promover la adherencia en el tejido y la destrucción de las células huésped.
GacS	Promover la afluencia de neutrófilos.
GigABCD	Apoyo a la supervivencia in vivo y a la destrucción de las células huésped.
Sistema de adquisición de hierro	Apoyo a la supervivencia in vivo y a la destrucción de las células huésped.
Lipopolisacáridos (LPS)	Evasión del sistema inmune del huésped y la infección tisular.
MumC/MumT	Apoyo a la supervivencia in vivo.
OMVs	Portan factores de virulencia y gen de resistencia a antibióticos.
PER-I	Apoyo a la supervivencia in vivo y resistencia sérica.
Proteína de unión a penicilina 7/8 and PER-I	Apoyar la adherencia y la supervivencia in vivo.
Pili	Promover la adherencia y la formación de biofilm.
PLC/PLD	Apoyo a la supervivencia in vivo y resistencia sérica.
PmrAB	Resistencia a los antimicrobianos y modificación del LPS.
Porinas (OmpA/Omp 33-36, Omp22)	Promover la adherencia e invasión de tejidos.
RecA	Apoyo a la supervivencia in vivo.
SurA1	Apoyo a la supervivencia in vivo y resistencia sérica.
Type I Sistema de secreción	Mejorar la formación de biopelículas.
Type II Sistema de secreción	Apoyo a la supervivencia in vivo.
Type V Sistema de secreción	Promover la adherencia y la formación de biofilm.
Type VI Sistema de secreción	Eliminación de bacterias competidoras.
	Admite la colonización del huésped.
Tuf	Mejorar la resistencia del suero.
UspA	Apoyo a la supervivencia in vivo y a la destrucción de las células huésped.
ZnuABC, ZigA, Zr1A	Mejorar la supervivencia y persistencia in vivo.

Tomado de Shadan et al. (2023) con modificaciones.

3.2.3. En el ambiente

A. baumannii es un patógeno que puede prevalecer de manera ubicua en el ambiente, donde la resistencia y la adaptabilidad le permiten ocupar diversos nichos (Atrouni et al., 2016; Benoit et al., 2020). Las especies de *Acinetobacter* en la naturaleza se pueden encontrar en diferentes fuentes ambientales, siendo el suelo y el agua sus principales hábitats (Salazar y Nieves, 2005). También, se han detectado con frecuencia en áreas contaminadas con hidrocarburos, vertederos, aguas residuales, plantas, animales y humanos (Doughari et al., 2011; Atrouni et al., 2016).

Esta especie tiene la capacidad de crecer en el ambiente a temperaturas entre -20 °C a 44 °C, entre pH 5 y 10, así como en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes (Dekic et al., 2018). Además, puede producir biopelículas resistentes a la sequía, a los desinfectantes y antibióticos (Harding et al., 2018), y su alta adaptabilidad a condiciones ambientales adversas le confiere la capacidad de persistir durante meses en el ambiente (Gallego, 2016), por lo que, algunos autores las consideran las hierbas malas microbianas (Cray et al., 2013; Atrouni et al., 2016).

Pese a su presencia en diferentes nichos, *A. baumannii* tiene predilección por ambientes acuáticos (Ng et al., 2018), y hasta hace poco tiempo, se aislaba principalmente de aguas residuales hospitalarias y rara vez, se encontraba en entornos no hospitalarios. Sin embargo, la presencia de este patógeno en ambientes afectados por desechos humanos ha sido reportada en la última década (Higgins et al., 2018), se ha determinado su presencia en ríos, aguas residuales urbanas (domésticas e industriales) y en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) (Girlich et al., 2010; Hrenovic et al., 2016; Kovacic et al., 2017). Sin embargo, en los ambientes acuáticos de origen hospitalario es donde con mayor frecuencia se detectan (Higgins et al., 2018).

En las aguas residuales de origen hospitalario, esta especie representa un riesgo para la salud pública, pues, son cuerpos de agua cerrados donde hay una entrada constante de agua contaminada por *A. baumannii* resistente en concentraciones superiores a 3 log UFC/mL (Dekić et al., 2018). De igual forma, en las PTAR contienen *A. baumannii* viables con genes que codifican la resistencia a algunos antibióticos y los emite a efluentes en el medio ambiente representando relevancia para la salud si no se lleva a cabo un correcto tratamiento (Higgins et al., 2018).

3.2.4. Mecanismos de resistencia

A. baumannii es un patógeno que posee una gran flexibilidad genética que le confiere reordenamientos genéticos rápidos, mutaciones provechosas y la incorporación de factores exógenos transportados por componentes genéticos móviles, y de estos últimos, se estima que las secuencias de inserción son un aspecto esencial en la estructuración del genoma y en el desarrollo de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Adams y Brown, 2019). La resistencia antimicrobiana de *A. baumannii* se logra mediante tres mecanismos principales: la regulación del transporte de antibióticos a través de las membranas (disminución de la permeabilidad de las porinas o aumento de la excreción), modificación o alteración del sitio objetivo de los antibióticos e inactivación enzimática o neutralización de los antibióticos (Kyriakidis et al., 2021).

Algunos de los mecanismos más frecuentes de resistencia en *A. baumannii* a diferentes clases de antibióticos incluyen:

→ Síntesis de β -lactamasa

Las β -lactamasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico de los antibióticos de la familia de β -lactámicos, destruyendo el sitio activo del antibiótico, se pueden clasificar en cuatro clases (A, B, C y D). Las de clase A (TEM-1, TEM-2 y CARB-5) utilizan plásmidos y otros elementos genéticos móviles para propagarse ampliamente en *A. baumannii* permitiendo diferentes rangos de espectro contra antibióticos como penicilinas y cefalosporinas (Tooke et al., 2019; Kyriakidis et al., 2021), las de clase B (SIM, IMP, NDM, SPM y VIM) se encuentran en integrones y confieren resistencia a aminoglicósidos, las de clase C (ADC) están mediada por secuencias de inserción que tienen promotores que transcriben genes como ISAbal1 e ISAbal25, que cuando se expresan le confiere resistencia a cefalotina, cefotaxima, ampicilina, ceftazidima y aztreonam, y las de clase D (OXA-23, OXA-24, y OXA-58) están codificadas por plásmidos e hidrolizan a meropenem, carbapenémicos e imipenem (Vanegas et al., 2014; Barletta et al., 2018).

→ Proteínas de membrana externa

Las OMP trabajan en conjunto con las enzimas β -lactamasas para aumentar la resistencia antimicrobiana (Kyriakidis et al., 2021). La proteína o porina A de baja permeabilidad que se encuentra en la membrana externa (OmpA) no es específica de *A. baumannii*, pero, cumple

funciones primordialmente a nivel estructural y de acuerdo con ciertas hipótesis, pudiera ser participe en el transporte de antibióticos al exterior del espacio periplásmico de la bacteria (Smani et al., 2014; Kyriakidis et al., 2021).

→ **Bombas de eflujo**

Las bombas de eflujo permiten expulsar antibióticos fuera de las células, por lo que se piensa que son uno de los mecanismos de resistencia más importante de *A. baumannii*. Existen tres sistemas involucrados: sistemas RND AdeFGH, AdeIJK y AdeABC, y de estos, el sistema AdeABC es el más relacionado con *A. baumannii*, ya que presenta genes (*adeA* y *adeS*) que son codificadores de bombas de expulsión (Basatian et al., 2020). Estas bombas de eflujo pueden trabajar con otros mecanismos de resistencia como las enzimas β -lactamasas produciendo resistencia a múltiples fármacos, dando como resultado fugas de antibióticos y de distintas sustancias de la bacteria (Kyriakidis et al., 2021).

→ **Mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos**

La resistencia de *A. baumannii* a los aminoglucósidos puede ocurrir a través de tres mecanismos diferentes: puede llevarse a cabo mediante la variación del sitio objetivo por 16S rRNA metiltransferasas, a través de enzimas transformadoras de aminoglucósidos (AME) que atenúan la capacidad de unión de aminoglucósidos al sitio activo de la bacteria y por la disminución de la absorción de los aminoglucósidos después de la pérdida de permeabilidad de las bombas de eflujo (Kyriakidis et al., 2021).

→ **Mecanismo de resistencia a tetraciclinas**

La resistencia a los antibióticos de tetraciclina se debe a tres mecanismos principales: el flujo de salida dependiente de ATP, proteínas ribosómicas protectoras (RPP) e inactivación enzimática de las tetraciclinas (Kyriakidis et al., 2021).

→ **Mecanismo de resistencia fluoroquinolonas**

La resistencia a las quinolonas se produce a través de mecanismos diferentes: resistencia por plásmidos llevada a cabo por proteínas Qnrs, y mutaciones dirigidas de girasa y Topoisomerasa IV que disminuyen la interacción de la enzima con sus respectivas quinolonas (Kyriakidis et al., 2021).

→ Mecanismo de resistencia a polimixinas

Los mecanismos de resistencia a la polimixina en *A. baumannii* incluyen: mutaciones en los genes LpxA, LpxC y LpxD, estos codifican aciltransferasas indispensables para biosintetizar el lípido A y asociadas a la deficiencia de este lípido y cambios en los objetivos de los fármacos a través de la modificación del LPS-lípido como resultado de mutaciones en el operón PmrCAB y el gen *mcr* (Kyriakidis et al., 2021).

→ Otros mecanismos de resistencia

Entre los mecanismos que promueven la resistencia se encuentran: proteínas de la membrana externa (porinas), enzimas específicas (fosfolipasas C y D, y proteasa específica de glucano tipo adamalislina (CpaA), factores de la envoltura celular (LPS y la cápsula), formación de biopelículas y detección de quórum sensi (GacSA TCS que regula la expresión de Csu, Csu pili regulada por BfmRS TCS, BapAb asociadas a biopelículas, producción del exopolisacárido poli- β -1,6-N-acetilglucosamina PNAG, acil-homoserina lactonas por el receptor AbaR y el autoinductor sintasa AbaI), sistemas para la adquisición de micronutrientes (transportadores de hierro FecA y FecI y sideróforos, transportador ZigA GTPasa y ZnuABC), proteínas asociadas a la resistencia NRAMP que transporta manganeso, motilidad de espasmos a través de pili tipo IV y sistemas que secreta proteína tipo VI (Kyriakidis et al., 2021).

3.2.5. Genes de resistencia

A. baumannii también presenta una creciente resistencia a diversos fármacos, que se debe principalmente a genes intrínsecos o adquiridos a través de la transferencia horizontal de genes y esto contribuye a la diversidad de su resistoma, y a la propagación en ambientes como aguas residuales, las cuales actúan como reservorios para la propagación de genes de esta bacteria (Novović y Jovčić, 2023).

Dentro de los genes más relevantes se encuentran:

→ Los genes *blaOXA-23*, *blaOXA-24*, *blaOXA-51* y *blaOXA-58* regulados por secuencias de inserción ascendentes (IS), concretamente ISAbal, ISAbal2, ISAbal3, ISAbal9 e IS18, codifican enzimas oxacilinasas o β -lactamasas de clase D (OXA-23, OXA-24, OXA-51 y OXA-58) con capacidad hidrolítica a diversos carbapenémicos como: meropenem, ticarcilina, imipenem y amoxicilina (Wu et al., 2023). Su efectividad frente a los

carbapenémicos es regida principalmente por la sobreexpresión de la enzima OXA-51 (intrínseca) y OXA-23 (adquirida) mediante la inserción de ISAba1 en su región promotora (Kyriakidis et al., 2021).

- Los genes *blaVIM*, *blaIMP*, *blaSIM* y *blaNDM* codifican enzimas metalo-β-lactamasas que hidrolizan básicamente todas las β-lactamasas, incluyendo carbapenémicos (Kyriakidis et al., 2021).
- Gen *blaADC* codifica enzimas β-lactamasas que hidrolizan cefalosporinas (Kyriakidis et al., 2021).
- Los genes PMQR (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) codifican proteínas de la familia de repeticiones de pentapéptidos que hidrolizan quinolonas y fluoroquinolonas usadas frecuentemente en infecciones por esta bacteria (Mojtaba et al., 2020).
- Genes Tet (*tetA* y *tetB*) codifican bombas de eflujo que provoca resistencia a tetraciclinas y glicilciclinas (Barletta et al., 2018).
- Gen *SulI* causa resistencia a las sulfonamidas y trimetoprima (Mojtaba et al., 2020).

Este patógeno presenta una resistencia a una amplia gama de antibióticos conferida por genes específicos, como los mencionados anteriormente.

4. Métodos de detección, aislamiento y caracterización de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*

La detección, aislamiento y caracterización minuciosa de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* precisa de la combinación de diferentes métodos que aporten información vital y complementaria para el entendimiento de los ecosistemas microbianos y su impacto en la salud pública.

Dentro de estos métodos se encuentra las pruebas rápidas que utilizan reactivos para la identificación bacteriana como Pseudalert, también los métodos tradicionales de aislamiento y cultivo que emplean el uso de medios selectivos y diferenciales para la identificación, asimismo, los métodos bioquímicos que son esenciales para una identificación más detallada a nivel de género y especie como el VITEK® 2 Compact y por último, los métodos moleculares los cuales brindan una mayor especificidad y sensibilidad que favorece en la detección de genes de resistencia a antimicrobianos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cabe resaltar que la selección de los métodos estará influenciada de acuerdo con la disponibilidad de recursos, el propósito del estudio, el tipo de muestra y las especies bacterianas.

4.1. Detección y aislamiento

Para la detección y aislamiento de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* utilizarán los siguientes reactivos y medios de cultivos:

Pseudalert

Pseudalert es una prueba rápida para la detección específicamente de *P. aeruginosa* en muestras de agua, se basa en una tecnología de sustrato definido que detecta enzimas bacterianas, las células utilizan el sustrato rico en vitaminas, aminoácidos y otros nutrientes presentes en el reactivo y lo hidrolizan para crecer y reproducirse rápidamente. Esas cepas que crecen activamente poseen una enzima que se adhiere al sustrato del reactivo formando un complejo enzima-sustrato para dar un resultado positivo, el cual se evidencia en el cambio de color amarillo claro a amarillo intenso o fluorescencia azul si se observa con luz ultravioleta. Detecta en aproximadamente 24 h a 1 unidad formadora de colonias (UFC) de *P. aeruginosa* por cada 100 mL de agua (IDEXX, 2023).

Agar Ceftrimida

Agar Ceftrimida es un medio selectivo y diferencial diseñado para el aislamiento e identificación de *P. aeruginosa* en UFC bacterianas de color amarillo verdoso (Mustafa et al., 2020). Este medio fomenta que se produzca un pigmento fluorescente verde-amarillo denominado fluoresceína (pyoverdina), cuando este pigmento se difunde por todo el medio de cultivo promueve la coloración amarillo verdoso fluorescente característico de *Pseudomonas* spp. Las cepas de *P. aeruginosa* se determinan en este medio por la producción de piocianina, un pigmento de fenazina azul que es soluble en agua y no fluorescente, que solo es expulsado por esta especie en específico (Condalab, 2021).

CHROMagar™ *Pseudomonas*

Es un medio de cultivo cromogénico y selectivo diseñado para identificar especies de *Pseudomonas* en muestras ambientales (incluyendo aguas residuales), alimentos o superficies, y puede utilizarse cultivando en la superficie del agar o dentro del mismo. Su composición contiene agar, peptona, sales y una mezcla cromogénica que inhibe el crecimiento de Gram positivos y permite el crecimiento de Gram negativos principalmente *Pseudomonas* spp. Las especies como

P. aeruginosa crecen como colonias visibles a simple vista de color azul verdoso, otras especies Gram negativas son inhibidas, se vuelven incoloras o crecen de color violeta (Leaflet, 2021; Labema, 2023).

CHROMagar™ *Acinetobacter*

Es un medio de cultivo cromogénico, selectivo y diferencial, elaborado para la identificación de *Acinetobacter* spp. que crece como UFC llamativamente rojas (Benoit et al., 2020). Este consiste en una placa de agar selectiva que tiene un sustrato cromogénico y agentes que inhiben a la mayoría de los organismos Gram positivos y bacilos Gram negativos susceptibles a carbapenem, otras especies Gram negativas crecen en un color azulado (Nguyen et al., 2021). Este medio es capaz de detectar rápidamente todos los aislamientos de *A. baumannii* y *A. baumannii multirresistente* (Nguyen et al., 2021).

4.2. Identificación por métodos bioquímicos

Para la identificación microbiana de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se utilizará el sistema automatizado VITEK® 2 Compact.

El sistema VITEK® 2 Compact es un equipo empleado en el área de la microbiología para la identificación microbiana (ID) y la determinación de la susceptibilidad antibiótica (AST), todo el ciclo, desde que se inicia la lectura hasta que arroja el registro de los resultados, se dan de manera automática (BioMérieux, 2023). Este equipo contempla una amplia base de datos de identificación, que favorece la detección de una gran variedad de microorganismos con resultados rápidos y eficientes para la mayoría de las especies Gram positivas y Gram negativas, y de igual forma, posee datos de una serie de antimicrobianos para las pruebas de resistencia (BLEE, alto nivel de resistencia a los aminoglicósidos, screening de cefoxitina, resistencia inducible a la clindamicina, entre otros) (BioMérieux, 2023).

La identificación bacteriana se lleva a cabo mediante la inoculación de una suspensión de un cultivo microbiano puro en tarjetas con específicos paneles de reacciones bioquímicas, mientras que la sensibilidad antimicrobiana se realiza mediante tarjetas que contienen diluciones estándares de diferentes fármacos o antibióticos (Romeu et al., 2010) según los puntos de corte de sensibilidad establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024).

Las tarjetas reactivas contienen 64 pozos, cada uno con un sustrato de prueba individual, con estos sustratos se busca medir varias actividades metabólicas en donde se pueden mencionar la acidificación, hidrólisis enzimáticas, alcalinización y desarrollo en presencia de sustancias inhibidas. Las tarjetas están cerradas en ambos lados por una película transparente que impide el contacto entre las distintas mezclas microorganismo-sustrato y al mismo tiempo garantiza el nivel adecuado de oxígeno, con una trazabilidad completa y un mínimo de errores de transcripción (Balcazar, 2018). El test de sensibilidad antimicrobiana utiliza el mismo principio, a diferencia que, los pozos contienen diversos antibióticos (Balcazar, 2018).

En cuanto a su utilidad, el sistema VITEK® 2 Compact se ha utilizado en innumerables casos para estudiar aislamientos clínicamente relevantes de muestras médicas u otras fuentes, como agua y alimentos (Romeu et al., 2010).

4.3. Identificación por métodos moleculares

La identificación molecular de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se realizará mediante una PCR.

La PCR es una técnica molecular utilizada en laboratorios de investigación y diagnóstico para copiar segmentos específicos de ADN, con el propósito de obtener grandes cantidades de un fragmento de ácidos nucleicos a base de una muestra pequeña sin importar su calidad, lo que lo hace un método confiable y preciso (Solanki, 2012). Esta tecnología, desde que fue elaborada en 1984 por el bioquímico Kary Mullis, ha ido ganando terreno para ser aplicada en diversos campos científicos como la genética clínica, la ciencia forense, la medicina, en el campo de la agricultura, la bioindustria, el ambiente y en el área de la microbiología para la detección de propagación viral y bacteriana (Shahzad et al., 2020; Zhu et al., 2020). La PCR es muy versátil, lo que ha dado lugar a modificaciones del protocolo básico utilizado en diversas técnicas para cumplir con un sin fin de objetivos como: PCR cuantitativa, PCR digital de cristal (cdPCR), PCR digital basada en gotas, secuenciación de ARNm de células individuales utilizando microfluídica y PCR puente para secuenciación de nueva generación (Zhu et al., 2020).

La PCR se lleva a cabo en ciclos de cambios de temperatura, comprende tres pasos principales: desnaturalización, hibridación y extensión. En el primer paso, el ADN se desnaturaliza a temperaturas altas (90 °C - 97 °C), y se producen dos piezas de ADN monocatenario. Para preparar la extensión, en el paso dos, se reduce la temperatura (45 °C – 60 °C) y se anexan cebadores que

se hibriden a las cadenas de ADN molde. En el tercer paso, la temperatura se eleva nuevamente (normalmente a 72 °C) para que la Taq polimerasa lleve a cabo la extensión final de los cebadores anexados, creando una cadena de copia complementaria de ADN, culminando el proceso con varias copias (Solanki, 2012; Shahzad et al., 2020).

La PCR es una herramienta de mucha utilidad desde el punto de vista científico y médico, puesto su simplicidad y rapidez, con alta sensibilidad y especificidad en comparación con otros métodos convencionales (Solanki, 2012).

5. Medidas de prevención y control de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Se consideran a *P. aeruginosa* y *A. baumannii* como dos de los fundamentales patógenos nosocomiales que representan un problema de salud pública a nivel mundial gracias a su resistencia a múltiples antibióticos, morbilidad, alto valor de su tratamiento y mortalidad asociados, debido a esto, es necesario el desarrollo de algunas estrategias como programas educativos que concienticen, protocolos de limpieza (en el ambiente, en lo personal, entradas y salidas de hospitales) y fagoterapia para la prevención y control (Ferrer et al., 2021).

→ Prevención y control en el ambiente

A. baumannii al ser un patógeno capaz de permanecer en superficies animadas e inanimadas y tener limitada sensibilidad a los biocidas, resulta ser difícil de eliminar en el ambiente (Meschiari et al., 2021; Kanafani et al., 2023). No obstante, existen ciertas medidas de prevención básicas que ayudan a minimizar su proliferación como el constante lavado de manos, se ha investigado que esta simple medida, si se hace con frecuencia, interviene de manera eficaz con la transmisión entre individuos y el ambiente (Weinberg et al., 2020). La limpieza y desinfección monitoreada es crucial para minimizar riesgo de infección y va de la mano con la acertada elección de desinfectantes dentro de los cuales se encuentra el hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno (en aerosol o vaporizado), marcadores ultravioleta, ácido peracético, alcohol al 70 %, los fenólicos y los yodóforos (Kelemen et al., 2024), los cuales deben utilizarse en concentraciones y tiempos aptos para que no produzcan diferentes efectos de limpieza en superficies o reservorios ambientales que aumenten el peligro de infección (Weinberg et al., 2020; Kanafani et al., 2023; Kelemen et al., 2024).

En el caso de *P. aeruginosa*, las medidas de prevención y control suelen ser las mismas que con *A. baumannii* en lo que respecta a la correcta higiene de manos, precauciones de contacto, la utilización de desinfectantes como los previamente mencionados, limpiezas ambientales constantes, evitar la inhalación de agua contaminada en forma de aerosol, salvo que para mitigar las infecciones por esta bacteria es crucial el monitoreo recurrente, ya que suele encontrarse con mayor frecuencia en ambientes como suelo, el agua, las heces animales y humanas (Balfour, 2020; Spagnolo et al., 2021). Cabe resaltar que estas medidas de prevención deben ir ligadas con el desarrollo de programas de educación que promuevan la importancia de los protocolos de higiene para mejorar la comprensión sobre la importancia de controlar la propagación de estos patógenos (Weinberg et al., 2020).

→ **Prevención y control en el sector sanitario**

De acuerdo con la OMS, se puede disminuir o prevenir riesgos relacionados a la contaminación bacteriana en centros hospitalarios, sistemas de abastecimiento y distribución de agua, ejecutando un plan de seguridad del agua (PSA), con el cual se puede adoptar procedimiento de saneamiento, mantenimiento, análisis progresivo del suministro de agua, muestreo de los puntos más importantes de los centros de salud y monitoreo activo de las infecciones causadas por patógenos (Spagnolo et al., 2021).

Las estrategias de control más utilizadas incluyen:

Terapia con antibióticos

Aunque en la actualidad el sobreuso de antibióticos ha favorecido al desarrollo de multirresistencia disminuyendo las estrategias de control, todavía siguen siendo la única línea de protección contra las infecciones por *P. aeruginosa*, donde antibióticos como las penicilinas, aminoglucósidos y β -lactámicos representan el primer nivel de tratamiento de infecciones por este patógeno. Esta terapia consiste en alternar escalonadamente el uso de antibióticos, iniciando con dos antibióticos de diferentes clases y luego, finalizar con uno solo (monoterapia), esto aumenta la probabilidad de eficiencia (Lopes et al., 2022). En el caso de *A. baumannii*, se piensa que los fármacos carbapenémicos son el primer nivel de tratamiento solamente en áreas de baja tasa de resistencia, pese a que no hay una sola sugerencia consensuada para el tratamiento óptimo de infecciones por

A. baumannii, estudios avalan el uso de la colistina junto con otros antibióticos como pilar en las terapias aumentando la tasa de curación y por ende, disminuyendo la tasa de mortalidad, aunque el empleo de este sigue siendo debatible por los efectos secundarios tóxicos, los científicos concuerdan en no emplear la monoterapia con colistina. Por otro lado, los péptidos antimicrobianos in vitro pueden ser una alternativa prometedora contra *A. baumannii* en reemplazo de los antibióticos, puesto que, logran inhibir la formación de biopelículas a ciertas concentraciones (Weinberg et al., 2020).

Terapia con bacteriófagos

A pesar de que la terapia con fagos data desde 1917, fue quedando en el olvido tras el descubrimiento de los antibióticos, sin embargo, con el incremento de bacterias resistentes a antibióticos ha vuelto a retomar el interés debido a su especificidad y simplicidad de alteraciones del genoma por medio de ingeniería genética (Reina y Reina, 2018; Weinberg et al., 2020). Aunque su uso está reducido por la competencia de las bacterias para desarrollar resistencia, estos pueden adaptarse y recuperar sus propiedades infecciosas rápidamente (Weinberg et al., 2020). Los cócteles de fagos han demostrado excelentes resultados contra estos patógenos. Los fagos podrían emplearse mejor en combinación con antibióticos para mayor actividad bactericida, por ejemplo, durante el proceso de compensación genética de una bacteria, ya que mientras esta desarrolla un rasgo en pro de su resistencia a los antibióticos, se podría volver propensa a la infección por fagos y viceversa, una mayor resistencia a los fagos podría resultar en una mayor sensibilidad a los antibióticos (Reina y Reina, 2018; Weinberg et al., 2020). En otros estudios se ha determinado que la aplicación de fagos con genes de resistencia dominantes favorece en una disminución de la resistencia en las bacterias captadoras, inclusive se han elaborado fagos alterados genéticamente que tienen incorporado el sistema de edición génica CRISPR-Cas9 para que localicen los genes bacterianos de resistencia y los inactiven (Reina y Reina, 2018).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Áreas de estudio

Se seleccionaron tres puntos de muestreo en la Ciudad de Panamá. El primer punto elegido fue la PTAR ubicada en el corregimiento de Juan Díaz a $9^{\circ}00'58''\text{N}$ $79^{\circ}26'45''\text{O}$ (Figura 1A), siendo esta planta responsable de recibir, tratar y descontaminar las aguas residuales provenientes de las cuencas de los ríos Juan Díaz, Tocumen, Matasnillo, Tapia, Río Abajo, Las Lajas, quebrada La Gallinaza y Curundú (Martínez et al., *s.f.*).

El segundo punto de muestreo se realizó en la CSS del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid situada a $8^{\circ}58'49''\text{N}$ $79^{\circ}32'10''\text{O}$ en Av. José de Fábrega. Este hospital drena aguas residuales de varios puntos como: el edificio administrativo (cocina y lavandería), cuarto de urgencias, unidades de infectología, hemodiálisis y parto, radiología, morgue, pie diabético, laboratorios, patología, especializada y hospital general (Figura 1B).

El tercer punto de muestreo se llevó a cabo en la Estación de Bombeo 3 de la Cinta Costera 2 localizada en la Av. Justo Arosemena y Calle 37 Este a $8^{\circ}58'01''\text{N}$ - $79^{\circ}31'58''\text{O}$. Esta estación bombea aguas residuales del Hospital Santo Tomás, el Hospital del Niño y el Hospital Nacional a la PTAR (Figura 1C).

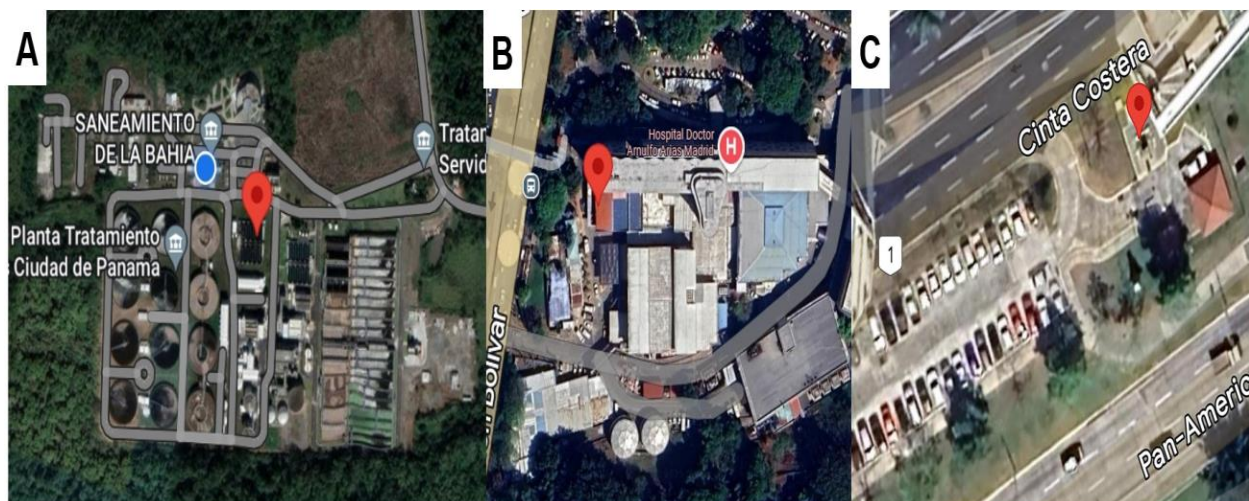


Figura 1. Colección de muestras en aguas residuales. A) Muestreo en la PTAR. B) Muestreo en la CSS. C) Muestreo en la EB3.

2. Colecta de muestras

Se recolectaron muestras periódicas de 100 mL de agua residual en envases de uroanálisis estériles en los tres puntos de muestreo, empleando la asepsia en todo el proceso. Luego, se transportaron en cadena de frío hasta los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA), y de Microbiología de Aguas (LAMA) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá, donde fueron procesadas.

3. Análisis en Laboratorio

Se trabajaron las muestras de agua cruda de acuerdo con las necesidades de crecimiento de cada bacteria y a las pruebas o técnicas que corroboraron su presencia en las mismas.

3.1. Aislamiento e identificación presuntiva

Se aislaron 25 UFC de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* en cada uno de los puntos de muestreo, garantizando que la mitad se consiguiera en un muestreo y la otra mitad en el siguiente. Se obtuvieron un total de 150 UFC entre los 3 puntos de muestreo y entre ambas cepas.

Para el aislamiento de *P. aeruginosa* se realizó inicialmente una prueba rápida Pseudalert, para ello, se agregó 1 mL de agua cruda de cada uno de los puntos colectados en tubos con 9 mL de la mezcla de un sobre de reactivo Pseudalert en 100 mL de agua destilada, y se dejaron incubando a 37 °C por 24 h. Luego, se realizó un primer estriado en Agar Cetrimida y se incubaron a 37 °C por 24 h. Después, se efectuó un segundo estriado de las UFC presuntivas en CHROMagar™ *Pseudomonas* y se incubaron a 37 °C por 24 h.

Para el aislamiento de *A. baumannii* se llevó a cabo un esparcido en superficie, se tomaron con una micropipeta 0.1 mL de las muestras directas de los puntos de muestreo y se extendieron con movimientos rotativos utilizando una espátula de Drigalski estéril sobre toda la superficie de los platos de CHROMagar™ *Acinetobacter*, y se dejaron incubando a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se seleccionaron las UFC típicas, se estriaron en CHROMagar™ *Acinetobacter* y se incubaron a 37 °C por 24 h.

Cabe resaltar que en cada selección de las UFC se tomó en cuenta características como morfología, color y olor típico de la especie.

3.2. Identificación bioquímica

Con ayuda del VITEK®2 Compact se procedió a identificar los aislados de ambas bacterias previamente estriados e incubados en agar nutritivo por 24 h, siguiendo el protocolo operativo detallado por MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK®2 SYSTEM (Pincus, *s.f.*). Como primer paso, se tomaron con ayuda de hisopos estériles las UFC aisladas en agar nutritivo y se introdujeron en tubos de poliestireno que contenían 3 mL de solución salina estéril al 0.45 %, se calibró la suspensión con un densitómetro (DensiCHEK) hasta obtener una densidad óptica de 0.50 - 0.63 equivalente a 0.5 McFarland. Luego, se procedió a llenar la información de cada bacteria en el software, se escaneó el código de barra de las tarjetas Gram negativas (GN) que entrarían en contacto con la suspensión bacteriana, se introdujo el cassette al equipo para continuar con la fase de llenado, sellado e incubación automática, donde después, se reflejaron los datos en un lapso de 3 a 6 h. Se finalizó con el descarte de las tarjetas utilizadas y el registro de los resultados.

Una vez se confirmaron las cepas, se procedió a criopreservar las UFC en glicerol al 20 %, para esto, se agregaron por triplicados de tubos tipo Eppendorf estériles (1,7 mL) 500 µL de glicerol al 40 % y 500 µL de caldo nutritivo con las UFC de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* incubados previamente, y se congelaron entre -20 °C y -80 °C.

3.3. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana

Para la prueba de perfil de resistencia, se realizó igualmente una suspensión bacteriana a una densidad óptica de 0.5 McFarland y luego, se agregó 145 µL de la suspensión a nuevos tubos de poliestireno con 3 mL de solución salina estéril al 0.45 %; seguidamente, se procedió a escanear el código de barra de las tarjetas AST-N402 y se introdujeron al equipo para la obtención de los resultados en un lapso de 3 - 8 h.

3.4. Extracción de ADN

Se realizó una suspensión densa de 500 µL de agua libre de nucleasa y las cepas bacterianas (previamente cultivadas) en tubos tipo Eppendorf estériles siguiendo el estándar de turbidez de 3 McFarland como referencia, en relación 1:5. Después, estos se agitaron en un vórtex por 1 min, para romper las células y liberar el ADN. Luego, se llenaron los pocillos del bloque térmico con agua destilada y se esperó a que llegara a una temperatura de 95 °C, una vez alcanzada la

temperatura, se colocaron los tubos tipo Eppendorf con la suspensión en los pocillos del bloque térmico por 20 min. Seguido, se continuó con el centrifugado de la suspensión a 12000 rpm por 10 min y posteriormente, se transfirieron 100 µL del sobrenadante con ADN a nuevos tubos tipo Eppendorf estériles, por duplicado. Finalmente, los tubos tipo Eppendorf con material genético, se almacenaron en el ultracongelador a -80 °C para su posterior uso.

3.5. Cuantificación de ADN

Se cuantificó el ADN extraído con el equipo NanoDrop Lite Plus (Thermo Fisher Scientific, 2022) para evaluar la concentración y pureza del ADN extraído (260 y 280 nm). La pureza de las muestras extraídas fue con índices de calidad entre 1.80 y 2.00.

3.6. Identificación molecular

Para la identificación de las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se trabajó con las metodologías de Choi et al. (2013) y Falah et al. (2019), respectivamente.

La PCR en tiempo final se llevó a cabo utilizando el kit Master Mix 2X (Promega, M7505), siguiendo el protocolo establecido por Corporation Promega (2021). Para un volumen de reacción de 25 µL, se mezcló en un tubo tipo Eppendorf: 12.50 µL de Master Mix 2X, la muestra de ADN <=50 ng, 0.5 µL de cada cebador (Forward y Reverse) a una concentración final de 0.1-1.0 µM y agua libre de nucleasa aforando hasta 25 µL (Cuadro 5).

Cuadro 5. Primers utilizados en la identificación molecular de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Microorganismo	Secuencia 5'--3'	Gen	Tamaño del amplicón	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>	F: 5' -CTGGGTCGAAAGGTGGTTGTTATC-3' R: 5' -GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC-3'	<i>oafA</i>	232 pb	Choi et al., 2013
<i>A. baumannii</i>	F: 5' -TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' R: 5' -TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	<i>blaOXA-51</i>	353 pb	Falah et al., 2019

Las condiciones de PCR para el gen *oafA* de *P. aeruginosa* (Choi et al., 2013) fueron las siguientes:

- Pre-desnaturalización a 95 °C durante 3 min.
- 35 ciclos de amplificación de: 95 °C durante 60 s, 63°C durante 30 s y 72 °C durante 60 s.
- Extensión final a 72 °C durante 10 min.

Las condiciones de PCR para el gen *blaOXA-51* de *A. baumannii* (Falah et al., 2019) fueron las siguientes:

- Pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min.
- 30 ciclos de amplificación de: 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min.
- Extensión final a 72 °C durante 10 min.

3.7. Detección de genes de resistencia a antimicrobianos

Se aplicó PCR Múltiple para determinar la presencia de genes de resistencia *blaVIM*, *blaIMP*, *blaNDM* y *blaKPC*. También, se realizó una PCR en tiempo final para el gen *blaOXA-48*.

Las PCR se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de Malbran (2019). Para un volumen de reacción de 25 µL, se mezcló en un tubo tipo Eppendorf, muestra de ADN <=50 ng, 0,5 µL de Primer Forward (10 µM), 0,5 µL de Primer Reverse (10 µM) y agua libre de nucleasa aforando hasta 25 µL (Cuadro 6).

Cuadro 6. Primers utilizados en la detección de genes de resistencia de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Gen	Nombre del primer	Secuencia 5'–3'	Tamaño del amplicón	Referencia
<i>blaIMP</i>	IMP-UF1 IMP-UR1	GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT	404 pb	Malbran, 2019
<i>blaVIM</i>	VIM-F VIM-R	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G ATG AAA GTG CGT GGA GAC	261 pb	
<i>blaNDM</i>	NDM-F NDM-R	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC GGC GTA GTG CTC AGT GTC	512 pb	
<i>blaKPC</i>	KPC-F KPC-R	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA	916 pb	
<i>blaOXA-48</i>	OXA48-F OXA48-R	ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG G TGA GCA CTT CTT TTG TGA TG	763 pb	

Las condiciones de la PCR Múltiple para los genes *blaIMP*, *blaVIM*, *blaNDM* y *blaKPC* fueron los siguientes:

- Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min.
- 30 ciclos de amplificación de: 94 °C por 30 s, 54 °C por 30 s y 72 °C por 60 s.
- Extensión final de 72 °C por 10 min.

Las condiciones de PCR para el gen *blaOXA-48* fueron los siguientes:

- Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min.
- 30 ciclos de amplificación de: 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s y 72 °C por 60 s.
- Extensión final de 72 °C por 10 min.

3.8. Electroforesis

Para la visualización de los resultados de las PCR realizadas, se implementó una electroforesis en gel de agarosa. Para esto, se colocaron los peines correspondientes en la cámara de electroforesis, posteriormente, se preparó el gel de agarosa y se disolvió en un tampón Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) a una concentración de 0.5 X, para obtener una concentración del 2 % (p/v). Luego, se adicionó el Sybr Safe a 0.5 µg/mL (4 - 8 µL dependiendo el tamaño de la cubeta) y se vació en la cámara de electroforesis hasta solidificar.

Seguido a esto, se mezclaron 8 µL de la muestra con 2 µL del tampón de corrida (Tinte de carga o loading buffer azul/naranja, 6X), para después, colocarlos en cada pocillo. Se agregó el marcador de peso molecular de 100 pb y se dejó corriendo a 80 V durante 1 h y 30 min. Por último, se utilizó el fotodocumentador con transiluminador de luz ultravioleta (UV) (BioDoc-it® 220 Imaging System, Analytik Jena, USA), para visualizar los resultados.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

1. Aislamiento, identificación y resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa*

Se lograron aislar 125 cepas presuntivas de *P. aeruginosa*, de las cuales se seleccionaron 75 cepas, distribuidas en 25 cepas de cada punto de muestreo. Luego de ser sometidas a identificación mediante VITEK 2, utilizando tarjetas GN, se determinó con porcentajes de confianza que varían entre 90 % y 99 %, considerándose ``confiable`` y ``excelente`` según el software de análisis de BioMérieux Inc., obteniéndose que el 100 % (75/75) de los aislados pertenecen a la especie *P. aeruginosa* (Cuadros 7, 8 y 9).

Las cepas confirmadas fueron sometidas a una prueba de susceptibilidad antimicrobiana utilizando el sistema automatizado VITEK 2, con tarjetas AST-N402, lo que permitió determinar la sensibilidad o resistencia a antibióticos de las familias de penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. La prueba de sensibilidad a distintos antibióticos realizada a las muestras de la PTAR, arrojaron como resultado que el 100 % (25/25) de las cepas presentaron resistencia intrínseca a cefazolina, mientras que el 4 % (1/25) mostró resistencia adquirida a piperacilina/tazobactam (Cuadro 7). En la CSS, la prueba de sensibilidad reveló que el 100 % (25/25) presentaron únicamente resistencia intrínseca a cefazolina, mientras que mostraron sensibilidad a piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem, ampicilina, gentamicina y ciprofloxacino (Cuadro 8). Para la EB3, se obtuvo que el 100 % (25/25) de las cepas exhibieron resistencia intrínseca a cefazolina, además, resistencia adquirida, 8 % (2/75) a imipenem, 4 % (1/25) a piperacilina/tazobactam, 4 % (1/25) a ceftazidima, 4 % (1/25) a meropenem y 4 % (1/25) a ciprofloxacino. También, 4 % (1/25) de las cepas presentaron resistencia intermedia a cefepima y otro 4 % (1/25) a meropenem (Cuadro 9).

Cuadro 7. Resultados de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas e identificadas de la PTAR.

PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE JUAN DIAZ														
Código de cepa	ID Bioquímica	Antibiograma									ID Molecular	Gen de resistencia		
		Penicilinas	Cefalosporinas			Carbapenémicos		Aminoglucósidos		Fluoroquinolonas				
		Piperacilina / Tazobactam	Cefazolina	Ceftazidima	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Amicacina	Gentamicina	Ciprofloxacino				
JAPA4213PTAR-1	93%											+	<i>blaOXA-48</i>	
JAPA4214PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4215PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4223PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4312PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4314PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4318PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4319PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA43110PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4415PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4512PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4514PTAR-1	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA32PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA321PTAR-3	97%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA323PTAR-3	98%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA34PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA38PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA381PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA39PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA40PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA41PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA411PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA48PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA481PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA49PTAR-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>

Sensibles Resistentes Intermedio

Cuadro 8. Resultados de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas e identificadas de la CSS.

COMPLEJO HOSPITALARIO DOCTOR ARNULFO ARIAS MADRID														
Código de cepa	ID Bioquímica	Antibiograma									ID Molecular	Gen de resistencia		
		Penicilinas	Cefalosporinas			Carbapenémicos		Aminoglucósidos		Fluoroquinolonas				
		Piperacilina / Tazobactam	Cefazolina	Ceftazidima	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Amicacina	Gentamicina	Ciprofloxacino				
JAPA1CSS-2	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA2CSS-2	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4CSS-2	97%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA6CSS-2	97%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA7CSS-2	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA8CSS-2	97%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA9CSS-2	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA91CSS-2	90%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA10CSS-2	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA101CSS-2	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA102CSS-2	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA11CSS-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA111CSS-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA12CSS-3	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA121CSS-3	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA13CSS-3	97%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA141CSS-3	93%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA161CSS-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA17CSS-3	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA171CSS-3	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA18CSS-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA19CSS-3	97%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA20CSS-3	99%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA21CSS-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA22CSS-3	95%												+	<i>blaOXA-48</i>

Sensibles Resistentes Intermedio

Cuadro 9. Resultados de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas e identificadas de la EB3.

ESTACIÓN DE BOMBEO 3 DE LA CINTA COSTERA 2													
Código de cepa	ID Bioquímica	Antibiograma									ID Molecular	Gen de resistencia	
		Penicilinas		Cefalosporinas			Carbapenémicos		Aminoglucósidos				Fluoroquinolonas
		Piperacilina / Tazobactam	Cefazolina	Ceftazidima	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Amicacina	Gentamicina	Ciprofloxacino			
JAPA1EB3-1	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA2EB3-1	97%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA21EB3-1	97%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA3EB3-1	97%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA31EB3-1	97%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA4EB3-1	98%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA9EB3-1	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA91EB3-1	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA11EB3-1	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA12EB3-1	97%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA13EB3-1	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA131EB3-1	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA18EB3-2	97%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA19EB3-2	99%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA20EB3-2	97%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA22EB3-2	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA23EB3-2	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA24EB3-2	97%											+	<i>blaVIM</i>
JAPA26EB3-2	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA27EB3-2	97%											+	<i>blaVIM</i>
JAPA28EB3-2	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA29EB3-2	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA30EB3-3	95%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA32EB3-3	97%											+	<i>blaOXA-48</i>
JAPA33EB3-3	97%											+	<i>blaOXA-48</i>

Sensibles
 Resistentes
 Intermedio

Con estos resultados, se establece la multirresistencia de las cepas, determinando que el 100 % (25/25) de los aislados de la PTAR y la CSS, no presentaron multirresistencia. Por otra parte, en los aislados de la EB3 un 4 % (1/25) de las cepas presentaron multirresistencia (Figura 2).

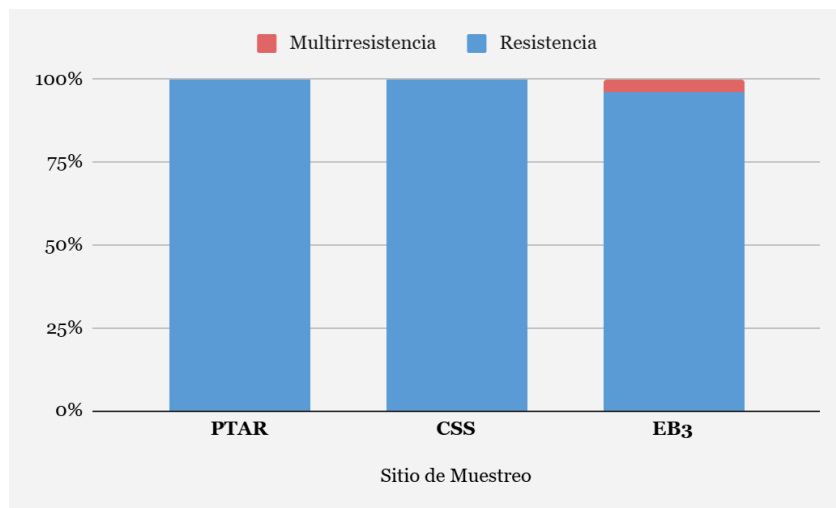


Figura 2. Comparación de la multirresistencia entre las cepas de los diferentes sitios de muestreo.

Adicionalmente, aplicando una PCR estandarizada para identificación, se logró amplificar un fragmento de 232 pb del gen *oafA* en cada una de las cepas analizadas, evidenciando bandas positivas y confirmando molecularmente el 100 % (75/75) de las muestras como *P. aeruginosa* (Figura 3).

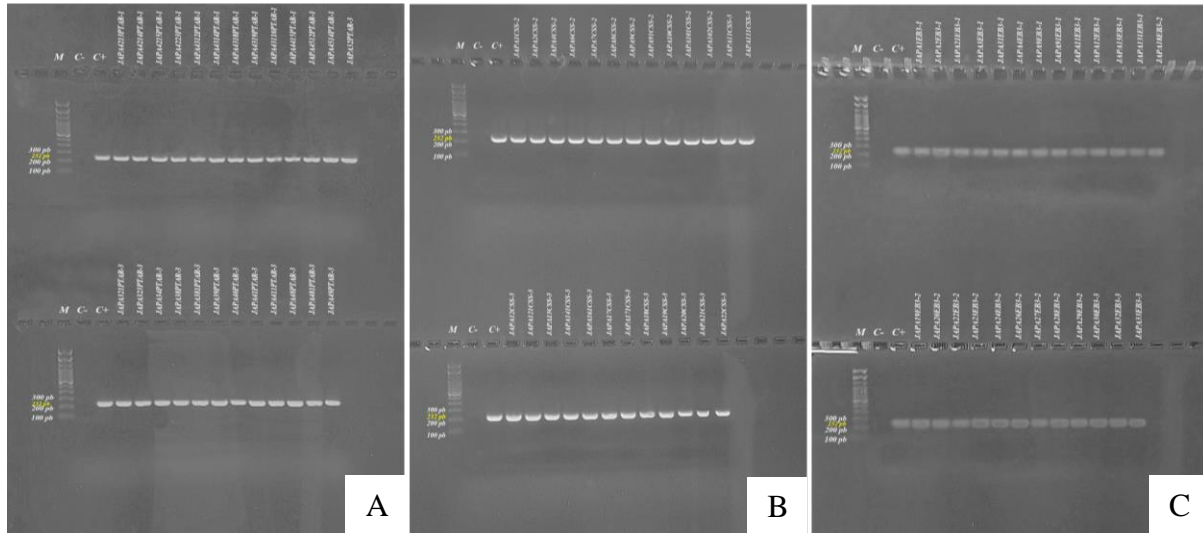


Figura 3. Resultados de las PCR en tiempo final para la identificación de *P. aeruginosa*. Patrones de amplificación de las cepas de: A) PTAR. B) CSS. C) EB3.

También, utilizando una PCR Multiplex estandarizada, se amplificaron fragmentos de 261 pb del gen *blaVIM*, de 404 pb del gen *blaIMP*, de 512 pb del gen *blaNDM* y de 916 pb del gen *blaKPC*, determinando que el 2,6 % (2/75) de las cepas analizadas portaban el gen *blaVIM* asociado a su resistencia (Figura 4). De igual forma, se realizó una PCR en tiempo final para amplificar un fragmento de 763 pb del gen *blaOXA-48*, obteniendo que el 97,3 % (73/75) de las cepas presentaron este gen (Figura 5).

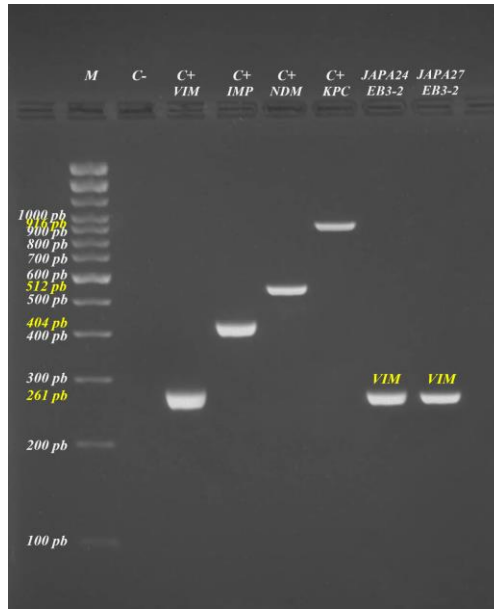


Figura 4. Resultados positivos de las PCR Múltiple para detección de genes de resistencia en *P. aeruginosa*.

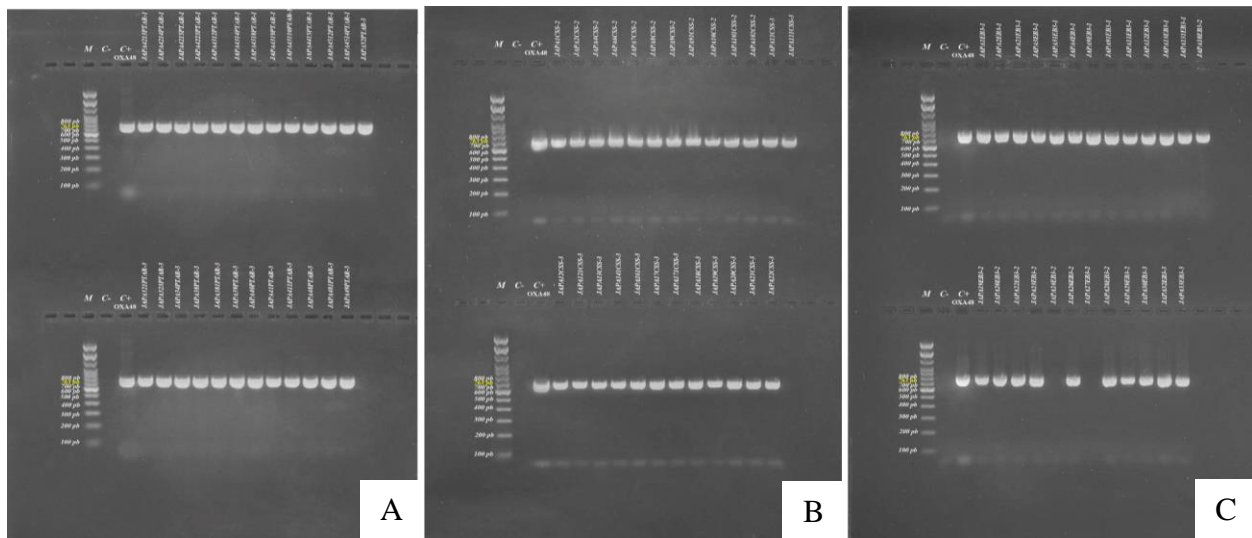


Figura 5. Resultados positivos de las PCR para detección del gen *blaOXA-48* en *P. aeruginosa*. Patrones de amplificación de las cepas de: A) PTAR. B) CSS. C) EB3.

2. Aislamiento, identificación y resistencia antimicrobiana de *A. baumannii*

Se lograron aislar 105 cepas presuntivas de *A. baumannii*, de las cuales se eligieron 75, distribuidas en 25 cepas de cada punto de muestreo. La identificación con el sistema automatizado VITEK 2, mediante el uso de tarjetas GN, reveló con niveles de confianza entre el 95 % y el 99 % (considerados ``confiable`` y ``excelente`` por el software de BioMérieux Inc.), que el 100 % de las 75 cepas analizadas corresponden a la especie *A. baumannii* (Cuadros 10, 11 y 12).

Se evaluó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas confirmadas utilizando el sistema automatizado VITEK 2, con tarjetas AST-N402, donde se logró determinar resistencia a antibióticos del grupo de las penicilinas y cefalosporinas. Los resultados de la prueba realizada a las muestras de la PTAR, indicaron que el 100 % (25/25) de las cepas presentaron resistencia intrínseca a cefazolina, y resistencia adquirida, 24 % (6/25) a piperacilina/tazobactam, 4 % (1/25) a ceftriaxona y 4 % (1/25) a cefepima. Además, presentaron resistencia intermedia, 28 % a ceftriaxona, 12 % a cefepima, 8 % a piperacilina/tazobactam y 4 % a ceftazidima (Cuadro 10).

En la CSS, la prueba de sensibilidad evidenció que el 100 % (25/25) de las cepas presentaron resistencia intrínseca a cefazolina y 4 % (1/25) reflejó resistencia adquirida a piperacilina/tazobactam. Además, presentaron resistencia intermedia, 4 % a ceftriaxona y 4 % a cefepima (Cuadro 11).

Para la EB3, se obtuvo que el 100 % (25/25) de las cepas presentaron resistencia intrínseca a cefazolina y el 48 % (12/25) exhibió resistencia adquirida a ceftazidima. Además, presentaron resistencia intermedia, 4 % a ceftriaxona y 4 % a ceftazidima (Cuadro 12).

Los resultados del estudio permitieron evaluar el perfil de resistencia de las cepas aisladas, reflejando resistencia a no más de dos grupos de antibióticos, por tanto, no se detectó multirresistencia en las cepas analizadas de *A. baumannii* en ninguno de los sitios de muestreo.

Cuadro 10. Resultados de las cepas de *A. baumannii* aisladas e identificadas de la PTAR.

PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE JUAN DIAZ																
Código de cepa	ID Bioquímica	Antibiograma											ID Molecular	Gen de resistencia		
		Penicilinas		Cefalosporinas				Carbapenémicos		Aminoglucósidos		Fluoroquinolonas				
		Ampicilina/ Subactam	Piperacilina/ Tazobactam	Cefazolina	Ceftazidima	Ceftriaxona	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Amicacina	Gentamicina	Ciprofloxacino				
JAAB40PTAR-2	99%														+	-
JAAB41PTAR-2	99%														+	-
JAAB42PTAR-2	99%														+	-
JAAB43PTAR-2	99%														+	-
JAAB44PTAR-2	99%														+	-
JAAB45PTAR-2	99%														+	-
JAAB46PTAR-2	99%														+	-
JAAB81PTAR-2	99%														+	-
JAAB82PTAR-2	99%														+	-
JAAB91PTAR-2	99%														+	-
JAAB92PTAR-2	99%														+	-
JAAB111PTAR-2	99%														+	-
JAAB112PTAR-2	99%														+	-
JAAB12PTAR-3	99%														+	-
JAAB13PTAR-3	99%														+	-
JAAB14PTAR-3	99%														+	-
JAAB15PTAR-3	99%														+	-
JAAB16PTAR-3	99%														+	-
JAAB17PTAR-3	99%														+	-
JAAB20PTAR-3	99%														+	-
JAAB21PTAR-3	99%														+	-
JAAB23PTAR-3	99%														+	-
JAAB25PTAR-3	99%														+	-
JAAB26PTAR-3	99%														+	-
JAAB29PTAR-3	99%														+	-

Sensibles
 Resistentes
 Intermedio

Cuadro 11. Resultados de las cepas de *A. baumannii* aisladas e identificadas de la CSS.

COMPLEJO HOSPITALARIO DOCTOR ARNULFO ARIAS MADRID																
Código de cepa	ID Bioquímica	Antibiograma											ID Molecular	Gen de resistencia		
		Penicilinas		Cefalosporinas				Carbapenémicos		Aminoglucósidos		Fluoroquinolonas				
		Ampicilina/ Subactam	Piperacilina/ Tazobactam	Cefazolina	Ceftazidima	Ceftriaxona	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Amicacina	Gentamicina	Ciprofloxacino				
JAAB1CSS-4	99%														+	-
JAAB2CSS-4	99%														+	-
JAAB21CSS-4	99%														+	-
JAAB3CSS-4	99%														+	-
JAAB4CSS-4	99%														+	-
JAAB5CSS-4	99%														+	-
JAAB51CSS-4	99%														+	-
JAAB52CSS-4	99%														+	-
JAAB53CSS-4	99%														+	-
JAAB6CSS-4	99%														+	-
JAAB61CSS-4	99%														+	-
JAAB7CSS-4	99%														+	-
JAAB71CSS-4	99%														+	-
JAAB8CSS-4	95%														+	-
JAAB81CSS-4	99%														+	-
JAAB82CSS-4	99%														+	-
JAAB9CSS-4	99%														+	-
JAAB10CSS-4	99%														+	-
JAAB101CSS-4	99%														+	-
JAAB11CSS-4	99%														+	-
JAAB12CSS-4	99%														+	-
JAAB121CSS-4	99%														+	-
JAAB13CSS-4	99%														+	-
JAAB14CSS-4	99%														+	-
JAAB15CSS-4	99%														+	-

Sensibles
 Resistentes
 Intermedio

Cuadro 12. Resultados de las cepas de *A. baumannii* aisladas e identificadas de la EB3.

ESTACIÓN DE BOMBEO 3 DE LA CINTA COSTERA 2														
Código de cepa	ID Bioquímica	Antibiograma										ID Molecular	Gen de resistencia	
		Penicilinas		Cefalosporinas				Carbapenémicos		Aminoglucósidos				Fluoroquinolonas
		Ampicilina/Sulbactam	Piperacilina/Tazobactam	Cefazolina	Ceftazidima	Ceftriaxona	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Amicacina	Gentamicina			Ciprofloxacino
JAAB1FB3-2	99%			Resistentes									+	-
JAAB2FB3-2	99%			Resistentes	Intermedio	Intermedio							+	-
JAAB3EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB4FB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB5EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB6EB3-3	99%			Resistentes	Resistentes								+	-
JAAB7EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB8EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB9EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB10EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB11EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB12EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB13FB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB14FB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB15EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB16EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB17EB3-3	99%			Resistentes	Resistentes								+	-
JAAB18EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB19EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB20EB3-3	99%			Resistentes	Resistentes								+	-
JAAB21EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB22FB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB23FB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB24EB3-3	99%			Resistentes									+	-
JAAB25EB3-3	99%			Resistentes									+	-

Sensibles
 Resistentes
 Intermedio

Además, mediante una PCR estandarizada para la identificación, se amplificó un fragmento de 353 pb del gen *blaOXA-51* en cada una de las cepas examinadas. La visualización de bandas positivas en la electroforesis confirmó a nivel molecular que el 100 % (75/75) de las muestras corresponden a *A. baumannii* (Figura 6).

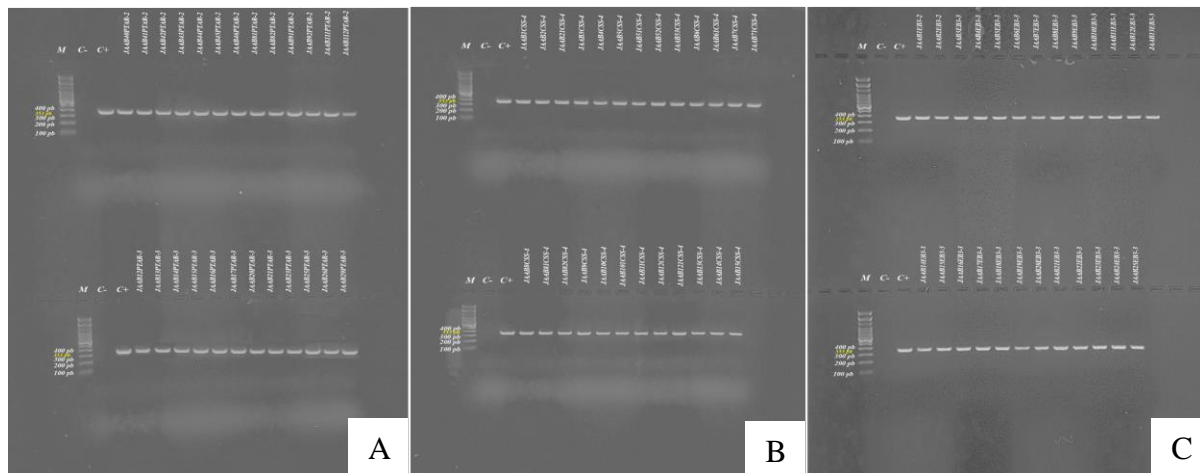


Figura 6. Resultados de las PCR en tiempo final para la identificación de *A. baumannii*. Patrones de amplificación de las cepas de: A) PTAR. B) CSS. C) EB3.

Asimismo, utilizando una PCR Múltiple estandarizada, se amplificaron fragmentos de 261 pb del gen *blaVIM*, de 404 pb del gen *blaIMP*, de 512 pb del gen *blaNDM* y de 916 pb del gen *blaKPC*, pero ninguno fue detectado en las cepas analizadas. Similarmente, la PCR en tiempo final para amplificar un fragmento de 763 pb del gen *blaOXA-48* y también, resultó negativa en todas las cepas (ANEXOS: Figura 16 y 17).

DISCUSIÓN

En esta investigación centrada en el aislamiento e identificación de cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* para detectar genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales de origen hospitalario, específicamente de la PTAR, la CSS y la EB3, se ha obtenido resultados que evidencian el estado actual de la resistencia antimicrobiana en nuestro país. A continuación, se discutirá los resultados observados anteriormente:

1. Aislamiento e identificación de *P. aeruginosa*

En relación con el aislamiento de *P. aeruginosa*, inicialmente, al utilizar los protocolos tradicionales del ``Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater`` (Greenberg et al., 1999) se encontró dificultades para aislar estas cepas. A pesar de seguir las instrucciones, las colonias crecían con características morfológicas atípicas de esta especie, debido a esto, se realizaron modificaciones al protocolo original y a partir de ese momento, se logró aislar UFC con características de morfología, color y olor típicos de *P. aeruginosa*. Esos cambios, que consistieron en enriquecer el agua cruda en Pseudalert permitió la proliferación de *P. aeruginosa*, como se menciona en el estudio de Ngwa et al. (2017), el enriquecimiento inicial de muestras de aguas ambientales en Pseudalert aumenta la recuperación de esta especie, demostrando una alta sensibilidad (100 %) y especificidad (71 %). La utilización de dos medios de cultivo selectivos asegura tanto la pureza de los aislados como la efectiva confirmación presuntiva de la especie, el agar cetrimida facilita la identificación mediante la producción de pigmentos característicos, mientras que el agar cromogénico asegura una identificación fácil por medio de un color en particular (azul-verde), contribuyendo a su confirmación. Ambos medios no solo permiten la distinción de la especie, sino que también reducen o impiden la proliferación de otras especies (Shahab et al., 2024). Estos cambios, garantizaron la identificación bioquímica de *P. aeruginosa* con altos porcentajes de confianza, y una identificación molecular exitosa, lo que resultó en datos confiables (Cuadros 7, 8 y 9).

2. Aislamiento e identificación de *A. baumannii*

Inicialmente, se intentó el aislamiento de *A. baumannii* utilizando agar MacConkey, un medio diferencial comúnmente empleado para Gram negativas. Sin embargo, no se obtuvo resultados satisfactorios. La presencia de otras bacterias con requerimientos nutricionales y de crecimiento similares en las muestras ambientales dificultó la proliferación selectiva de *A. baumannii*, limitando su recuperación en este medio. Ante la ineficacia del agar MacConkey, se optó estratégicamente por un medio cromogénico (CHROMagar™ *Acinetobacter*). Esta elección demostró ser crucial para el aislamiento exitoso de esta especie, dada su alta selectividad y capacidad de diferenciación dentro del género *Acinetobacter* (Benoit et al., 2020). Esta ventaja se corrobora en el estudio comparativo realizado por Benoit et al. (2020), el cual evaluó la eficiencia de CHROMagar™ *Acinetobacter* frente al medio Leeds *Acinetobacter* (LAM) y al Agar modificado Karmali (MKA) para el aislamiento de *A. baumannii* de matrices acuáticas. Los resultados de dicho estudio demostraron que el medio CHROMagar™ *Acinetobacter* facilita un aislamiento más eficiente, especialmente en entornos complejos como las aguas residuales, donde coexisten diversas especies bacterianas, muchas de ellas con mecanismos de resistencia a fármacos. Su formulación específica permite una diferenciación visual clara de las colonias de *Acinetobacter* spp. basada en la producción de enzimas cromogénicas (Benoit et al., 2020).

El aislamiento de *A. baumannii* en los distintos puntos de muestreo reveló la presencia de cepas con características morfológicas diversas, ya que este patógeno, es capaz de cambiar la morfología de sus UFC en placas de agar (Mushtaq et al., 2024), producto a su ventajosa plasticidad fenotípica (Lucidi et al., 2023) y variación de fase, que da lugar a diferentes variantes de UFC, tanto opacas como translúcidas en los medios de cultivo (Mushtaq et al., 2024), lo que genera problemas de diferenciación a nivel de especie dentro del género y ha llevado a los científicos a dividir el género en “complejos” para facilitar su estudio y clasificación (Alsan y Klompas, 2010).

La implementación de ajustes en la metodología de aislamiento, incluyendo el cambio al medio cromogénico, garantizó la obtención de UFC puras de *A. baumannii* que pudieron ser sometidas a una identificación bioquímica y molecular con un alto nivel de certeza (Cuadros 10, 11 y 12).

3. Resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa*

La creciente resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* es preocupante, especialmente en las aguas residuales de origen hospitalario que son fuentes importantes de antibióticos, bacterias y genes de resistencia (Reem et al., 2024), la diseminación de estos en el medio ambiente puede causar graves riesgos a la salud pública (Mapipa et al., 2021).

En este estudio, los datos (Cuadros 7, 8 y 9) muestran que *P. aeruginosa* posee resistencia a una variedad de antibióticos, incluidos cefalosporinas, carbapenémicos, fluoroquinolonas y combinaciones con penicilinas. Sin embargo, la resistencia a varias de estas familias es intrínseca, debido a que es un rasgo fundamental codificado en su genoma y que le permite expresar factores como baja permeabilidad de la membrana externa, bombas de eflujo de tipo Mex y β -lactamasa AmpC (Elfadadny et al., 2024), que les confieren resistencia natural principalmente a antibióticos del grupo de las cefalosporinas (Usman et al., 2023). En caso contrario, la resistencia adquirida en *P. aeruginosa* se puede evidenciar en la resistencia a carbapenémicos, fluoroquinolonas y algunas combinaciones con penicilinas (Strateva y Yordanov, 2009; Pachori et al., 2019), siendo estas familias de antibióticos de amplio espectro frecuentemente utilizadas para tratar infecciones bacterianas (Hutchings et al., 2019), y su resistencia es inquietante, especialmente la resistencia a carbapenémicos, dado que estos son considerados la última línea de defensa contra infecciones graves causadas por Gram negativos multirresistentes (Álvarez et al., 2023).

Los perfiles obtenidos muestran que existe una clara diferencia en los patrones de resistencia entre los tres entornos estudiados. En la PTAR y la CSS hubo en su mayoría resistencia intrínseca a cefalosporinas (Cuadros 7 y 8), esto indica que la resistencia de las cepas de este estudio es inherente de la especie y no adquirida por exposición a antibióticos o por transferencia horizontal de genes, tal es el caso de estudios internacionales en los que se ha documentado resistencia únicamente a cefalosporinas (Mapipa et al, 2021). En la EB3, la mayoría de las cepas también presentaron resistencia intrínseca, no obstante, las cepas ``JAPA24EB3-2`` y ``JAPA27EB3-2`` presentaron resistencia a carbapenémicos y/o fluoroquinolonas (Cuadro 9), esto sugiere, que las condiciones de las aguas residuales provenientes del Hospital Santo Tomás, el Hospital del Niño y el Hospital Nacional pueden estar actuando como un reservorio de antibióticos, bacterias resistentes y genes de resistencia (Zhang et al., 2020). Estos hallazgos se alinean con estudios realizados a nivel internacional, donde se ha reportado a *P. aeruginosa* resistente a

piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem y ciprofloxacino en aguas residuales hospitalarias (Ng et al., 2018; Roulová et al., 2022; Okafor y Nwodo, 2023).

Pese a que en Panamá no se han llevado a cabo estudios de resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa* aisladas de aguas residuales de origen hospitalario hasta ahora, existen investigaciones realizadas con aislamientos clínicos donde se han obtenido resultados que concuerdan y contrastan con los obtenidos en este estudio. En el Complejo Hospitalario de la CSS se reportó la presencia de cepas resistentes a cefalosporinas y fluoroquinolonas (Díaz et al., 2012), en contraste con los resultados de este estudio y los niveles de cloro encontrados en las aguas residuales de este centro hospitalario, sugieren que las bacterias resistentes en pacientes y fómites son eliminadas antes de llegar a las aguas residuales. En el caso del Hospital del Niño y El Hospital Santo Tomás, en concordancia con nuestros resultados, se han reportado cepas resistentes a cefalosporinas, carbapenémicos y fluoroquinolonas (Rodríguez et al., 1986; Sambrano, 2018), lo que indica que estas bacterias pueden estar abandonando el entorno hospitalario hasta las aguas residuales, pudiendo contribuir a la propagación de la resistencia a los antibióticos (Roulová et al., 2022).

En cuanto a los genes de resistencia, nuestros hallazgos concuerdan con otras investigaciones realizadas a nivel mundial en donde se ha detectado el gen *blaVIM* en *P. aeruginosa* aislada en aguas residuales de origen hospitalario (Slekovec et al., 2012; Adiba y Ferdous, 2023; Okafor y Nwodo, 2023, Sgobbi et al., 2024), también coincide con reportes clínicos en Panamá, en donde se ha registrado la circulación de cepas con este gen (Moreno et al., 2012). La presencia del gen *blaVIM* es preocupante, ya que, este le confiere resistencia a una gran variedad de antibióticos como carbapenémicos, penicilinas y cefalosporinas, codifica una metalo- β -lactamasa capaz de hidrolizar e inactivar el modo de acción de los antibióticos, limitando así las opciones de tratamiento para infecciones causadas por esta especie (Vigiawati et al., 2022).

En el caso del gen *blaOXA-48*, los resultados obtenidos también son consistentes con investigaciones internacionales, donde se ha detectado su presencia en *P. aeruginosa* aislada de efluentes hospitalarios (Okafor y Nwodo, 2023; Al-Bayati et al., 2025), al contrario, en nuestro país, no se ha reportado la presencia de este gen en esta especie bacteriana, sin embargo, se ha encontrado a nivel clínico en la especie *E. coli* (Villarreal et al., 2014).

Este hallazgo es muy significativo y preocupante, dado que, no es común encontrar el gen *blaOXA-48* en cepas de *P. aeruginosa*, sin embargo, este codifica para una carbapenemasa de clase D que es fácilmente transferible de especies como *K. pneumoniae* y *E. coli* (Nicolau y Oliver, 2010; Bakthavatchalam et al., 2016). El plásmido portador del gen *blaOXA-48* está asociado a una tasa alta de conjugación, se propaga y disemina rápidamente entre especies Gram negativos (Bakthavatchalam et al., 2016), por tanto, bacterias como *P. aeruginosa* pueden adquirirlos fácilmente a partir de Enterobacteriaceae portadoras de este gen. Esto sugiere que las aguas residuales de los sitios de muestreo de este estudio pueden estar actuando como una ruta de diseminación de genes de resistencia entre bacterias clínicas y bacterias ambientales, representando un riesgo de contaminación de fuentes de aguas naturales, con consecuencias negativas para los ecosistemas acuáticos y para la salud humana.

La detección del gen *blaOXA-48*, tanto bioquímica como molecularmente, representa un reto en los laboratorios microbiológicos clínicos. A nivel fenotípico es un poco complejo, dado que, la enzima OXA-48 hidroliza débilmente a las cefalosporinas de amplio espectro y a los carbapenémicos, lo que conlleva a presentar una CMI dentro de los rangos susceptibles, debido a esta expresión débil puede pasar desapercibido y subestimar su verdadera resistencia, implicando un riesgo elevado de resultados falsos negativos, esto de acuerdo con las directrices del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) y del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST) (Bakthavatchalam et al., 2016; Boyd et al., 2022). De acuerdo a esto, es común que en los antibiogramas de las cepas obtenidas en este estudio no se muestre resistencia, aunque contengan el gen.

De igual forma, la identificación molecular es dificultosa, puesto que, la enzima OXA-48 pertenece a una familia diversa de oxacilinasas, que poseen múltiples variantes homólogas como OXA-48b, OXA-54, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-242 y OXA-247, que difieren en deleciones y/o sustituciones de entre uno y cinco aminoácidos (Bakthavatchalam et al., 2016; Boyd et al., 2022), poseyendo una identidad en la secuencia de aminoácidos > 92 %, por lo tanto, al detectarlo molecularmente, podría ocurrir que se detecte una de sus variantes que comparten similitudes en sus secuencias genéticas (Nicolau y Oliver, 2010). La mayoría de los cebadores comerciales diseñados para la detección de este gen pueden amplificar de igual forma a sus variantes, de hecho, muchas veces son indistinguibles utilizando una PCR

convencional (Lau et al., 2020). Esto subraya la necesidad de utilizar métodos moleculares más avanzados que permitan distinguir entre el *blaOXA-48* original y sus variantes, como es el caso de la secuenciación del genoma completo.

La alta frecuencia del gen *blaOXA-48* en cepas de *P. aeruginosa* con sensibilidad a carbapenémicos sugiere una expresión reducida o nula del gen, lo que plantea un riesgo, ya que, puede dificultar la selección de tratamientos para esta especie bacteriana, además, puede representar un peligro inadvertido de diseminación de una bacteria a otra, siendo aún más problemático el hecho de que esa propagación se extienda a fuentes ambientales.

La presencia de *P. aeruginosa* con genes de resistencia en aguas residuales de origen hospitalario resulta peligroso, pues, diversos estudios han atribuido brotes de infecciones por *P. aeruginosa* a fuentes ambientales contaminadas con efluentes hospitalarios, dado que, estos son liberados en el ambiente alterando los ecosistemas y representando una amenaza para la salud pública (Mapipa et al., 2021; Okafor y Nwodo, 2023).

4. Resistencia antimicrobiana de *A. baumannii*

La creciente resistencia a los antibióticos en *A. baumannii* es una preocupación sanitaria mundial que impacta de forma predominante al ámbito clínico, en comparación con el ambiental. A diferencia de otras especies de su género, *A. baumannii* no es común en aguas residuales, sino que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados, especialmente en la unidad de cuidados intensivos (UCI), por su capacidad de adherencia (Vanegas et al., 2014). No obstante, su presencia actual en efluentes hospitalarios y plantas de tratamiento podría contribuir a la propagación de la resistencia antimicrobiana, al facilitar el intercambio de genes entre patógenos clínicos y bacterias ambientales, debido a la alta concentración de antibióticos y bacterias resistentes liberadas por los pacientes (Jimenez y Rodríguez, 2023).

En este estudio, los datos (Cuadros 10, 11 y 12) muestran que *A. baumannii* presenta resistencia a cefalosporinas y combinaciones con penicilinas. Sin embargo, la resistencia a cefalosporinas es intrínseca, ya que es una propiedad inscrita en su genoma, que le posibilita la expresión de factores como β -lactamasas cromosómicas (oxacilinasas), bombas de eflujo y baja permeabilidad de la membrana externa (Vanegas et al., 2014). La insensibilidad a antibióticos como piperacilina/tazobactam, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima observada consistentemente en todas

las cepas de este estudio, concuerdan con el patrón de resistencia conocido en *A. baumannii*. Su resistencia a este último antibiótico es bastante común y se debe a la presencia de la cefalosporinasa de clase C (ADC) codificada en su cromosoma, tal como se señala en el estudio de Vanegas et al. (2014).

Es importante destacar que la ausencia de resistencia a carbapenémicos y fluoroquinolonas en las cepas de PTAR, CSS y EB3 sugiere una menor presión selectiva de estos antibióticos en aguas residuales panameñas en comparación con el ámbito clínico. Esta situación contrasta marcadamente con estudios internacionales como el de Odih et al. (2023) en Nigeria, donde se encontró alta resistencia a múltiples antibióticos (incluyendo carbapenémicos) en *A. baumannii* provenientes de aguas residuales hospitalarias. Asimismo, un estudio eslovaco de Kisková et al. (2023) halló una alta resistencia a penicilinas en aislamientos de las PTAR.

A pesar de la falta de estudios sobre la resistencia de *A. baumannii* en aguas residuales hospitalarias en Panamá, investigaciones con muestras clínicas dentro del país señalan a este patógeno como la bacteria de tratamiento más complejo con una resistencia consistentemente alta a la mayoría de los antibióticos (Moreno et al., 2018). Esto deja como limitadas alternativas terapéuticas a los carbapenémicos con solo un 75 % de susceptibilidad, a la ampicilina-sulbactam con un 66 % de susceptibilidad y a los aminoglucósidos (como amikacina) con un 40 % de susceptibilidad (Moreno et al., 2018). A nivel internacional, las tasas de resistencia a estos fármacos tienden a ser aún mayores, oscilando entre el 80,3 % y el 83,6 % (Lin y Lan, 2014). Esta situación restringe la disponibilidad de opciones terapéuticas efectivas y subraya la necesidad urgente de implementar estrategias de control.

Por otro lado, los hallazgos sobre genes de resistencia de este estudio contrastan con estudios globales donde se han detectado genes *blaVIM*, *blaIMP*, *blaNDM*, *blaKPC* y *blaOXA-48* en *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (Sabour et al., 2024). La ausencia de resistencia a antibióticos de amplio espectro en las cepas de este estudio difiere de la situación común en cepas multirresistentes de *A. baumannii* de entornos clínicos y aguas residuales hospitalarias a nivel mundial, donde genes como *blaNDM*, *blaVIM* y *blaOXA-48* suelen tener una prevalencia significativa (Kagambèga et al., 2023). Esto podría reflejar una situación epidemiológica diferente en Panamá en cuanto a la diseminación de estos determinantes de resistencia a la comunidad a través de las aguas residuales. Factores como la competencia con otras bacterias y las condiciones

ambientales particulares de las aguas residuales podrían no favorecer el crecimiento de cepas portadoras de estos genes (Van der Heijden et al., 2019; Fang et al., 2024).

La falta de resistencia a múltiples antibióticos en las cepas de *A. baumannii* aisladas en este trabajo indican una menor exposición a antibióticos de amplio espectro en los ambientes estudiados (aguas residuales); en comparación con los hospitales. La ausencia de genes de resistencia adquirida, típicos de cepas clínicas multirresistentes, respalda esta idea (Barbosa y Levy, 2000). No obstante, se requiere más investigación a nivel nacional, incluyendo el análisis de la resistencia en cepas clínicas panameñas, para comprender mejor la situación general de la resistencia de *A. baumannii* en el país y cómo los genes de resistencia podrían moverse entre diferentes ambientes.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Se logró identificar bioquímicamente y molecularmente 75 cepas de *P. aeruginosa* y 75 cepas de *A. baumannii* en las aguas residuales de dos efluentes hospitalarios y la PTAR de la ciudad de Panamá.
2. En *P. aeruginosa*, el 100 % de las cepas presentaron resistencia a uno o más antibióticos, distribuyéndose de la siguiente manera, cefalosporinas (100 %), combinaciones con penicilinas (2,6 %), carbapenémicos (2,6 %) y fluoroquinolonas (1,3 %). En el caso de *A. baumannii*, el 100 % de las cepas fueron resistentes a no más de dos grupos de antibióticos, cefalosporinas (100 %) y combinaciones con penicilinas (9,3 %).
3. El 1,3 % de las cepas de *P. aeruginosa* fueron multirresistentes, mientras que en *A. baumannii* no se encontró multirresistencia.
4. Se detectó el gen *blaVIM* (2,6 %) y el gen *blaOXA-48* (97,3 %) en las cepas de *P. aeruginosa*. En *A. baumannii* no se encontraron genes de resistencia.
5. Es importante destacar, que debido a la compleja detección del gen *blaOXA-48*, existe la posibilidad que no se haya detectado específicamente, sino que pueda corresponder a alguna de sus variantes.
6. La presencia de cepas multirresistentes y genes de resistencia en las cepas de *P. aeruginosa* puede representar un problema en el tratamiento de las aguas residuales de origen hospitalario, producto de la presión selectiva que favorece la supervivencia y disminuye la efectividad de eliminación de la especie bacteriana. La ausencia de genes de resistencia en las cepas de *A. baumannii* aisladas de aguas residuales podría reflejar una dinámica de diseminación diferente en Panamá, aunque no descarta el ambiente como potencial punto de intercambio genético.
7. La presencia de cepas multirresistentes en aguas residuales de origen hospitalario guarda similitud con estudios realizados a nivel mundial, como resultado del uso inadecuado de antibióticos y mal manejo de los desechos hospitalarios que contribuye a la diseminación de antimicrobianos, genes de resistencia y bacterias multirresistentes al ambiente. Es preocupante, ya que, si se propaga en el ambiente puede representar un riesgo de diseminación a otras especies bacterianas sensibles a los antibióticos, y además de alterar los ecosistemas y causar problemas de salud pública.
8. Es importante mejorar el tratamiento de las aguas residuales de origen hospitalario para evitar problemas ambientales y proteger la salud pública.

RECOMENDACIONES

1. Realizar monitoreos regulares en los efluentes de aguas residuales de origen hospitalario para detectar la presencia de bacterias multirresistentes e implementar medidas de control si es necesario.
2. Llevar a cabo recolección de muestras de aguas residuales tanto en influentes como en efluentes de la PTAR para evaluar la eficacia del tratamiento de las aguas residuales en la eliminación de bacterias multirresistentes.
3. Utilizar técnicas, reactivos y equipos apropiados para el aislamiento e identificación de cada especie, y para la detección de los genes de resistencia, como medios de cultivos selectivos y cromogénicos, sistemas como Vitek 2 y PCR para mejorar la precisión y confiabilidad de los resultados.
4. Evaluar la presencia de antibióticos y otros elementos que pueden impulsar la adquisición de resistencia bacteriana en las aguas residuales.
5. Ampliar la cantidad de genes de resistencia analizados en cada especie bacteriana para proporcionar un perfil molecular más completo.
6. Realizar la secuenciación del genoma de las cepas, para verificar la presencia de genes de resistencia con compleja detección, como es el caso del *blaOXA-48*.
7. Utilizar este estudio como base para futuras investigaciones, que incluyan otras especies bacterianas presentes en aguas residuales y que pueden ser causantes de graves problemas de salud pública.

REFERENCIAS

- Abushaheen, M., Muzaaheed, A., Fatani., A, Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A., Shaik, J. & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Dis Mon*, 66(6). doi:10.1016/j.disamonth.2020.100971.
- Adams, F. & Brown, M. (2019). MITEAba12, a Novel Mobile Miniature Inverted-Repeat Transposable Element Identified in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Its Prevalence across the Moraxellaceae Family. *mSphere*, 4(1), 28-19. doi:10.1128/mSphereDirect.00028-19
- Adesoji, A., Onuh, J., Palang, I., Liadi, A., & Musa, S. (2023). Prevalence of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from selected residential sewages in Dutsin-Ma, Katsina State, Nigeria. *Journal of public health in Africa*, 14(2), 2152. <https://doi.org/10.4081/jphia.2023.2152>
- Adiba, R. & Ferdous, R. (2023). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from hospital sewage water and nearby community water based on their multidrug-resistant gene. <https://dspace.bracu.ac.bd/xmlui/handle/10361/22127>
- Akremiti, I., Merabishvili, M., Jlidi, M., Haj, A., Ben, M., Karoui, A., Lavigne, R., Wagemans, J., Pirnay, J. & Ben, M. (2022). Isolation and Characterization of Lytic *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages Isolated from Sewage Samples from Tunisia. *Viruses*, 14(11). doi:10.3390/v14112339.
- Al-Bayati, M., AboKsour, M., Taha, B., Hussein, N., & Haider, S. (2025). Prevalence of BlaOXA-48, BlaDIM-1, and BlaKPC1 genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas* species isolated from wastewater and clinical samples from Baghdad hospitals. *Journal of applied and natural science*, 17(1), 24-30. <https://doi.org/10.31018/jans.v17i1.6129>
- Alsan, M., & Klompas, M. (2010). *Acinetobacter baumannii*: An Emerging and Important Pathogen. *Journal of clinical outcomes management: JCOM*, 17(8), 363–369. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26966345/>
- Álvarez, C., Guevara, F., Ferrer, L., Valderrama, S., Cortés, J., Osorio, J., Oñate, J., Villegas, M., Zhang, S., Huang, J., Zhao, Z., Cao, Y., & Li, B. (2020). Hospital Wastewater as a Reservoir for Antibiotic Resistance Genes: A Meta-Analysis. *Frontiers in public health*, 8, 574968. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.574968>
- Ambulkar, A., & Nathanson, J. (2023). Wastewater treatment. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/technology/wastewater-treatment>
- Atrouni, A., Joly, M., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. *Frontiers in Microbiology*, 7(1). doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00049>
- Azam, M., & Khan, A. (2018). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350-359. doi:10.1016/j.drudis.2018.07.003

- Baghal, F., Dehghani, M., Dehghanzadeh, R., Farajzadeh, D., Shanehbandi, D., Mahvi, A., Yaghmaeian, K., & Rajabi, A. (2021). Performance evaluation of ozonation for removal of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and genes from hospital wastewater. *Scientific Reports*, 11(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-04254-z>
- Bakthavatchalam, Y., Anandan, S. & Veeraraghavan, B. (2016). Laboratory Detection and Clinical Implication of Oxacillinase-48 like Carbapenemase: The Hidden Threat. *Journal of global infectious diseases*, 8(1), 41-50. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.176149>
- Balcazar, J. (2018). *Escherichia coli* productora de betalactamasas aisladas de urocultivo de usuarios del Hospital Isidro Ayora- Loja. Universidad Nacional de Loja, Ecuador. Tesis de Licenciatura. <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/21443>
- Balfour, L. (2020). Environmental risks of *Pseudomonas aeruginosa*—What to advise patients and parents. *Journal of Cystic Fibrosis*, 20(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.12.005>
- Barbosa, M., & Levy, B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 3(5), 303-311. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0167>
- Barletta, R., Pérez, L., Castro, G., Pérez, M., Barletta, J. & Pérez, Y. (2018). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapéutica actual. *MediSur*, 16(2), 322-334. <https://www.redalyc.org/journal/1800/180061493015/html/>
- Basatian, B., Niakan, M., Khaledi, M., Afkhami, H., Sameni, F., Bakhti, S., & Mirnejad, R. (2020). Antibiotic resistance assessment of *Acinetobacter baumannii* isolates from Tehran hospitals due to the presence of efflux pumps encoding genes (adeA and adeS genes) by molecular method. *BMC Research Notes*, 13(1), 543. doi:<https://doi.org/10.1186/s13104-020-05387-6>
- Bejarano, L., Bustamante, Z., Gamarra, N., Gallego, L., Espinoza, M., Funes, F., & Goitia, A. (2021). *Acinetobacter Baumannii* Multiresistente y su Relación con la Producción de Biopelículas. *Gaceta Médica Boliviana*, 44(2), 148-153. <https://doi.org/10.47993/gmb.v44i2.233>
- Bendicho, C., & Lavilla, I. (2005). Water analysis - Sewage. *Encyclopedia of Analytical Science*, 1(1), 300-307. doi:10.1016/b0-12-369397-7/00113-8
- Benoit, T., Cloutier, M., Schop, R., Lowerison, M. & Khan, I. (2020). Comparative assessment of growth media and incubation conditions for enhanced recovery and isolation of *Acinetobacter baumannii* from aquatic matrices. *Journal of Microbiological Methods*, 176(1). doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106023>
- BioMérieux. (2023). Identificación microbiana de rutina para aplicaciones alimentarias. BioMérieux Microbiología Industrial. <https://www.biomerieux-industry.com/es/products/vitek-2-compact-identificacion-microbiana-de-rutina-para-aplicaciones-alimentarias>

- Boyd, S., Holmes, A., Peck, R., Livermore, D. & Hope, W. (2022). OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 66(8). <https://doi.org/10.1128/aac.00216-22>
- Chadha, J., Harjai, K. & Chhibber, S. (2022). Revisando las características de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*: una crónica a través de la perspectiva de la detección de quórum. *Environ Microbiol*, 24(1), 2630-2656. doi:<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15784>
- Chang, C. (2018). Surface Sensing for Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8(1), 2671. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02671>
- Chávez, V. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23(1). doi:<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Choi, H., Kim, M., Cho, M., Kim, B., Kim, J., Kim, C., & Park, D. (2013). Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(8), 3643-3651. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4709-0>
- CLSI. (2024). CLSI Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI AST News Update. CLSI, 9(1). <https://clsi.org/ast-news-updates-january-2024/>
- Coleman, J. & Smith, C. (2014). Microbial Resistance. Reference Module in Biomedical Research, 1(1), 1-2. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05148-5>
- Condalab. (2021). Base de Agar Ceftrimida EP/USP/ISO. Ficha técnica. N° DE CATÁLOGO: 1102. <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/150-12363-base-de-agar-ceftrimida-ep-usp-iso.html>
- Corporation Promega. (2021). PCR Master Mix Protocol. <https://worldwide.promega.com/es-es/resources/protocols/product-information-sheets/g/pcr-master-mix-protocol/>
- Cray, J., Bell, A., Bhaganna, P., Mswaka, A., Timson, D. & Hallsworth, J. (2013). La biología del dominio del hábitat; ¿Pueden los microbios comportarse como malas hierbas? *Microbio. Biotecnología*, 6(1), 453-492. doi:10.1111/1751-7915.12027
- Dekic, S., Hrenović, J., Ivankovic, T. & De Wilpe, Y. (2018). Survival of ESKAPE pathogen *Acinetobacter baumannii* in water of different temperatures and pH. *Water Sci Technol*, 78(5-6), 1370-1376. doi: 10.2166/wst.2018.409.
- Dekić, S., Klobučar, G., Ivanković, T., Zanella, D., Vucić, M., Bourdineaud, J., & Hrenović, J. (2018). Emerging human pathogen *Acinetobacter baumannii* in the natural aquatic environment: a public health risk?. *International Journal of Environmental Health Research*, 28(3), 3153-22. doi:<https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1472746>
- Díaz, Y., Núñez, J. Ángel, de Mayorga, B., Jaramillo, F., Chen, O., de Paredes, M. y de Chial, M. (2012). Epidemiología molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el Complejo Metropolitano Harmodio Arias Madrid. *Tecnociencia*, 14(2), 23-38. <https://revistas.up.ac.pa/index.php/tecnociencia/article/view/1002>

- Di Conza, J., Power, P. & Gutkind, G. (2013). Intercambio de mecanismos de resistencia entre bacterias gram negativas. *Rev. Farm.*, 155(2), 57-69. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/1729>
- Doughari, H., Ndakidemi, P., Human, I. & Benade, S. (2011). La ecología, biología y patogenia de *Acinetobacter* spp.: una visión general. *Microbios Entorno*, 26(1), 101-112. doi:10.1264/jsme2.ME10179
- Durán, L. (2018). Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 29(2). doi:<https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2018.01.002>
- Elfadadny, A., Ragab, R., AlHarbi, M., Badshah, F., Ibáñez, E., Farag, A., Hendawy, A., De los Ríos, P., Aboubakr, M., Zakai, A. & Nageeb, M. (2024). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1664-3020. DOI=10.3389/fmicb.2024.1374466
- Escolà, L., Los, I. & Almirante, B. (2020). New antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant microorganisms. *Med Clin (Barc)*, 154(9), 351-357. doi:10.1016/j.medcli.2019.11.002.
- Espinoza, D. & Esparza, G. (2021). Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 38(1), 69-80. doi:<https://doi.org/10.4067/s0716-10182021000100069>
- Falah, F., Shokoohzadeh, L., & Adabi, M. (2019). Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR. *Scars, burns & healing*, 5. <https://doi.org/10.1177/2059513119831369>
- Fang, Z., Zhao, X., Zhang, Z., Wu, J., Cheng, J., Lei, D., Li, N., Ge, R., He, Q., & Sun, X. (2024). Unveiling a novel mechanism for competitive advantage of ciprofloxacin-resistant bacteria in the environment through bacterial membrane vesicles. *Journal of Hazardous Materials*, 466. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133453>
- Fariñas, M., & Martínez, L. (2013). Multiresistant Gram-negative bacterial infections: *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and other non-fermenting Gram-negative bacilli. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31(6), 402-409. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- Ferrer, R., Soriano, A., Cantón, R., Del Pozo, J., García, C., Garnacho, J., Larrosa, N., Rascado, P., Salavert, M., Pintado, V., Pellicer, B., & Badía, X. (2021). A systematic review and expert's analysis of risk factors of infections in adults due to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* or *Acinetobacter baumannii* in Spain. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 34(4), 298-307. doi:<https://doi.org/10.37201/req/034.2021>

- Gallego, L. (2016). *Acinetobacter baumannii*: Factors Involved in its High Adaptability to Adverse Environmental Conditions. *Journal of microbiology & experimentation*, 3(2). doi:<https://doi.org/10.15406/jmen.2016.03.00085>
- García, D. (2022). Impacto del bloqueo del reciclaje del peptidoglicano y la expresión de Beta-Lactamasas de clase D sobre la capacidad de invasión celular de *Pseudomonas aeruginosa*. Universitat de les Illes Balears. IUB. <https://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/156983>
- GBD. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 400(10369), 2221-2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)
- Girlich, D., Poirel, L. & Nordmann, P. (2010). First isolation of the *bla*OXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (1), 578-579. doi:10.1128/AAC.00861-09
- Gómez, A., Leal, A., Pérez, M. & Navarrete, M. (2005). Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(1), 27-34. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/43484>
- Greenberg, A., Eaton, A., Franson, M. ann, Clesceri, L., & Baird, R. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (L. Clesceri, A. Greenberg, & A. Eaton, Eds.; 20th ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Guevara, J., Maldonado, M., Valadez, D., Muro, R. & Matsumoto, I. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 41(3), 111-117. <https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Guevara-Diaz/publication/357355210>
- Habboush, Y. & Guzman, N. (2023). Resistencia a los antibióticos. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
- Harding, C., Hennon, S & Feldman, M. (2018). Descubriendo los mecanismos de virulencia de *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol*, 16(1), 91-102. doi: 10.1038/nrmicro.2017.148
- He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., Stadler, L., Senehi, N., Sun, R. & Alvarez, J. (2020). Genes de resistencia a antibióticos en desechos ganaderos: aparición, diseminación y tratamiento. *Clean Water*, 3(4). <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>
- Hernández, S. & Leiva, J. (2005). Bacterias multirresistentes. *GH CONTINUADA*, 4(4). DOI:10.1016/S1578-1550(05)75141-X
- Herrera, M. (2004). El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova*, 2(2), 71-80. <https://www.researchgate.net/publication/251861536>

- Higgins, J., Hrenović, J., Seifert, H., & Dekić, S. (2018). Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Research*, 140:261-267. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.057>
- Hrenovic, J., Goic, I., Kazazic, S., Kovacic, A., Ganjto, M. & Tonkic, M. (2016). Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Euro Surveillance* 21(1), 1-10. DOI:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30195
- Hu, Y., Zhang, X., Deng, S., Yue, C., Jia, X., & Lyu, Y. (2023). Non-antibiotic prevention and treatment against *Acinetobacter baumannii* infection: Are vaccines and adjuvants effective strategies?. *Frontiers in Microbiology*, 14(1). doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1049917>
- Hutchings, M., Truman, A. & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- IDEXX. (2023). Pseudalert: Detección en 24 horas de *Pseudomonas aeruginosa*. Idexx.com. <https://www.idexx.es/es/water/water-products-services/pseudalert/>
- Jacoby, G. & Brooks, K. (1980). Genetics of antimicrobial resistance. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK216503/>
- Jimenez, J. & Rodríguez, E. (2023). Resistencia bacteriana en ambientes acuáticos: origen e implicaciones para la salud pública. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 41, (3). DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.e351453>
- Jiménez, M., Galas, M., Corso, A., Hormazabal, J., Duarte, C., Salgado, N., Ramón, P., Melano, R. (2019). Latin American consensus to define, categorize, and report multidrug-resistant, extensively drug-resistant, or pandrug-resistant pathogens. *Rev Panam Salud Publica*, 43(1), 65. doi: 10.26633/RPSP.2019.65.
- Joji, R., Rashed, N., Saeed, N., & Bindayna, K. (2019). Detection of VIM and NDM-1 metallo-beta-lactamase genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in Bahrain. *Journal of laboratory physicians*, 11(2), 138-143. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_118_18
- Kagambèga, A., Dembélé, R., Bientz, L., M'Zali, F., Mayonnove, L., & Mohamed, A., Coulibaly, H., Barro, N., & Dubois, V. (2023). Detection and Characterization of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Hospital Effluents of Ouagadougou, Burkina Faso. *Antibiotics*, 12(10). DOI:10.3390/antibiotics12101494
- Kanafani, Z., Kanj, S., Calderwood, S. & Hall, K. (2023). Infección por *Acinetobacter*: tratamiento y prevención. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/acinetobacter-infection-treatment-and-prevention/print>
- Karungamye, P., Rugaika, A., Mtei, K. & Machunda, R. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Hospital Wastewater. *Appl. Microbiol*, 3(3), 867-882. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3030060>

- Kauppinen, A., Siponen, S., Pitkänen, T., Holmfeldt, K., Pursiainen, A., Torvinen, E., & Miettinen, I. (2021). Phage biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Viruses*, 13(5), 928. doi: <https://doi.org/10.3390/v13050928>
- Kaushal, S., & Singh, J. (2017). Wastewater impact on human health and microorganism-mediated remediation and treatment through technologies. *Agro-Environmental Sustainability*. Springer International Publishing, 1(1), 235-250. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-49727-3_12
- Kelemen, J., Sztermen, M., Dakos, E., Budai, J., Katona, J., Szekeressy, Z., Sipos, L., Papp, Z., Stercz, B., Dunai, Z., Kocsis, B., Juhasz, J., Michelisz, F., Daku, Z., Domokos, J., Szabo, D., & Eross, L. (2024). Las medidas complejas de control de infecciones con interruptor desinfectante ayudan al control temprano exitoso del brote de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenems en la unidad de cuidados intensivos. *Antibióticos*, 13, 869. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090869>
- Killough, M., Rodgers, A., & Ingram, R. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development. *Vaccines*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/vaccines10071100>
- Kisková, J., Juhás, A., Galušková, S., Maliničová, L., Kolesárová, M., Píknová, M., & Pristaš, P. (2023). Antibiotic Resistance and Genetic Variability of *Acinetobacter* spp. from Wastewater Treatment Plant in Kokšov-Bakša (Košice, Slovakia). *Microorganisms*, 11(4), 840. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040840>
- Kovacic, A., Seruga, M., Dekic, S., Tonkic, M., Novak, A., Rubic, Z., Hrenovic, J. & Goic, I. (2017). Transmission and survival of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outside hospital setting. *International Microbiology* 20(4), 165-169. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.299>
- Kumar, A. & Pal, D. (2018). Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.059>.
- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(3), 373. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- Labema. (2023). CHROMagar™ *Pseudomonas*. Labema.com. <https://www.labema.fi/en/>
- Lau, M., Abdul, K., Chua, K., Kee, B., Ponnampalavanar, S., Chong, C., & Teh, C. (2020). One-Step Differential Detection of OXA-48-Like Variants Using High-Resolution Melting (HRM) Analysis. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(5), 256. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050256>
- Leaflet, A. (2021). CHROMagar™ *Pseudomonas*. Leaflet, 5(1), 1-7. https://www.chromagar.com/wp-content/uploads/2021/11/LF_EXT_051_PS_V.5.pdf
- Lepe, J. & Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina intensiva*, 46(7), 392-402. doi:<https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>

- Lewenza, S., Abboud, J., Poon, K., Kobryn, M., Humplik, I., Bell, J., Mardan, L., & Reckseidler, S. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* displays a dormancy phenotype during long-term survival in water. *PloS One*, 13(9). doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198384>
- Lin, F., & Lan, Y. (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World journal of clinical cases*, 2(12), 787-814. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.787>
- Lopes, A., Rghei, D., Thompson, B., Susta, L., Khursigara, M., & Wootton, S. (2022). Overcoming Barriers to Preventing and Treating *P. aeruginosa* Infections Using AAV Vecteded Immunoprophylaxis. *Biomedicines*, 10(12), 3162. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123162>
- López, P., Torres, M., & Prada, C. (2015). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Rev Universidad y Salud*, 1(1), 190-202. <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v18n1/v18n1a18.pdf>
- López, S., & López, M. (2000). ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*?. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 18(3), 153-156. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-que-debemos-saber-acerca-infecciones-9771>
- Lucidi, M., Visaggio, D., Migliaccio, A., Capecchi, G., Visca, P., Imperi, F., & Zarrilli, R. (2023). Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: Factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host. *Virulence*, 15(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2289769>
- Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 48(4), 465-474. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572014000400009&lng=es&tlng=es.
- Malbran, C. (2019). Protocolo de PCR múltiple para la detección de los genes *blaKPC*, *blaOXA-48-like*, *blaVIM*, *blaIMP* y *blaNDM* en bacilos gram negativos. Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas- ANLIS. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/10/Detecci%C3%B3n-CBP-Multiplex.pdf>
- Mapipa, Q., Digban, T., Nnolim, N. & Nwodo, U. (2021). Perfil de antibiograma y firmas de virulencia de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de efluentes hospitalarios agrestes seleccionados. *Sci Rep* 11, 11800 . <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91280-6>
- Mapipa, Q., Digban, T. O., Nnolim, N. E., Nontongana, N., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2022). Caracterización molecular y perfil de susceptibilidad a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* recuperado de efluentes de aguas residuales hospitalarias. *Current Microbiology*, 79(4). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02815-7>

- Marei, E. (2020). Isolation and Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* and its Virulent Bacteriophages. *Pak J Biol Sci*, 23(4), 491-500. doi: 10.3923/pjbs.2020.491.500.
- Martínez, G., Bocco, M., Velásquez, M., Perroni, M., Bretas, F., Merino, L., Muñoz, R., Cartin, I., Arechaga, P., Cambiasso, E., Dugand, J., Arosemena, A., Grau, J., Carías, M., & Olivera, M. (s.f). Programa de Saneamiento de la Ciudad y la Bahía de Panamá II PN-L1109. <https://www01.eib.org/attachments/registers/60410117.pdf>
- Mea, H., Yong, P., & Wong, E. (2021). An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiological Research*, 247(1), 12. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126722>
- Medell, M., Hart, M., & Mora, I. (2012). *Acinetobacter baumannii* versus *Pseudomonas aeruginosa*. Comportamiento en pacientes críticos con ventilación mecánica. *Revista cubana de medicina*, 51(3), 239-246. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232012000300005
- Mena, K., & Gerba, C. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 201, 71-115. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3
- Meschiari, M., Lòpez, J., Di Pilato, V., Gimenez, C., Vecchi, E., Bacca, E., Orlando, G., Franceschini, E., Sarti, M., Pecorari, M., Grottola, A., Venturelli, C., Busani, S., Serio, L., Girardis, M., Rossolini, G., Gyssens, I., Monnet, D., & Mussini, C. (2021). Un paquete de cinco componentes para el control de infecciones para eliminar permanentemente la propagación de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos en una unidad de cuidados intensivos. *Antimicrob Resist Infect Control* 10, 123. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00990-z>
- Miranda, C., De Filippis, I., Pinto, L., Coelho, T., Bianco, K., Cacci, L. C., Picão, R. & Clementino, M. (2015). Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of applied microbiology*, 118(6), 1276-1286. <https://doi.org/10.1111/jam.12792>
- Mohanty, S., Baliyarsingh, B., & Kumar, S. (2020). Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A Concise Review. *Antimicrobial Resistance*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.88706
- Mojtaba, M., Khadijeh, A., Saeed, S., Jalal, M., Fatemeh, S. & Maryam A. (2020). Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Ahvaz, Southwest Iran. *MethodsX*, 7(1). <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101031>.
- Moreno, J., Conte, E., Tribaldos, M., Morales, J., Zamorano, C., Gómez, B., & Toro, J. (2018). Perfiles de resistencia a antibióticos en Panamá: Tendencias de 2007 a 2013. *Pharm Pharmacol Int J*. 2018;6(5):350-355. DOI: 10.15406/ppij.2018.06.00200

- Moreno, J., Morán, J., Fernández, M., Ramos, R., Bolaños, R & Quinzada, M. (2012). Enzimas IMP y VIM en Panamá, evidencia de metalo- β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa*. Boletín GORGAS Informa, 3(7).
- Mushtaq, F., Nadeem, A., Yabrag A., Bala, A., Karah, N., Zlatkov, N., Nyunt, W., Uhlin, B., & Ahmad, I. (2024). El cambio de fase de colonia modula la tolerancia antimicrobiana y la formación de biopelículas en *Acinetobacter baumannii*. Microbiol Spectr, 12(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02956-23>
- Mustafa, S., Taghreed, M. & Hanaa, A. (2020). Aislamiento y diagnóstico de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos en pacientes con heridas y quemaduras en la ciudad de Bagdad. Revista india de medicina forense y toxicología, 14(3), 2431-2437. doi:<https://doi.org/10.37506/ijfmt.v14i3.10801>
- Ng, C., Gu, X., Goh, S., Chen, H., Haller, L., Tan, B., & Gin, K. (2018). Draft Genome Sequences of Four Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Hospital Wastewater in Singapore. Microbiology resource announcements, 7(19), e01193-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01193-18>
- Ng, D., Marimuthu, K., Lee, J., Khong, W., Ng, O., Zhang, W., fong, A., Rao, P., Rajinder, M., Ang, B. & Pratim, P. (2018). Environmental colonization and onward clonal transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in a medical intensive care unit: the case for environmental hygiene. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 7(51). <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0343->
- Nguyen, M & Joshi, S. (2021). Resistencia a los carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii* y su importancia en las infecciones adquiridas en el hospital: una revisión científica. Revista de microbiología aplicada, 131(6), 2715-2738. doi:<https://doi.org/10.1111/jam.15130>
- Ngwa, G., Schop, R., Chow, J., Lukic, L. & McKague, K. (2017). Comparative detection and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration and a Most Probable Number technique. Journal of microbiological methods, 133, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.012>
- Nicolau, C., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 28(1), 19-28. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)
- Novović, K., & Jovčić, B. (2023). Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. Antibiotics (Basel, Switzerland), 12(3), 516. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030516>
- Odihi, E., Sunmonu, T., Okeke, N., & Dalsgaard, A. (2023). NDM-1- and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in wastewater of a Nigerian hospital. Microbiology spectrum, 11(6). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02381-23>
- Okafor, J. & Nwodo, U. (2023). Antibiogram Profile and Detection of Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Recovered from Hospital Wastewater Effluent. Antibiotics, 12 (10), 1517. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101517>

- Oteo, J., Bou, G., Chaves, F., & Oliver, A. (2017). Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multiresistentes. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(10), 667-675. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.013>
- Pachori, P., Gothalwal, R., & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & diseases*, 6(2), 109-119. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B., Lin, T., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Panga, Z., Raudonis, R., Glick, B., Lin, T., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192. [doi:https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013)
- Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2). [doi:https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180](https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180)
- Pérez, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 22(1), 57-67. <https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- Pérez, M. (2018). Motilidad y virulencia en el patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*. Universidad Autónoma de Barcelona, España. Tesis Doctoral. <https://www.tdx.cat/handle/10803/665604>
- Pincus, D. (s.f). MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM. BioMérieux. https://www.researchgate.net/publication/315832305_MICROBIAL_IDENTIFICATION_USING_THE_BIOMERIEUX_VITEK_R_2_SYSTEM
- Prakash, S., Misbahul, S., Kumar, A., Arif, M. & Mohan, M. (2023). Chapter 10 - Human health hazards due to antimicrobial resistance spread, *Antimicrobial Resistance in Wastewater and Human Health*. Academic Press, 10, 225-240, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96124-0.00007-6>.
- Puljko, A., Dekić, S., Barišić, I., Maravić, A., Jelić, M., Babić, I., Milaković, M., Petrić, I. & Udiković, N. (2023). Resistance to critically important antibiotics in hospital wastewater from the largest Croatian city. *Science of The Total Environment*, 87(0). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161805>.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C. Qinqin, P., Deng, X., Lan, L., Haihua, L., Xiangrong, C. & Min, W. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: patogénesis, factores de virulencia, resistencia a los antibióticos, interacción con el huésped, avances tecnológicos y terapias emergentes. *Sig Transduct Target Ther*, 7, 199. [doi:https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1](https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1)

- Rada, A., De La Cadena, E., Agudelo C., Pallares, C., ,E., Correa, A., Villegas, M. & Capataz, C. (2021). Genetic Diversity of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Carrying *bla*VIM-2 and *bla*KPC-2 Genes That Spread on Different Genetic Environment in Colombia. *Frontiers in Microbiology*, 12(1). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663020>
- Raut, S., Rijal, K., Khatiwada, S., Karna, S., Khanal, R., Adhikari, J., & Adhikari, B. (2020). Trend and Characteristics of *Acinetobacter baumannii* Infections in Patients Attending Universal College of Medical Sciences, Bhairahawa, Western Nepal: A Longitudinal Study of 2018 Infection and Drug Resistance, 13, 1631-1641. doi:<https://doi.org/10.2147/idr.s257851>
- Reem, A., Almansoob, S., Senan, A., Raj, A., Shah, R., Shrewastwa, M. & Prasad, J. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* and related antibiotic resistance genes as indicators for wastewater treatment. *Heliyon*, 10 (9). doi:10.1016/j.heliyon.2024.e29798
- Reina, J., & Reina, N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? [Phage therapy, an alternative to antibiotic therapy?]. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 31(2), 101–104. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159377/>
- Reina, R., Moya, C., & Montero, J. (2022). Tratamiento de infecciones graves por *Acinetobacter baumannii*. *Medicina Intensiva*, 46(12), 700-710. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.08.003>
- Riverón, F., López, J., Ponce, L. & Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana Médica Militar*, 32(4). doi:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572003000100007
- Rodríguez, A., Suárez, M., Castro, O., Iglesias, M. & Vega, F. (1986). *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en el Hospital Santo Tomás. *Revista Medicina Panamá*, 11(2), 87-93. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-34473>
- Romeu, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., & Eslava, C. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1-9. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509037.pdf>
- Roulová, N., Mot'ková, P., Brožková, I., & Pejchalová, M. (2022). Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. *Journal of Water and Health*, 20(4), 692-701. doi:<https://doi.org/10.2166/wh.2022.101>
- Ruiz, M. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Universidad de Barcelona. https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf?se
- Sabaté, M. (2002). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 20(7), 341-345. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(02\)72813-9](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(02)72813-9)
- Sabour, S., Bantle, K., Bhatnagar, A., Huang, J., Biggs, A., Bodnar, J., Dale, J., & Brown A. (2024). Análisis descriptivo de genes de carbapenemasas específicos y perfiles de susceptibilidad

- a antibióticos en *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos evaluados en la Red de Laboratorios de Resistencia a los Antimicrobianos de Estados Unidos, 2017-2020. *Microbiol Spectr*, 12(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02828-23>
- Salam, M., Al-Amin, M., Salam, M., Pawar, J., Akhter, N., Rabaan, A. & Alqumber, M. (2023). Resistencia a los antimicrobianos: una amenaza grave y creciente para la salud pública mundial. *Healthcare*, 11(13), 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
- Salazar, E. & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter* spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(2), 64. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000200003&lng=es&tlng=es.
- Saldarriaga, E., Echeverri, L., & Ospina, S. (2015). Factores clínicos asociados a multirresistencia bacteriana en un hospital de cuarto nivel. *Infectio: revista de la Asociación Colombiana de Infectología*, 19(4), 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.04.003>
- Sambrano, H. (2018). Determinación de marcadores moleculares asociados a resistencia a antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Hospital del Niño de la República de Panamá. Tesis de Maestría. https://up-rid.up.ac.pa/1659/1/hector_sambrano
- Samrot, A., Wilson, S., Sanjay, R., Prakash, P., Sathiyasree, M., Saigeetha, S., Shobana, N., Pachiyappan, S. & Rajesh, V. (2023). Fuentes de contaminación por antibióticos en aguas residuales y métodos para su eliminación: descripción general. *Sustainability*, 15 (16). <https://doi.org/10.3390/su151612639>
- Sgobbi, G., Gonçalves, O., Columbaro, N., Aziani, N., Celere, M., Costa, A., Neves, L. & Segura, S. (2024). Hospital wastewater as source of human pathogenic bacteria: A phenotypic and genomic analysis of international high-risk clone VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235/O11. *Environmental Research*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119166>.
- Shadan, A., Pathak, A., Ma, Y., Pathania, R., & Singh, P. (2023). Deciphering the virulence factors, regulation, and immune response to *Acinetobacter baumannii* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(1). doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1053968>
- Shahab, S., Van Veen, A., Büchler, A., Saharman, Y., Karuniawati, A., Vos, M., Voor, A. & Severin, J. (2024). In search of the best method to detect carriage of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in humans: a systematic review. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 23(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00707-1>
- Shahzad, S., Afzal, Mo., Sikandar, S., & Afzal, I. (2020). Polymerase Chain Reaction. *IntechOpen*. doi:10.5772/intechopen.81924.
- Silva, J. & Martínez, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Rev Salud Pública de México*, 51(1), 439-446. <https://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v51s3/a09v51s3.pdf>

- Sisakhtpour, B., Mirzaei, A., Karbasizadeh, V., Hosseini, N., Shabani, M., & Moghim, S. (2022). The characteristic and potential therapeutic effect of isolated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lytic phage. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 21(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s12941-022-00492-9>
- Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2012). Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PloS one*, 7(12), e49300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049300>
- Smani, Y., Fàbrega, A., Roca, I., Sánchez, V., Vila, J., & Pachón, J. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(3), 1806-1808. doi:<https://doi.org/10.1128/AAC.02101-13>
- Solanki, G. (2012). Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Pharmacological Research*, 2(1). doi:10.7439/ijpr.v2i3.514.
- Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M., Maltez, L., Pereira, J., Capita, R., Alonso, C., Igrejas, G. & Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*, 22(23) doi:10.3390/ijms222312892.
- Spagnolo, A., Sartini, M. & Cristina, M. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* en el ámbito sanitario. *Reseñas en Microbiología Médica*, 32(3), 169-175. doi:10.1097/MRM.0000000000000271
- Steintún, A., Poulsen, S., Fríðriksmørk, M. & Djurhuus, A. (2024). Distribución de bacterias y genes resistentes a los antibióticos en las aguas residuales y el entorno de Tórshavn, Islas Feroe. *Frontiers in Environmental Science*, 12(1). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1336318>
- Strateva, T. & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: un fenómeno de resistencia bacteriana. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133-1148. DOI:10.1099/jmm.0.009142-0.
- Sundayi, P. & Naicker, N. (2023). Contribution of wastewater to antimicrobial resistance: A review article. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 34, 23-29, <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.05.010>.
- Tafur, J., Torres, J. & Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de infectología*, 12 (3), 223-233. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2022). NanoDrop Lite Plus. User Guide. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Product-Guides/nanodrop-lite-plus-user-guide-en-s120.pdf>
- Thi, M., Wibowo, D., & Rehm, B. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tiwari, A., Kurittu, P., Al-Mustapha, A., Heljanko, V., Johansson, V., Thakali, O., Mishra, S., Lehto, K., Lipponen, A., Oikarinen, S., Pitkänen, T., Heikinheimo, A. & WastPan Study

- Group. (2022). Wastewater surveillance of antibiotic-resistant bacterial pathogens: A systematic review. *Front Microbiol*, 13. doi:10.3389/fmicb.2022.977106.
- Tooke, C., Hinchliffe, P., Bragginton, E., Colenso, C., Hirvonen, V., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472-3500. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Usman, Y., Hafiz, T., Aliyu, I., Sharif, A., Umar, K., Idris A., Fatima A. & Shamsuddeen, H. (2023). Mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an overview. *Bayero Journal of Medical Laboratory Science*, 8(1), 93-103. <https://www.ajol.info/index.php/bjmls/article/view/253331/239363>
- Van der Heijden, M., Sandgren, A., Pr nting, M., Karvanen, M., Aagaard, H., Zorzet, A., Ren, M., & Cars, O. (2019). When the Drugs Don't Work. Antibiotic Resistance as a Global Development Problem. *Dag Hammarskjold Foundation and ReAct*, 11(2). <https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2019/02/When-the-Drugs-Don%E2%80%99t-Work-Antibiotic-Resistance-as-a-Global-Development-Problem-Feb-2019.pdf>
- Vanegas, J., Villamil, G., & Jiménez, J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Medicina*, 28(2), 233-246. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052014000200008&lng=en&tlng=es.
- Vigiawati, K., Sri, N. & Iswari. I. (2022). La presencia del gen VIM-2 en la resistencia a los carbapenémicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Health Sciences*, 6(10), 1093-1101. doi: 10.53730/ijhs.v6nS10.13809.
- Villarreal, O., González, J., González, A., & Zurita, A. (2024). Primeros casos aislados de *Escherichia coli* con carbapenemasas tipo OXA-48 en Panamá. *Infectio*, 28(4), 246-249. <https://doi.org/10.22354/24223794.1203>
- Wang, H., Du, D., Ding, Y., Zhang, K. & Zhi, S. (2023). Removal of Antibiotic Resistance Genes from Animal Wastewater by Ecological Treatment Technology Based on Plant Absorption. *Int J Environ Res Public Health*, 20(5), 4357. doi:10.3390/ijerph20054357.
- Wei, Q., & Ma, L. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10). doi:<https://doi.org/10.3390/ijms141020983>
- Weinberg, S., Villedieu, A., Bagdasarian, N., Karah, N., Teare, L., & Elamin, F. (2020). Control and management of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A review of the evidence and proposal of novel approaches. *Infection prevention in practice*, 2(3), 100077. <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2020.100077>
- Wu, H., Xiao, Z., Lv, X., Huang, H., Liao, C., Hui, C. & Li, H. (2023). Drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: From molecular mechanisms to potential therapeutics (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 25, 209. <https://doi.org/10.3892/etm.2023.11908>

- Zahra'a, F. (2022). Rapid measurement of the waterborne pathogen *Pseudomonas aeruginosa* in different spiked water sources using electrochemical sensing: Towards on-site applications. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 95(1). doi:<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2022.111124>
- Zambrano, H. (2018). Determinación de marcadores moleculares asociados a resistencia a antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el hospital del niño de la República de Panamá. Universidad de Panamá. <http://up-rid.up.ac.pa/id/eprint/1659>
- Zhang, W., Zhou, H., Jiang, Y., He, J., Yao, Y., Wang, J., Liu, X., Leptihn, S., Hua, X., & Yu, Y. (2022). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces pulmonary epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation through the TLR2/IQGAP1 axis. *Frontiers in Immunology*, 13(1). doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.927955>
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neuzil, P. (2020). PCR Past, Present and Future. *BioTechniques*, 69(4), 317–325. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>

ANEXOS



Figura 7. Toma de muestras. A y B) Muestreo en la PTAR. C y D) Muestreo en la EB3. E, F y G) Muestreo en la CSS.

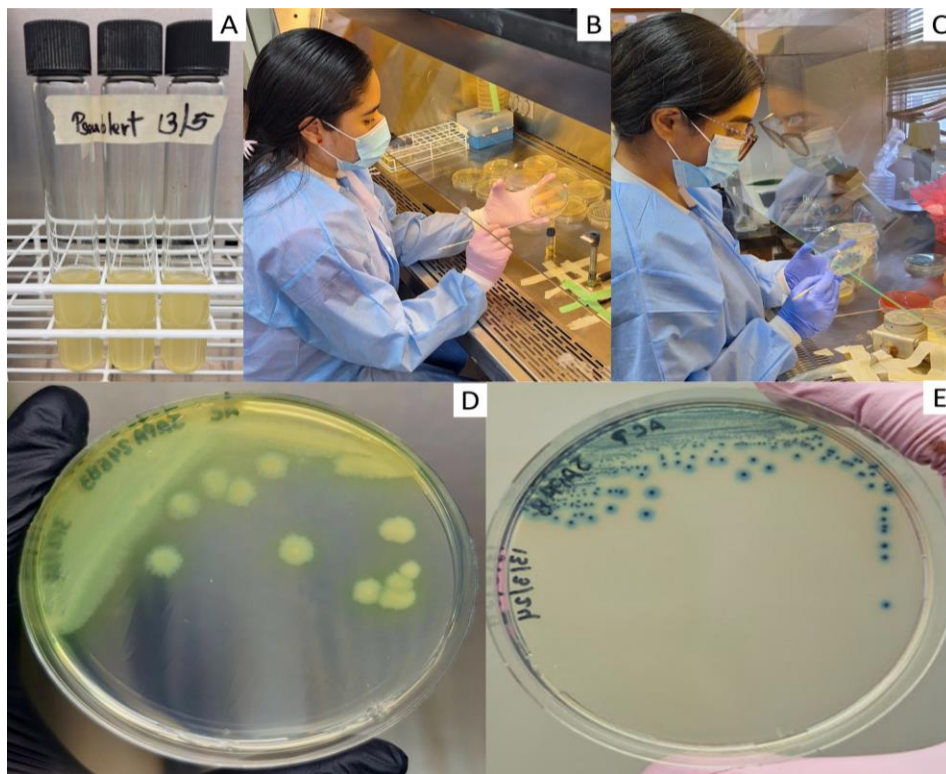


Figura 8. Aislamiento de cepas de *P. aeruginosa* en agar selectivo. A) Enriquecimiento en Pseudalert. B y C) Proceso de aislamiento. C) Resultado de aislado en agar Cetrimida. E) Resultado de aislado en agar cromogénico.

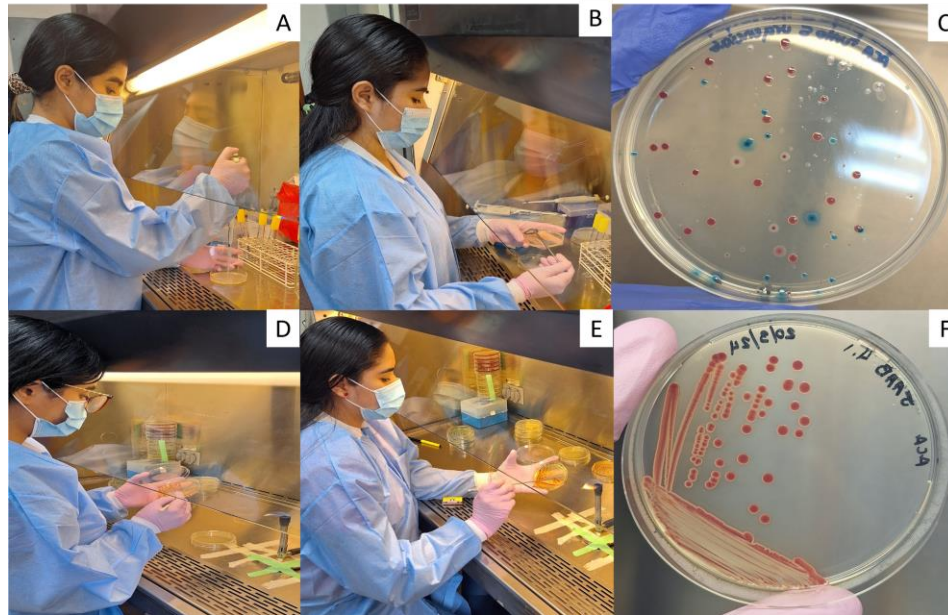


Figura 9. Aislamiento de cepas de *A. baumannii* en agar selectivo. A y B) Proceso de esparcido. C) Resultado de esparcido en agar cromogénico. D y E) Proceso de aislamiento. F) Resultado de aislado en agar cromogénico.

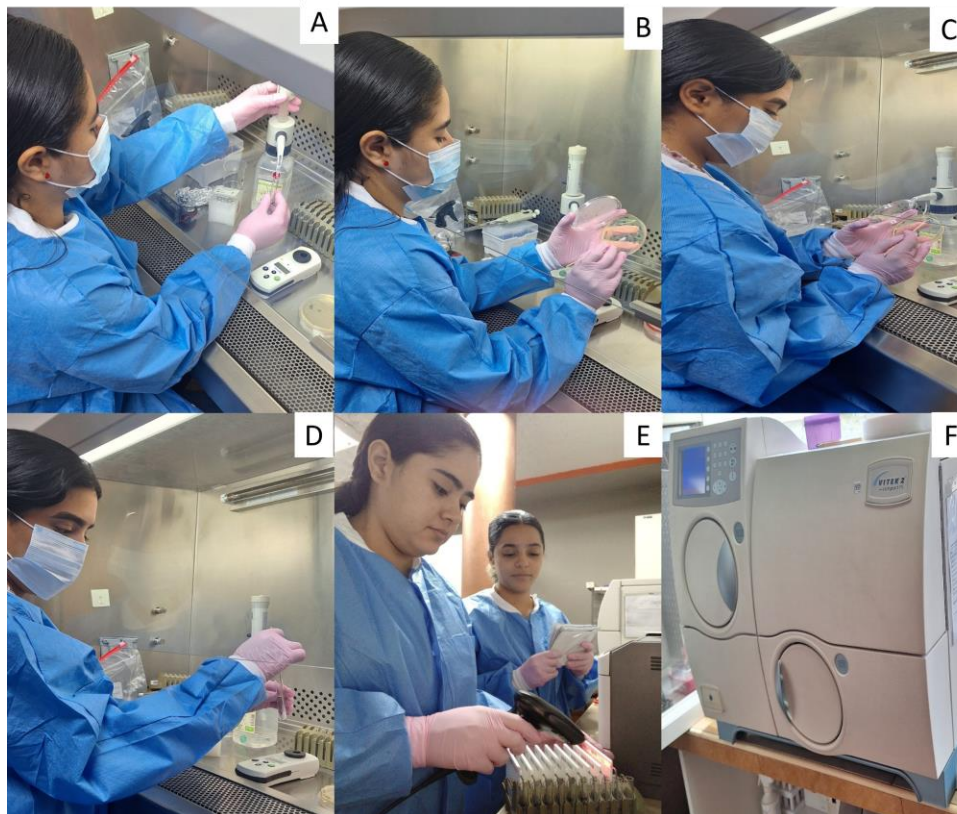


Figura 10. Proceso de identificación bioquímica y perfil de susceptibilidad microbiana con el Vitek 2. A) Llenado de tubos con agua salina. B y C) Toma de colonias con hisopos estériles. D) Suspensión. E) Llenado de datos de tarjetas. F) Vitek 2.

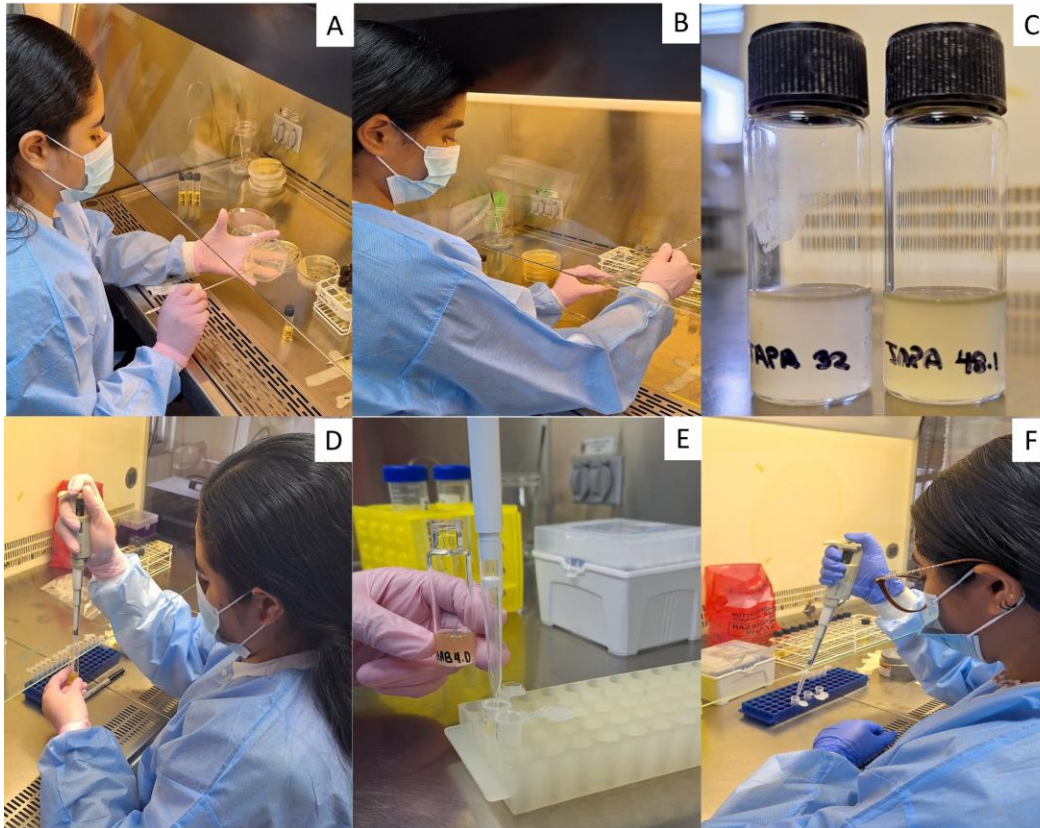


Figura 11. Preparación de glicerados para criopreservación de muestras confirmadas. A y B) Inoculación de caldos nutritivos. B) Cepas positivas crecidas en caldo nutritivo. C, E y F) Conservación en glicerol al 20%.

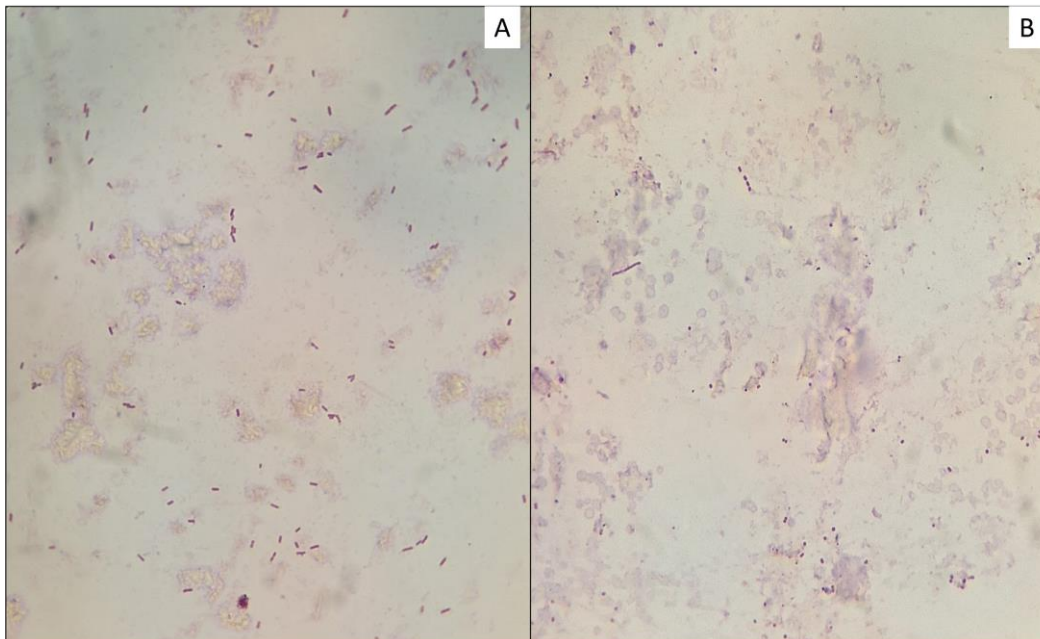


Figura 12. Prueba de Calidad realizada a las cepas positivas. A) Bacilos de *P. aeruginosa*. B) Cocobacilos de *A. baumannii*.



Figura 13. Procedimiento de extracción y cuantificación de ADN. A y B) Preparación de suspensión. C) Calentado en bloque térmico. D) Centrifugación. E) Extracción del Ácido nucleico. F) Cuantificación del ADN.



Figura 14. Proceso de identificación molecular y detección de genes de resistencia con la PCR. A, B y C) Preparación de la PCR. D y F) Preparación de la electroforesis. F) Observación de los resultados en el fotodocumentador.

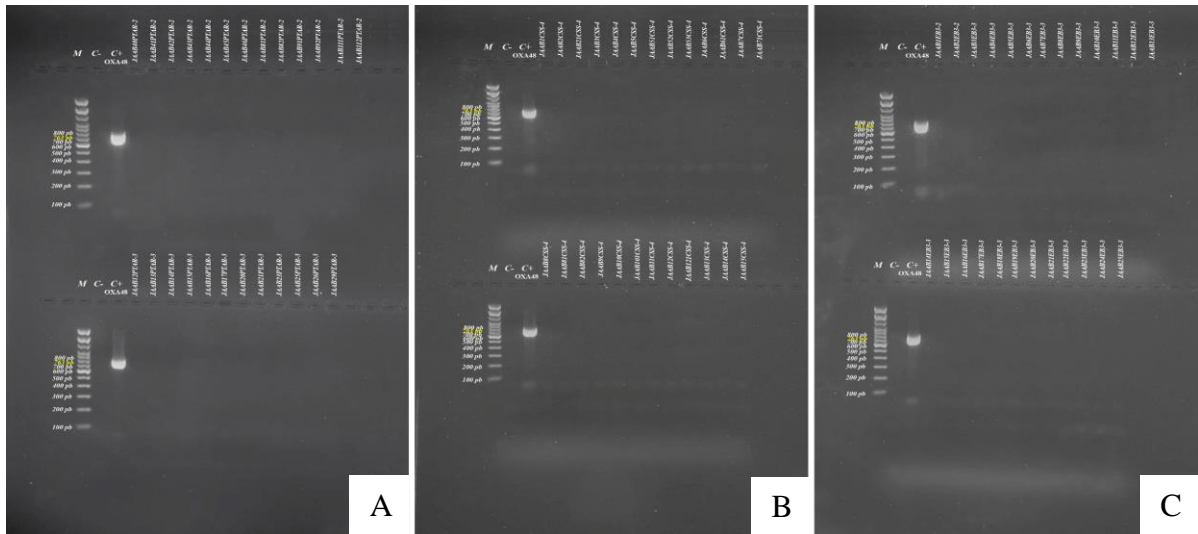


Figura 17. Resultados de las PCR para detección del gen *blaOXA-48* en *A. baumannii*. Patrones de amplificación de las cepas de: A) PTAR. B) CSS. C) EB3.