



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología
Escuela de Biología

Dpto. de Microbiología y Parasitología - Dpto. de Biología Molecular y Genética
Proyecto de Graduación

Título:

**CARACTERIZACIÓN DE PATOTIPOS DE *E. coli* CIRCULANTES EN AGUAS SIN
TRATAR EN LA CIUDAD DE PANAMÁ.**

Por:

Emmanuel J. Michelangelli C.
EC-43-11913

Gabriela A. Rodríguez G.
8-928-1980

Asesores:

Jordi Querol-Audí, PhD
Asesor Principal

Fermín Mejía, Mgtr
Asesor

Magaly Sánchez de Chial, PhD
Asesor

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología y Licenciado en Biología con orientación en Biología Molecular y Genética

2024



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“Caracterización de patotipos de *E. coli* circulantes en aguas sin tratar en la ciudad de Panamá”.

Por:

**GABRIELA A. RODRÍGUEZ G.
8-928-1980**

**EMMANUEL J. MICHELANGELLI C.
EC-43-11913**

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología, y Licenciatura en Biología con orientación en Biología Molecular y Genética

Prof. Jordi Querol-Audí

Profa. Magaly Sánchez de Chial

Prof. Fermín Mejía

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a todas esas personas que me han apoyado y motivado en poder llevar esta hazaña a cabo:

A mi padre Rumeno Michelangelli, por enseñarme que el trabajo duro siempre paga, que una persona debe saber siempre resolver, cumplir a su palabra y enfrentarse siempre a los retos con la frente en alto. A mi madre Julissa Cedeño por enseñarme el valor del conocimiento y el esfuerzo en siempre nutrir mis capacidades, por creer siempre en mí, sin importar que y mostrarme que la educación es una de las herramientas más importantes en la vida.

Dedico este trabajo a mis hermanos, Agatha y Christian Michelangelli, pilares clave en la persona que hoy en día soy. Su apoyo infinito, sus palabras de ánimo y su fiel consejo me motiva día a día a querer ser mejor, y que ustedes se sientan tan orgullosos de mí como yo lo estoy de ustedes.

A mis amigos y colegas Julio Cantatore y Valentina Padrón, hermanos de la vida y los biólogos con los que empecé esta carrera, esta tesis es de ustedes también.

Finalmente, a Gabriela Rodríguez, mi compañera de tesis y pareja, por todas las noches de trabajo incansable, de desesperaciones, lágrimas y esfuerzo. Por todo el amor, el apoyo, la dedicación y las risas. Esto es para ti.

Emmanuel J. Michelangelli C.

Quiero dedicarle este trabajo a mis abuelos: Nina, Ito & Ada, Chavelín & Orlando, el esfuerzo y amor de ustedes se ve reflejado en las generaciones posteriores.

A mis Padres, Onésimo Rodríguez y Ruby Guevara, Uds. me han enseñado a hacer lo que me gusta con amor, entrega y disciplina, siempre dando lo mejor de mí y evaluando mis debilidades como áreas de desarrollo para mejorar.

A mi hermana Andrea R. quien me motivaba en los días más difíciles de la carrera y con quien puedo compartir temas de biología y química que me apasionan.

A mis amigos, Yusseth y Gabriela Villarreal, Ediner Fuentes, María Lacayo, todo el equipo de iGEM Panamá 2019, Jenny I., Angela R., Kimberly S., Dereck S., Helio Q., y todos mis amigos de la carrera. Los admiro a cada uno por llevar su labor con gran dedicación aportando en la generación de conocimiento y cambiando en positivo a Panamá, para ustedes también va dedicado este trabajo.

En especial dedico este arduo trabajo a la persona que más admiro, Emmanuel Michelangelli. Por su constante apoyo, su capacidad de análisis crítico, por resolver problemas del laboratorio con facilidad, por su buen humor y gran compañerismo, por atreverse a enfrentar cada reto con la mejor disposición. Por ser un gran científico.

“Un poco de ciencia nos aleja de Dios, pero mucha ciencia nos acerca a Él” - Louis Pasteur

Gabriela A. Rodríguez G.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecer a Dios por permitirnos llegar hasta aquí y cumplir este sueño de ambos, que a pesar de lo difícil de la situación y lo complicado de los retos, nos mantuvo siempre con la frente en alto y la disposición para seguir luchando, además de poder conocer gente extraordinaria dentro del ambiente científico.

A nuestros profesores, tutores y asesores: Dr. Alex O. Martínez Torres, Prof. Mgtr. Fermín Mejía, Prof. Mgtr. Carmen Indira Espino, Mgtr. José Moreno, por todo el apoyo en el desarrollo de nuestra investigación, fueron cruciales con su guía, consejo y dirección para llevar a cabo esta investigación, estamos muy agradecidos que hayan formado parte de nuestro proceso académico y nuestra formación como profesionales.

Agradecer al Mgtr. Ediner Fuentes Campos, por su amistad, mentoría y consejo. Gracias a él por brindarnos las herramientas que hoy en día nos dieron la oportunidad de ser los profesionales que somos, clave en nuestra formación como científicos y un ejemplo de amor por la ciencia. De igual manera, agradecer a Yusseth Villarreal, compañera indispensable a lo largo de la carrera y que tanto ha luchado a nuestro lado para convertirnos en profesionales.

Agradecemos a nuestros compañeros de laboratorio Ing. Juan Medina y Lic. Marielena Salvatierra, por su inmenso apoyo en el transcurso de este proyecto de investigación sin ustedes no lo habríamos conseguido,

Al laboratorio de microbiología experimental y aplicada (LAMEXA), al departamento de microbiología humana de la facultad de medicina y al instituto conmemorativo Gorgas y todo el personal que los integra, por habernos facilitado los espacios, equipos y apoyo para culminar nuestro proyecto de investigación. De igual forma agradecer a la SENACYT y la Universidad de Panamá por financiar este proyecto.

Al Ministerio de Ambiente por la financiación del proyecto mediante el convenio N° 0-26-45-2019 de detección molecular y análisis filogenético de virus, bacteriófagos, bacterias, hongos filamentosos y parásitos patógenos en aire y agua provenientes de la bahía de Panamá del fondo de agua, áreas protegidas y vida silvestre, donde el investigador principal es el Dr. Alex O. Martínez Torres. Al financiamiento por parte de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado (VIP) con el concurso CUFI-2022-CNET-EG-001, para la realización de este proyecto y su culminación posible. También, al financiamiento por parte de la SENACYT con los fondos de Nuevos Investigadores APY-NI-2022-10, para la realización de este proyecto y su culminación posible.

Finalmente, agradecer de forma muy especial a nuestro tutor Dr. Jordi Querol-Audí, por ser la auténtica definición de mentor, por llevarnos de la mano no solo en este proyecto si no en nuestra formación como científicos. Su manera de enseñar, su disposición, su infinita paciencia, sabiduría y gran responsabilidad, son motivos por los cuales hemos podido crecer como profesionales y como personas a lo largo del tiempo que hemos pasado con usted. Todas las cosas que nos ha enseñado las llevaremos con nosotros por siempre.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES.....	8
JUSTIFICACIÓN	10
MARCO TEÓRICO	11
<i>Escherichia coli</i>	11
Descubrimiento.....	11
Estructura	11
Taxonomía.....	11
Filogrupos de <i>E. coli</i>	12
Método de Clermont para la identificación de filogrupos	13
Patotipos de <i>Escherichia coli</i> :	14
• <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica (ETEC).....	14
Patogénesis.....	14
Serotipos	15
• <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	15
Patogénesis.....	16
Serotipos	16
• <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva(EIEC)	16
Patogénesis.....	17
Serotipos	18
• <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC)	18
Patogénesis.....	18
Serotipos	18
• <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	19
Patogénesis.....	20
Serotipos	20
• <i>Escherichia coli</i> de Adherencia difusa (DAEC)	20
Descripción.....	20
Patogénesis.....	20
Serotipos	20
Detección de Patotipos de <i>E. coli</i>	20
Detección de <i>E. coli</i> y calidad del agua.....	22
VITEK 2 (BioMérieux)	22
Resistencia a antibióticos	23
Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	24
Resistencias antimicrobianas en <i>E. coli</i>	25

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	26
Multiplex PCR	26
Medios de cultivo:	27
• Caldo Nutritivo	27
• Caldo Lauril-Triptosa	27
• Caldo Bilis Verde Brillante	27
• Caldo EC-MUG	27
• Agar Agar	28
• Agar LB	28
• Agar EMB	28
• Agar Tripticasa de soya	28
OBJETIVOS	29
Objetivo General	29
Objetivos Específicos	29
HIPÓTESIS	30
METODOLOGÍA	31
Sitios de muestreo	32
Obtención de muestras	32
Aislamiento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)	33
• Fase presuntiva	33
• Fase confirmativa	33
• Conservación en glicerol	34
Caracterización de las cepas aisladas con VITEK 2	34
Extracción de ADN	34
Determinación de los grupos filogenéticos de las muestras de <i>E. coli</i>	34
Determinación de los Patotipos de las muestras de <i>E. coli</i>	35
• mPCR para la detección de los patotipos: EPEC, EHEC, EIEC y DAEC	35
• mPCR para la detección de los patotipos: EIEC, ETEC y EHEC	36
Visualización de los resultados de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa	37
RESULTADOS	39
Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	39
Resistencia antimicrobiana	40
Perfiles de resistencia antimicrobiana	41
Identificación de Filogrupos	42
Estandarización de mPCR para la detección de Patotipos	43
Identificación de Patotipos	44
DISCUSIÓN	45
Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	46

Resistencias a antimicrobianos.....	46
Identificación de Filogrupos	47
Identificación de Patotipos	48
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de los grupos de <i>E. coli</i> diarreogénicas.....	7
Cuadro 2. Genes de virulencia para la identificación de patotipos, producto, función y localización.	21
Cuadro 3. Primers utilizados en la determinación de filogrupos de <i>E. coli</i>	36
Cuadro 4. Primers y concentración utilizados en la detección de patotipos.....	36
Cuadro 5. Cepas aisladas e identificadas del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz.	39
Cuadro 6. Cepas, filogrupos y patotipos identificados	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de patotipos de <i>E. coli</i> en Latinoamérica.....	9
Figura 2. Árbol filogenético de 72 especies de <i>Escherichia</i> representantes de cada clado y filogrupo.	13
Figura 3. Método Clermont de detección de filogrupos.....	14
Figura 4. Sistema VITEK 2 de BioMérieux.	23
Figura 5. Colección de Muestra en el río Matasnillo.	33
Figura 6. Distribución de las resistencias antimicrobianas en las cepas del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz.	41
Figura 7 . Perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz.	42
Figura 8. Resultados de la identificación de Filogrupos para las muestras del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz.	43
Figura 9. Ensayos para la estandarización de la temperatura de amplificación.	44
Figura 10. Resultados de la identificación de Patotipos de <i>E.coli</i> para las muestras del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz.	45
Figura 11. Toma de muestras en el río Matasnillo	64
Figura 12. Aislamiento de coliformes totales de las muestras de agua.....	65
Figura 13. Aislamiento de <i>E. coli</i> en medio EMB y conteo de colonias.	65
Figura 14. Preparación de glicerizados	66
Figura 15. Confirmación de <i>E. coli</i> en medio EC-MUG	66
Figura 16. Flujo de trabajo para análisis en VITEK 2.....	67
Figura 17. Resultados de PCR con gradiente de temperatura de anidamiento para el gen <i>chuA</i>	68
Figura 18. Estandarización de los controles para los genes <i>yjaA</i> y <i>TspE4C2</i>	68
Figura 19. Resultados de PCR del gen <i>chuA</i> de las cepas del Matasnillo	69
Figura 20. Resultados de PCR del gen <i>TspE4C2</i> de las cepas del Matasnillo	69
Figura 21. Resultados de PCR del gen <i>TspE4C2</i> de las cepas de la PTAR.....	70
Figura 22. Estandarización de mPCRs para la detección de patotipos.....	70
Figura 23 . Resultados positivos de mPCR para identificación de patotipos en muestras de la PTAR	71

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Colección de muestra.....	64
Anexo 2. Trabajo en laboratorio	65
Anexo 3. Metodología VITEK 2	67
Anexo 4. Geles de electroforesis y resultados de PCR	68
Anexo 5. Tabla de resultado.....	72

RESUMEN

Los cuerpos de agua sin tratar representan nichos ecológicos importantes en los que existen interacciones entre poblaciones microbianas, donde las condiciones ambientales conllevan a la evolución adaptativa de dichos microorganismos, otorgándoles nuevas capacidades como genes de virulencia o de resistencia a antibióticos. Esto se debe a que las descargas de ríos y desechos humanos aumentan la diversidad genética y promueven asociaciones bacterianas. Uno de los agentes infecciosos más comunes en agua es *Escherichia coli*. Ésta se considera una bacteria comensal, sin embargo, se puede convertir en un ente patogénico de gran importancia, causando enfermedades en tejido intestinal y extraintestinal. Las *E. coli* diarreogénicas (DEC) como grupo, causan alrededor de un 40% de episodios de diarrea aguda en niños, y son una de las principales causas de muerte en menores de 5 años. Además, las DEC poseen un amplio espectro de resistencia a antibióticos, aumentando su capacidad infectiva. Por ello, el objetivo de este proyecto fue aislar y caracterizar patotipos de *E. coli* de muestras de aguas provenientes del río Matasnillo y el influente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) del río Juan Díaz. Estas cepas fueron identificadas por tarjetas GN en el sistema VITEK 2 para obtener un total de 37 cepas de *E. coli* del río Matasnillo y 17 cepas de la PTAR. Se realizó la evaluación de resistencia a antibióticos utilizando tarjetas AST, encontrando que el 11% (4/37) de las cepas del río Matasnillo mostraron resistencia a antibióticos, mientras que el 100% (17/17) de las cepas de la PTAR presentaron resistencia a múltiples antibióticos. Aplicando el método de Clermont, se identificaron los filogrupos de las cepas estudiadas según la presencia o ausencia de los genes *yjaA*, *chuA* y *TspE4C2*. El 100% (37/37) de las cepas del río Matasnillo pertenecieron al filogrupo A (bacterias comensales). En contraste, las cepas de la PTAR mostraron una distribución variada: el 12% (2/17) fueron del filogrupo D y el 6% (1/17) del B2 (bacterias patógenas), y el 72% (14/17) del A. Para la identificación de patotipos, se estandarizaron dos mPCR utilizando genes de patogenicidad como dianas de amplificación y se determinó que todas las cepas del río Matasnillo son presumiblemente comensales, mientras que en las de la PTAR, el 12% (6/17) corresponden a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), el 18% (3/17) a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y el 70% (12/17) a comensales. Basados en estos resultados, se puede concluir que el río Matasnillo presenta una contaminación por antibióticos que permite la aparición de estas cepas ambientales, además de ser, un posible peligro para la salud pública. Por otra parte, las cepas de la PTAR fueron cepas multirresistentes a diversos antibióticos de amplio espectro y se halló la presencia de DEC, lo que sugiere una sobre exposición de la población a estos antibióticos, lo cual permite a las bacterias desarrollar estos cuadros de resistencias y convertirse en posibles causantes de futuros brotes epidémicos.

Palabras clave: *E. coli*, resistencia a antibióticos, aguas residuales, filogrupos, patotipos

ABSTRACT

Untreated water bodies represent important ecological niches in which there are interactions between microbial populations, where environmental conditions lead to the adaptive evolution of these microorganisms, giving them new capabilities such as virulence or antibiotic resistance genes. This is because river discharges and human waste increase genetic diversity and promote bacterial associations. One of the most common infectious agents in water is *Escherichia coli*. It is considered a commensal bacterium; however, it can become a major pathogen, causing disease in intestinal and extraintestinal tissue. Diarrhoeagenic *E. coli* (DEC) as a group causes about 40% of acute diarrhea episodes in children and is one of the leading causes of death in children under 5 years of age. In addition, DEC have a broad spectrum of resistance to antibiotics, increasing their infective capacity. Therefore, the objective of this project was to isolate and characterize pathotypes of *E. coli* from water samples from the Matasnillo River and the influent of the Juan Díaz River Wastewater Treatment Plant (WWTP). These strains were identified by GN cards in the VITEK 2 system to obtain a total of 37 strains of *E. coli* from the Matasnillo River and 17 strains from the WWTP. Antibiotic resistance evaluation was performed using AST cards, finding that 11% (4/37) of the strains from the Matasnillo River showed antibiotic resistance, while 100% (17/17) of the strains from the WWTP showed resistance to multiple antibiotics. Applying Clermont's method, the phylogroups of the strains studied were identified according to the presence or absence of the *yjaA*, *chuA*, and *TspE4C2* genes. 100% (37/37) of the Matasnillo River strains belonged to phylogroup A (commensal bacteria). In contrast, the strains from the WWTP showed a varied distribution: 12% (2/17) were from phylogroup D and 6% (1/17) from B2 (pathogenic bacteria), and 72% (14/17) from A. For pathotype identification, two mPCRs were standardized using pathogenicity genes as amplification targets and it was determined that all strains from the Matasnillo river are presumably commensal, while in those from the WWTP, 12% (6/17) correspond to Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), 18% (3/17) to Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and 70% (12/17) to commensal. Based on these results, we can conclude that the Matasnillo River presents antibiotic contamination that allows the appearance of these environmental strains, in addition to being a possible danger to public health. On the other hand, the strains from the WWTP were multiresistant strains to various broad-spectrum antibiotics and the presence of DEC was found, suggesting an overexposure of the population to these antibiotics, which allows the bacteria to develop resistance and become possible causes of future epidemics outbreaks.

Key words: *E. coli*, antibiotic resistance, sewage water, enteropathogenic, phylogroups, pathotypes.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

La diarrea es la segunda causa de muerte infantil en niños menores de 5 años a nivel mundial, alcanzando 1700 millones de casos confirmados anualmente y hasta 525.000 muertes al año (World Health Organization, 2017b). Solamente en Panamá, para el 2019, se reportaron más de 74.000 casos de diarrea en niños con edades de entre 1 a 4 años, lo que representa una tasa de 25.360 casos por cada 100.000 habitantes dentro de este rango de edad (MINSA, 2019). La contaminación del agua suele ser una de las principales causas de este tipo de infecciones diarreicas a nivel mundial (Wolf *et al.*, 2014; Troeger *et al.*, 2018; Rojas-Renjifo *et al.*, 2021). Los agentes infecciosos más comunes presentes en el agua son *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Giardia lamblia*, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*, cepas enteropatógenas de *E. coli* y virus entéricos (Leclerc *et al.*, 2002; Troeger *et al.*, 2018).

E. coli es una bacteria Gram negativa que coloniza el tracto digestivo en conjunto con otras que están en tránsito por el organismo. Las cepas no patógenas de *E. coli* coexisten en armonía con el hospedero en una relación simbiótica (Savageau, 1983). Esta es habitualmente comensal y se encuentra de forma natural en el intestino de los humanos y animales de sangre caliente. Sin embargo, puede convertirse en un ente patogénico de gran importancia, causando enfermedades en tejido intestinal y extraintestinal de su hospedero (Robins-Browne *et al.*, 2016). Se ha determinado que las *E. coli* diarreogénicas (DEC) como grupo, son las bacterias responsables del 30 al 40% de episodios de diarrea aguda en niños en países en desarrollo (Cuadro 1) (O’Ryan *et al.*, 2005). Esto representa una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años y adultos mayores de 70 (Troeger *et al.*, 2018).

Los antibióticos son uno de los recursos más utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas. La falta de nuevos antibióticos y el incremento de patógenos multirresistentes se ha convertido en uno de los problemas mundiales de mayor relevancia (Matzov *et al.*, 2017). Además, el uso y abuso de antibióticos en medicina y agropecuaria, ha tenido un impacto significativo en la incidencia, selección y dispersión de la resistencia a los antibióticos (Vester y Long, 2009). Además, *E. coli* ha sido clasificada como una de las bacterias críticas para el desarrollo de nuevos antibióticos (World Health Organization, 2017a), ya que cuenta con la capacidad de transmitir estos factores de resistencia entre sí y otros grupos bacterianos con relativa facilidad, mediante la transferencia de plásmidos por conjugación o la transformación del material genético (Valencia, 2009; Madigan *et al.*, 2021), lo cual puede ocasionar que los métodos de tratamiento ante brotes emergentes sean poco eficientes. Todo esto representa una gran carga para los sistemas sanitarios, en especial los de recursos más limitados (Mazzariol *et al.*, 2017; Paitan, 2018; Bader *et al.*, 2020).

Cuadro 1. Características de los grupos de *E. coli* diarrenogénicas

Grupo	Abreviación	Síntomas	Epidemiología	Serogrupos y serotipos comunes
Enterotoxigénica	ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20
Enterohemorrágica	EHEC	Síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito.	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145.
Enteroinvasiva	EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses	O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, 164:H-O167:H-
Enteropatógena	EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55, O86, O142, O111:H- O127
Enteroagregativa	EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta por 20 días	Recién nacidos y niños menores de 2 años	O44:H18
Adherencia difusa	DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27

Adaptado de Rodríguez-Ángeles, 2002

La detección y caracterización de bacterias presentes en cuerpos de agua circulantes permite prever posibles brotes de enfermedades y tratarlos de forma apropiada, además de brindarnos información de cómo se encuentra la contaminación por el uso excesivo de determinados grupos de antibióticos en la población (Pérez *et al.*, 2016).

Por lo tanto, esta investigación permitirá determinar la naturaleza de las *E. coli* circulantes en el área de la ciudad de Panamá, brindando no solamente un perfil de resistencias antimicrobianas, sino también una clasificación de los grupos patógenos y comensales hallados, aumentando la información referente a grupos bacterianos

resistentes en contacto con la población, y promoviendo los sistemas de investigación y saneamiento de estas áreas para el mejor manejo de posibles focos de infección.

ANTECEDENTES

En Latinoamérica, se ha determinado una alta presencia de los diferentes patotipos de DEC y a su vez, cuál es su distribución en cada país (Figura 1) (Torres, 2017). La presencia de DEC en diversos cuerpos de agua como ríos, represas, diques y plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), se ha asociado a brotes de enfermedades diarreicas (Canizalez-Roman *et al.*, 2019; Chacón-Jiménez *et al.*, 2022). Se ha establecido que, pese a ser tratados, los efluentes provenientes de las PTAR pueden contener una gran concentración de estos patógenos, terminando en cuerpos receptores que son habitualmente utilizados en sistemas de riego (agrícola, parques y jardines), y usos urbanos no potables (riego de zonas verdes, sanitarios, lavado, etc.) (Canizalez-Roman *et al.*, 2019). Existen estudios que relacionan la presencia EPEC en aguas contaminadas como la causa de brotes de diarrea aguda por contaminación de alimentos (Aijuka *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2020). Además, cabe destacar que hasta un 50% de las DEC encontradas en pacientes con diarrea aguda, presentan resistencia a múltiples antibióticos (Angulo-Zamudio *et al.*, 2021)



Figura 1. Prevalencia de patotipos de *E. coli* en Latinoamérica. El tamaño de la fuente y orden de la lista representa la magnitud y dominancia de los diferentes patotipos en cada país. El color representa el patotipo al que pertenece. Tomada de Torres, 2017.

Se han realizado estudios sobre la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en distintos tramos del río Juan Díaz en la ciudad de Panamá, los cuales han logrado determinar que, no solamente existen múltiples bacterias resistentes en los distintos caudales que componen este cuerpo de agua, si no que sus poblaciones se encuentran en aumento progresivo, gran parte debido a las descargas de desechos sanitarios en diferentes zonas del cauce (Pérez *et al.*, 2016). Además, en el influente de la PTAR de Juan Díaz, se aislaron 17 cepas de *E. coli* con múltiples resistencias a antibióticos importantes, como β -lactámicos, quinolonas y fluoroquinolonas (Hall y Ramírez, 2020).

Dado lo expuesto en la información aquí recopilada, se puede demostrar la importancia de realizar esta investigación, ya que se centra en la caracterización y clasificación de *E. coli* ambientales, lo que podría prevenir una epidemia de enfermedades posiblemente letales, en especial para la población panameña, tomando en cuenta la falta de reportes de esta índole, el peligro inmediato que representan las bacterias resistentes a antibióticos y la calidad que poseen estos cuerpos de agua ubicados en las inmediaciones de la ciudad de Panamá.

JUSTIFICACIÓN

Los ecosistemas acuáticos representan nichos ecológicos importantes, puesto que se establecen múltiples interacciones entre poblaciones microbianas, donde ciertas condiciones ambientales conllevan a su evolución. Este fenómeno es especialmente relevante en aguas residuales, ya que las descargas de ríos y desechos provenientes de actividades antropogénicas se mezclan entre sí, aumentando la diversidad genética presente en estos, promoviendo nuevas asociaciones genéticas (Delgado-Blas *et al.*, 2021). De esta manera, las aguas residuales son un punto de enfoque importante para estudios epidemiológicos ya que suponen un riesgo para la salud pública por su potencial como reservorio y vehículo de propagación de patógenos (Franz *et al.*, 2015).

El agua sin tratar, debido a sus contaminantes químicos, fármacos, hongos, virus, parásitos y bacterias, impacta negativamente al ambiente que nos rodea, como áreas recreativas, ecosistemas silvestres y zonas pesqueras, comprometiendo la salud pública de los ciudadanos (Denchak, 2022). Dentro de los microorganismos de interés clínico que circulan en aguas sin tratar, se encuentra la *E. coli*, más específicamente las DEC, las cuales pueden causar diarreas e infecciones en el tracto urogenital y sangre. Cabe destacar que un 10 a 15% de los casos se deben al serotipo O157 productor de la toxina Shiga, que ocasiona síndrome urémico hemolítico (CDC, 2018; CDC, 2022).

Los distintos patotipos de *E. coli* (Cuadro 1), poseen una serie de genes de virulencia expresados dentro del huésped, por lo que, en el transcurso de los años, ha sido necesario el uso de antibióticos para hacerle frente a estas infecciones. No obstante, la irresponsabilidad en el uso generalizado e incontrolado de estos fármacos, tanto en animales como en seres humanos, conlleva a una presión selectiva que ha generado la proliferación de bacterias resistentes a antimicrobianos, donde las *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), resistentes a carbapenémicos, están dentro del grupo crítico que encabeza la lista de patógenos para los cuales es urgente el desarrollo de nuevos antibióticos (World Health Organization, 2017a).

Casos como el hallazgo del clon pandémico de *E. coli* ST131, portador de BLEE en la provincia de Veraguas en 2019 (Núñez-Samudio *et al.*, 2021), realzan la necesidad de generar estudios periódicos de la calidad hídrica en aguas sin tratar en Panamá, para comprender la relación entre los patógenos presentes en las descargas y la incidencia de casos clínicos del país. Por tanto, este proyecto tiene como objetivo, aislar y caracterizar cepas de *E. coli* patogénicas presentes en aguas sin tratar de la ciudad de Panamá, con la finalidad de aportar información actualizada sobre los patotipos circulantes y sus resistencias a antimicrobianos, permitiendo tomar las medidas

adecuadas para la prevención y manejo de posibles brotes epidémicos en el territorio nacional.

MARCO TEÓRICO

Escherichia coli

Esta bacteria es Gram negativa de tipo bacilo, no esporulada, midiendo por lo general 1 x 2 µm. Es mesófila (7°C a 50°C) aunque su crecimiento óptimo es de 37°C. Coloniza el tracto digestivo de animales homeotermos (sangre caliente) como el ser humano, en conjunto con bacterias que están en tránsito por el organismo. Las cepas no patógenas de *E. coli* coexisten con el hospedero en una relación simbiótica. Es anaerobia facultativa y dispone de metabolismo respiratorio y fermentativo con producción de gases, oxidasa negativa, lactosa positiva, indol positivo y lisina descarboxilasa negativo (Ramos *et al.*, 2020; Rodríguez y Angeles, 2002; Canet, 2016).

Descubrimiento

E. coli fue descrita en 1885 por el pediatra profesor alemán Theodore Escherich, el cual aisló esta bacteria durante su investigación sobre la microbiota en las deposiciones de niños y neonatos, denominándose bacteria *común del colon*. Castellani y Chalmers propusieron el nombre de *E. coli* en 1919 y fue oficialmente aceptado en 1958 (CDC, 2015).

Estructura

E. coli consta de tres partes principales: la membrana plasmática, membrana externa, y el espacio periplásmico, que se encuentra entre estas dos membranas, compuesto por moléculas de peptidoglucano. Esto le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas hasta 1700 mosmol (Canet, 2016 ; Xiao *et al.*, 2017). Algunas *E. coli* pueden poseer flagelos y/o fimbrias; estas últimas ayudan en la adherencia bacteriana a las células epiteliales intestinales, aunque también existen ejemplares de *E. coli* no móviles. Pueden poseer una capa de polisacárido gruesa y mucosa que rodea a la bacteria, que se denomina cápsula. Su función es ayudar en la adherencia y proteger la célula contra posibles amenazas del entorno (Rípodas Navarro *et al.*, 2017; El Romeral Masía, s.f.).

Taxonomía

Como bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia Enterobacteriácea, la taxonomía del género *Escherichia* ha visto múltiples cambios a lo largo de los años. Recientemente, se describieron cinco clados crípticos y se reubicaron las especies *E. blattae*, *E. hermanii* y *E. vulneris* a otros géneros, de forma que el género, ahora, se encuentra compuesto por tres especies nombradas: *E. albertii*, *E. Fergusonii* y *E. coli*,

y los cinco clados de *Escherichia* identificados desde el “I” hasta el “V” (Figura 2): (Denamur *et al.*, 2021). Estos cinco clados son idénticos fenotípicamente a *E. coli*, sin embargo, reúnen suficientes diferencias genómicas para ser considerados aparte de esta. Se ha propuesto que el clado V y el clado III junto al IV, sean considerados 2 especies nuevas del género. Por otra parte, se ha propuesto que el clado I y la *E. coli* sean considerados subespecies dentro de la especie llamada *E. coli sensu lato*. El clado II tiene pocas cepas descritas, aunque apunta a ser una nueva especie del género *Escherichia* (Denamur *et al.*, 2021).

Filogrupos de *E. coli*

E. coli sensu lato posee una clara estructura filogenética, lo cual nos permite identificar al menos ocho grupos filogenéticos distintos divididos en dos agrupaciones principales: la primera, compuesta por los filogrupos B2, G, F y D, y la segunda formada por los filogrupos A, B1, C y E (Figura 2) (Denamur *et al.*, 2021). Se ha demostrado que las cepas de *E. coli* pueden ubicarse en alguno de los cuatro filogrupos (A, B1, B2 y D), los cuales permiten distinguir la capacidad de virulencia de la cepa, siendo el grupo A y B1 los de baja virulencia, donde A abarca a la mayoría de los serotipos comensales, mientras que los grupos B2 y D comprenden las de alta virulencia, donde B2 se compone de la mayoría de bacterias causantes de virulencia extraintestinal (Clermont *et al.*, 2000, 2013; Lee *et al.*, 2016). El filogrupo E comprende un pequeño grupo de *E. coli* enterohemorrágicas previamente ubicadas en el grupo D. El grupo F comprende un derivado de un grupo de bacterias que están estrechamente relacionadas al grupo B2. De la misma forma el grupo C deriva del grupo B1, con ligeras pero consistentes diferencias genéticas (Clermont *et al.*, 2013; Denamur *et al.*, 2021).

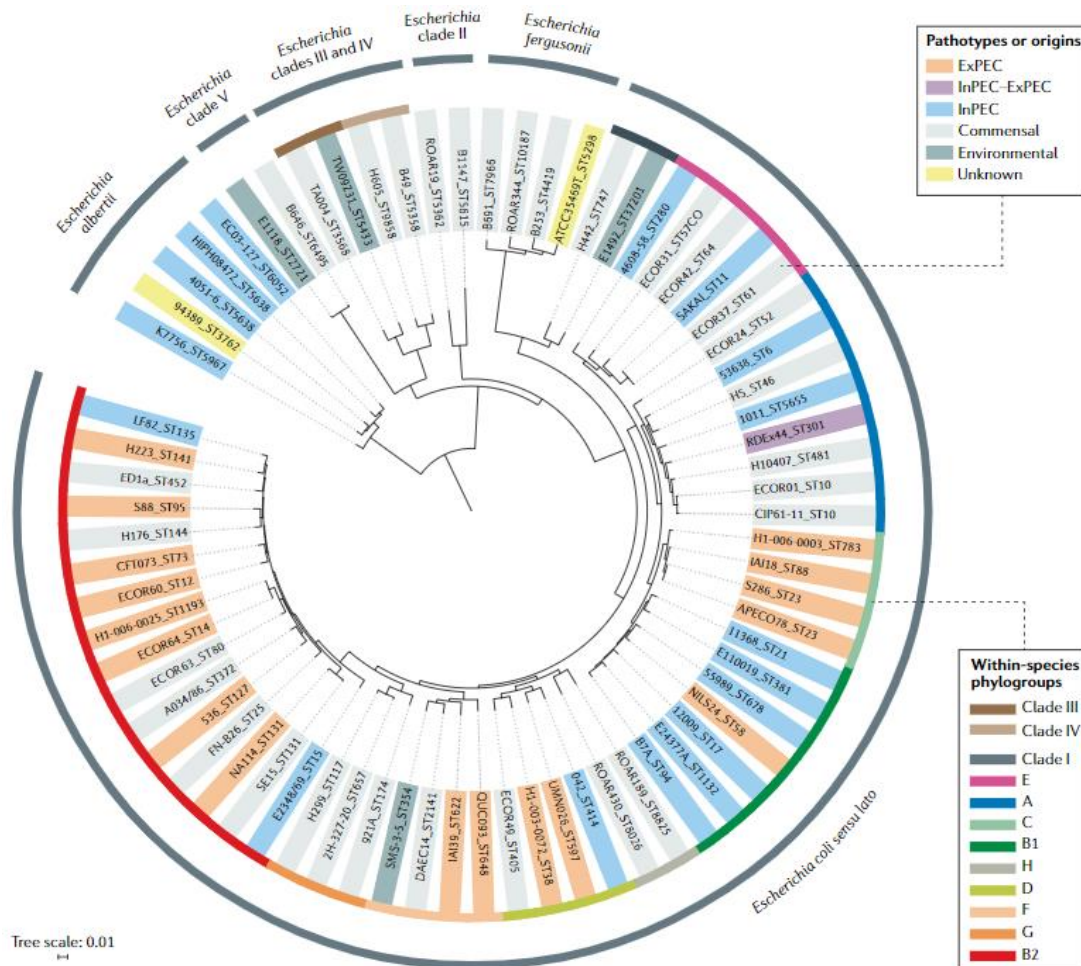


Figura 2. Árbol filogenético de 72 especies de *Escherichia* representantes de cada clado y filogrupo. Tomado de Denamur *et al.* (2021).

Método de Clermont para la identificación de filogrupos

Las cepas de *E. coli* pueden ser ubicadas en uno de los cuatro grupos filogenéticos principales mediante el uso de PCR multiplex (mPCR) basada en la amplificación de tres genes marcadores. El gen *chuA*, el cual es requerido para el transporte del grupo hemo en el serotipo enterohemorrágico O157:H7. También *yjaA*, gen identificado en el genoma de K-12 cuya función está ligada a la respuesta al exceso de peróxido de hidrógeno o estrés inducido por ácido. Por último, el fragmento de ADN anónimo *TspE4C2* (Clermont *et al.*, 2000). Aplicando el criterio de exclusión dicotómico (Figura 3) (Clermont *et al.*, 2000), que permite hacer la discriminación de los aislados en los grupos correspondientes (Acevedo, 2017).

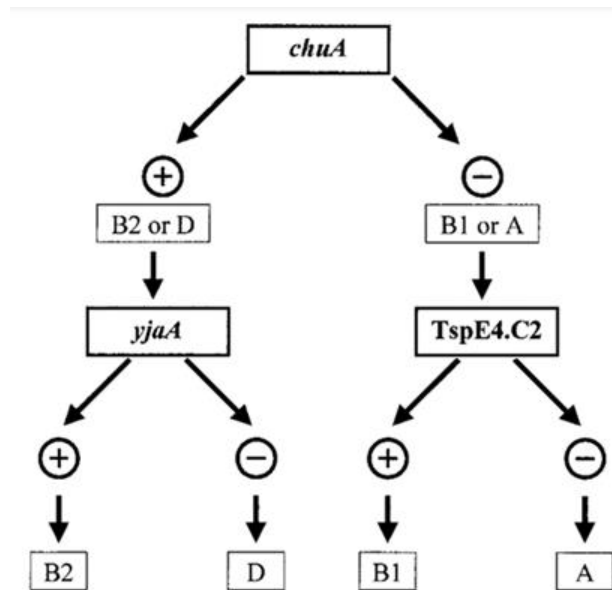


Figura 3. Método Clermont de detección de filogrupos. Árbol de decisión dicotómico para determinar el grupo filogenético de una cepa de *E. coli* utilizando los resultados de la amplificación por PCR de los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*. Tomado de Clermont *et al.* (2000).

Patotipos de *Escherichia coli* (Cuadro 1):

- ***Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)**

Comprende cepas de *E. coli* productoras de factores de colonización (CFs), toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Es responsable de numerosos casos de infección y muerte en niños menores de 5 años provenientes de países en vías de desarrollo y en adultos que transitan por dichas regiones causando diarrea del viajero (DV). La sintomatología son cólicos, náuseas, vómitos, fiebre, tenesmo (necesidad de defecar sin tener material fecal en intestinos). Se estima que causa la muerte de más de 157.000 personas al año (Gomes *et al.*, 2016; Vila *et al.*, 2016; Ríos-Muñoz *et al.*, 2019.; Pakbin *et al.*, 2021).

Patogénesis

La transmisión de ETEC está asociada principalmente a alimentos y fuentes de agua contaminadas. Una vez en el tracto digestivo, la ETEC se adhiere a los enterocitos mediante fimbrias en animales, y, en el caso de humanos, mediante factores de colonización que codifican para fimbrias y otras estructuras como antígenos de superficie de coli (Cs), proteínas autotransportadoras, como las del grupo Etp (proteína-tirosina-fosfatasa). Los flagelos protagonizan la unión inicial a células epiteliales y una vez unida a la mucosa intestinal, la ETEC libera sus toxinas (Pakbin *et al.*, 2021).

La EtpA, es una adhesina excretada por las ETEC y además, una glicoproteína que contiene un glucósido presente en el serogrupo sanguíneo A, y, como resultado, contribuye a la severidad de la enfermedad en personas con este tipaje. Además, el gen *EtpA* y *tolC* codifican una proteína de membrana implicada en el transporte de ST hacia las células hospederas. Estas pueden comprometer la integridad del tejido ya que afectan a las uniones celulares epiteliales incrementando de esta forma, la permeabilidad del intestino. Se han descrito subtipos de las toxinas ST como STp y STh encontrados principalmente en porcinos y humanos, responsables de desencadenar la inhibición del intercambio iónico y absorción de sodio, aportando en la pérdida de agua y electrolitos, resultando en diarrea aguda acuosa (Gomes *et al.*, 2016; Pakbin *et al.*, 2021).

Por otra parte, la LT es sintetizada como una holoenzima en el espacio periplásmico y posteriormente, puede ser excretada principalmente mediante vesículas de la membrana externa. Esta toxina se asemeja en un 80% a la toxina del cólera. La LT puede desencadenar la inhibición de la GTPasa llevando a cabo el incremento de monofosfato de adenosina cíclico intracelular (cAMP), esto desestabiliza la dinámica osmótica de la célula huésped mediante la excreción de agua y sales. Se ha relacionado la LT con el incremento de expresión de factores de virulencia (Gomes *et al.*, 2016; Ríos-Muñiz *et al.*, 2019 ; Pakbin *et al.*, 2021).

Serotipos

La tipificación serológica de las cepas de ETEC está basada en la composición de las proteínas de la membrana externa y principalmente, en los antígenos somáticos LPS (O) y flagelar (H). Comprende más de 100 serogrupos somáticos (O) y al menos 34 tipos flagelares (H). De estos, los que están asociados con enfermedades infecciosas son O8:H9, O6:16, O78:H12 y O25:H42 (Gomes *et al.*, 2016).

- ***Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)**

Fue descubierta debido a un brote de colitis hemorrágica que sucedió en Canadá en 1982, por un supuesto consumo de hamburguesas crudas. El serotipo de *E. coli* O157:H7, es el principal sospechoso causante de brotes epidémicos, ya que es el serotipo con mayor prevalencia y virulencia. Los demás disminuyen en la severidad de la enfermedad. Ha sido aislado de diferentes fuentes de alimentos como carne de res, pollo, leche y vegetales (Stavric y Speirs, 1989).

Las *E. coli* enterohemorrágicas pueden causar dolor abdominal, colitis, diarrea acuosa y progresar a diarreas sanguinolentas y fiebre, ocasionando el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). El SUH se caracteriza por causar daño renal agudo, trombocitopenia, anemia y sangre en heces. La población vulnerable frente a estas

infecciones incluye comúnmente a niños menores de 5 años y ancianos mayores de 65 (Rodríguez-Angeles, 2002; Kanayama *et al.*, 2015).

Patogénesis

El principal mecanismo de patogenidad es la expresión de la toxina shiga 1 (Stx1) y toxina shiga 2 (Stx2), que inducen diarrea sanguinolenta. Existen serotipos que expresan Stx1, otros expresan solo Stx2 y algunos que expresan ambas toxinas. Estas son un grupo de proteínas AB bacterianas compuestas de una subunidad A y 5 subunidades B capaces de inhibir la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 60S del ribosoma en células intestinales y renales del huésped. El resultado de esto es la muerte celular del enterocito e inflamación causando colitis (Rodríguez-Angeles, 2002; Mueller y Tainter, 2023).

El genoma de estas bacterias posee genes que codifican para intimina, la cual es la principal adhesina relacionada a su patogenidad. También, poseen un plásmido pO157 el cual expresa toxinas llamadas hemolisinas las cuales crean poros en las células hospederas y abren paso a las Stx (Mueller y Tainter, 2023).

Serotipos

Existen más de 200 serotipos causantes de enfermedad, algunos de los más sobresalientes son O26, O45, O103, O111, O121 y O145. También podemos señalar la cepa O154:H4, la cual azotó Alemania en el 2011, causando más de 4.000 casos de infección y 48 muertes (Gomes *et al.*, 2016). Esta cepa resultó ser un híbrido con genes de virulencia procedentes de diferentes patotipos, como el gen *stx2* de EHEC, además de contar con múltiples resistencias a antibióticos, lo cual aumentó drásticamente su letalidad (Zhao *et al.*, 2011).

Inicialmente, se culpó a los pepinos españoles como la fuente de la infección, lo que impactó negativamente la industria alimentaria española, sin embargo, investigaciones posteriores identificaron como fuente los brotes de semillas de fenogreco importados de Egipto (Mellmann *et al.*, 2011; Kramer *et al.*, 2011). Finalmente se observó que hubo un aumento en los viajes a Alemania desde países con alta incidencia de *E. coli* O154:H4 en las semanas previas al brote (Mellmann *et al.*, 2011), lo que sugiere que los viajeros podrían haber introducido la bacteria en Alemania.

- ***Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

En 1971 se describieron cepas de EIEC capaces de causar diarreas en voluntarios de un estudio liderado por DuPont. Las cepas de este grupo de *E. coli* son patógenos intracelulares, no excretan toxinas, no poseen flagelos, son generalmente lactosa negativa, no móviles y lisina descarboxilasa negativas. Su genética, patogenidad y

bioquímica, son similares a las enterobacterias *Shigella* sp. (Nataro y Kaper, 1998; Croxen y Finlay, 2010).

La incidencia de EIEC difiere dependiendo de la región, aunque estas disimilitudes en los reportes clínicos pueden deberse a la incapacidad y dificultad para discernir entre EIEC y *Shigella* sp. En países como Chile, Tailandia, India y Brasil, la *E. coli* enteroinvasiva se encuentra como el patógeno diarreico más común, y se muestra en varios reportes de personas asintomáticas que excretan la bacteria. Se transmite por alimentos y agua contaminada que están en contacto con desechos fecales de humanos infectados, en ciertos casos de persona a persona (Pasqua *et al.*, 2017).

Los síntomas y afecciones de la enfermedad causada por EIEC incluyen: dolor abdominal, calambres, fiebre, diarrea acuosa y también, puede presentar cuadro disentérico, heces con mucosidad y sangre. La población vulnerable ante infecciones por EIEC son los niños menores de seis meses (Rodríguez-Angeles, 2002; Sourav, 2023).

Patogénesis

La invasión comienza en el tracto intestinal, a nivel del intestino delgado, infectando en el Íleon, a las células M de la placa de Peyer. Dentro de estas, las bacterias son transportadas a macrófagos residentes para ser fagocitadas y, una vez dentro, desencadenan una reacción de piroptosis y la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1b y IL-18. Una vez liberadas las bacterias del macrófago, invaden enterocitos adyacentes, entrando por la superficie basolateral, donde son encerrados en una vacuola. La bacteria logra lizar el organelo siendo rápidamente liberada en el citosol. A continuación, inyecta efectores para robar la maquinaria celular del huésped y evitar ser reconocido por el sistema inmune. Posteriormente, se multiplica y moviliza nucleando microfilamentos de actina para desplazarse entre células adyacentes. La respuesta inmune inflamatoria en fases tempranas de la infección, promueve el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMNL) que migran a través del epitelio desestabilizando uniones intercelulares y facilitando el contacto de las bacterias a la superficie de los enterocitos. Todo esto conlleva a la ulceración del intestino (Rodríguez-Angeles, 2002; Croxen y Finlay, 2010; Pasqua *et al.*, 2017; Suárez y Canales, 2019; Sourav, 2023).

La bacteria se adhiere a las vellosidades de la mucosa intestinal utilizando mucinasa y adhesinas. Los genes necesarios para la invasión, sobrevivencia y difusión de la bacteria en la célula hospedera, se encuentran en un plásmido tipo F de 140 MDa llamado pInV, que codifica para proteínas como por ejemplo *ipaH* involucrada en la degradación de proteínas del hospedero, *virF* que codifica para un regulador de virulencia primaria evadiendo la autofagia e involucrado en la activación de algunos genes cromosomales (Rodríguez-Angeles, 2002; Pasqua *et al.*, 2017).

Serotipos

Existen varios serotipos dentro del grupo de las EIEC: O28ac:H-, O29:H-, O112ac:H-, O115:H-, O121:H-, O124:H-, O124:H7, O124:H30, O124:H32, O135:H-, O136:H-, O143:H-, O144:H-, O144:H25, O152:H-, O159:H-, O159:H2, O164:H-, O167:H-, O167:H4, O167:H5, O173:H-, O96:H19. Algunos de estos, como O28, O112ac, O121, O124, O143, O144, O152, y O167 comparten estructuras idénticas a *Shigella* en el serotipo O (Pasqua *et al.*, 2017).

- ***Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC)**

Este grupo fue caracterizado por primera vez en 1945 en Reino Unido mostrando un índice alto de morbilidad y mortalidad en niños menores de 6 meses. Fue el primer grupo que se identificó serológicamente (Rodríguez-Angeles, 2002).

Su transmisión es fecal-oral, mediante contaminación de alimentos y fomites. Los reservorios pueden ser niños y/o adultos sintomáticos o asintomáticos. Los síntomas de una infección causada por EPEC son: diarrea aguda, vómito, fiebre baja y deshidratación por la mala absorción (Rodríguez-Angeles, 2002).

Patogénesis

Este grupo se distingue por su habilidad de inducir lesiones de tipo de adherencia y esfacelamiento (A/E). Esto es mediado por pilis o fimbrias rizadas BFP ("Bundle forming pili") que se adhieren a las microvellosidades, además de expresar intiminas codificadas por el gen *eae*, provocando, en conjunto, daño en las microvellosidades, comprometiendo la integridad de la superficie celular y ocasionando finalmente su muerte (Rodríguez-Angeles, 2002; Suárez y Canales, 2019; Pakbin *et al.*, 2021).

Inicia por una lesión que empieza por el contacto de la bacteria con la membrana plasmática apical. De esta forma, se destruye el recubrimiento del intestino y una posterior distorsión y pérdida de electrolitos causada por la incapacidad de adsorción del enterocito. Como consecuencia, se desata una diarrea acuosa (Rodríguez-Angeles, 2002; Suárez y Canales, 2019).

Las EPEC se dividen en típicas (presentan BFP) y atípicas (ausencia de BFP), siendo estas últimas las de mayor prevalencia (Alonso *et al.*, 2014).

Serotipos

Los serotipos más frecuentes entre las cepas EPEC típicas son: O55:H6, O55:H-, O86:H34, O111:H2, O111:H-, O114:H2, O119:H6, O119:H-, O127:H6, O142:H6 y O142:H3414. Dentro de las EPEC atípicas se ha descrito una amplia variedad de

serotipos a nivel mundial, los más comunes son O33:H6, O51:H40, O51:H49, O111:H-, O119:H2, O127:H40, O132:H34, O145:H-, OR:H- y ONT6 (Alonso *et al.*, 2014).

- ***Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

Este grupo fue descrito en 1987 por Nataro *et al.*, en un estudio sobre diferentes patrones de adherencia de *E. coli* a células HEp-2 en laboratorio. Estas cepas fueron colectadas de niños con diarrea en Chile. Se observó que estas bacterias se agrupaban en un patrón asemejando una pila de ladrillos a lo que se conoce como empalizadas. Esto caracteriza el patrón de adherencia de las EAEC a las células epiteliales llamándose adherencia agregativa (AA) (Asea *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2014).

Se caracterizan por causar brotes aislados de diarrea persistente. Su transmisión es por la ruta fecal-oral por medio de agua y alimentos contaminados con materia fecal. Se desconoce si existen reservorios a parte del ser humano (Jensen *et al.*, 2014). No todas las infecciones por EAEC desarrollan la enfermedad. Dentro de los casos sintomáticos y afecciones se encuentran diarrea acuosa con moco, fiebre leve, vómito y en algunos casos, pueden presentarse deposiciones de heces con sangre. La población más vulnerable ante infecciones por EAEC son niños menores de 5 años (Rodríguez-Angeles, 2002; Suárez y Canales, 2019).

Patogénesis

La patogénesis de EAEC puede resultar complicada ya que dichas cepas son heterogéneas por lo que no todas llevan los mismos genes de virulencia e incluso se han descrito cepas con producción de toxinas Shiga. Una vez en el tracto intestinal, la bacteria se adhiere a través de fimbrias a las células de la mucosa del intestino delgado y grueso, formando biopelículas gruesas y produciendo enterotoxinas y citotoquinas, induciendo a la respuesta inflamatoria y, en consecuencia, causando daño celular. Aunque no invade las células del hospedero, no obstante, las altera funcionalmente. Estas cepas poseen los locus *aggR* que controlan la expresión de factores de adherencia como la dispersina la cual enmascara la carga eléctrica del polisacárido permitiendo que las fimbrias se extiendan apartadas de la superficie bacteriana recubriendo mayor superficie del epitelio. El locus *aggA* posee los genes de las fimbrias AAF/I, AAF/II, AAF/III y Hda. La adherencia a células HEp-2 y hemaglutinación de eritrocitos, es causada por una fimbria de adherencia agregativa I (AAF/I). No todas las cepas de EAEC expresan esta fimbria, algunas pueden expresar otras como por ejemplo AAF/II que de igual manera media la adherencia bacteriana a los enterocitos. El gen *pic* codifica para una proteasa autotransportadora con actividad mucinasa. La enterotoxina termoestable EAST1 contribuye en la diarrea acuosa y la toxina Pet es una proteína autotransportadora y enterotóxica que ocasiona acortamiento de vellosidades, alteraciones hemorrágicas y necróticas, ulceraciones del epitelio superior

y capacidad para provocar cambios en el citoesqueleto de la célula del hospedero. Algunas bombas de eflujo como la AcrAB-TolC han sido reportadas como sistemas asociados a la colonización y persistencia de la bacteria en el hospedero, además de tener un rol en la patogenicidad de esta (Rodríguez-Angeles, 2002; Asea *et al.*, 2010; Croxen y Finlay, 2010; Jensen *et al.*, 2014; Pasqua *et al.*, 2017; Suárez y Canales, 2019).

Serotipos

O44:H18, O126:H27, O111: H21 y la cepa híbrida O104:H4 Stx2a son los serotipos relacionados a brotes epidémicos (Jensen *et al.*, 2014).

- ***Escherichia coli* de Adherencia difusa (DAEC)**

Descripción

Este es un grupo heterogéneo de bacterias con virulencia variable que se caracteriza por presentar un patrón de adherencia difusa en células epiteliales HeLa o HEP-2, en los cuales no forman microcolonia, sino que se encuentran en el entorno o cubriendo la superficie de la célula huésped. Cerca del 75% de estas *E. coli* contiene adhesinas de la familia Afa/Dr, las cuales son responsable de otorgar característica de este tipo de adherencia (Riveros *et al.*, 2011).

Patogénesis

Los principales genes de virulencia responsables de la patogénesis son los operones *afa*, *daa* y *dra* que codifican para adhesinas y cuyos receptores se encuentran en la superficie del epitelio intestinal. Estos genes que pueden estar en el genóforo o en plásmidos. Como consecuencia de esta adherencia, las DAEC inducen efecto citopático, dado al desarrollo de la extensión celular adyacente a la unión con la bacteria. Sin embargo, no existe información detallada del mecanismo de patogénesis dado a la falta de estudios del genoma completo de DAEC a la fecha (Meza-Segura *et al.*, 2020).

Serotipos

El serotipo más común de DAEC es O126:H27 (Rodríguez-Angeles, 2002).

Detección de Patotipos de *E. coli*

La identificación de patotipos de *E. coli* se puede realizar mediante métodos moleculares, dirigidos a la detección de genes de virulencia que han sido ampliamente descritos, tanto para ADN cromosómico, como plasmídico (Águila Sánchez *et al.*, 2020; Cardona-López *et al.*, 2020; Riley, 2020). Algunos de los genes más utilizados se describen a continuación (Cuadro 2: Chandra *et al.*, 2013; Pakbin *et al.*, 2021).

Cuadro 2. Genes de virulencia para la identificación de patotipos, producto, función y localización.

Gen	Producto	Función	Localización	Patotipos
<i>bfpB</i>	Proteína pilis formadora de haces BfpB	Adherencia	Plásmido	EPEC
<i>eae</i>	Intimina	Unión y separación del enterocito	Cromosoma	EPEC y EHEC
<i>stx1</i>	Toxina Shiga 1	Localización de la superficie de la nucleína y efecto citotóxico	Genoma de Fago lisogénico incorporado a la bacteria	EHEC
<i>stx2</i>	Toxina Shiga 2	Localización de la superficie de la nucleína y efecto citotóxico	Genoma de Fago lisogénico incorporado a la bacteria	EHEC
<i>est1b</i>	Toxina termoestable	Secreción de quimioquinas y citoquinas	Plásmido	ETEC
<i>ipaH</i>	Plásmido de invasión, antígeno H	Invasión e inhibición del tráfico de la membrana celular del hospedero	Plásmido	EIEC
<i>virF</i>	Regulador transcripcional VirF	Factor de virulencia	Plásmido	EIEC
<i>pic</i>	Autotransportador de la Serin-proteasa	Inducción de la extrusión de células epiteliales, actividad mucolítica	Cromosoma	EAEC
<i>aafII</i>	Fimbria de adherencia agregativa II proteína AafB	Fimbria de adherencia agregativa	Plásmido	EAEC

<i>daaE</i>	Familia de proteínas Dr adhesina DaaE	Reordenamiento del citoesqueleto, destrucción de microvilli, secreción de IL-8	Cromosoma	DAEC
-------------	--	--	-----------	------

(Adaptado de Chandra *et al.*, 2013 y Pakbin *et al.*, 2021).

Detección de *E. coli* y calidad del agua

La presencia de coliformes en cuerpos de agua ha sido uno de los indicadores de calidad más utilizados mundialmente (Madigan *et al.*, 2021). Sin embargo, son las coliformes fecales o termotolerantes las más importantes para realizar estudios de calidad de agua, particularmente *E. coli*. La presencia de esta en cualquier cuerpo de agua evidencia la contaminación con materia fecal y, por ende, lo vuelve no apto para uso y/o consumo humano. No obstante, la ausencia de *E. coli* no garantiza la potabilidad del agua (Madigan *et al.*, 2021).

Existen múltiples métodos bien desarrollados y estandarizados para la detección de coliformes en muestras de agua, que varían dependiendo del objeto de estudio y origen de la muestra (Greenberg *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2021). Métodos como el filtrado por membranas (MF) y el cultivo en medios selectivos ricos en lactosa (ej. métodos de números más probable-NMP por tubos múltiples), son comúnmente utilizados para el aislamiento y detección de coliformes totales, entre ellos *E. coli* (Greenberg *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2021).

También, existen protocolos centrados específicamente en la detección de *E. coli* basados en el uso de las capacidades metabólicas de esta, para diferenciarla de otras coliformes. El cultivo de *E. coli* en platos de Eosina Azul de Metileno (EMB) es un ejemplo de estos ya que se aprovecha de la ruta metabólica de *E. coli* para generar un pigmento verde metálico que facilita su reconocimiento (Greenberg *et al.*, 1999).

VITEK 2 (BioMérieux)

El sistema VITEK 2, diseñado por bioMérieux (Figura 3a) (BioMérieux España), es un equipo automatizado con la capacidad de identificar y caracterizar microorganismos a partir de aislados primarios obtenidos en laboratorio, mediante el uso de tarjetas individuales de identificación (IDT) y tarjetas de resistencia a antibióticos (AST). Estas tarjetas cuentan con 64 pocillos (Figura 3b) (BioMérieux España) donde los aislados bacterianos son sometidos a diversas pruebas bioquímicas colorimétricas. Los datos obtenidos de la prueba para cada organismo se comparan con la base de datos respectiva mediante el software de análisis de datos del sistema VITEK 2, quién determina un valor cuantitativo de proximidad a cada uno de los taxones en dicha base. Si no se reconoce un patrón de identificación único, se ofrece una lista de posibles organismos, o se determina que la cepa está fuera del ámbito de la base de datos (Pincus, s.f.).



Figura 4. Sistema VITEK 2 de BioMérieux. **A)** Sistema VITEK 2 compact. **B)** Carrusel con tarjetas IDT y AST. Adaptado de BioMérieux España.

Existen cinco tarjetas IDT en el mercado actualmente: tarjetas GN para la identificación de bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores, tarjetas GP para Gram positivos, tarjetas YST para levaduras y organismos similares, tarjetas NH para *Neisseria*, *Haemophilus* y otras bacterias fastidiosas Gram negativas, y tarjetas ANC para bacterias anaerobias y corineformes (*Tarjetas de Identificación VITEK®2 | BioMérieux España, s.f.*).

Resistencia a antibióticos

Se definen como antibióticos a aquellos compuestos producidos por microorganismos que poseen capacidades antimicrobianas, de forma tal que tienen la habilidad de matar o inhibir el crecimiento de grupos bacterianos. Estos actúan atacando objetivos específicos en los procesos moleculares de la bacteria, los cuales son esenciales para su desarrollo, o afectan a su habilidad de supervivencia (Madigan *et al.*, 2021).

Sin embargo, las bacterias cuentan con mecanismos inherentes que otorgan la capacidad de disminuir o, inclusive, resistir la acción de los agentes antibióticos. A esta habilidad de adaptación se la conoce como resistencia antimicrobiana. Según la cantidad de antibióticos a los que puede resistir una bacteria, esta puede ser considerada multirresistente o ultrarresistente (Madigan *et al.*, 2021; CDC, 2022). Este fenómeno es de gran importancia médica, ya que la presencia de cepas resistentes en una infección puede ocasionar la complicación del tratamiento en pacientes, y en el caso de bacterias multirresistentes, puede llevar a la muerte de este (CDC, 2022).

El uso indiscriminado de un determinado grupo antibiótico para combatir infecciones bacterianas resulta en el aumento de bacterias resistentes por presión selectiva, lo cual resulta en complicaciones en el sistema sanitario al momento de hacer frente a

estas, en especial en regiones donde los hospitales no cuentan con los medios para enfrentar este tipo de brotes (Giono-Cerezo *et al.*, 2020; OMS, 2022).

Mecanismos de resistencia antimicrobiana

Los mecanismos de resistencia antimicrobiana pueden dividirse en cuatro clases principales según su método de acción: modificación de la diana del fármaco, inactivación enzimática, remoción del fármaco mediante bombas de excreción o expulsión, y/o impermeabilización de la membrana y bypass enzimático (Madigan *et al.*, 2021).

Las mutaciones aleatorias en el ADN pueden inducir resistencias a antibióticos. Tal es el caso de la rifampicina, antibiótico que inhibe la actividad de la ARN polimerasa, el cual, al ser expuesto a grandes poblaciones bacterianas, incentiva la aparición de mutaciones espontáneas y termina en la aparición de polimerasa modificadas las cuales ya no son afectadas por el fármaco (Madigan *et al.*, 2021).

Por otra parte, existen genes de resistencia a antibióticos que se pueden hallar en distintos elementos móviles de información genética, como los plásmidos. Estos, a diferencia de las mutaciones espontáneas, no modifican la diana del antibiótico, si no que, en su mayoría, codifican enzimas con capacidad de inhibir la actividad del antibiótico mediante la alteración de su estructura, la modificación química o la degradación del compuesto (Madigan *et al.*, 2021).

Las bombas de excreción o expulsión son otro medio de resistencia eficiente implementado por las bacterias, el cual les permite excretar cualquier sustancia que haya penetrado al medio intracelular. Estas bombas pueden encontrarse en todas las bacterias Gram negativas y cumplen la función de transportar varios tipos de moléculas fuera de la célula, entre ellas los antibióticos (Madigan *et al.*, 2021). Esto hace que las bacterias puedan reducir la concentración interna del antibiótico, y por ende, reducir su efectividad, lo que resulta en la supervivencia ante altas concentraciones de antibióticos en el medio extracelular. Además de esto, La modificación de la membrana externa de la bacteria puede afectar la permeabilidad de esta los antibióticos, mediante la alteración o eliminación de las porinas utilizadas en el acceso del antimicrobiano al medio intracelular, como en el caso de los β -lactámicos (Daza Pérez, 1998).

El último método de resistencia de las bacterias es conocido como el bypass enzimático, el cual ocurre cuando la molécula o diana del antibiótico, ya no es esencial para el proceso metabólico o la supervivencia de la célula (Madigan *et al.*, 2021). Esto puede ocurrir en bacterias que cuentan con secuencias codificadoras para rutas alternas metabólicas que se activan cuando la vía principal falla, permitiendo la supervivencia del organismo.

Resistencias antimicrobianas en *E. coli*

E. coli, al igual que el resto de las bacterias Gram negativas, cuenta con la capacidad de utilizar los 4 mecanismos de defensa antes mencionados para desarrollar resistencia a los distintos grupos antimicrobianos (Madigan *et al.*, 2021). Sin embargo, existen resistencias típicas asociadas a cada grupo bacteriano, y *E. coli* no es la excepción, ya que se asocia principalmente a resistencias a β -lactámicos, quinolonas y fluoroquinolonas, Trimetoprima y sulfonamidas (Mosquito *et al.*, 2011; Paitan, 2018; Poirel *et al.*, 2018).

Existen numerosos genes en *E. coli* de origen animal y humano que confieren resistencia a los β -lactámicos. Algunos de origen animal se encuentran frecuentemente en *E. coli* y cuentan con la capacidad de inhibir a un estrecho grupo de penicilinas y amino penicilinas, mientras que los de origen humano han emergido de forma más reciente otorgando la capacidad de generar carbapenemasas y β -lactamasas (Poirel *et al.*, 2018). Las β -lactamasas son enzimas que actúan mediante la hidrólisis del enlace amida del núcleo β -lactámico, inactivando el antibiótico antes de que genere cualquier efecto (Mosquito *et al.*, 2011). Dentro de las más de 890 β -lactamasas descritas, las familias más comunes en *E. coli* son: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA-1* y *blaCARB* (Mosquito *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2018).

Las quinolonas y fluoroquinolonas son de los antibióticos más utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas en animales y humanos. Estas se encargan de inhibir la ADN girasa y la topoisomerasa IV de *E. coli* lo que impide la replicación del ADN (Madigan *et al.*, 2021; Mosquito *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2018). La resistencia a quinolonas viene dada por la mutación aleatoria de los genes *gyrA* y *gyrB*, quienes codifican para las subunidades A y B de la ADN girasa, alterando el sitio de unión del fármaco (Mosquito *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2018). Por otro lado, la resistencia a fluoroquinolonas es ocasionada también por mutaciones aleatorias, pero de los genes *parC* y *parE* (principalmente *parC*), que codifican para subunidades de la topoisomerasa IV (Paitan, 2018).

Las sulfonamidas y la trimetoprima son antibióticos de origen sintético utilizados en la medicina y la veterinaria desde 1935, que al ser utilizadas por sí solas actúan como bacteriostáticos (Mosquito *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2018). Sin embargo, al ser utilizados en conjunto, estos son un eficiente bactericida, el cual actúa como agente inhibidor de distintos pasos en la ruta de síntesis del ácido fólico (Poirel *et al.*, 2018). La resistencia a sulfonamidas y trimetoprima viene dada por 2 razones: la mutación al azar de genes en la ruta de síntesis del ácido fólico, principalmente los genes de dihidropteroato sintetasa o dihidrofolato reductasa; y la adquisición de genes *sul* que codifican para dihidropteroato sintetasa insensible a sulfonamidas, o la adquisición de

genes *dhfr* que codifican para dihidrofolato reductasa insensibles a trimetoprima (Poirel *et al.*, 2018).

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La PCR es una reacción enzimática “in vitro” que se realiza con la finalidad de reproducir millones de veces un fragmento de ADN específico a través de ciclos de reproducción utilizando una polimerasa capaz de actuar en un amplio gradiente de temperaturas (Espinosa Asuar, 2007; Tamay de Dios *et al.*, 2013). En el proceso de PCR se pretende simular el ciclo de replicación natural del ADN en la célula, con la diferencia de que se controlan los factores involucrados en la reacción para obtener un producto específico (Espinosa Asuar, 2007).

Para llevar a cabo la PCR se utiliza una polimerasa proveniente de bacterias termófilas como *Thermus aquaticus* (Taq), el ADN del organismo a estudiar, los primers o cebadores, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y las concentraciones de magnesio y sales que necesite la polimerasa para su mejor desempeño (Espinosa Asuar, 2007; Tamay de Dios *et al.*, 2013). Esta técnica consiste en tres pasos en donde se lleva a cabo la síntesis del ADN: 1- La desnaturalización, que como su nombre indica, es la fase en la que el ADN de doble cadena se separa mediante calor para poder dar paso a la acción de la polimerasa. 2- La hibridación, en cuya etapa los primers o cebadores, se alinean de forma complementaria con el ADN diana en sus extremos con dirección 5'-3' . 3- La extensión, en la que la Taq polimerasa se une al complejo primer-diana y comienza la síntesis del nuevo ADN utilizando los dNTPs en la mezcla de reacción (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

PCR Múltiple

La PCR múltiple (mPCR) es una variante de la PCR tradicional, en donde se busca amplificar dos o más secuencias diana, utilizando más de un juego de primers (Markoulatos *et al.*, 2002). Fue descrita por primera vez por Chamberlain *et al.*, en 1988, donde amplificaron múltiples loci para el gen de la distrofia muscular en humanos. De ahí en adelante se ha utilizado en muchas áreas para el análisis simultáneo de diversos marcadores (Bolívar *et al.*, 2014).

La mPCR permite reducir los tiempos y costos de investigación al disminuir la cantidad de reacciones de PCR a un solo experimento, disminuyendo la cantidad de reactivos consumidos y tiempo de laboratorio (Bolívar *et al.*, 2014; Markoulatos *et al.*, 2002). Sin embargo, esta técnica también puede representar un reto al momento de estandarizarla, debido a que los primers deben ser diseñados para compartir temperaturas de hibridación y según la cantidad de estos, las concentraciones deberán ser precisamente ajustadas para que todas las dianas puedan amplificarse de forma adecuada (Markoulatos *et al.*, 2002).

Medios de cultivo:

- **Caldo Nutritivo**

El caldo nutritivo es un medio enriquecido que se utiliza para el cultivo de un amplio número de microorganismos. Al no contar con ningún factor específico que inhiba o limite el crecimiento de ningún grupo en particular, se usa habitualmente para la proliferación de bacterias antes de realizar alguna otra prueba. Esto permite que las células se recuperen, diluir tóxicos o sustancias inhibitorias y contar con un mayor número de microorganismos recuperados para su posterior estudio (Neogen, 2021).

- **Caldo Lauril-Triptosa**

Este es un medio utilizado en la detección y recuento de organismos coliformes en aguas, leches y alimentos. Para ello, utiliza laurilsulfato de sodio que inhibe el crecimiento de cualquier microorganismo perteneciente a la flora secundaria. Los demás componentes se utilizan para dar nutrición, energía, soporte salino y regulación de pH para el desarrollo de Coliformes (Cultimed, 2003).

- **Caldo Bilis Verde Brillante**

Caldo utilizado en la investigación y recuento de bacterias coliformes en aguas, leches, alimentos, etc. Se recomienda, particularmente, para el enriquecimiento selectivo y numeración de *E. coli*, ya que este inhibe el crecimiento de microorganismos Gram positivos y Gram negativos distintos a Coliformes y bacterias anaerobias capaces de fermentar a 44°C, mediante el uso de bilis de buey y el tinte verde brillante (Cultimed, 2003).

- **Caldo EC-MUG**

El medio EC con MUG, es un caldo utilizado para la detección por fluorescencia de *E. coli*. El EC es un medio desarrollado para el cultivo eficaz de *E. coli*, utilizando un caldo de lactosa mezclado con sales biliares y con cualidades de tampón que favorece el crecimiento de esta. La adición del 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) permite la detección de *E. coli* gracias a su actividad glucuronidasa que convierte el MUG en 4-metilumbeliferona, el cual es un compuesto fluorescente (Neogen, 2019a).

- **Agar Agar**

El agar-agar es un agente solidificante utilizado en medios de cultivo bacteriológicos para preparar medios sólidos, y en otras aplicaciones como cultivos de tejidos, geles de electroforesis, etc. Este es un polisacárido extraído de algas rojas marinas, el cual tiene la característica de no ser degradable por la mayoría de microorganismos, por ende, su éxito en el trabajo con bacterias (Cultimed, 2003).

- **Agar LB**

El agar LB, también conocido como agar Miller, es un medio enriquecido que no inhibe el crecimiento bacteriano y fue diseñado en base a la fórmula de Miller sobre el crecimiento lento en la fase logarítmica de *E. coli*. Este medio se utiliza principalmente para el crecimiento de cultivos puros de bacterias, en especial bacterias recombinantes (Neogen,2019b).

- **Agar EMB**

El agar Eosina Azul de Metileno según Levine, o agar EMB para abreviar, es un medio selectivo que se emplea en la detección de bacilos entéricos y coliformes, particularmente *E. coli* y *Enterobacter*. La eosina y el azul de metileno inhiben el crecimiento de microorganismos Gram positivos, y su combinación permite la coloración de ciertas bacterias. En el caso de *E. coli*, su rápida metabolización de la lactosa presente acidifica el medio de cultivo, lo que permite la formación de enlaces amida entre los pigmentos y resulta en una coloración verde metálica (Cultimed, 2003).

- **Agar Tripticasa de soya**

Este agar es utilizado para la preparación y mantenimiento de cepas en estudio utilizadas en pruebas de crecimiento, susceptibilidad y como controles negativos descritos en múltiples protocolos de investigación (Neogen, 2023).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar los patotipos y filogrupos de cepas de *E. coli* ambientales circulantes en agua sin tratar en la ciudad de Panamá.

Objetivos Específicos

- Aislar cepas ambientales de *E. coli* de aguas sin tratar colectadas en el río Matasnillo y Juan Díaz en la ciudad de Panamá.
- Verificar la naturaleza de los aislados y determinar los perfiles de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas, utilizando el equipo automatizado VITEK 2 para detección y sensibilidad de microorganismos.
- Distinguir los filogrupos de *E. coli*, A, B1, B2 y D a los que pertenecen los aislados mediante amplificación por PCR de los genes marcadores *chuA*, *yjaA*, y *TspE4.C2*.
- Clasificar los patotipos de *E. coli* presentes en las muestras aisladas mediante la detección con PCR multiplex de los genes *bfpB*, *stx1*, *stx2*, *eae*, *est1b*, *ipaH* y *virF*.

HIPOTESIS

Ho: No existe diferencia significativa en la resistencia a antibióticos y/o el perfil de patogenicidad entre las cepas de *E. coli* ambientales y las de aguas residuales.

Ha: Las cepas de *E. coli* de origen ambiental y de aguas residuales presentarán diferencias significativas en la resistencia a antibióticos y/o el perfil de patogenicidad.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Sitios de muestreo

Para este trabajo, se seleccionaron dos sitios de muestreo diferentes. El primero fue el efluente de la PTAR de Juan Díaz, la cual se encuentra al sur del corredor sur y al oeste de la desembocadura del río Juan Díaz. El río Juan Díaz, uno de los más importantes a nivel nacional, con 28 Km de longitud, que nace a 700 metros sobre el nivel del mar y que recibe las aguas provenientes del área del Cerro Azul y del este de San Miguelito, posee una población de más de 100.000 habitantes en el corregimiento que lo rodea (Lucio Alonso, 2017)

El segundo punto de muestreo fue el río Matasnillo, el único río de Panamá que tiene su origen y desembocadura en la ciudad, posee 6 Km de longitud y drena una cuenca hidrográfica de 383 Km², su delta llega directamente a la Bahía de Panamá, y es considerado uno de los ríos más perturbados del territorio (Schidlder, 2019).

Obtención de muestras

Las muestras provenientes de la PTAR de Juan Díaz fueron 17 cepas suministradas por el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y obtenidas del aislamiento realizado por Hall y Ramírez (2020).

Para el río Matasnillo, se realizó el muestreo de aguas superficiales en la desembocadura del mismo, exactamente en el puente peatonal, paseo cinta costera, Paitilla, Panamá, Panamá. 8°58'28,6" N; 79°31'6,2". Para ello, se utilizó un frasco de vidrio previamente esterilizado, con el cual se colectó 1L de agua de la superficie en el sentido de la corriente, se tapó el frasco y se colocó dicha muestra en un recipiente con hielo y se transportó al laboratorio LAMEXA para ser procesadas (Figura 4).

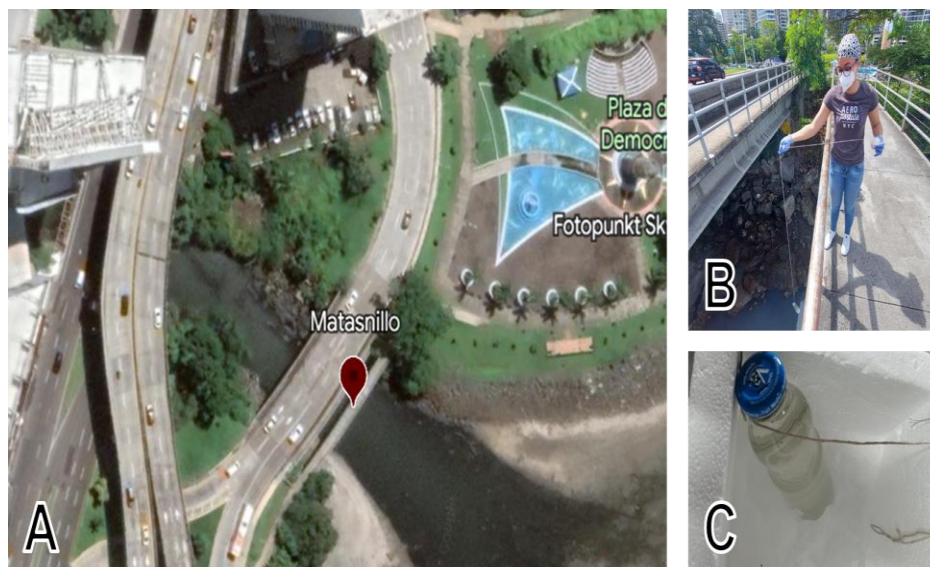


Figura 5. Colección de Muestra en el río Matasnillo **A)** Lugar exacto de muestreo en la desembocadura del río. **B)** Obtención de la muestra. **C)** Transporte de la muestra colectada en cadena de frío.

Aislamiento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

El aislamiento de las cepas de *E. coli* se realizó siguiendo el protocolo establecido en el “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (Greenberg et al., 1999), con ligeras modificaciones como se describe a continuación:

- **Fase presuntiva**

Se agregó 1mL de la muestra de agua colectada en campo a tubos con 10mL de Caldo Lauril Triptosa y campana de Durham, y se incubaron a 44.5°C durante 24 h. Aquellos cultivos que presentaron producción de gas y turbidez, se inocularon en 10 mL de caldo bilis verde brillante y campana de Durham, y se incubaron a 44.5°C durante 48 h.

- **Fase confirmativa**

Se realizaron estriados en agar EMB, con las muestras provenientes de tubos con formación de gases y turbidez. Estos se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se identificaron en el plato las UFC aisladas cuya morfología fue lisa, circular y de coloración oscura total, las cuales se inocularon en tubos con 10 mL de caldo EC-MUG y campanas Durham, y se incubaron a 44.5°C durante 24 h. Después, se visualizaron los tubos bajo luz ultravioleta (UV), y aquellos que presentaron turbidez, formación de gas y brillo, se consideraron positivos para la presencia de *E. coli*.

- **Conservación en glicerol**

Los cultivos positivos de *E. coli* se inocularon en tubos de ensayo con 5 mL de caldo nutritivo, y se incubaron en agitación (125 rpm) a 37°C durante 18 h. A continuación,

se tomaron alícuotas de los cultivos con aspecto turbio en tubos de 1.5 mL y se le agregó un volumen igual de glicerol al 40% como crioprotector, y se conservaron congeladas a -20°C para su posterior uso.

Caracterización de las cepas aisladas con VITEK 2

Se utilizó el sistema VITEK 2 para la identificación bacteriana y sensibilidad antimicrobiana, siguiendo el protocolo establecido en *MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM* (Pincus, s.f.). Para ello, se tomaron muestras de los glicerizados para ser activadas en caldo nutritivo, mediante incubación con agitación a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se realizaron estriados en platos de agar LB que fueron incubados a la misma temperatura durante 18 h. Luego, se procedió a transferir 1 Unidades formadoras de colonia (UFC) aisladas de los platos, utilizando un hisopo estéril, a tubos de poliestireno con 3 mL de solución salina estéril al 0.45%, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.50-0.63 McFarland, la cual se midió con un densitómetro "DensiChek". Las suspensiones bacterianas se pusieron en contacto con las tarjetas correspondientes mediante una cánula (tarjetas GN para identificación bacteriana, o tarjetas AST para sensibilidad y perfiles de resistencia). Finalmente, las tarjetas fueron registradas en el software de análisis del VITEK 2, junto al identificador de muestra suministrado, y se procedió a la fase de llenado e incubación automática en el equipo (35.5°C durante un lapso de 3 a 6 h). Los resultados fueron analizados por el sistema y se emitió un reporte final con los resultados.

Extracción de ADN

Se utilizó el método de hervido de la muestra para la obtención de los ácidos nucleicos totales (genómico y plasmídico). Para ello, se realizó suspensiones de UFC puras en agua estéril libre de nucleasas a una concentración óptica del 0.5 McFarland. Estas se llevaron a 100°C en plato caliente durante 10 min y posteriormente, se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4°C, se extrajo el sobrenadante, se comprobó la presencia del ADN utilizando medición por NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers *Thermofisher Scientific*, y se almacenó en tubos Eppendorf a -20°C.

Determinación de los grupos filogenéticos de las muestras de *E. coli*

La detección de los filogrupos de *E. coli* se realizó mediante la detección de los genes *yjaA*, *chuA* y *TspE4C2*, de acuerdo a la metodología establecida por Clermont *et al.* (2000), utilizando como controles las cepas CiGa6 (*yjaA*) y CiVa1 (*TspE4C2*) obtenidas de los aislados de Acevedo (2017), y la cepa O157:H7 (*chuA*), donada por el departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá. Para llevar a cabo la PCR, se utilizó el kit de PCR AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (4398886, *Thermofisher Scientific*) ajustado a un volumen final de 20 µL. Estos 20 µL consistieron de: 10µL de Master Mix 2X, ADN con una concentración

mínima 50 ng, primers Forward y Reverse para cada uno de los genes con concentración final 0.5 μ M y 2 μ L de Agua Libre de Nucleasas. Los primers utilizados se listan en el Cuadro 3.

Las condiciones de PCR para el gen *chuA* fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C durante 5min, seguido de 30 ciclos de: 94°C por 30 s, 63°C por 30 s, 72°C por 30 s, y luego, una extensión final a 72°C por 5 min.

Las condiciones para los genes *yjaA* y *TspE4C2* fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de: 94°C por 30s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s, y luego, una extensión final a 72°C por 5min.

Cuadro 3. Primers utilizados en la determinación de filogrupos de *E. coli*.

Gen	Primer de 5'-3'	Producto en pb	Referencia
<i>yjaA</i>	F 5'TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG3'	211	Clermont <i>et al.</i> , 2000
	R 5'ATGGAGAATGCGTTCTCAAC3'		
<i>chuA</i>	F 5'GACGAACCAACGGTCAGGAT3'	279	Clermont <i>et al.</i> , 2000
	R 5'TGCCGCCAGTACCAAAGACA3'		
<i>TspE4C2</i>	F 5'GAGTAATGTCGGGGCATTCA3'	152	Clermont <i>et al.</i> , 2000
	R 5'CGCGCCAACAAAGTATTACG3'		

Determinación de los Patotipos de las muestras de *E. coli*

Para la detección de patotipos, se estandarizaron dos protocolos de mPCR basados en lo descrito por Chandra *et al* (2013), con un volumen final de 20 μ L, dividiéndose los Primers de acuerdo a su temperatura de unión de los primers a la secuencia molde a identificar y se establecieron los protocolos que se describen a continuación:

- **mPCR para la detección de los patotipos: EPEC, EHEC, EIEC y DAEC**

Esta consistió en la detección de los genes de virulencia *eae* (EPEC y EHEC), *bfpB* (EPEC), *stx2* (EHEC), *virF* (EIEC) y *daaE* (DAEC), los 20 μ L de solución se dividieron en: 10 μ L de solución de Master Mix 2x, solución de ADN con una concentración final mínima de 100 ng, solución de primer hacia adelante (Forward) al igual que el primer hacia atrás (Reverse) para cada uno de los genes con una concentración final de 0.2 μ M y 3 μ L de Agua libre de Nucleasas. Las condiciones de mPCR fueron las siguientes:

desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de: 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s y luego, una extensión final a 72°C por 5 min.

- **mPCR para la detección de los patotipos: EIEC, ETEC y EHEC**

Esta mPCR se basó en la detección de los genes *stx1* (EHEC), *ipaH* (EIEC) y *est1b* (ETEC), los 20µL de solución se dividieron en: 10 µL de solución de Master Mix 2x, solución de ADN con una concentración final mínima de 100 ng, solución de primer Forward al igual que el primer Reverse de *stx1* y *est1b* con concentración final de 0,2 µM, solución de primer Forward al igual que el primer Reverse para el gen *ipaH* concentración final 0,3 µM y 5,6 µL de Agua Libre de Nucleasas. Las condiciones de mPCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de: 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s y luego, una extensión final a 72°C por 5 min.

Los primers utilizados para las mPCR se describen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Primers y concentración utilizados en la detección de patotipos.

Gen	primer de 5'-3'	Concentración en µM	producto en pb	Referencia
<i>bfpB</i>	F 5'GACACCTCATTGCTGAAGTCG3'	0,2	910	Chandra <i>et al.</i> , 2013
	R 5'CCAGAACACCTCCGTTATGC3'			
<i>eae</i>	F 5'TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT3'	0,2	482	Chandra <i>et al.</i> , 2013
	R 5'GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG3'			
<i>stx1</i>	F 5'CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAG C3'	0,2	244	Chandra <i>et al.</i> , 2013
	R 5'AATGCCACGCTTCCCAGAATTG3'			
<i>stx2</i>	F 5'GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGA G3'	0,2	324	Chandra <i>et al.</i> , 2013
	R 5' AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC 3'			

<i>est1b</i>	F 5'TGTCTTTTTCACCTTTCGCTC3' R 5'CGGTACAAGCAGGATTACAACAC3'	0,2	171	Chandra <i>et al.</i> , 2013
<i>ipaH</i>	F 5'CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG3' R 5'GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC3'	0,3	933	Chandra <i>et al.</i> , 2013
<i>virF</i>	F 5'AGCTCAGGCAATGAACTTTGAC3' R 5'TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC3'	0,2	618	Chandra <i>et al.</i> , 2013
<i>daaE</i>	F 5'GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA3' R 5'TATTCACCGGTCGGTTATCAGT3'	0,2	542	Chandra <i>et al.</i> , 2013

Visualización de los resultados de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa

Para la preparación de los geles de agarosa, se arregló la cámara de electroforesis, colocando los peines correspondientes y sellando cualquier fuga. Posteriormente, se pesó la agarosa y se disolvió en el tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) a una concentración de 1X, utilizando un horno microondas para obtener una concentración del 1.5% (m/v). Luego, se le añadió Sybr Safe 0.5 µg/mL (5 a 7.5µL según el tamaño de la cubeta que se utilizó) y se vertió a la cámara de electroforesis dejando solidificar. Seguido, se llenó con TAE 1x la cubeta hasta el punto de aforado. Luego, se mezclaron 5µL de las muestras con 1µL del buffer de carga Blue/Orange Loading Dye, 6x *Promega™*, y se depositaron en cada pocillo, corriéndose a 80 V durante 45 min, aproximadamente. Finalmente, se observó en un fotodocumentador *UVP® 220 Imaging Systems*, con transiluminador de luz ultravioleta (UV) *BioDoc-It® 210*, para la toma de imágenes y registro de los resultados.

Este paso se realizó para visualizar todos los resultados de los ensayos mediante PCR antes descritos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *E. coli*.

Se lograron aislar 37 cepas positivas para presuntas *E. coli* al final de la fase confirmativa del procedimiento de aislamiento de UFC. Estas fueron sometidas a identificación por tarjetas GN (Gram negativas) en el sistema automatizado VITEK 2 y se logró confirmar que el 100% (37/37) de los aislados pertenecen a la especie de *E. coli* con un porcentaje de confianza superior al 95% o “excelente” de acuerdo al software de análisis de *Biomérieux Inc.* De igual manera, las 17 cepas suministradas por LAMEXA provenientes de la PTAR de Juan Díaz (Hall y Ramírez, 2020), fueron confirmadas como especie de *E. coli*, utilizando el mismo sistema. Las cepas fueron codificadas como aparece en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Cepas aisladas e identificadas del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz.

Cepas Identificadas por VITEK 2								
Código	Lugar de Colecta	Identificación	Código	Lugar de Colecta	Identificación	Código	Lugar de Colecta	Identificación
EC-A1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-G3	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-M4	Matasnillo	<i>E. coli</i>
EC-A4	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-G7	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR A10-4	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-B1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-I1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR A15-2	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-B2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-I2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR B15-1	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-B3	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-I3	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR B15-3	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-D3	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-I4	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR B19-3	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-E1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-I5	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR B19-4	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-E2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-J2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR B25-1	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-E3	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-K1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR B25-2	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-E4	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-K2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR B25-5	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-F1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-K4	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR B25-6	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-F2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-K5	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR C10-1	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-F3	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-L1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR C15-1	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-F4	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-L2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR C15-2	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-F5	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-L3	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR C19-3	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-F6	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-M1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR C25-1	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-G1	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-M2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR C25-4	PTAR	<i>E. coli</i>
EC-G2	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EC-M3	Matasnillo	<i>E. coli</i>	EcAR C25-5	PTAR	<i>E. coli</i>

Resistencia antimicrobiana

Las cepas del río Matasnillo fueron incubadas en el sistema VITEK 2 con tarjetas AST-N401 y AST-N403 *Biomérieux Inc.*, siendo sometidas estas bacterias a pruebas bioquímicas con antibióticos pertenecientes a las familias de β -lactámicos, quinolonas/fluoroquinolonas, sulfonamidas, aminoglucósidos, macrólidos y

tetraciclinas. Se obtuvo que el 11% (4/37) de las cepas presentaron resistencias a antibióticos, siendo estas: 8% (3/37) a ciprofloxacino, 3% (1/37) a norfloxacino y otro 3% (1/37) a trimetoprima/sulfametoxazol. Por otra parte, 32% (12/37) de las cepas presentaron resistencias intermedias: 22% (8/37) a ciprofloxacino y 11% (4/37) a cefalotina (Figura 6). Las cepas aisladas de la PTAR de Juan Díaz fueron sometidas a caracterización con tarjetas AST-N249 por Hall y Ramírez (2020), y se obtuvo que el 100% (17/17) de las cepas presentaron resistencias a antibióticos, siendo estas: 100% (17/17) a cefuroxima, 88% (15/17) a cefazolina, 76% (13/17) a ampicilina, ceftazidima, cefotaxima y cefepima, 53% (9/17) a piperacilina, 29% (5/17) a gentamicina, 18% (3/17) a ciprofloxacino y 18% (3/17) a trimetoprima/sulfametoxazol. De igual manera, 88% (15/17) presentaron resistencias intermedias, las cuales fueron: 88% (15/17) a amikacina, 41% (7/17) a ertapenem, meropenem e imipenem, 23% (4/17) a piperacilina, 12% (2/17) a ceftazidima, 6% (1/17) a gentamicina y 6% (1/17) a ampicilina (Figura 5).

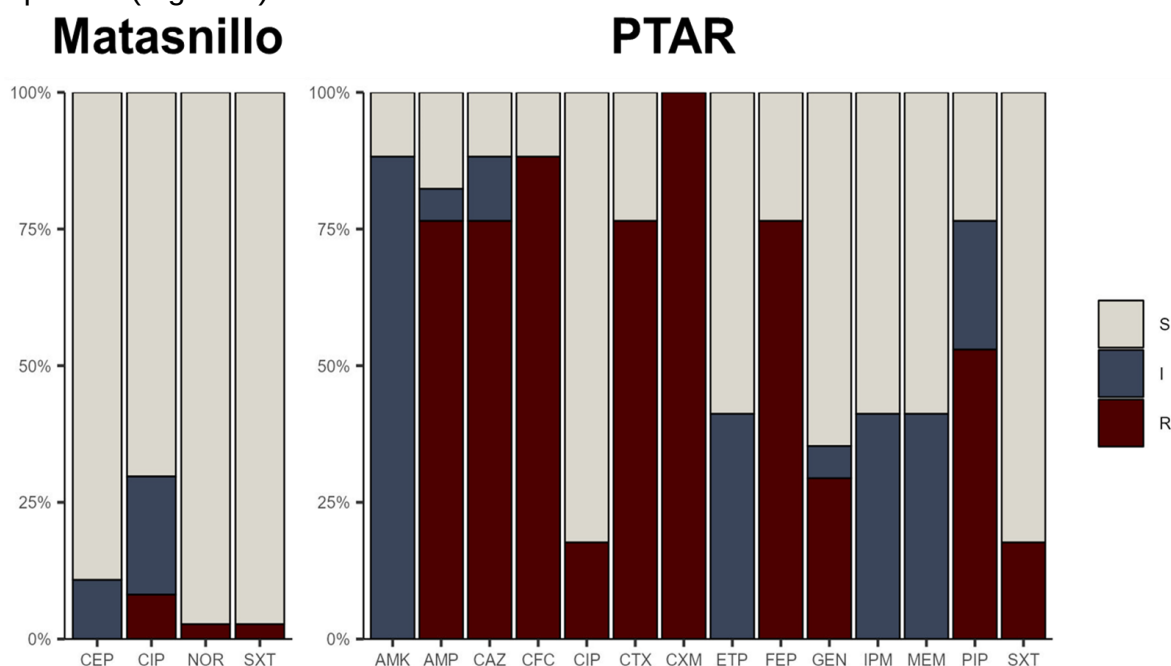
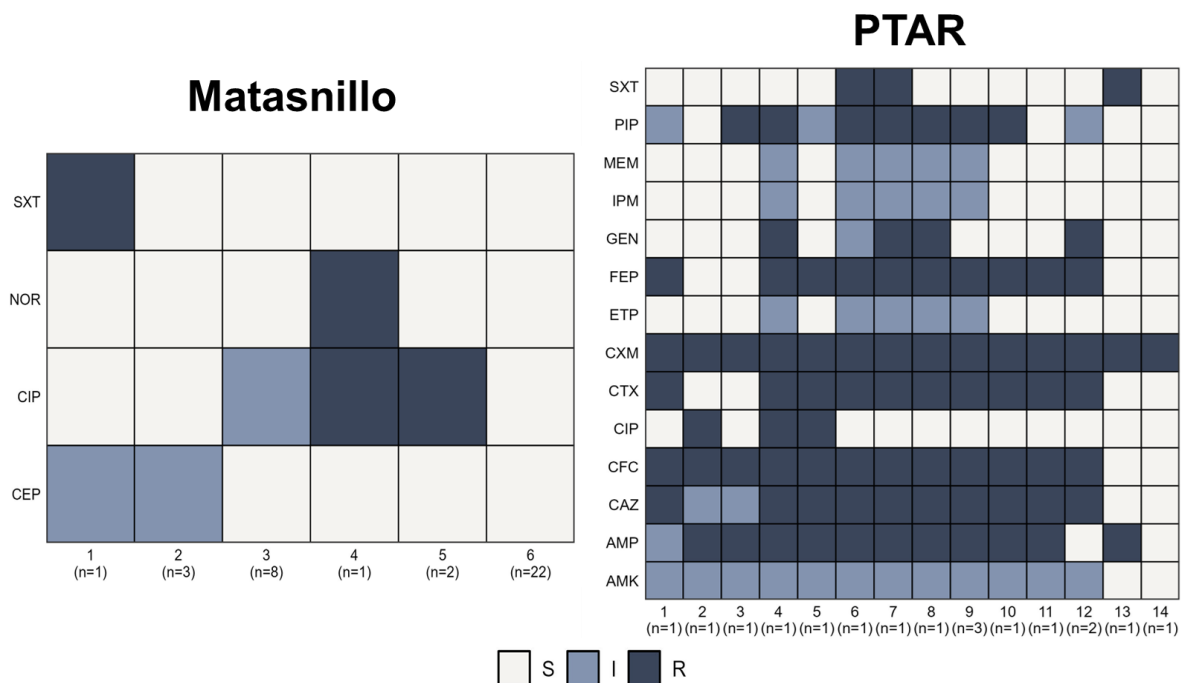


Figura 6. Distribución de las resistencias antimicrobianas en las cepas aisladas del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz. Antibióticos: ampicilina (AMP), cefalotina (CEP), cefazolina (CFC), cefepima (FEP), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefuroxima (CXM), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), piperacilina (PIP), amikacina (AMK), ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), norfloxacino (NOR), trimetoprima/sulfametoxazol (SXT).

Perfiles de resistencia antimicrobiana

Con los resultados obtenidos de los ensayos de resistencia, se procedió a identificar los perfiles presentes en los aislados, con la finalidad de determinar si existían cepas multirresistentes entre ellas, para ello, una bacteria debe poseer resistencia a 3 o más grupos antimicrobianos diferentes (World Health Organization, 2023). Con lo que se determinó que no hubo presencia de bacterias multirresistentes en las cepas aisladas del río Matasnillo, mientras

que, en las aisladas de la PTAR, 94% (16/17) de las cepas presentaron multirresistencias (Figura 6), donde se puede observar, cepas con hasta 7



resistencias antimicrobianas, como es el caso del perfil N° 7.

Figura 6. Perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz.

Identificación de Filogrupos

Siguiendo la clave dicotómica de Clermont (2000), se determinaron los filogrupos presentes en las muestras estudiadas mediante la presencia o ausencia de los genes *yjaA*, *chuA* y *TspE4C2* (Figura 7B y 7C). Esto dio como resultado que, para las cepas aisladas del río Matasnillo, el 100% (37/37) se ubicó en el filogrupo A de bacterias predominantemente comensales. Mientras que, para las cepas aisladas de la PTAR, 12% (2/17) pertenecieron al filogrupo D, 6% (1/17) al filogrupo B2 de bacterias predominantemente patogénicas y 72% (14/17) del grupo A (Figura 7A).

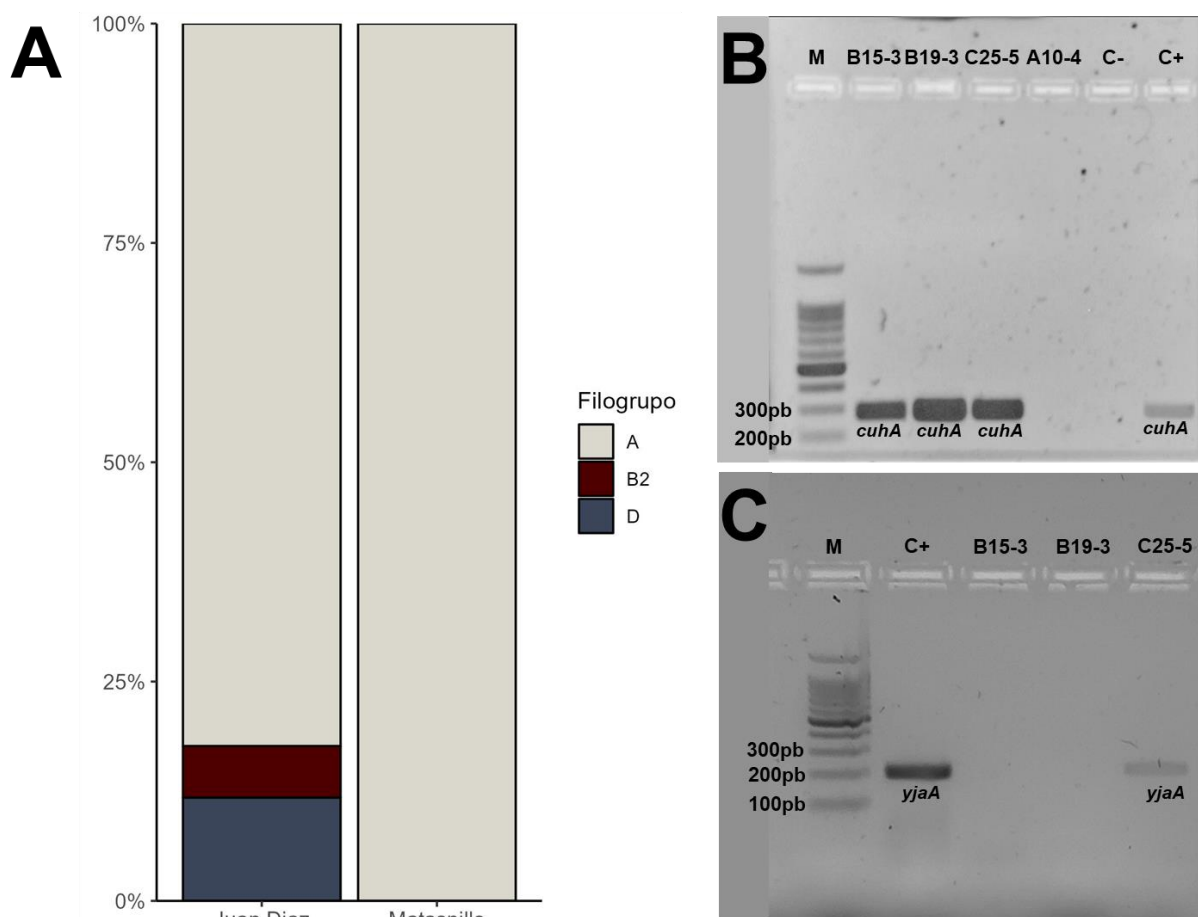


Figura 7. Resultados de la identificación de Filogrupos para las muestras del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz. **A)** Distribución de filogrupos de *E. coli*. **B)** Resultados positivos de la amplificación del gen *chuA*. **C)** Resultados positivos de la amplificación del gen *yjaA*.

Estandarización de mPCR para la detección de Patotipos

Para la detección e identificación de patotipos se estandarizó un protocolo de mPCR basado en el descrito por Chandra *et al.*, (2013), utilizando los genes *bfpB*, *eae*, *stx1*, *stx2*, *virF*, *ipaH*, *daaE* y *est1b*, como dianas de amplificación. Para ello, se mandaron a sintetizar los primers y se purificaron por HPLC, y luego, se realizó la PCR tiempo final de estos junto con los controles respectivos (ADN de EPEC, EHEC, EIEC, ETEC y DAEC donado por el instituto conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud-ICGES), utilizando el kit de PCR AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (4398886, Thermofisher Scientific), para determinar la temperatura óptima de amplificación (Figura 8).

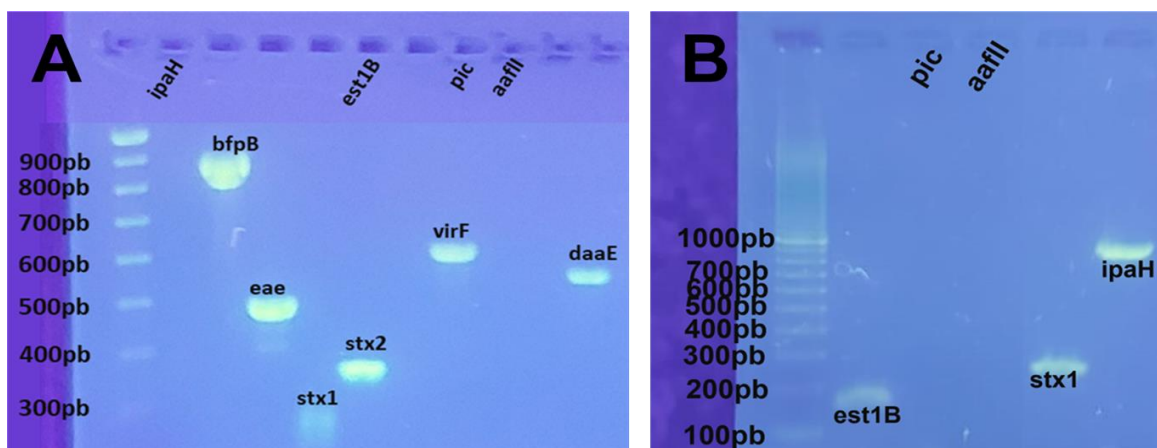


Figura 8. Ensayos para la estandarización de la temperatura de amplificación. **A)** Resultados de la PCR tiempo final de los primers con sus controles, condiciones: desnaturalización inicial de 95°C durante 5min, seguido de 35 ciclos de; 95°C por 30s, 63°C por 30s, 72°C por 30s y una extensión final a 72°C por 5min. **B)** PCR de los primers que no tuvieron amplificación o presentaron baja señal con 63°C como temperatura de amplificación, condiciones: desnaturalización inicial de 95°C durante 5min, seguido de 35 ciclos de; 95°C por 30s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s y una extensión final a 72°C por 5min.

Esto permitió desarrollar los dos protocolos de mPCR descritos en la metodología para la detección óptima de los patotipos EPEC, EHEC, EIEC, ETEC y DAEC. Quedó un patotipo por fuera en la determinación, porque no se consiguió el control positivo para la estandarización.

Identificación de Patotipos

Aplicando las dos mPCR estandarizados en este estudio, se logró determinar que para las cepas obtenidas del río Matasnillo el 100% (37/37) son presumiblemente comensales, ya que estas no amplificaron ninguno de los genes de virulencia estudiados (Figura 9). Por otra parte, para las cepas aisladas de la PTAR de Juan Díaz, se obtuvo que 12% (2/17) de las cepas amplificaron en gen *est1b*, lo cual corresponde a ETEC, el 18% (3/17) amplificó el gen *stx1* de EHEC y 70% (12/17) resultaron presuntas comensales (Figura 9).

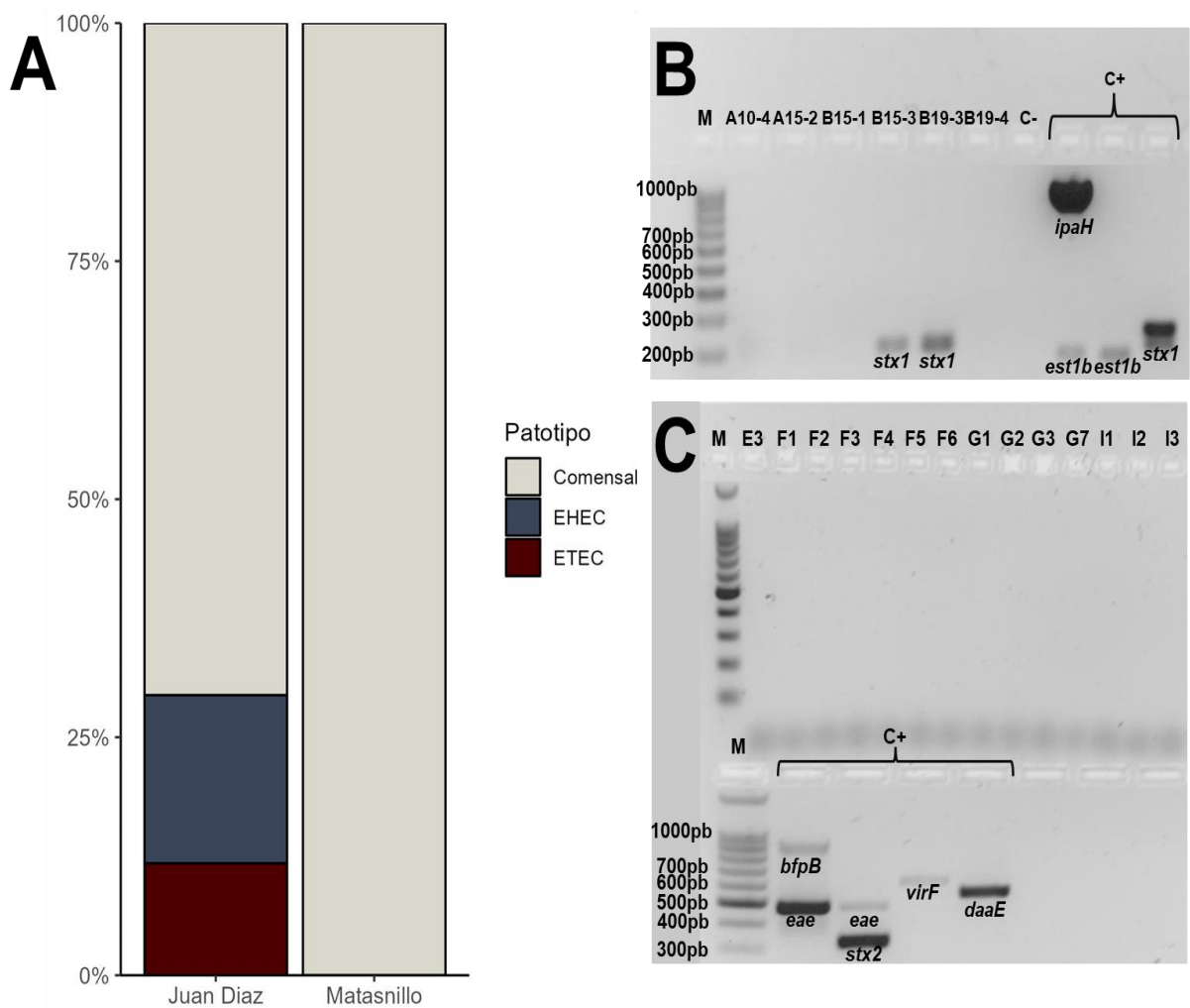


Figura 9. Resultados de la identificación de Patotipos de *E.coli* para las muestras del río Matasnillo y la PTAR de Juan Díaz **A)** Distribución de los Patotipos de *E. coli*. **B)** Resultados positivos de la mPCR para la identificación de los patotipos EIEC, ETEC y EHEC. **C)** Resultados de la mPCR para la identificación de los patotipos EPEC, EHEC, EIEC y DAEC.

DISCUSIÓN

La presente investigación se centró en caracterizar cepas de *E. coli* a partir de aislados provenientes de agua sin tratar, determinando su perfil de resistencias a antimicrobianos e identificando de forma molecular los grupos filogenéticos y patogénicos presentes en las muestras. Para ello, se siguieron métodos establecidos junto a la estandarización de nuevos protocolos que permitieron la obtención de los resultados observados los cuales discutimos a continuación:

Aislamiento e identificación de *E. coli*

Se ha observado en trabajos anteriores que, a pesar de seguir los protocolos tradicionales al pie de la letra, coliformes distintas a *E. coli* pueden resultar aisladas por equivocación (Hall *et al.*, 2020). Es por esto, que los resultados obtenidos del aislamiento e identificación de *E. coli* nos demuestran que las modificaciones realizadas al protocolo original establecido en el “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (Greenberg *et al.*, 1999), incrementaron de forma efectiva la especificidad para el aislamiento de estas bacterias, ya que todas las cepas aisladas al final de la fase confirmativa (37/37) resultaron *E. coli* en la verificación por el VITEK 2. El aumento de las temperaturas de incubación en la fase confirmativa de 35°C a 44,5°C permitió limitar el crecimiento de bacterias diferentes a coliformes termotolerantes e incrementar la proliferación de posibles *E. coli* presentes en la muestra (Csuros y Csuros, 1999). Además, la inclusión del medio selectivo y diferencial EC-MUG al final de la fase confirmativa, funcionó como un último paso discriminatorio para garantizar la pureza de los aislados gracias a sus componentes que permite la distinción precisa de *E. coli* de otros coliformes (Neogen, 2019).

Resistencias a antimicrobianos

Las resistencias a antibióticos en bacterias es uno de los problemas de mayor importancia a nivel mundial, siendo en particular las enterobacterias uno de los grupos de mayor preocupación (Matzov *et al.*, 2017; World Health Organization, 2017). En este trabajo, se logró identificar una gran presencia de resistencias antimicrobianas en *E. coli* proveniente de muestras de aguas residuales de la PTAR y aguas ambientales del río Matasnillo, destacando que existe una clara diferencia entre los perfiles y cantidades de resistencias obtenidos entre una matriz y la otra (Figura 6 y 7). Esto concuerda con estudios realizados a nivel mundial, donde las *E. coli* aisladas de aguas residuales tienen una tendencia más marcada a presentar resistencias a mayor cantidad de familias de antibióticos, que muestras aisladas de aguas ambientales, debido a la naturaleza de los contaminantes presentes en las diferentes matrices (Molina-Lopez *et al.*, 2011; Franz *et al.*, 2015; Canizalez-Roman *et al.*, 2019; Delgado-Blas *et al.*, 2021).

Ambas muestras tuvieron una disposición clara a la resistencia a cefalosporinas y quinolonas/fluoroquinolonas, siendo ambas familias de antibióticos, comúnmente utilizadas en tratamientos para infecciones bacterianas tanto veterinarias como humanas de acuerdo con la gravedad de la infección (Franz *et al.*, 2015). La presencia de estas resistencias en particular coincide con los reportes clínicos de *E. coli* en Panamá, donde se ha registrado como estas mismas resistencias predominan en los aislados, principalmente las fluoroquinolonas (Núñez-Samudio *et al.*, 2021).

La presencia de resistencias marcadas e intermedias halladas en el río Matasnillo sugieren también como la contaminación del río está afectando directamente a la población de bacterias que aquí se encuentra, generando una presión selectiva que permite la proliferación de estas bacterias, así como en el caso de Pérez *et al.*, (2018), donde se observó como la alta contaminación y la perturbación humana en el río Juan Díaz, influía directamente en la aparición de bacterias resistentes y cómo estas aumentaban a lo largo de su cauce.

Identificación de Filogrupos

La detección de filogrupos de *E. coli* es uno de los métodos más utilizados para la clasificación filogenética de estas bacterias y es una de las herramientas más utilizadas para predecir la posible patogenicidad de una cepa (Clermont *et al.*, 2000; Halaji *et al.*, 2022). La presencia predominante del filogrupo A en las muestras (Figura 8) revela un patrón marcado y significativo, que concuerda con lo esperado para este tipo de muestras. Estudios hechos en diversos cuerpos de aguas circulantes han concordado en que este es el grupo más común de *E. coli* que se puede encontrar en el ambiente (Acevedo, 2017; Franz *et al.*, 2015; Redha *et al.*, 2022). Sin embargo, a pesar de que este grupo sea considerado predominantemente comensal, esto no limita la capacidad que tienen las cepas de ser posiblemente patógenas (Denamur *et al.*, 2021). Se han registrado casos de enfermedades urinarias asociadas a bacterias del filogrupo A, además de haber identificado cepas portadoras de genes de virulencia (Franz *et al.*, 2015; Halaji *et al.*, 2022). Por otro lado, la presencia de los filogrupos B2 (2/17) y D (1/17), grupos donde se encuentran la mayoría de bacterias patogénicas (Clermont *et al.*, 2000), en las muestras de la PTAR, también se encuentran dentro de lo esperado, siendo estos los filogrupos patogénicos y de mayor representación que se suelen hallar más comúnmente en cuerpos contaminados por heces de individuos infectados (Franz *et al.*, 2015).

Identificación de Patotipos

En el marco de este estudio se analizó la presencia de los patotipos EHEC, EPEC, EIEC, ETEC y DAEC debido a su gran importancia para la salud, su previa relación con brotes epidémicos y su distribución en Latino América (Torres, 2017; Pakbin *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos para el río Matasnillo sugieren que las cepas estudiadas son comensales, debido a que estas no amplificaron ninguno de los genes de virulencia estudiados, sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que existan cepas EAEC entre las muestras, ya que ha sido establecido que cepas patogénicas de este tipo pueden encontrarse en el filogrupo A (Denamur *et al.*, 2021), y bacterias de este patotipo se han encontrado, en baja cantidad, en estudios anteriores (Sánchez, 2018). De igual manera, siguen siendo bacterias de alta importancia médica debido a las resistencias encontradas y la capacidad natural de *E. coli* de transmitir y conservar estas resistencias (Poirel *et al.*, 2018).

En el caso de la PTAR se obtuvo la presencia de Patotipos de *E. coli*, aunque en más baja proporción que las posibles comensales. Esto se encuentra dentro de lo esperado para aguas residuales, donde se ha demostrado se pueden hallar más comúnmente estas bacterias en comparación con cuerpos de agua ambiental (Franz *et al.*, 2015; Canizalez-Roman *et al.*, 2019). De los patotipos encontrados tenemos 2 cepas que resultaron positivas para ETEC que habían sido ubicadas dentro del filogrupo A, esto debido a que, como se ha establecido previamente, a pesar de ser un grupo de bacterias principalmente comensales, existen cepas patogénicas entre ellos (Croxen y Finlay, 2010; Denamur *et al.*, 2021). Las 3 cepas que amplificaron el gen *stx1* fueron catalogadas como EHEC al ser este uno de los genes más característicos de este grupo ya que es uno de los encargados de la síntesis de la toxina Shiga (Croxen y Finlay, 2010). Sin embargo, una de estas cepas fue clasificada dentro del filogrupo B2 de bacterias patogénicas, mientras las otras 2 fueron clasificadas en el filogrupo D predominado por EHEC. Esto sugiere que la EHEC de B2 podría tratarse de una cepa híbrida, o de una *E. coli* Patogénica extraintestinal, ya que en ambos casos se ha demostrado su capacidad de portar el gen *stx1* y pertenecer a este mismo grupo filogenético (Denamur *et al.*, 2021).

CAPÍTULO IV COCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Se logró de forma exitosa y precisa aislar 37 cepas de *E. coli* confirmadas por el sistema VITEK 2.
- Se estandarizaron 2 mPCR para la identificación de forma rápida de 5 patotipos diferentes de *E. coli*.
- Las 37 cepas provenientes del río Matasnillo pertenecen al filogrupo A (Comensales), lo cual concuerda con los trabajos publicados a nivel internacional y lo esperado para muestras ambientales.
- Para la PTAR, se obtuvieron 12 cepas comensales pertenecientes al filogrupo A, 2 cepas ETEC de filogrupo A, 2 cepas EHEC de filogrupo D, y 1 cepa EHEC de filogrupo B2.
- El 41% de las cepas aisladas del Matasnillo presentaron algún tipo de resistencia a antibióticos, lo que sugiere que la alta contaminación genera una presión selectiva que permite la persistencia de estos genes.
- El 100% de las cepas provenientes de la PTAR fueron resistentes a betalactámicos de distintas familias, principalmente Cefalosporinas, y el 94% de las cepas fueron multirresistentes.
- Actualmente, se siguen estudiando las cepas para determinar los genes responsables de las resistencias antimicrobianas.

RECOMENDACIONES

- Aumentar el número de puntos de muestreo a lo largo del río Matasnillo para observar la distribución de las cepas y sus características.
- Muestrear el influente y el efluente de la PTAR para determinar la eficiencia de la eliminación de bacterias potencialmente peligrosas.
- Aumentar la cantidad de aislados por punto de muestreo.
- Estudiar la concentración de antibióticos presentes en las muestras de agua.
- Aislar todas las muestras con el mismo método para establecer comparaciones directas entre ellas.
- Ampliar los genes de virulencia utilizados en la PCR múltiple para mayor precisión de identificación.
- Estandarizar un método de identificación que incluya las nuevas divisiones de los filogrupos de *E. coli*

BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, M. (2017). Determinación de los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* aisladas en muestras ambientales y humanas de Panamá [Tesis de Maestría]. Universidad de Panamá.
2. Aijuka, M., Santiago, A. E., Girón, J. A., Nataro, J. P., & Buys, E. M. (2018). Enteraggregative *Escherichia coli* is the predominant diarrheagenic *E. coli* pathotype among irrigation water and food sources in South Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 278, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.018>
3. Alonso, M. Z., Sanz, M. E., Padola, N. L., & Lucchesi, P. M. A. (2014). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteropatogénico (EPEC) aisladas durante el proceso de faena de pollos Characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains isolated during the chicken slaughtering process. *Rev Argent Microbiol*, 46(2). www.elsevier.es/ram
4. Angulo-Zamudio, U. A., Gutiérrez-Jiménez, J., Monroy-Higuera, L., Flores-Villaseñor, h., Leon-Sicairos, N., Velazquez-Roman, J., Vidal, J. E., Tapia-Pastrana, G., & Canizalez-Roman, A. (2021). Non-diarrheagenic and diarrheagenic *E. coli* carrying supplementary virulence genes (SVG) are associated with diarrhea in children from Mexico. *Microbial Pathogenesis*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104994>
5. Asea, A., Kaur, P., & Chakraborti, A. (2010). Enteraggregative *Escherichia coli*: An emerging enteric food borne pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/254159>
6. Bader, M. S., Loeb, M., Leto, D., & Brooks, A. A. (2020). Treatment of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance and new antimicrobial agents. *Postgraduate Medicine*, 132(3), 234–250. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1680052>
7. Bolívar, A., Rojas, A., & Garcia-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol). *Avances En Biomedicina*, 3(1), 25–33.

8. Canet, J. J. (2016). Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I). BETELGEUX.
<https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
9. Canizalez-Roman, A., Velazquez-Roman, J., Valdez-Flores, M. A., Flores-Villaseñor, h., Vidal, J. E., Muro-Amador, S., Guadrón-Llanos, A. M., Gonzalez-Núñez, E., Medina-Serrano, J., Tapia-Pastrana, G., & León-Sicairos, N. (2019). Detection of antimicrobial-resistance diarrheagenic Escherichia coli strains in surface water used to irrigate food products in the northwest of Mexico. International Journal of Food Microbiology, 304, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.017>
10. Cardona-López, M. A., Padilla-Frausto, J. J., Madriz-Elisondo, A. L., Hinojosa-Dávalos, J., Navarro-Villarruel, C. L., Varela-Hernández, J. J., & Ibarra Velázquez, L. M. (2020). Identificación de patotipos de Escherichia coli en carne molida de expendios de Guadalajara, Jalisco, México. Revista Bio Ciencias, 7, 12. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e924>
11. Center for Disease Control and Prevention. (2015). Etymologia: Escherichia coli. Emerging Infectious Diseases Journal, 21(8).
<http://dx.doi.org/10.3201/eid2108.ET2108>
12. Center for Disease Control and Prevention. (n.d.). CDC | Bioterrorism Agents/Diseases (by category) | Emergency Preparedness & Response. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Retrieved July 20, 2022, from <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
13. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2022, May 9). La E. coli y la seguridad de los alimentos | CDC.
<https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/ecoli-and-food-safety.html>
14. Chacón-Jiménez, L. M., Hall, K., Rivera, P. C., Reyes, L., Achí, R., & Barrantes, K. (2022). Circulación de genes de virulencia asociados a Escherichia coli diarreogénica en aguas residuales del Gran Área Metropolitana de Costa Rica. Población y Salud En Mesoamérica, 19(2).
<https://doi.org/https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.48037>

15. Chandra, M., Cheng, P., Rondeau, G., Porwollik, S., & McClelland, M. (2013). A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(4), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.013>
16. Clermont, O., Bonacorsi, P., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 66, Issue 10).
17. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
18. Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 26–38). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
19. Csuros, M., & Csuros, C. (1999). *Microbiological Examination of Water and Wastewater* (1st Edition). CRC Press.
20. Cultimed. (2003). *Manual Básico de Microbiología* (4ta ed.). Panreac Química S.A.
21. Daza Pérez, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica Del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57–67.
22. Delgado-Blas, J. F., Ovejero, C. M., David, S., Montero, N., Calero-Caceres, W., Garcillan-Barcia, M. P., de la Cruz, F., Muniesa, M., Aanensen, D. M., & Gonzalez-Zorn, B. (2021). Population genomics and antimicrobial resistance dynamics of *Escherichia coli* in wastewater and river environments. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01949-x>
23. Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 37–54). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>

24. Denchak, M. (2022, April 18). Water Pollution: Everything You Need to Know. Nrdc. <https://www.nrdc.org/stories/water-pollution-everything-you-need-know>
25. El Romeral Masía. Escherichia coli - Principales virotipos enteropatógenicos (ETEC, EPEC, EaggEC-EAEC, EIEC, EHEC y DAEC; Escherichia coli K1: diagnóstico molecular (PCR). - IVAMI. Instituto Valenciano de Microbiología. Retrieved May 1, 2023, from <https://www.ivami.com/es/microbiologia-clinica/341-escherichia-coli-principales-virotipos-enteropatogenicos-etec-epec-eaggec-eiec-y-ehc-i-escherichia-coli-i-k1-diagnostico-molecular-pcr>
26. Espinosa Asuar, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. In L. Eguarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), Ecología molecular (Vol. 1, pp. 517–539). Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes>
27. Franz, E., Veenman, C., van Hoek, A.h. A. M., Husman, A. D. R., & Blaak, h. (2015). Pathogenic Escherichia coli producing Extended-Spectrum β -Lactamases isolated from surface water and wastewater. Scientific Reports, 5. <https://doi.org/10.1038/srep14372>
28. Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic Escherichia coli. In Brazilian Journal of Microbiology (Vol. 47, pp. 3–30). Elsevier Editora Ltda. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
29. 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.
30. Halaji, M., Fayyazi, A., Rajabnia, M., Zare, D., Pournajaf, A., & Ranjbar, R. (2022). Phylogenetic Group Distribution of Uropathogenic Escherichia coli and Related Antimicrobial Resistance Pattern: A Meta-Analysis and Systematic Review. In Frontiers in Cellular and Infection Microbiology (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.790184>
31. Hall, G., Ramírez, A., Martínez, A., Querol-Audi, J., & Mejía, F. (2020). AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS ESPECÍFICOS

PARA CEPAS DE *Escherichia coli* y *Salmonella* sp A PARTIR DE AGUAS RESIDUALES. [Licenciatura]. Universidad de Panamá.

32. Jensen, B.h., Olsen, K. E. P., Struve, C., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2014). Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 614–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-13>
33. Kanayama, A., Yahata, Y., Arima, Y., Takahashi, T., Saitoh, T., Kanou, K., Kawabata, K., Sunagawa, T., Matsui, T., & Oishi, K. (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreaks related to childcare facilities in Japan, 2010-2013. *BMC Infectious Diseases*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1259-3>
34. Kramer, M. H., Schwebke, I., & Kampf, G. (2011). The 2011 *E. coli* O104:H4 outbreak in Germany: lessons learned. *Journal of Infection*, 63(5), 321-328.
35. Leclerc, h., Schwartzbrod, L., & Dei-Cas, E. (2002). Microbial Agents Associated with Waterborne Diseases. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 28, Issue 4).
36. Lee, J.h., Subhadra, B., Son, Y. J., Kim, D.h., Park, h. S., Kim, J. M., Koo, S.h., Oh, M.h., Kim, h. J., & Choi, C.h. (2016). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Letters in Applied Microbiology*, 62(1), 84–90. <https://doi.org/10.1111/lam.12517>
37. Lim, M.-A., Kim, J.-Y., Acharya, D., Bajgain, B. B., Park, J.-H., Yoo, S.-J., & Lee, K. (2020). A Diarrhoeagenic Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Infection Outbreak That Occurred among Elementary School Children in Gyeongsangbuk-Do Province of South Korea Was Associated with Consumption of Water-Contaminated Food Items. *International Journal of Environmental Research and Public Health Article Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17, 3149. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093149>
38. Lucio Alonso, M. de. (2017). ENVIRONMENTAL RESTORATION AND CHANNELING OF JUAN DÍAZ RIVER IN PANAMA CITY. UNIVERSIDADE DA CORUÑA.

39. Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, M., & Stahl, D. (2021). BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS (16th ed.). Pearson Education Limited.
40. Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002a). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51.
41. Matzov, D., Bashan, A., & Yonath, A. (2017). A bright future for antibiotics? *Annual Review of Biochemistry*, 86, 567–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044617>
42. Mazzariol, A., Bazaj, A., & Cornaglia, G. (2017). Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy*, 29, 2–9. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1380395>
43. Mellmann, A., Bielaszewska, M., & Karch, H. (2011). E. coli O104:H4 outbreak in Germany—new insights into an emerging pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(9), 671-678.
44. Meza-Segura, M., Zaidi, M. B., Vera-Ponce de León, A., Moran-Garcia, N., Martinez-Romero, E., Nataro, J. P., & Estrada-Garcia, T. (2020). New Insights Into DAEC and EAEC Pathogenesis and Phylogeny. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572951>
45. Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R. M., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocal, M. E., Hernández-Castro, R., & Ángel Manjarrez-Hernández, h. (2011). Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City.
46. Mosquito, S., Ruiz, J., Luis Bauer, J., & Ochoa, T. J. (2011, November 9). MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648–656.
47. Mueller M, Tainter CR. *Escherichia coli* Infection. [Updated 2023 Feb 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
48. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli* (Vol. 11, Issue 1). <https://journals.asm.org/journal/cmrr>

49. Neogen. (2019a). EC Medium with MUG (NCM0107).
50. Neogen. (2019b). Technical Specification Sheet LB Agar (Miller) (NCM0142).
51. Neogen. (2021). Technical Specification Sheet Nutrient Broth (NCM0110).
52. Neogen. (2023). Tryptic Soy Agar (Soybean-Casein Digest Agar).
53. Núñez-Samudio, V., Pecchio, M., Pimentel-Peralta, G., Quintero, Y., Herrera, M., & Landires, I. (2021). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates from central panama. *Antibiotics*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080899>
54. O’Ryan, M., Prado, V., & Pickering, L. K. (2005). A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 16(2), 125–136. <https://doi.org/10.1053/j.spid.2005.12.008>
55. Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
56. Paitan, Y. (2018). Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 416, pp. 181–211). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_110
57. Park, J., Kim, J. S., Kim, S., Shin, E., Oh, K.h., Kim, Y., Kim, C.h., Hwang, M. A., Jin, C. M., Na, K., Lee, J., Cho, E., Kang, B.h., Kwak,h. S., Seong, W. K., & Kim, J. (2018). A waterborne outbreak of multiple diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections associated with drinking water at a school camp. *International Journal of Infectious Diseases*, 66, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.09.021>
58. Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M. L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., Morabito, S., & Prosseda, G. (2017). The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue DEC). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02390>
59. Pérez, L. E., Guardia, Á., Vargas, J. M., Mejía, F., Cornejo,h., & Gracia, J. (2016). IMPACTO DE LAS AGUAS RESIDUALES EN MICROORGANISMOS

INDICADORES EN AGUAS DEL RÍO JUAN DÍAZ: RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS. *Scientia*, 26, 61–75.

60. Pincus, D.h. (n.d.). MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM. www.pda.org/bookstore
61. Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
62. Ramos, S., Silva, V., de Lurdes Enes Dapkevicius, M., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production. *Animals*, 10(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani10122239>
63. Redha, M. A., al Sweih, N., & Albert, M. J. (2022). Virulence and phylogenetic groups of *Escherichia coli* cultured from raw sewage in Kuwait. *Gut Pathogens*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13099-022-00490-4>
64. Riley, L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020>
65. Robins-Browne, R. M., Holt, K. E., Ingle, D. J., Hocking, D. M., Yang, J., & Tauschek, M. (2016). Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 6, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141>
66. Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., & Macho Martínez M. (2017). Investigación de *Escherichia Coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanid. Mil*, 73(3), 147–152. <https://doi.org/10.4321/S1887-85712017000300002>
67. Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E.h., Contreras, C., Rivera, F. P., Mosquito, S., Lluque, Á., & Ochoa, T. J. (2011). PATRONES DE ADHERENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* DIFUSAMENTE ADHERENTE

- (DAEC) PROVENIENTES DE NIÑOS CON Y SIN DIARREA. In Rev Peru Med Exp Salud Publica (Vol. 28, Issue 1).
68. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Pública de México, 44(5), 464–475. <http://www.insp.mx/salud/index.html>
 69. Rojas-Renjifo, K., Urrego, L. M., Dietista, N. (2021). Enfermedades transmitidas por alimentos: Diarrea. ReCiTeIA, 19(2), 26–39. <http://revistareciteia.es.tl/>
 70. Sánchez, J. (2018). Detección molecular de los serogrupos de Escherichia coli aisladas de muestras ambientales y humanas de Panamá [Maestría]. Universidad de Panamá.
 71. Schidlder, S. (2019). Outfall development to provide a good recreational water environment near a polluted river [Master]. Delft University of Technology.
 72. Sourav. (2023, July 10). E. coli enteroinvasiva (EIEC): transmisión, enfermedad, patogenia, tratamiento. Microbiology Note. <https://microbiologynote.com/es/E-coli-enteroinvasiva-eiec/>
 73. Stavric, S., & Speirs, J. I. (1989). Escherichia coli Associated with Hemorrhagic Colitis. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 22(3), 205–208. [https://doi.org/10.1016/s0315-5463\(89\)70375-8](https://doi.org/10.1016/s0315-5463(89)70375-8)
 74. Suárez, S., & Canales, I. (2019). Trabajo Fin de Grado en Nutrición Humana y Dietética. Identificación y caracterización de E. coli aisladas de conejos con sintomatología diarreica. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/42209/TFG-M-N2031.pdf?sequence=1>
 75. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013, August). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación En Discapacidad, 2, 70–78. www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx
 76. Tarjetas de identificación VITEK®2 | bioMérieux España. (n.d.). Retrieved August 14, 2023, from <https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/tarjetas-de-identificacion-vitekr2>

77. Torres, A. G. (2017). Escherichia coli diseases in Latin America-a “One Health” multidisciplinary approach. *Pathogens and Disease*, 75(2).
<https://doi.org/10.1093/femspd/ftx012>
78. Troeger, C., Blacker, B. F., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Zimsen, S. R., Albertson, S. B., Stanaway, J. D., Deshpande, A., Abebe, Z., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Asgedom, S. W., Anteneh, Z. A., Antonio, C. A. T., Aremu, O., Asfaw, E. T., Atey, T. M., Atique, S., ... Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1211–1228.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)
79. Valencia, A. P. (2009). Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO.
80. Vester, B., & Long, K. (2009). Antibiotic Resistance in Bacteria Caused by Modified Nucleosides in 23S Ribosomal RNA. *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*.
81. VITEK® 2 | bioMérieux España. (n.d.). Retrieved August 14, 2023, from https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/vitekr-2#Simplemente%20automatizaci%C3%B3n_0_0
82. Wolf, J., Prüss-Ustün, A., Cumming, O., Bartram, J., Bonjour, S., Cairncross, S., Clasen, T., Colford, J. M., Curtis, V., de France, J., Fewtrell, L., Freeman, M. C., Gordon, B., Hunter, P. R., Jeandron, A., Johnston, R. B., Mäusezahl, D., Mathers, C., Neira, M., & Higgins, J. P. T. (2014). Systematic review: Assessing the impact of drinking water and sanitation on diarrhoeal disease in low- and middle-income settings: Systematic review and meta-regression. *Tropical Medicine and International Health*, 19(8), 928–942.
<https://doi.org/10.1111/tmi.12331>
83. World Health Organization. (2023, 16 de noviembre). Resistencia a los antibióticos: preguntas y respuestas. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

84. World Health Organization. (2017a, February 17). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. News Release. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
85. World Health Organization. (2017b, May 2). Diarrhoeal disease. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
86. Xiao, M., Zhu, X., Fan, F., Xu, h., Tang, J., Qin, Y., Ma, Y., & Zhang, X. (2017). Osmotolerance in *Escherichia coli* is improved by activation of copper efflux genes or supplementation with sulfur-containing amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7). <https://doi.org/10.1128/AEM.03050-16>
87. Zhao, S., Maurer, J. J., & Dillon, M. E. (2011). *Escherichia coli* O104:H4—an emerging pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 52(12), 1332-1339.

ANEXOS

Anexo 1. Colección de muestras

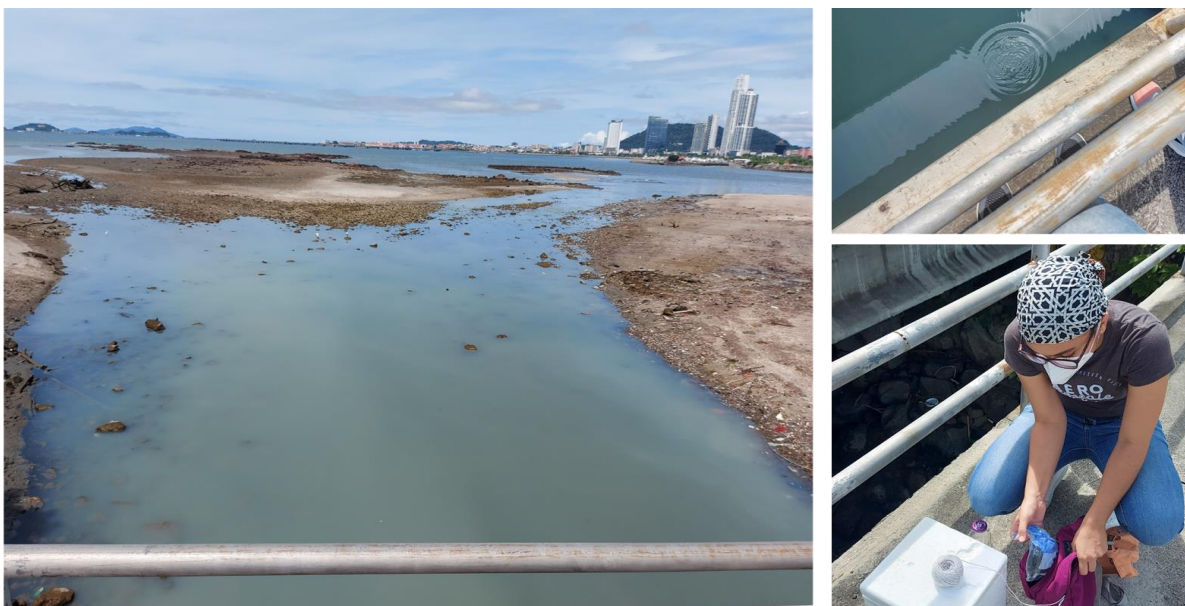


Figura 10. Toma de muestras en el río Matasnillo.

Anexo 2. Trabajo en laboratorio



Figura 11. Aislamiento de coliformes totales de las muestras de agua.



Figura 12. Aislamiento de *E. coli* en medio EMB y conteo de colonias.

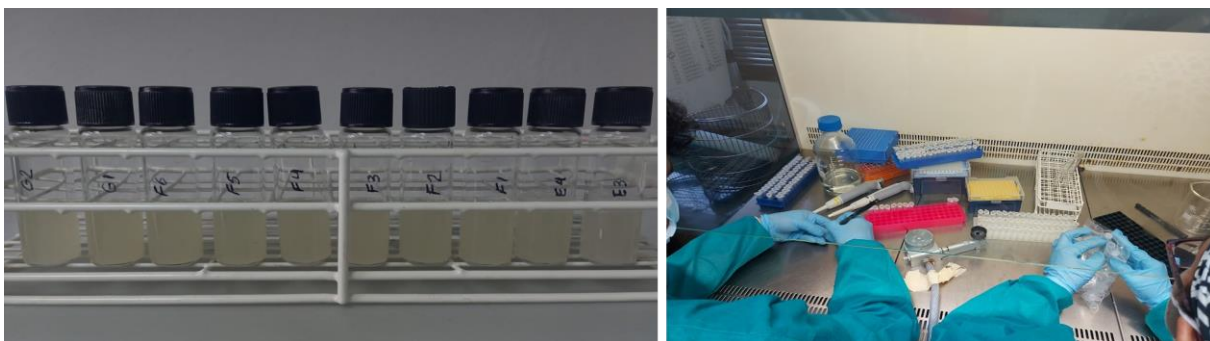


Figura 13. Preparación de glicerizados.

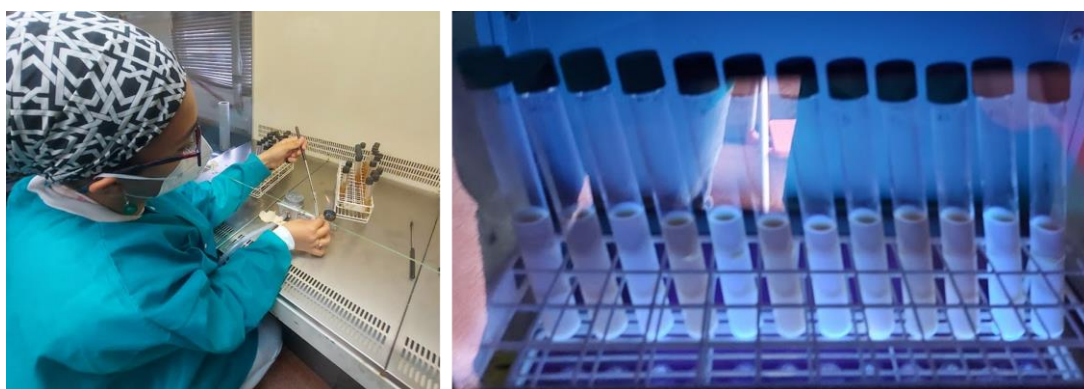


Figura 14. Confirmación de *E. coli* en medio EC-MUG.

Anexo 3. Metodología VITEK 2



Figura 15. Flujo de trabajo para análisis en el VITEK 2.

Anexo 4. Geles de electroforesis y resultados de PCR

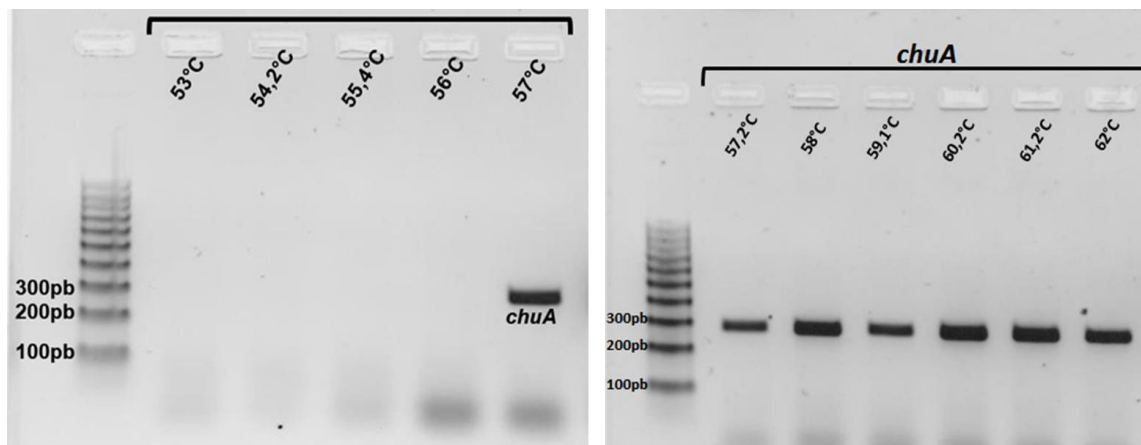


Figura 16. Resultados de PCR con gradiente de temperatura de anidamiento para el gen *chuA*.

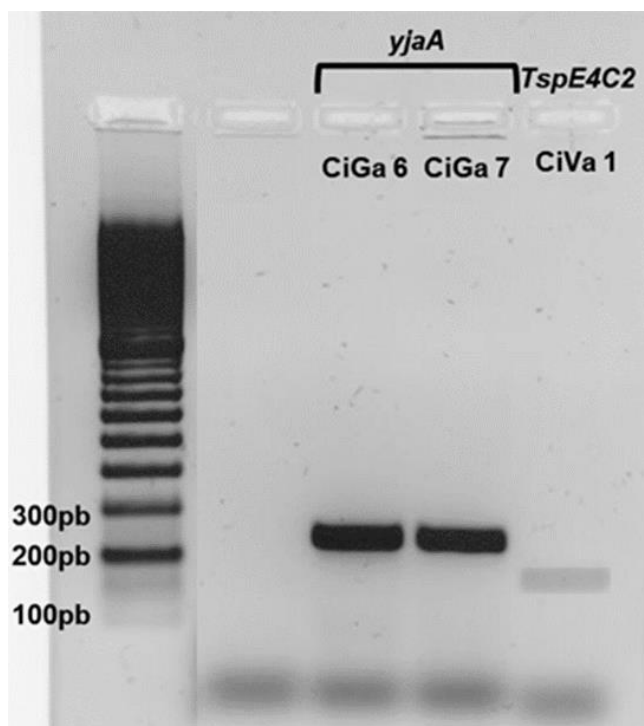


Figura 17. Estandarización de los controles para los genes *yjaA* y *TspE4C2*.

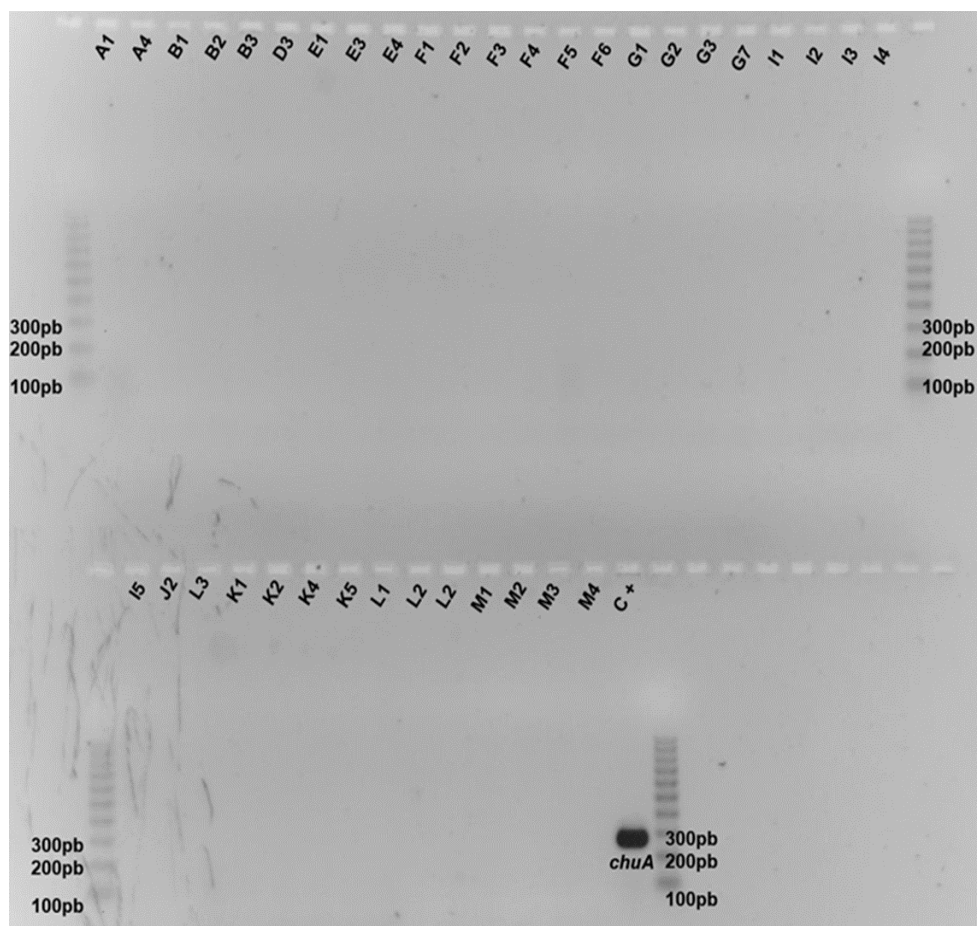


Figura 18. Resultados de PCR del gen *chuA* de las cepas del Matasnillo.

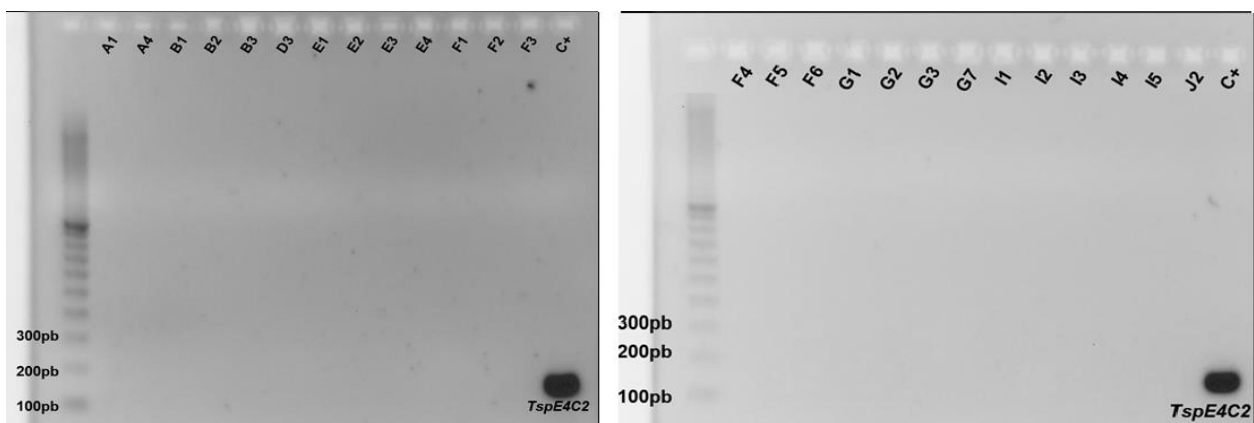


Figura 19. Resultados de PCR del gen *TspE4C2* de las cepas del Matasnillo

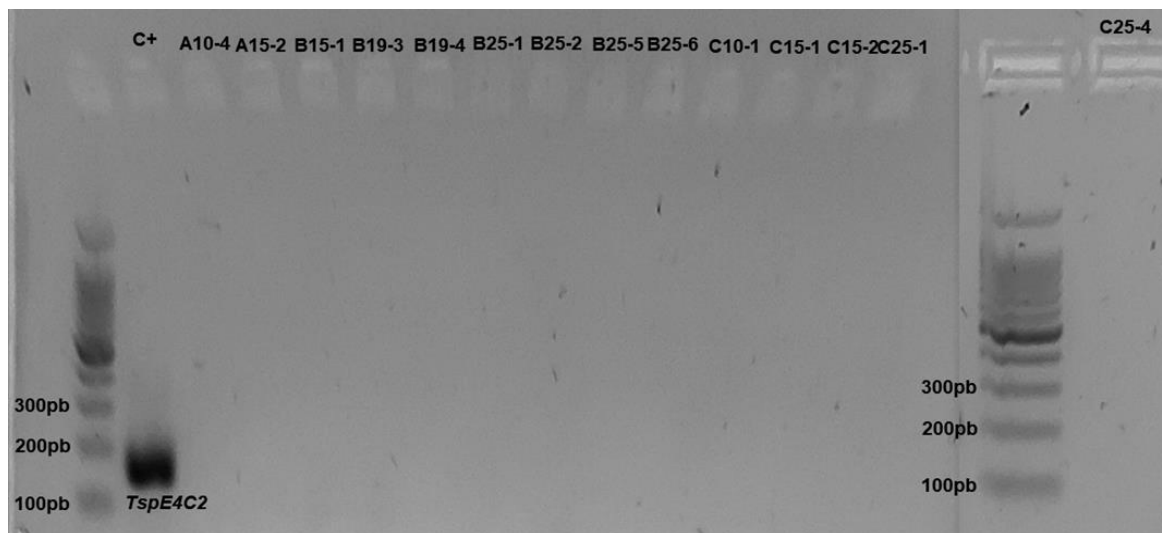


Figura 20. Resultados de PCR del gen *TspE4C2* de las cepas de la PTAR.

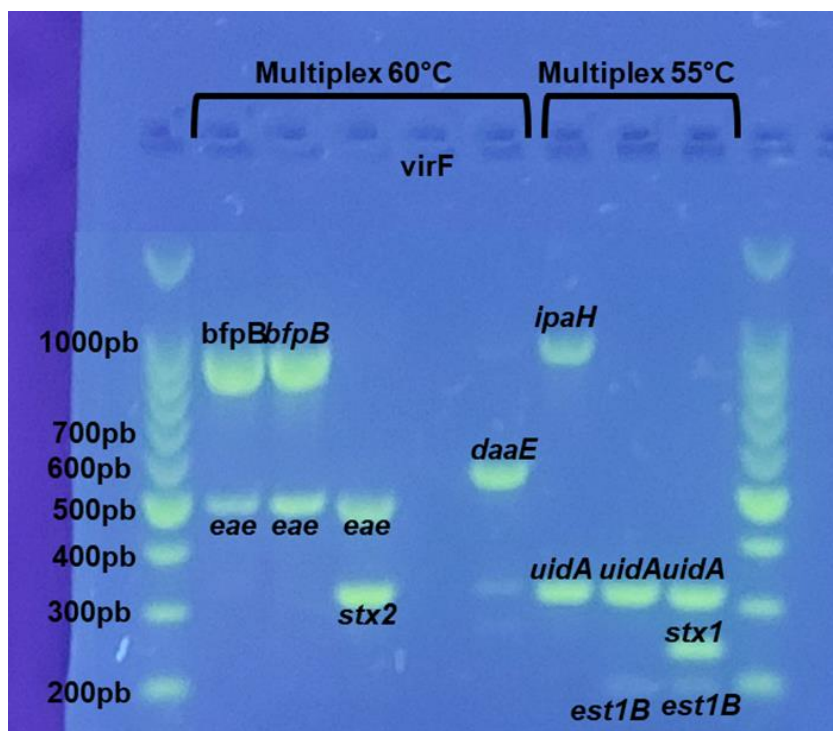


Figura 21. Estandarización de mPCRs para la detección de patotipos.

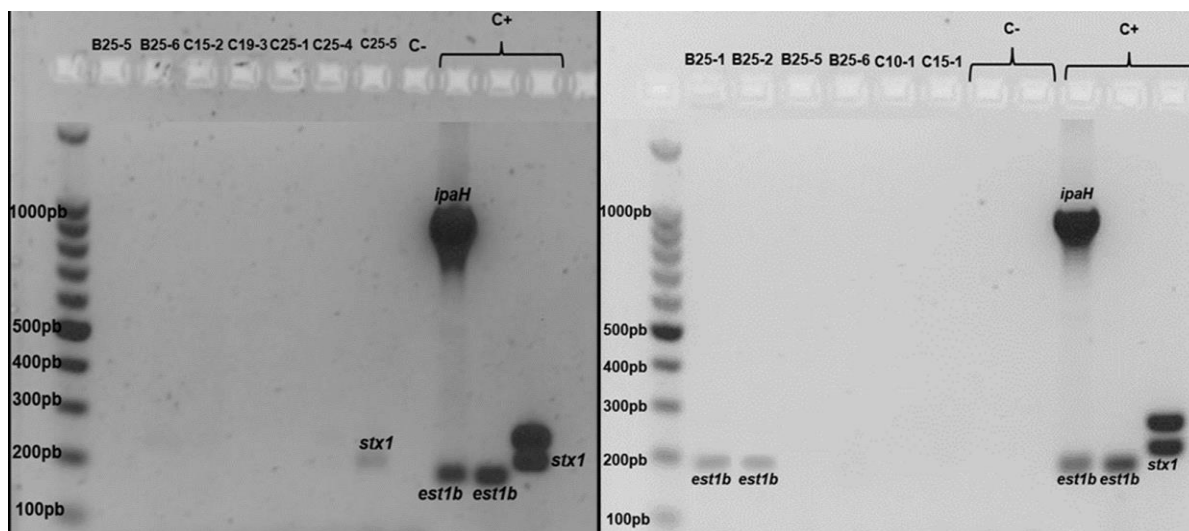


Figura 22. Resultados positivos de mPCR para identificación de patotipos en muestras de la PTAR.

Anexo 5. Tabla de resultado

Cuadro 6. Cepas, filogrupos y patotipos identificados.

Patotipos y Filogrupos identificados								
Cepa	Filogrupo	Patotipo	Cepa	Filogrupo	Patotipo	Cepa	Filogrupo	Patotipo
EC-A1	A	Comensal	EC-G3	A	Comensal	EC-M4	A	Comensal
EC-A4	A	Comensal	EC-G7	A	Comensal	EcAR A10-4	A	Comensal
EC-B1	A	Comensal	EC-I1	A	Comensal	EcAR A15-2	A	Comensal
EC-B2	A	Comensal	EC-I2	A	Comensal	EcAR B15-1	A	Comensal
EC-B3	A	Comensal	EC-I3	A	Comensal	EcAR B15-3	D	EHEC
EC-D3	A	Comensal	EC-I4	A	Comensal	EcAR B19-3	D	EHEC
EC-E1	A	Comensal	EC-I5	A	Comensal	EcAR B19-4	A	Comensal
EC-E2	A	Comensal	EC-J2	A	Comensal	EcAR B25-1	A	ETEC
EC-E3	A	Comensal	EC-K1	A	Comensal	EcAR B25-2	A	ETEC
EC-E4	A	Comensal	EC-K2	A	Comensal	EcAR B25-5	A	Comensal
EC-F1	A	Comensal	EC-K4	A	Comensal	EcAR B25-6	A	Comensal
EC-F2	A	Comensal	EC-K5	A	Comensal	EcAR C10-1	A	Comensal
EC-F3	A	Comensal	EC-L1	A	Comensal	EcAR C15-1	A	Comensal
EC-F4	A	Comensal	EC-L2	A	Comensal	EcAR C15-2	A	Comensal
EC-F5	A	Comensal	EC-L3	A	Comensal	EcAR C19-3	A	Comensal
EC-F6	A	Comensal	EC-M1	A	Comensal	EcAR C25-1	A	Comensal
EC-G1	A	Comensal	EC-M2	A	Comensal	EcAR C25-4	A	Comensal
EC-G2	A	Comensal	EC-M3	A	Comensal	EcAR C25-5	B2	EHEC