



Universidad de Costa Rica

Facultad de Microbiología

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y  
Química Clínica

“Detección de *Escherichia coli* resistente a tetraciclina y cefotaxima en muestras de agua  
superficial de la microcuenca del río Durazno, Vázquez de Coronado, San José”

Estudiante: Adriana Brenes Peraza

Carné: B81284

Tutora: Kenia Barrantes Jiménez

Revisores:

Luis César Rivera Montero

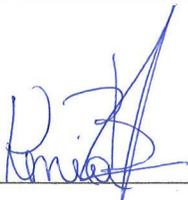
Luz María Chacón Jiménez

San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica

Sede Rodrigo Facio

Julio 2023

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:



---

Dra. Kenia Barrantes Jiménez

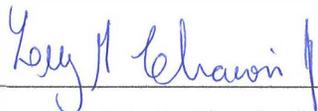
Tutora



---

Dr. Luis César Rivera Montero

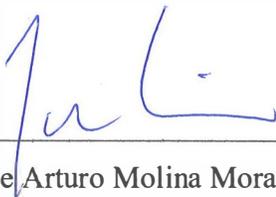
Lector



---

Dra. Luz María Chacón Jiménez

Lectora



---

Dr. Jose Arturo Molina Mora

Presidente del Tribunal



---

Dra. Katherine Hidalgo Rodríguez

Profesora designada

## **Reconocimientos**

En primer lugar, le agradezco a Dios por haberme permitido recorrer este largo camino y hoy encontrarme tan cerca de la meta. Gracias por acompañarme en todo momento y por tantas enseñanzas para la vida.

Seguido, le agradezco infinitamente a mi familia. A mis padres Edgar Brenes y Kattia Peraza y a mis hermanos Daniela Brenes y José Pablo Brenes, por estar siempre ahí para mí. Gracias por celebrar conmigo los momentos alegres y por ayudarme a atravesar aquellos difíciles. Gracias por demostrarme que con esfuerzo y dedicación puedo cumplir los objetivos que me proponga.

A mis amigos, especialmente a Verónica Sánchez quién ha sido un apoyo fundamental durante todos estos años de carrera, gracias por hacer de mis días en la universidad momentos inolvidables. Gracias por todas las buenas experiencias que vivimos juntos y por el apoyo en los momentos que parecían imposibles.

Finalmente, un especial agradecimiento al INISA, en particular a la doctora Kenia Barrantes y al doctor Luis Rivera por su acompañamiento, orientación, paciencia y consejos a lo largo de este proceso. Así mismo, gracias a los técnicos de laboratorio, Melissa Mora y José Pablo Barrantes por toda su ayuda en el desarrollo del trabajo de laboratorio de los diversos proyectos.

## Índice general

Justificación .....	9
Hipótesis .....	10
Objetivo general .....	11
Objetivos específicos .....	11
Resumen .....	11
Antecedentes.....	13
<i>Escherichia coli</i> dentro del grupo de coliformes fecales .....	13
<i>Escherichia coli</i> como bacteria indicadora .....	14
Tetraciclinas y betalactámicos .....	16
La resistencia a los antibióticos .....	18
Los cuerpos de agua como reservorios de BRA .....	25
Zona de estudio: Microcuenca del río Durazno .....	29
Metodología.....	31
1) Identificación de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> resistente a antibióticos en muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno: .....	33
a) Muestreo: .....	33
b) Recuperación de <i>Escherichia coli</i> :.....	33
c) Detección de <i>E. coli</i> potencialmente resistente en Caldo Müller Hinton (CMH) suplementado con antibióticos: .....	34
d) Confirmación de <i>E. coli</i> : .....	34
2) Perfil fenotípico de resistencia a tetraciclina y cefotaxima: .....	36
3) Perfil genotípico de resistencia a tetraciclina y cefotaxima: .....	36
a) Amplificación de los genes de resistencia: .....	36
b) Identificación de los genes de resistencia: .....	39
4) Análisis estadístico de resultados .....	39

Resultados.....	39
Discusión .....	50
Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	60
Anexos .....	73

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Categorías antimicrobianas y sus respectivos agentes definidos para <i>Enterobacteriaceae</i> .....	20
<b>Tabla 2.</b> Concentración requerida de cada primer, condiciones de ciclado y tamaño del amplicón para los diferentes genes por analizar.....	37
<b>Tabla 3.</b> NMP/ 100 mL de coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> identificados en las muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno.....	40
<b>Tabla 4.</b> Crecimiento de las muestras en Caldo Müller Hinton (CMH) suplementado con tetraciclina (4 µg/mL) y CMH suplementado con cefotaxima (0,25 µg/mL). .....	42
<b>Tabla 5.</b> Resultados del perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antibióticos de los aislamientos de <i>E. coli</i> .....	43

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de las cefalosporinas mostrando el anillo betalactámico y el enlace amida característico de los antibióticos betalactámicos .....	22
<b>Figura 2.</b> Diagrama de un integrón de clase 1 y de la integración de un cassette génico ..	23
<b>Figura 3.</b> Diagrama resumen de la metodología.....	32
<b>Figura 4.</b> Resultados de coliformes fecales (A) y <i>E. coli</i> (B) para los diferentes puntos de la microcuenca según la época de muestreo y su clasificación de acuerdo con las clases establecidas en el Decreto N° 33903-MINAE-S, Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales (2007).....	41
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de aislamientos de <i>E. coli</i> resistentes para cada uno de los antibióticos analizados. ....	45
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de aislamientos de <i>E. coli</i> resistentes para cada uno de los antibióticos según el punto de muestreo. ....	46
<b>Figura 7.</b> Cantidad de aislamientos de <i>E. coli</i> que presentan un fenotipo de resistencia ante diverso número de categorías de antibióticos.....	47
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de aislamientos de <i>E. coli</i> positivos para cada uno de los genes analizados. ....	48
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de aislamientos de <i>E. coli</i> positivos para cada uno de los genes según el punto de muestreo.....	49
<b>Figura 10.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>tet(A)</i> , en geles de agarosa al 2%.....	73
<b>Figura 11.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>tet(B)</i> , en geles de agarosa al 2%.....	73
<b>Figura 12.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>tet(C)</i> , en geles de agarosa al 2%.....	74
<b>Figura 13.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , en geles de agarosa al 2%.....	74

<b>Figura 14.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>bla<sub>SHV</sub></i> , en geles de agarosa al 2%.....	75
<b>Figura 15.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>bla<sub>TEM</sub></i> , en geles de agarosa al 2%.....	75
<b>Figura 16.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>bla<sub>OXA</sub></i> , en geles de agarosa al 2%.....	76
<b>Figura 17.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>intl-1</i> , en geles de agarosa al 2%. .....	76
<b>Figura 18.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>intl-2</i> , en geles de agarosa al 2%.: .....	77
<b>Figura 19.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>sul1</i> , en geles de agarosa al 2%. .....	77
<b>Figura 20.</b> Amplicones del PCR para el gen <i>sul2</i> , en geles de agarosa al 2%. .....	78

## Justificación

En las últimas décadas se ha dado una degradación importante de los recursos hídricos en Costa Rica, lo cual, es una problemática que incide directamente en la salud de los costarricenses. Es así que, en zonas que presentan una alta densidad poblacional se han evidenciado niveles de contaminación categorizados como severos o muy severos; vinculados con un vertido a los ríos de aguas residuales domésticas sin tratamiento alguno (Calvo Brenes, 2013; Morales Mora, 2018; Ramírez-Morales et al., 2021). *Escherichia coli* representa un buen indicador para evaluar la calidad del agua, cuya detección se relaciona con la posible presencia de patógenos intestinales; esto pues, al estar presente en heces tanto humanas como de origen animal se asocia a contaminación fecal (Khan & Gupta, 2020; Rodríguez Cavallini et al., 2016; Torres et al., 2010). Así mismo, el análisis del perfil de sensibilidad a antibióticos de *E. coli* es sumamente relevante, pues este microorganismo, al presentar una acelerada capacidad de adquisición de resistencia contra antibióticos, funciona como indicador del aumento de resistencia en bacterias potencialmente patógenas (Torres et al., 2010).

Aunado a lo anterior, la resistencia a antimicrobianos fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una problemática que ataca a la salud mundial, y esta misma institución estableció la necesidad de realizar más investigación en el tema. Esta situación representa una crisis cada vez más grave, la cual, desencadena la aparición de infecciones ocasionadas por microorganismos resistentes a diversos antimicrobianos, siendo así más difíciles de tratar (Aslam et al., 2018; Davies & Davies, 2010; Organización Mundial de la Salud, 2001). Esta resistencia se propicia a través del uso inadecuado de los antibióticos tanto en medicina humana como veterinaria. Además su desarrollo se ve influenciado por la urbanización e industrialización, lo cual implica una alta disposición de residuos líquidos; que de la mano con el tratamiento ineficiente o inexistente de aguas residuales, potencia la llegada de microorganismos y diversos contaminantes a los cuerpos de agua (Lee Ventola, 2015; Mena-Rivera et al., 2018; Quesada, 2012; Ramírez-Morales et al., 2021; Rodríguez-Mozaz et al., 2015). Estos factores han permitido la introducción medioambiental de variedad de antibióticos y fármacos de uso común, detectándose en distintos estudios de aguas superficiales compuestos como tetraciclinas y cefalosporinas; lo cual, conlleva a una

presión selectiva sobre mecanismos de adaptación microbiana, como lo son la expresión de sistemas de eflujo y betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) (Ramírez-Morales et al., 2021; Spongberg et al., 2011; Wilkinson et al., 2022). Esta resistencia adquirida constituye un problema de salud pública, pues la presión selectiva asociada a la existencia de antibióticos en el medio ambiente puede ocasionar una transmisión horizontal de genes de resistencia (THG) a organismos virulentos y/o que no los producirían normalmente (Torres et al., 2010).

Por estas razones, es crucial estudiar los principales sistemas de abastecimiento de agua en la GAM, como es el caso de las microcuencas ubicadas en el cantón de Vázquez de Coronado; particularmente, la microcuenca del río Durazno, la cual, se utiliza como captación superficial para la planta de tratamiento de agua para consumo humano para diversos cantones, como Goicoechea, Montes de Oca, Curridabat y parte de San José. Cabe destacar que, de acuerdo a reportes anteriores, esta microcuenca ha presentado niveles elevados para parámetros físicoquímicos (turbidez y temperatura), así como niveles de parámetros microbiológicos (coliformes fecales) fuera de los rangos aceptables definidos para el uso de aguas superficiales como fuente de abastecimiento de agua para uso y consumo humano (Morales Mora, 2018). Por lo tanto, este proyecto pretende evaluar la presencia de *E. coli* resistente a antibióticos de uso común en medicina veterinaria, como tetraciclina, o que representan una alternativa terapéutica como segunda línea de acción, como cefotaxima, en la microcuenca del río Durazno, para detectar posibles perfiles de resistencia microbiana que constituyan un riesgo para la población, y de esta manera proveer información documentada sobre la presencia y circulación de organismos resistentes a antibióticos en esta microcuenca.

## **Hipótesis**

Existen fenotipos de *Escherichia coli* resistentes a tetraciclina y cefotaxima en muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno en Vázquez de Coronado, San José.

## **Objetivo general**

Evaluar aislamientos de *Escherichia coli* de muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno mediante pruebas bioquímicas y moleculares para determinar su perfil fenotípico y genotípico de resistencia a los antibióticos tetraciclina y cefotaxima.

## **Objetivos específicos**

- 1) Examinar muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno a través del cultivo y la caracterización bioquímica para identificar aislamientos de *Escherichia coli* en estas muestras.
- 2) Analizar los aislamientos de *Escherichia coli* de las muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno por medio de pruebas de sensibilidad a los antibióticos para establecer un perfil fenotípico de resistencia a tetraciclina y cefotaxima.
- 3) Estudiar los aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a tetraciclina y cefotaxima de las muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno mediante pruebas moleculares para identificar el genotipo de resistencia a estos antibióticos.

## **Resumen**

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa comensal del intestino grueso en seres humanos y animales, esta adquiere fácilmente genes de resistencia a los antimicrobianos y es el indicador de contaminación fecal por excelencia. Actualmente, hay una problemática creciente relacionada al desmedido uso de antibióticos y el aumento de bacterias resistentes a estos. El uso de tetraciclinas y cefalosporinas de tercera generación ha incrementado en contextos médicos, agropecuarios e industriales; de ahí su consecuente liberación en fuentes de agua, que implica una presión selectiva sobre mecanismos de adaptación microbiana, propiciando el intercambio de genes de resistencia y el surgimiento de cepas

multirresistentes. Dado esto, es fundamental estudiar sistemas de abastecimiento de agua en Costa Rica, como es el caso de la microcuenca del río Durazno, ubicada en el cantón de Vázquez de Coronado, para proveer información precisa sobre la circulación de organismos resistentes a antibióticos en esta zona. Para esto, se analizaron aislamientos de *E. coli* en muestras de agua superficial mediante pruebas bioquímicas y moleculares con el fin de determinar su perfil fenotípico y genotípico de resistencia a tetraciclina y cefotaxima. Inicialmente, se trabajó con la técnica de NMP de la cual se obtuvieron valores de coliformes fecales y *E. coli*, seguido de un cultivo en CMH adicionado con antibióticos para eliminar a las bacterias sensibles. Posteriormente, se aisló *E. coli* mediante su crecimiento en medios selectivos y diferenciales, y se confirmó su identificación a través del análisis del gen *16S rRNA* por PCR de punto final. Para el perfil fenotípico y genotípico de resistencia se utilizaron pruebas de sensibilidad a antibióticos con el método de difusión por disco y PCR de punto final para la detección de genes de resistencia asociados a estos. Por cada muestra se analizó un aislamiento de *E. coli*. De 18 aislamientos, 16 presentaron resistencia ante al menos 1 antibiótico. El 78% de aislamientos de *E. coli* mostró resistencia a tetraciclina, cuyo principal gen asociado en este estudio corresponde al *tet(A)*, presente en el 64% de los aislamientos resistentes a tetraciclina. El 67% evidenciaron resistencia a cefalosporinas, y el 28% particularmente a cefotaxima, donde el gen más frecuente encontrado fue *bla<sub>TEM</sub>*; este se detectó en el 58% de los aislamientos con resistencia a cefalosporinas y el 40% de los resistentes a cefotaxima. El gen *intl-1* se detectó en el 83% de los aislamientos totales y en el 94% de los aislamientos que mostraron resistencia ante algún antibiótico, lo cual se asocia a un alto grado de contaminación antropogénica. En el 39% de los aislamientos se determinó un perfil multirresistente (MDR). Los niveles más altos de contaminación y resistencia demostraron una tendencia hacia el punto más bajo de la microcuenca. Se comprobó la hipótesis planteada, afirmando que existen fenotipos de *E. coli* resistentes a tetraciclina y cefotaxima en muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno. Esto es muy preocupante, pues es una problemática potenciada por acciones humanas, que han llevado a la presencia de bacterias MDR, en aguas superficiales. Las cuales, por medio de mecanismos como THG pueden compartir estos determinantes genéticos con bacterias más virulentas; y en consecuencia, dado que el agua de esta microcuenca se utiliza como captación superficial para una planta de tratamiento de agua para consumo humano, o mediante la presencia de

tomas para el uso de estas aguas con fines de riego en agricultura, estas bacterias podrían llegar a ser las causantes de infecciones y debido a su alta resistencia ante antimicrobianos, se contaría con terapias muy limitadas y/o con fuertes efectos de toxicidad.

## **Antecedentes**

### *Escherichia coli* dentro del grupo de coliformes fecales

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, perteneciente al grupo de los coliformes fecales. *E. coli* presenta un metabolismo anaerobio facultativo, por lo que es capaz de hacer respiración anaerobia y fermentación, dependiendo de las condiciones en que se encuentre. Esta versatilidad es considerada parte de la razón que le permite adaptarse tanto a ambientes intestinales (anaerobios) como extraintestinales (aerobios o anaerobios) (Torres et al., 2010).

El grupo de coliformes fecales incluye además otras bacterias de los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, entre otros, las cuales de igual manera fermentan lactosa y presentan crecimiento a 44 °C, y por ello deben ser diferenciadas de *E. coli*. Cabe destacar que los coliformes fecales, mediante su detección y cuantificación, son utilizados como indicador de la calidad del agua, mientras *E. coli* se asocia directamente a presencia de materia fecal (Khan & Gupta, 2020; Torres et al., 2010).

Específicamente, según el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Aguas Superficiales (Decreto N° 33903-MINAE-S), se establece a los coliformes fecales (NMP/ 100 mL) como un parámetro biológico a tomar en cuenta para la determinación de la calidad de las aguas de cuerpos superficiales y su distribución en las diversas clases definidas en este reglamento. De acuerdo con lo anterior, los valores de coliformes fecales considerados para cada clase son los siguientes: (i) Clase 1: menor a 20 NMP/100 mL, (ii) Clase 2: 20 a 1000 NMP/100 mL, (iii) Clase 3: 1000 a 2000 NMP/100 mL, (iv) Clase 4: 2000 a 5000 NMP/100 mL, (v) Clase 5: mayor a 5000 NMP/100 mL. Con base en esto, las aguas superficiales ubicadas dentro de la clase 1 pueden ser utilizadas para abastecimiento de agua para uso y consumo humano después de un tratamiento simple con desinfección, la clase 2 posterior a un tratamiento convencional y la clase 3 luego de un

tratamiento avanzado; mientras que, las clases 4 y 5 no se consideran aptas para este uso (Decreto N° 33903-MINAE-S. Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales, 2007).

### *Escherichia coli* como bacteria indicadora

La mayoría de las cepas son no patogénicas, no obstante, pueden actuar como patógenos oportunistas para individuos inmunosupresos (Torres et al., 2010). Dentro de aquellas cepas consideradas patógenas, se destacan las productoras de diarreas; estas incluyen: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Jesser & Levy, 2020; Kaper et al., 2004). Sin embargo, esta bacteria usualmente se encuentra como un organismo comensal que habita el intestino grueso de seres humanos y animales, y forma parte de la microbiota esencial involucrada en el mantenimiento de un estado saludable (Khan & Gupta, 2020; Torres et al., 2010).

Al ser un microorganismo principalmente abundante en intestino grueso y en heces, tanto de origen humano como de animales de sangre caliente, se emplea como indicador de contaminación fecal y su detección se relaciona con la posible presencia de patógenos intestinales. Además, es fácilmente detectable dada su capacidad de fermentar glucosa y lactosa, y es más factible de aislar de agua y alimentos contaminados que otros patógenos gastrointestinales (Rodríguez Cavallini et al., 2016; Torres et al., 2010).

Otra característica importante de *E. coli* como bacteria indicadora, es su acelerada capacidad de adquisición de resistencia. De esta manera, el aumento de resistencia adquirida contra antibióticos en esta especie puede actuar como indicador de resistencia en otras bacterias potencialmente patogénicas. La adquisición de genes de resistencia a antibióticos (GRA) en las comunidades de bacterias es peligrosa, debido a que se convierten en un reservorio de estos genes que pueden transferirse a otras bacterias virulentas, y además las bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) pueden proteger a bacterias no resistentes de la acción de los antibióticos (Torres et al., 2010).

Las metodologías más empleadas para la detección de coliformes (totales y fecales) y *E. coli* se basan en las técnicas de recuento (obteniendo unidades formadoras de colonias) o número más probable (NMP) (Torres et al., 2010).

Esta última consiste en un método estadístico conformado por distintas fases: presuntiva, confirmatoria de coliformes fecales y confirmatoria de *E. coli*. En esta técnica se realiza una serie de diluciones decimales de la muestra, las cuales son inoculadas inicialmente en un medio líquido - Caldo Lauril Sulfato - para la fase presuntiva. A partir de esta se toman los tubos positivos para proseguir con las siguientes fases, utilizando tubos con medio EC-MUG, tanto para la confirmación de coliformes fecales como para la de *E. coli*. Finalmente, con base en los resultados positivos se consultan tablas estadísticas estandarizadas para estimar el número de microorganismos presentes por unidad de volumen de la muestra original (Rice et al., 2017; Rodríguez Cavallini et al., 2016; Torres et al., 2010).

Como se mencionó anteriormente, para el aislamiento de *E. coli* se suele aprovechar su capacidad de utilizar la lactosa, por lo que usualmente se utilizan medios diferenciales como agar MacConkey y agar EMB Levine (Eosina Azul de Metileno). En agar MacConkey, al ser fermentadora de lactosa, las colonias se suelen apreciar en tonalidades rosadas o rojizas, diferenciándose de las no fermentadoras que se observan incoloras (Rodríguez Cavallini et al., 2016). En el caso de agar EMB, *E. coli* forma colonias negro-azuladas con un brillo metálico, mientras que algunos otros coliformes como *Enterobacter* spp. forman colonias babosas rojizas (Torres et al., 2010).

Por otra parte, *E. coli* produce la enzima  $\beta$ -glucoronidasa que al utilizar MUG (4-metilumbeliferil- $\beta$ -glucorónido) como sustrato este es hidrolizado obteniéndose 4-metilumbeliferil como producto; y este último al someterse a luz ultravioleta (312 nm) emite fluorescencia azul. Lo anterior se puede aprovechar realizando un cultivo en caldo EC-MUG, de manera que al obtenerse la fluorescencia azul se tiene un indicio de la presencia de *E. coli* (Carroll et al., 2016; Forbes et al., 2009).

## Tetraciclinas y betalactámicos

Con relación al uso de antibióticos, estos se emplean en humanos como uno de los principales tratamientos contra una gran cantidad de infecciones bacterianas, y como prevención a su aparición secundaria a distintos procedimientos médicos (Lee Ventola, 2015). Además, se ha extendido en gran manera su uso en animales, siendo este guiado en base a distintos objetivos, ya sea: (i) terapéutico, para el tratamiento de infecciones bacterianas en animales clínicamente enfermos, (ii) metafiláctico, como tratamiento para animales clínicamente sanos pertenecientes al mismo rebaño o corral de los animales que presentan síntomas, (iii) profiláctico, para la prevención de enfermedades en animales sanos que atraviesan un periodo de estrés, o (iv) promoción de crecimiento, donde se suelen agregar antibióticos en el alimento de los animales con el fin de aumentar su peso. Cabe destacar que, el uso profiláctico de antibióticos en animales se considera una práctica ilegal o imprudente en muchos países (Aarestrup, 2005).

Las tetraciclinas corresponden a un grupo de antibióticos derivados de distintas especies de *Streptomyces* spp., que abarcan productos naturales, dentro de los que se destacan tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina, entre otros, y semisintéticos, como por ejemplo doxiciclina, metaciclina y tigeciclina. Estos actúan mediante la inhibición de la síntesis proteica bacteriana, al unirse al 16S de la subunidad 30S ribosomal en las bacterias, impidiendo la unión del aminoacil-tARN en la posición A; de forma que, no permiten el ingreso de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica. Se clasifican como agentes bacteriostáticos de amplio espectro, por lo que surgieron como antibióticos de uso habitual tanto en seres humanos como animales, e inclusive han presentado gran aplicación en la agricultura (Carroll et al., 2016; Mosquito et al., 2011; Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

En humanos, las tetraciclinas se han utilizado como primera línea para el tratamiento de brucelosis, enfermedad de Lyme, tularemia, melioidosis, nocardiosis, peste, leptospirosis, cólera, tracoma, enfermedades de transmisión sexual y sepsis bucal; entre otras (Morejón García et al., 2003). No obstante, el uso de la tetraciclina ha ido disminuyendo con el paso de los años, debido a la imposibilidad de aplicarse en niños, durante el embarazo o la lactancia, y al surgimiento de nuevos componentes más eficaces pertenecientes a otras familias de antibióticos. Cabe destacar que, a pesar de la disminución en el empleo de las

tetraciclinas clásicas (tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, demeclociclina, rolitetraciclina, limeciclina, metaciclina, doxiciclina y minociclina), donde su consumo se ha limitado casi exclusivamente a doxiciclina, se incrementó el uso de la tigeciclina (García-Álvarez & Oteo, 2010; Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

A nivel agropecuario, se ha observado que las tetraciclinas se encuentran dentro de los antibióticos más utilizados por los productores ganaderos, con frecuencia para tratar problemas digestivos, particularmente en la ganadería bovina. Además, en el área veterinaria, se ha visto que tanto las tetraciclinas como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación se encuentran dentro de los antibióticos prescritos con mayor frecuencia; siendo las tetraciclinas más empleadas en problemas reproductivos y las cefalosporinas en casos de mastitis (Trujillo Pillajo, 2019). Así mismo, se ha descrito el uso de tetraciclinas en agricultura, donde estas son rociadas sobre árboles frutales en busca de que actúen como pesticidas (Lee Ventola, 2015).

Los betalactámicos conforman un grupo de antibióticos dentro del que se incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, los cuales actúan mediante la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, de manera que, presentan actividad bactericida contra bacterias en crecimiento exponencial (Carroll et al., 2016; Ryan et al., 2018). Estos pertenecen al grupo de antibióticos de mayor uso a nivel clínico, presentando un alto margen terapéutico con una mínima toxicidad para los pacientes (Yucailla Baltazar, 2019).

Con respecto a las cefalosporinas, estas se clasifican en generaciones, basado en avances de acuerdo con el espectro de acción. Las de tercera generación abarcan antibióticos como la ceftriaxona, la cefotaxima y la ceftazidima, las cuales son activas ante organismos Gram negativos, con frecuencia con concentraciones mínimas inhibitorias 10 o 100 veces menores en comparación a las cefalosporinas de primera generación (Ryan et al., 2018). Las cefalosporinas de tercera generación se recomiendan en humanos para tratamiento vía parenteral de infecciones con una intensidad de moderada a grave. Particularmente, la cefotaxima ha presentado importancia en el manejo de la meningitis purulenta aguda. No obstante, se le ha dado un mal uso, ya que se ha empleado en una gran variedad de infecciones comunitarias y nosocomiales, tales como: neumonía, infecciones respiratorias, sepsis e infecciones del tracto urinario (ITU); lo cual ha provocado una alta resistencia en muchas

bacterias Gram negativas, grupo en el cual se encuentran organismos como *E. coli*. (Maguiña-Vargas et al., 2006).

### La resistencia a los antibióticos

Los fenómenos de resistencia a antimicrobianos se pueden presentar de manera natural o adquirida. La resistencia natural puede ser a su vez puede ser intrínseca (asociada a genes que siempre están expresados por la especie o la capacidad de formar biofilms), o puede ser inducida (son genes que se encuentran de forma natural en la bacteria, pero se expresan tras exposición hacia un antibiótico) (Alonso Fernández, 2019; Munita & Arias, 2016; Reygaert, 2018). En cuanto a la adquirida, esta proviene de un proceso en el cual los microorganismos obtienen genes, ya sea por transferencia vertical, mutaciones espontáneas o transferencia horizontal, que les permiten desarrollar mecanismos para superar el efecto de los antibióticos; lo cual puede ser temporal o permanente (Davies & Davies, 2010). Cabe destacar que, las bacterias no son uniformemente resistentes a ningún agente antimicrobiano en particular, sino que su capacidad de resistencia puede variar entre grupos bacterianos relacionados. Esta resistencia suele medirse como una función de la CMI, es decir, la concentración mínima de una droga que puede inhibir el crecimiento de una bacteria (Reygaert, 2018).

El resistoma se refiere a la totalidad de genes de resistencia a los antibióticos (GRA) aislados de bacterias patogénicas y no patogénicas (Davies & Davies, 2010). A través de estudios microbianos metagenómicos ambientales, humanos y animales, se sabe que este proceso no es un fenómeno moderno, sino que tiene un origen ancestral, con evidencia de genes de resistencia contra antibióticos como betalactámicos, tetraciclinas y glicopéptidos, en ADN aislado de sedimentos de permafrost con 30 000 años de antigüedad (D'Costa et al., 2011).

La adquisición de material genético por medio de transferencia horizontal de genes (THG) es considerada uno de los mayores impulsores de la evolución bacteriana, pues se asocia con la ganancia de funciones que proporcionan un impacto positivo en términos de sobrevivencia y proliferación. Dado lo anterior, estos mecanismos se suelen ver incrementados al encontrarse las bacterias en condiciones adversas, de manera que, ofrecen un valor adaptativo ante los cambios ambientales que atraviesan. Con base en esto, la THG se ha asociado a la generación de resistencia antimicrobiana, debido a que, ante situaciones

en las que la viabilidad celular se encuentra en riesgo, como sería la presión ejercida por la presencia de antibióticos, las tasas de intercambio genético aumentan, proporcionando la posibilidad de obtener genes que confieran funciones asociadas a resistencia a antibióticos (Haudiquet et al., 2022; Munita & Arias, 2016).

Los mecanismos de resistencia contra antibióticos pueden clasificarse en cuatro categorías principales: (i) limitación de absorción de un fármaco, (ii) modificación del blanco terapéutico, (iii) inactivación de droga, y (iv) movimiento activo del fármaco hacia el exterior. De estos, los mecanismos de resistencia natural se centran en las categorías i, iii y iv, mientras que los de resistencia adquirida se basan en ii, iii y iv. Además, debido a diferencias estructurales, existen variación entre los mecanismos empleados por bacterias Gram positivas y negativas; de manera que, las Gram negativas aprovechan los cuatro métodos mencionados, mientras que las Gram positivas utilizan con menor frecuencia la disminución en la absorción de la droga y no son capaces de usar o utilizan en menor medida ciertos mecanismos de eflujo, como aquellas bombas de eflujo de la familia de cassettes de unión de ATP (ABC), la familia de resistencia a multidroga pequeñas (SMR) y la familia de resistencia, nodulación y división celular (RND) (Carmona Jerez, 2022; Reygaert, 2018).

De la mano con el incremento que se ha presentado en torno a la resistencia antimicrobiana, se han empleado diversos términos para referirse a bacterias que muestran resistencia ante múltiples antibióticos; entre estos, se destacan: multi-resistentes (“MDR” por sus siglas en inglés), extremadamente resistentes (“XDR” por sus siglas en inglés) y pan-resistentes (“PDR” por sus siglas en inglés). Es importante mencionar que, para la elaboración de estas definiciones se tomó en consideración únicamente la resistencia adquirida a antibióticos, y no así la resistencia intrínseca (Magiorakos et al., 2012).

Con base en lo anterior, se define como MDR a las bacterias que demuestren un fenotipo resistente o no susceptible para al menos un agente en tres o más categorías antimicrobianas. Análogamente, se establece como XDR aquellas resistentes a mínimo un agente en prácticamente todas las categorías, exceptuando dos o menos de estas; y PDR para las que sean resistentes a todos los agentes en todas las categorías antimicrobianas. Estas categorías de antibióticos se establecieron de manera particular para cada bacteria o grupo bacteriano, basándose en significancia epidemiológica. Para esto, como criterio de inclusión se requería que los agentes antimicrobianos estuvieran aprobados para uso humano por la Agencia

Europea de Medicamentos (EMA) o la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), y que tuviera puntos de corte para el microorganismo o el grupo establecidos por el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) o la FDA. Además, se excluyeron agentes para los que se alcanzan concentraciones terapéuticas únicamente en orina o para los que se presenta resistencia adquirida ampliamente distribuida. Las categorías establecidas para Enterobacteriaceae y sus respectivos agentes se muestran en la **tabla 1** (Magiorakos et al., 2012).

**Tabla 1.** Categorías antimicrobianas y sus respectivos agentes definidos para *Enterobacteriaceae*.

Categoría	Agentes antimicrobianos
Aminoglicósidos	Gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina
Cefalosporinas anti- <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (MRSA)	Ceftarolina
Penicilinas anti- <i>Pseudomonas</i> + inhibidores de betalactamasas	Ticarcilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam
Carbapenémicos	Ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem
Cefalosporinas de espectro no extendido (cefalosporinas de primera y segunda generación)	Cefazolina, cefuroxima
Cefalosporinas de espectro extendido (cefalosporinas de tercera y cuarta generación)	Cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima
Cefamicinas	Cefoxitina, cefotetan
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina
Inhibidores de la vía de folatos	Trimetoprima-sulfametoxazol
Glicilciclinas	Tigeciclina
Monobactámicos	Aztreonam
Penicilinas	Ampicilina

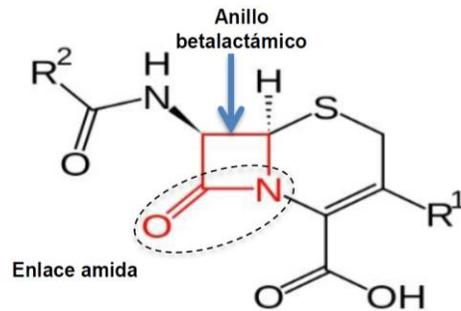
Fuente: Adaptada de *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), por Magiorakos et al., 2012, p. 273-274.

**Continuación tabla 1.** Categorías antimicrobianas y sus respectivos agentes definidos para *Enterobacteriaceae*.

Categoría	Agentes antimicrobianos
Penicilinas + inhibidores de betalactamasas	Amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam
Fenicoles	Cloranfenicol
Ácidos fosfónicos	Fosfomicina
Polimixinas	Colistina
Tetraciclinas	Tetraciclina, doxiciclina, minociclina

Fuente: Adaptada de *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), por Magiorakos et al., 2012, p. 273-274.

Con respecto a los mecanismos de resistencia de *E. coli* y los genes asociados a esta, la hidrólisis enzimática es uno de los principales involucrados hacia el grupo de los betalactámicos, dentro del cual se encuentra la cefotaxima, que es una cefalosporina de tercera generación. En este caso, la resistencia se debe a la presencia de betalactamasas, que son enzimas que cortan el enlace amida del núcleo betalactámico de los antibióticos (**figura 1**), inactivándolos antes de que lleven a cabo su función. Se han descrito gran cantidad de betalactamasas y su número sigue incrementando. Los genes más comunes dentro de las enterobacterias corresponden a: *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>* y *bla<sub>CARB</sub>*, no obstante, entre los genes que codifican por estas enzimas también se destacan *bla<sub>CTX-M</sub>* y *bla<sub>GES</sub>*. Particularmente, *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>* pertenecen a las penicilinasas y son inhibidas por el ácido clavulánico, además, en ocasiones ejercen acción contra cefalosporinas de tercera generación. *bla<sub>OXA-1</sub>* se encuentra en el grupo de las penicilinasas caracterizadas por hidrólisis incrementada de cloxacilina u oxacilina, sin embargo, otras *bla<sub>OXA</sub>* desempeñan un papel ante cefalosporinas de espectro extendido. *bla<sub>CTX-M</sub>* forma parte del grupo de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), y afecta la actividad de cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Cabe destacar que, en *E. coli* comensales se ha observado una mayor frecuencia de *bla<sub>TEM</sub>* sobre *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>OXA</sub>* (Mosquito et al., 2011).



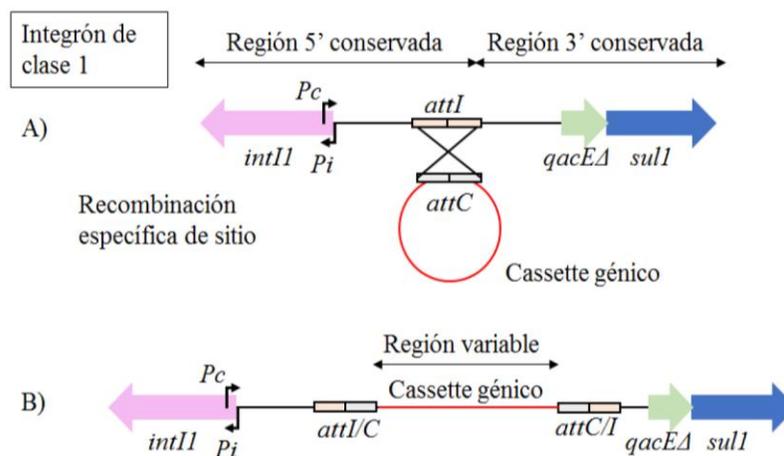
**Figura 1.** Estructura de las cefalosporinas mostrando el anillo betalactámico y el enlace amida característico de los antibióticos betalactámicos (Martínez Torres, 2023, p. 5).

Por otra parte, en cuanto a las tetraciclinas, los sistemas de eflujo codificados por genes como *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(I)* y *tet(Y)* son los principales mecanismos de resistencia a estos antibióticos y todos han sido previamente descritos en *E. coli*. No obstante, la protección ribosomal y la acción de enzimas sobre las tetraciclinas son otros mecanismos de resistencia que se pueden encontrar contra este grupo; los cuales están codificados por distintos genes, como por ejemplo *tet(M)* y *tet(O)* para la protección ribosomal, y *tet(X)* para la modificación enzimática. Es importante resaltar que, dentro de los genes mencionados, se suele detectar con mayor frecuencia *tet(A)*, el cual es seguido de *tet(B)*, tanto en aislamientos de origen humano como ambiental (Mosquito et al., 2011; Ramírez Bayard, 2016).

De igual manera, existen sistemas o plataformas genéticas de gran importancia involucrados en la resistencia antimicrobiana. Dentro de estos se destacan los integrones, los cuales corresponden a secuencias genéticas con la capacidad de captar genes que codifican por determinantes de resistencia u otras funciones. En este grupo sobresalen los integrones clase 1 y clase 2. Estos han sido observados en un amplio rango de bacterias, y se caracterizan por ser determinantes en la propagación de GRA, dada su alta capacidad de captar y transferir estos genes (Mosquito et al., 2011; Zhang et al., 2019). Su estructura consta de tres elementos principales, incluyendo un gen que codifica por una integrasa, una secuencia primaria de unión para cassettes génicos y secuencias promotoras (**figura 2**) (Cambray et al., 2010; Mosquito et al., 2011). *intl-1* (integrasa del integrón de clase 1), es característica de los integrones de clase 1, que son los más comunes y se asocian con resistencia ante antibióticos, desinfectantes y metales pesados, por lo que es considerado un biomarcador, relacionado a la presencia de antibióticos en muestras ambientales y el grado de presión antropogénica.

Tanto los integrones de clase 1 como los de clase 2 han sido detectados en *E. coli*, sin embargo, se ha reportado en aislamientos de *E. coli* asociados a origen humano y animal una predominancia de integrones que contienen el gen *intl-1* sobre los que poseen el gen *intl-2* (integrasa del integrón de clase 2) (Cano Larrotta, 2019; Zhang et al., 2019).

De la mano con lo anterior, la resistencia a sulfonamidas codificada por los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* se ha visto relacionada a integrones (Wu et al., 2010). Particularmente se ha observado una gran asociación entre el gen *sul1* y el gen *intl-1*, de manera que *sul1* se encuentra vinculado a los integrones de clase 1 y se considera una estructura conservada en la región 3' (**figura 2**) (Mosquito et al., 2011; Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2019). El gen *sul3* también se ha detectado en relación a los integrones de clase 1, por lo que se dice que puede remplazar al *sul1* en estos y formar integrones de clase 1 atípicos (Jiang et al., 2019; Wu et al., 2010). Así mismo, se han reportado casos en donde se ha encontrado tanto a *intl-1* como a *intl-2* en plásmidos que transportan el gen *sul2*. Cabe destacar que, dentro de estos genes de resistencia a sulfonamidas, se ha evidenciado una mayor prevalencia de *sul2* en *E. coli* provenientes de humanos y animales, la cual es seguida por *sul1*; y *sul3* corresponde al de menor frecuencia (Wu et al., 2010).



Nota= A) Integrón sin cassette insertado: en la región 5' se encuentra el gen de la integrasa (*intl-1*), su promotor ( $P_i$ ), el promotor  $P_c$  y el sitio unión *attI*, en la región 3' se encuentran los genes *qacEA* y *sul1*. Se representa un cassette génico con su sitio de recombinación *attC* antes de ser insertado. B) Integrón con el cassette insertado.

**Figura 2.** Diagrama de un integrón de clase 1 y de la integración de un cassette génico (De los Santos Silva, 2019, p. 2).

Actualmente, existe una problemática creciente debido al aumento de casos de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA), donde se han presentado casos de resistencia ante prácticamente todos los antibióticos. El desarrollo progresivo de resistencia bacteriana contra antibióticos se puede atribuir a varias causas como la sobrepoblación humana, asociada a altos niveles de urbanización y hacinamiento, falta de regulaciones sobre el uso aumentado y/o inapropiado de antibióticos en clínicas y producción agropecuaria, tratamiento ineficiente de aguas residuales, sistema de alcantarillado deficiente y la falta de desarrollo de nuevos fármacos (Aslam et al., 2018; Lee Ventola, 2015; Rodriguez-Mozaz et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de la creciente crisis de BRA, no existe una vigilancia estricta de esta en circunstancias no clínicas, situación que se ha ido denunciando desde hace algunos años. Autores mencionan que esta falta de vigilancia se podría atribuir a que las concentraciones de antibióticos presentes en el medio son relativamente bajas (Marti et al., 2014). No obstante, se ha demostrado el enriquecimiento y mantenimiento de mutantes bacterianos resistentes preexistentes o inclusive la selección *de novo* de nuevas mutaciones asociadas a resistencia aún con concentraciones bajas de antibióticos, inferiores a la CMI, semejantes a las que se han encontrado en muchos ambientes naturales. Particularmente, en el pasado se ha evidenciado que la concentración mínima selectiva (CMS) para tetraciclina es similar a las concentraciones que se pueden encontrar de este antibiótico en los suelos o en ambientes acuáticos (Gullberg et al., 2011). Aunado a esto, una revisión que analiza la resistencia antimicrobiana en ambientes acuáticos en Estados Unidos reporta la menor concentración causante de resistencia (MCCR), utilizada como la menor concentración con efecto observable (MCEO), y la concentración sin efecto observable (CSEO) para diversos antibióticos. Para el caso de tetraciclina se describe una MCEO de 0,01 µg/mL y una CSEO < 0,1 µg/mL, que representan valores inferiores a la CMI, la cual en esta revisión se sitúa entre 8 y 16 µg/mL (Scott et al., 2016).

Más recientemente, autores sugieren que niveles subletales de antimicrobianos ejercen un impacto significativo en la fisiología bacteriana y su evolución, de forma que, podrían actuar como inductores de la expresión génica microbiana (Aslam et al., 2018). De esta manera, concentraciones de antibióticos sub-inhedoras, como aquellas presentes en el ambiente, se sugieren como agentes que ejercen presión selectiva promoviendo la resistencia a antimicrobianos. Estas concentraciones pueden aumentar la tasa de mutaciones y

transferencias de genes, incrementando así la prevalencia de la resistencia a antibióticos. Así mismo, pueden incrementar mutaciones y conjugación mediante la respuesta vía SOS, la cual se activa ante daño en el ADN, similar al producido por algunos antibióticos; específicamente, los betalactámicos son conocidos por activar esta respuesta. Además, se dice que exposiciones a largo plazo a concentraciones sub-clínicas de antibióticos puede aumentar la generación y transferencia de GRA (Chow et al., 2021). Esto, en conjunto con el uso excesivo de antibióticos en contextos médicos, agropecuarios e industriales y su consecuente liberación en fuentes de agua, contribuyen a la distribución de BRA en el ambiente (Davies & Davies, 2010; Marti et al., 2014).

### Los cuerpos de agua como reservorios de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA)

Los cuerpos de agua, principalmente aquellos de poca profundidad, actúan como reservorios de BRA al ser el punto focal donde llegan y se concentran las aguas provenientes de diversas fuentes, tales como plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) y aguas empleadas para actividades agropecuarias y de uso humano. De manera que, en estos cuerpos se mezclan bacterias provenientes de distintos orígenes, antibióticos, desinfectantes y metales pesados, propiciando la evolución y la diseminación de la resistencia antimicrobiana (Biyela et al., 2004; Marti et al., 2014).

Es así como, en estos cuerpos de agua, se puede encontrar una mezcla diversa de antibióticos, contaminantes varios y bacterias resistentes, lo cual genera condiciones específicas que permiten la transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias. En ambientes acuáticos, las bacterias forman *biofilms*, los cuales corresponden a comunidades de microorganismos altamente organizadas y estructuradas, generadas con el fin de facilitar su sobrevivencia. Estos podrían influir en la transferencia de genes debido a la alta densidad celular, la proximidad y la acumulación de GRA (Marti et al., 2014).

Otro factor importante son los sedimentos acuáticos. Los antibióticos empleados en acuicultura y otras actividades agropecuarias son retenidos en estos sedimentos, de forma que, actúan como una interfaz para una comunidad compleja de microorganismos facilitando la transferencia, el mantenimiento y la diseminación de GRA (Marti et al., 2014). Cabe destacar que, se ha reportado que las quinolonas y las tetraciclinas pueden formar complejos

relativamente estables con diversas partículas y metales, de manera que tienen la capacidad de ser más abundantes en los sedimentos acuáticos (Watkinson et al., 2009).

Asimismo, se debe tomar en consideración el papel de los organismos acuáticos como agentes de desarrollo y diseminación de genes de resistencia. Muchos moluscos y crustáceos presentan exoesqueletos compuestos de quitina, que no solo actúa como superficie para la formación de *biofilms*, sino que también inducen competencia genética e intercambio genético entre poblaciones bacterianas de diferentes ambientes (Marti et al., 2014).

Las PTARs son las principales fuentes antropogénicas de liberación de antibióticos hacia el ambiente. En estas, se tiene un contexto ideal para la THG, pues debido a sus condiciones promueven el contacto constante de bacterias no resistentes con antibióticos, y residuos de estos, y con bacterias resistentes (Marti et al., 2014; Watkinson et al., 2009). Las descargas de estas PTARs a los ríos, junto con tratamientos de aguas poco eficientes no diseñados para la eliminación efectiva de antibióticos, BRA y GRA causan la diseminación de estos a otros cuerpos de agua naturales. Lo anterior es de especial interés, pues al ser los ríos fuentes de agua, ya sea directas o indirectas, para consumo humano o animal, la contaminación de estos con antimicrobianos, BRAs y GRAs pueden representar un riesgo severo para la salud humana y animal mediante su dispersión (Rodríguez-Mozaz et al., 2015).

Adicionalmente, la contaminación de los cuerpos de agua superficiales también se asocia con la disposición de aguas residuales de fuentes dispersas, difusas o no puntuales (Arce-Villalobos et al., 2022; Valcárcel Rojas et al., 2010). Dentro de estas se hace referencia a drenajes provenientes de asentamientos poblacionales que fluyen hacia el cauce de un río, lixiviados de desechos sólidos, retornos agrícolas, lavado de contaminación atmosférica, silvicultura, drenados de minas (Jiménez Cisneros, 2010; Valcárcel Rojas et al., 2010). Su control supone grandes dificultades, dado el origen tan diverso de estas descargas contaminantes, y puesto que, son fuentes no específicamente localizadas (Jiménez Cisneros, 2010; Pérez et al., 2011).

De manera generalizada, mundialmente se ha observado una tendencia en la cual los sitios más contaminados con ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) corresponden a aquellos que presentan un nivel económico de bajo a medio ingreso, que han tenido poca o nada de monitorización previa de estos compuestos en ambientes acuáticos; así como a áreas

asociadas con un tratamiento deficiente de aguas residuales y una mala infraestructura para la gestión de desechos. En un estudio a escala global se analizaron muestras provenientes de 258 ríos, abarcando regiones de África, Antártica, Asia, Europa, América y Oceanía. Se detectaron cuatro compuestos en común en todos los continentes, los cuales fueron: cafeína, nicotina, acetaminofén y cotinina; y se evidenciaron otros 14 IFAs en todos los continentes a excepción de la Antártica, estos abarcan: atenolol, carbamazepina, cetirizina, citalopram, desvenlafaxina, fexofenadina, gabapentina, lidocaína, metformina, naproxeno, sitagliptina, temazepam, trimetoprima y venlafaxina. Aquellos detectados en mayor frecuencia corresponden a carbamazepina, metformina y cafeína. Los contaminantes que presentaron mayores concentraciones fueron: paracetamol, cafeína, metformina, fexofenadina, sulfametoxazol, metronidazol y gabapentina. Cabe destacar que, dentro de esta investigación se calcularon las concentraciones farmacéuticas acumuladas para cada sitio de muestreo, representado estas una suma de todos residuos de IFAs cuantificados para esa ubicación específica. Con base en estas concentraciones, Costa Rica se ubicó en la novena posición en orden descendente, siendo San José la segunda región en América (dentro de las analizadas), después de La Paz (Bolivia), que presentó los niveles más altos de contaminación en las zonas muestreadas (Wilkinson et al., 2022).

En relación con el continente americano, en un estudio de revisión por Domínguez et al., (2021) se analizaron diversos ambientes acuáticos en busca de resumir el estado de la resistencia ambiental a antibióticos. De acuerdo con este, se han encontrado BRAs principalmente contra antibióticos betalactámicos en varios países de América Latina. Además, se observó que los GRAs pueden aislarse de diversos ambientes acuáticos, incluyendo agua superficial, agua potable y aguas residuales. Específicamente, en el 100% de los estudios revisados se reportaron bacterias resistentes a carboxipenicilina, cefalosporinas de primera generación, macrólidos y nitrofurano, tanto para la región de Norte América, América Central y el Caribe (NCC) como para la región de Sur América (SA). En el caso de las cefalosporinas de tercera generación, se evidenciaron BRAs en el 79% y el 96% de los estudios para NCC y SA respectivamente; y para la tetraciclina los porcentajes fueron de 100% y 97% respectivamente. Además, dentro de los GRAs reportados se destacan BLEEs, genes de resistencia a quinolonas e integrones.

Particularmente en Costa Rica, en un estudio publicado en el 2021 se analizaron aguas superficiales de ríos ubicados en San José (río Virilla, río Torres y río Jorco) y se detectó la presencia de diversos residuos farmacológicos. Dentro de estos, se destacaron con mayor frecuencia los estimulantes del sistema nervioso central, seguidos por cafeína y 1,7-dimetilxantina, el cual corresponde a un producto común de transformación de la cafeína. Así mismo, los analgésicos y los antiinflamatorios no esteroideos presentaron una alta frecuencia, sumado a una alta diversidad, encontrándose 6 componentes para este grupo, los cuales corresponden a: naproxeno, ibuprofeno, acetaminofén, ketoprofeno, diclofenaco y ácido mefenámico. El gemfibrozilo (regulador de lípidos) también fue determinado con una frecuencia bastante alta. De manera semejante, el grupo de antibióticos presentó alta diversidad, conformándose igualmente por 6 componentes, siendo estos: cefalexina, ciprofloxacina, ofloxacino, azitromicina, claritromicina y trimetoprima; no obstante, estos se encontraron en una menor frecuencia. Dentro de otros compuestos detectados con menor frecuencia se encuentran: medicamentos psiquiátricos, antihistamínicos, beta-bloqueadores, alcaloides y drogas simpaticomiméticas. Cabe destacar que, la cafeína fue la sustancia que se obtuvo con una mayor concentración, seguida por 1,7-dimetilxantina, gemfibrozilo, ibuprofeno, ofloxacino, cefalexina y azitromicina (Ramírez-Morales et al., 2021).

Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios previamente realizados en Costa Rica, como es el caso de uno publicado en el 2011, en el cual se analizaron 86 muestras provenientes de aguas residuales, tratadas y no tratadas, y de escorrentías urbanas y rurales, en busca de 34 productos farmacéuticos y de cuidado personal. De estas se determinó que la cafeína era el agente predominante, proveniente probablemente de contaminación de aguas residuales domésticas. Sin embargo, también se encontraron, en orden de relevancia, tetraciclinas, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), el lípido regulador de gemfibrozilo (nombre comercial: Lopid) y acetaminofén. El predominio de estos correlaciona con el hecho que son de fácil adquisición y de bajo costo, por lo que son de mucho uso en países centroamericanos. Además, los antibióticos que se reportaron con mayor frecuencia fueron doxiciclina, sulfadimetoxina, norfloxacina, tetraciclina, ciprofloxacina y sulfametazina (Spongberg et al., 2011).

### Zona de estudio: Microcuenca del río Durazno

Esta pertenece a la subcuenca del río Virilla, la cual recorre alrededor de 829 km<sup>2</sup> del territorio costarricense, y a su vez forma parte de la cuenca del río Grande de Tárcoles, esta última abarca 2155.5 km<sup>2</sup> (Quesada, 2012; Tribunal Ambiental Administrativo, 2014).

La subcuenca del río Virilla presenta una topografía irregular, la cual cuenta con montañas y valles. Esta zona se encuentra dominada por cultivos permanentes, sin embargo, se han expandido otras prácticas, tales como, usos urbanos, pastos y cultivos estacionales. Dentro de estas, las áreas dedicadas a la urbanización se han incrementado considerablemente a través de los años, y las áreas forestales corresponden a las primeras en ser sustituidas y las más afectadas. De manera que, dado el gran desarrollo urbano alrededor de esta cuenca, se presenta una alta disposición de residuos líquidos en la misma, abarcando aquellos de origen municipal, industrial, residencial e inclusive aguas de retorno agrícola (Quesada, 2012).

Particularmente, la microcuenca del río Durazno presenta una zona de captación que abarca un área de aproximadamente 9 km<sup>2</sup> y un mediano grado de desnivel altitudinal. El tipo del suelo corresponde a un origen andisol, lo cual implica que es derivado de cenizas volcánicas, formado por la meteorización de material procedente de eyecciones volcánicas. Estos suelos presentan una alta permeabilidad y su pH acostumbra a ser de intermedio a básico, con alta capacidad de fijar fosfatos debido a su alto contenido de hierro y aluminio libres. Referente al uso del suelo, en esta microcuenca se ha visto una predominancia por el uso forestal, seguido por el pastoreo y el urbano (Morales Mora, 2018).

La tasa de contaminación de los cuerpos de agua en la subcuenca del río Virilla ha ido incrementando con el paso de los años. Se ha evidenciado que gran cantidad de puntos distribuidos en esta muestran niveles de contaminación importantes de moderados a severos, los cuales se concentran en su mayoría en las microcuencas de algunos ríos ubicados en el Gran Área Metropolitana (GAM), entre los que se destaca el río Virilla. Esta contaminación se debe principalmente a las actividades humanas, siendo uno de los mayores factores involucrados el vertido de aguas residuales no tratadas provenientes de actividades domésticas e industriales (Herrera et al., 2013).

De la mano con lo anterior, otros estudios han demostrado la presencia de contaminantes en cuerpos de agua pertenecientes a la microcuenca IV, correspondiente a la microcuenca del

río Tibás. Tanto esta microcuenca como la del río Durazno forman parte de la subcuenca del río Virilla. Las fuentes de contaminación en este caso se han asociado en mayor medida a la escorrentía superficial, en los puntos superiores de la microcuenca, y a una combinación de esta con fuentes de contaminación puntuales antropogénicas para los puntos inferiores. Particularmente se ha observado una tendencia de aumento de coliformes fecales, *E. coli* y otros indicadores de contaminación, como sólidos totales y turbidez, en los puntos bajos de la microcuenca. Estos puntos corresponden a la región en la cual se concentra la población, y el aumento de coliformes se debe en su mayoría a un mal manejo de alcantarillados y un predominio de tanques sépticos como medios para manejar las aguas negras, lo cual se relaciona con un mayor aporte de materia fecal a las aguas superficiales. Esto es de suma importancia, pues la alta presencia de indicadores fecales, particularmente *E. coli*, representa una amenaza para la salud humana, dado que se relaciona con la posibilidad de que estos cuerpos de agua se presenten como una fuente de infecciones bacterianas, parasitarias y virales (Leandro et al., 2010; Mena-Rivera et al., 2018).

De tal manera, los cuerpos de agua suelen presentar una calidad del agua disminuida en los puntos inferiores, donde se aumentan las áreas de industrialización y urbanización. Esta disminución de la calidad se asocia a un aumento en la escorrentía superficial, en la descarga de aguas residuales de origen doméstico y en las actividades agropecuarias. No obstante, cabe resaltar que, en ocasiones la presencia de afluentes ejerce un efecto de dilución importante sobre los contaminantes del río, de forma que, pueden influenciar en la observación del patrón mencionado anteriormente (Leandro et al., 2010; Mena-Rivera et al., 2018).

Propiamente en la microcuenca del río Durazno se han documentado valores elevados para parámetros fisicoquímicos, específicamente para los casos de turbidez y temperatura. Lo anterior presenta relevancia dado que la turbidez se utiliza como un indicador de sólidos suspendidos y disueltos en el agua, de manera que, estos podrían estar conformados por metales, sedimentos, materia orgánica o microorganismos. En cuanto a los parámetros microbiológicos, se destacan los coliformes fecales, donde se han observado valores variables que se ubican predominantemente dentro de las clases 3 (apta para consumo humano tras tratamiento avanzado), 4 y 5 (no aptas para consumo humano) según el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Aguas

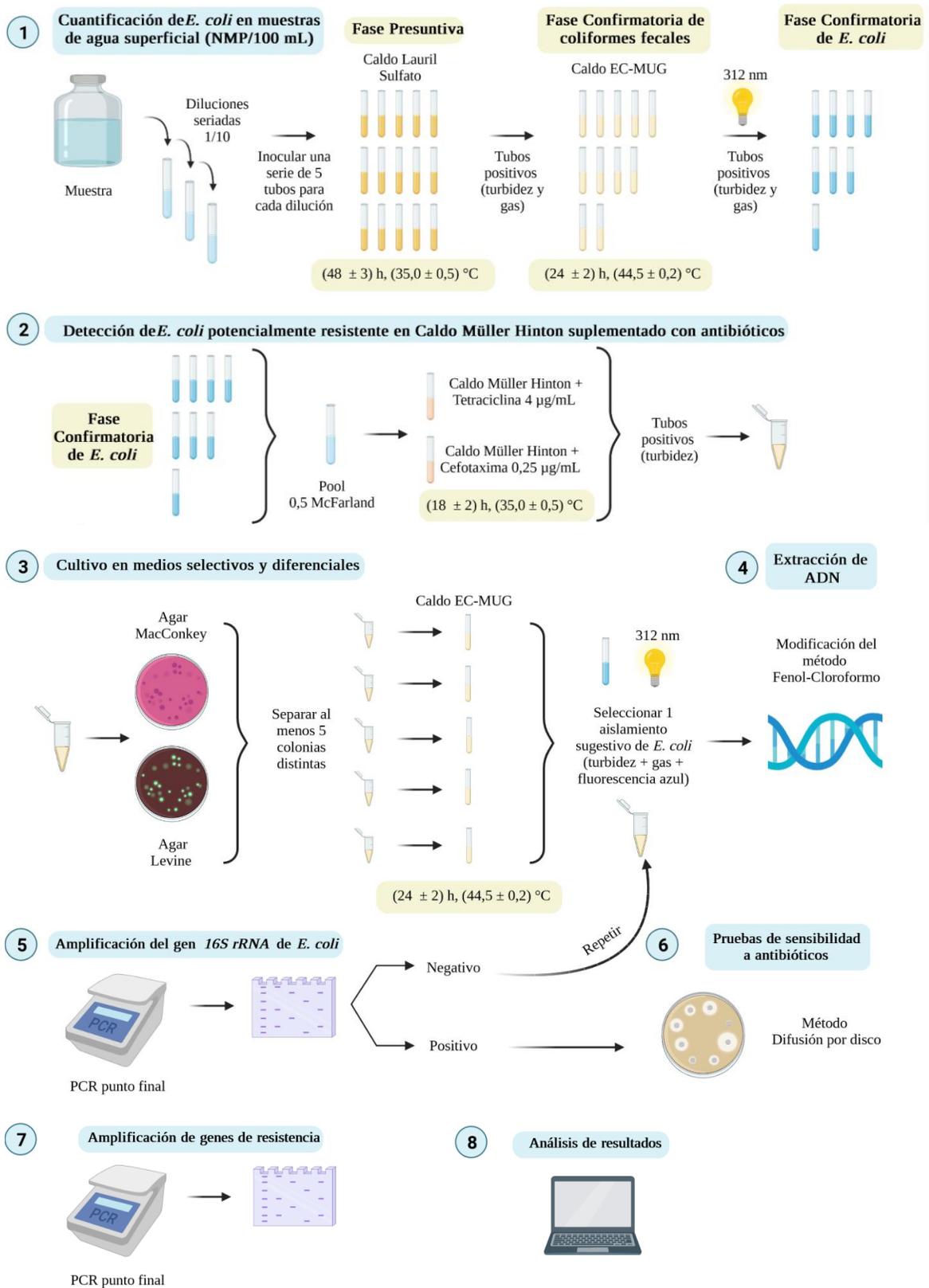
Superficiales (Decreto N° 33903-MINAE-S). Así mismo, se han recuperado quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas provenientes de esta microcuenca; presentándose un alto riesgo tanto de probabilidad de infección como de probabilidad de enfermar, siendo este mayor para *Cryptosporidium* spp. en comparación a *Giardia* spp. (Morales Mora, 2018).

En esta microcuenca se ha descrito influencia de la temperatura del aire, la precipitación y la escorrentía sobre los indicadores microbiológicos y la turbidez. Cabe destacar que, la precipitación se puede relacionar con una disminución de las concentraciones de microorganismos, debido a que los diluye en el cuerpo de agua. No obstante, debido a las condiciones de contaminación de los suelos, sumado a la escorrentía, se puede ver un incremento en la concentración de estos (Morales Mora, 2018).

Así mismo, un estudio más reciente indica niveles de contaminación severos en la microcuenca del río Durazno; donde se evidenciaron altas concentraciones de coliformes fecales, *E. coli* y *Enterococcus faecalis*. Particularmente, se reportaron valores de coliformes fecales desde 2 200 NMP/100 mL hasta 4 600 NMP/100 mL para la época seca, y desde 5 240 hasta 77 559 NMP/100 mL para la época lluviosa; lo que clasifica a este cuerpo de agua entre las clases 4 y 5 según el reglamento según el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Aguas Superficiales (Decreto N° 33903-MINAE-S). Aunado a esto, se detectó la presencia de antibióticos pertenecientes a las categorías de tetraciclinas y betalactámicos en muestras de agua superficial de esta microcuenca, en específico doxiciclina y cefotaxima, cuyo origen se sugiere ser agrícola (Venegas González et al., 2023).

## **Metodología**

En la **figura 3** se muestra un diagrama que resume la metodología.



**Figura 3.** Diagrama resumen de la metodología.

1) Identificación de aislamientos de *Escherichia coli* resistente a antibióticos en muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno:

a) Muestreo:

Se recolectaron muestras de agua superficial en 3 puntos ubicados a distintas alturas en la microcuenca del río Durazno en Vázquez de Coronado, San José, durante la época seca (marzo, 2022) y la época de transición seca-lluviosa (mayo, 2022). Las muestras de agua se tomaron de cada punto en 3 días distintos de una misma semana. Para la toma de muestras microbiológicas se siguió el protocolo de muestreo I-AG-01, el cual se encuentra al alcance del Sistema de Gestión de Calidad del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA); cuya metodología está descrita conforme a *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Rice, Braid & Eaton, 2017).

b) Recuperación de *Escherichia coli*:

Para la cuantificación y recuperación de *E. coli* se trabajó con la técnica de Número Más Probable (NMP) conforme al método ME-MI-01 “Detección de coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de Número Más Probable en muestras de agua”, el cual se basa en Rice et al. (2017). Esta metodología consiste en una fase presuntiva, en la cual se realizan diluciones de la muestra y con estas se inoculan series de tubos de Caldo Lauril Sulfato, los cuales se incuban ( $48 \pm 3$ ) horas a ( $35,0 \pm 0,5$ ) °C, y posteriormente se evalúa su crecimiento por turbidez. Seguido se realiza una fase de confirmación de coliformes fecales. En esta los tubos positivos de la fase anterior se inoculan en tubos con medio EC-MUG y se incuban a ( $44,5 \pm 0,2$ ) °C por ( $24 \pm 2$ ) horas. Para su lectura, se definen como positivos aquellos que presenten turbidez y formación de gas. Por último, se realiza una fase confirmatoria de *E. coli*, en la que los tubos positivos de la fase anterior son expuestos a una fuente de luz ultravioleta (longitud de onda: 312 nm) y aquellos que presenten fluorescencia azul brillante se consideran positivos. Para la obtención de los resultados, se utiliza la cantidad de tubos positivos para cada dilución en cada una de las fases y se realiza una lectura utilizando tablas de NMP estandarizadas.

Para esta técnica se utilizó como control negativo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502, y *E. coli* ATCC 25922 como control positivo, ambas de la bacterioteca del INISA,

además de controles de esterilidad del medio de cultivo correspondiente y del buffer o diluyente utilizado para la preparación de las diluciones.

c) Detección de *E. coli* potencialmente resistente en Caldo Müller Hinton (CMH) suplementado con antibióticos:

A partir de los tubos que resultaron positivos de la fase confirmatoria de *E. coli* en la técnica de NMP, se realizó un cultivo en CMH suplementado con tetraciclina (4 µg/mL) y en CMH suplementado con cefotaxima (0,25 µg/mL). Para esto, se elaboró un pool de todos los tubos positivos para cada muestra. El pool se realizó inoculando a partir de cada tubo positivo, con un palito de madera estéril, un tubo de buffer estéril hasta alcanzar una turbidez semejante al estándar 0,5 de McFarland. Lo anterior, con el fin de estandarizar la concentración del inóculo a utilizar.

De este pool se inocularon 0,5 mL en un tubo con 3 mL del medio correspondiente. Estos medios se incubaron por (18 ± 2) h a (35,0 ± 0,5) °C y se determinaron como positivos aquellos que presentaban crecimiento evidenciado por turbidez. Las concentraciones de antibiótico seleccionadas se basan en los (T)ECOFF reportados por el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), los cuales corresponden a un consenso para la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de determinado antibiótico ante un microorganismo específico, en base a múltiples fuentes (EUCAST, 2021a; EUCAST, 2021b). Estos cultivos se realizaron como un tamizaje, en busca de obtener aquellas bacterias que presentaban resistencia a los antibióticos y su concentración respectiva. Para este se utilizó la *E. coli* ATCC 25922 como control sensible, y como control resistente se trabajó con la *E. coli* 973-2 de la bacterioteca del INISA, la cual es resistente a ambos antibióticos. Además, se incluyó un control de esterilidad del medio de cultivo y del buffer estéril con el que se realizaron las diluciones, y controles de crecimiento de las bacterias sin antibiótico.

d) Confirmación de *E. coli*:

Se confirmó que el crecimiento obtenido del CMH suplementado con antibiótico correspondía a *E. coli*, mediante el cultivo en medios diferenciales y medios selectivos y el análisis del gen *16S rRNA* de *E. coli* por PCR de punto final como se describe a continuación. Para esto, en caso de que la muestra presentara crecimiento para los dos medios (CMH

suplementado con tetraciclina y CMH suplementado con cefotaxima), se elaboró un pool a partir de los dos tubos, y sí solo se presentó crecimiento en uno de los dos medios, se continuó trabajando con este.

i) Medios diferenciales y medios selectivos:

A partir del pool proveniente del CMH suplementado con antibióticos, se realizó un cultivo en Agar MacConkey y Agar Levine (OXOID®). A partir de las colonias aisladas se seleccionaron al menos 5 por muestra, con morfotipos distintos, esto con el fin de encontrar al menos un aislamiento por cada muestra que corresponda a *E. coli*. Los 5 aislamientos se procedieron a cultivar en caldo EC-MUG, incubando ( $24 \pm 2$ ) h a ( $44,5 \pm 0,2$ ) °C. De estos, se seleccionó un aislamiento para cada muestra cuyo crecimiento fuera sugestivo de *E. coli*, lo cual corresponde a turbidez positiva, presencia de gas en la campana de Durham y fluorescencia positiva bajo luz UV a una longitud de onda de 312 nm. Con el aislamiento seleccionado se procedió a continuar el esquema de trabajo.

ii) Extracción de ADN:

Tanto para la confirmación de *E. coli* por medio de la amplificación del gen *16S rRNA*, como su posterior análisis genético se requirió hacer una extracción de ADN genómico, la cual se realizó por medio de una modificación del método de fenol-cloroformo utilizado por Barrantes Jiménez, McCoy & Achí (2010). Esta modificación consiste en trabajar con 2 microtubos de 1,5 mL de cultivo joven (18-24 horas) en Caldo Trypticasa Soya (CTS), los cuales se centrifugan por 6 min a 3824 g. Posteriormente, se resuspenden los botones con buffer TE y se unifican a un volumen final de 750 µL en un microtubo. Seguido, se repite la centrifugación por 6 min a 3824 g y se continúa con el procedimiento descrito, con la siguiente modificación: el botón se resuspende en 560 µL de buffer TE, 30 µL de SDS al 10% y 3,5 µL de proteinasa K. Además, previo a los lavados con etanol al 70%, se deja en refrigeración el precipitado de ADN hasta el día siguiente.

iii) Amplificación del gen *16S rRNA* de *E. coli*:

Se amplificó el gen *16S rRNA* del ARNr de *E. coli* por medio de PCR de punto final. Las condiciones de reacción y secuencias de primers se utilizaron conforme a lo descrito por

Chacón J., Taylor C., Valiente A., Alvarado P., & Cortés B. (2012), y se trabajó con el siguiente ciclado: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 56 °C, y 1 minuto a 72 °C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Cabe destacar que, se utilizó agua libre de nucleasas como control blanco, y la cepa *E. coli* 973-2 de la bacterioteca del INISA como control positivo. Los productos obtenidos se identificaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, según lo establecido en la sección 3.c de la metodología. El tamaño del amplicón es de 584 bp.

En caso de que el aislamiento fuera negativo para el gen *16S rRNA* se seleccionaba otro aislamiento que presentara un crecimiento sugestivo de *E. coli* en EC-MUG según la sección 1.d.i de la metodología, siguiendo a continuación los pasos posteriores.

2) Perfil fenotípico de resistencia a tetraciclina y cefotaxima:

Para la caracterización del perfil fenotípico de resistencia, se realizaron pruebas de susceptibilidad a antibióticos, lo cual, se trabajó con el método de difusión por disco (Cavaliere et al., 2005), utilizando tetraciclina (30 µg) y cefotaxima (30 µg). Se evaluó además la sensibilidad ante cefalotina (30 µg), ampicilina (10 µg), amoxicilina (10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), amikacina (30 µg), gentamicina (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), cloranfenicol (30 µg) y trimetoprima-sulfametoxazol (25 µg). Como control sensible se utilizó *E. coli* ATCC 25922.

3) Perfil genotípico de resistencia a tetraciclina y cefotaxima:

a) Amplificación de los genes de resistencia:

En cuanto a la identificación de los genes de resistencia, se utilizó PCR de punto final. Para la resistencia asociada a tetraciclina, se realizó la detección de los genes *tet(A)*, *tet(B)*, y *tet(C)*. Con respecto a la resistencia asociada a cefotaxima, se efectuó la detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), particularmente *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>OXA</sub>*. Además, se llevó a cabo la detección de otros genes como *intl-1*, *intl-2*, *sul1* y *sul2*, los cuales se relacionan a plataformas móviles de resistencia a antibióticos y resistencia a sulfonamidas.

Se emplearon iniciadores o primers específicos para cada gen con base en diversas referencias como se observa en la **tabla 2**. Para todos los genes se utilizó el Master Mix DreamTaq PCR (2x) (Thermo Scientific), a excepción del *tet(C)*, para el cual se utilizó buffer 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 0,1 U/μL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), 300 μM de dNTP Mix (Promega) y 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega). La concentración final de cada primer se detalla en la **tabla 2** y todas las soluciones de trabajo se almacenaron a 10 μM. Finalmente cada reacción posee 2 μL de ADN (40 ng/μL). El volumen final es de 25 μL para cada reacción.

Las condiciones de ciclado y el tamaño del amplicón se muestran en la **tabla 2**. Los ciclados específicos para cada caso fueron estandarizados de acuerdo con las referencias respectivas y a los procedimientos previos con los que se han trabajado estos genes en el INISA.

**Tabla 2.** Concentración requerida de cada primer, condiciones de ciclado y tamaño del amplicón para los diferentes genes por analizar.

Gen	Concentración de cada primer (μM)	Ciclado	Tamaño del amplicón (bp)	Referencia
<i>tet(A)</i>	0,5	5 min a 94 °C	888	(Maynard et al., 2003)
		30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C, y 1,5 min a 72 °C		
<i>tet(B)</i>	0,4	5 min a 72°C	634	(Momtaz et al., 2012)
		5 min a 95 °C		
<i>tet(C)</i>	0,4	5 min a 72°C	418	(Ng et al., 2001)
		5 min a 94 °C		
		5 min a 72°C		

**Continuación tabla 2.** Concentración requerida de cada primer, condiciones de ciclado y tamaño del amplicón para los diferentes genes por analizar.

<b>Gen</b>	<b>Concentración de cada primer (μM)</b>	<b>Ciclado</b>	<b>Tamaño del amplicón (bp)</b>	<b>Referencia</b>
		7 min a 94 °C		
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	0,6	35 ciclos de 50 s a 94 °C, 40 s a 50 °C, y 1 min a 72 °C 5 min a 72°C	593	(Pagani et al., 2003)
		10 min a 95 °C		
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	0,4	30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 54 °C, y 1 min a 72 °C	862	(Mirzaei et al., 2021)
		5 min a 72°C		
		10 min a 95 °C		
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	0,5	30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 50 °C, y 1 min a 72 °C	859	(Barrantes et al., 2014)
		5 min a 72°C		
<i>bla<sub>OXA</sub></i>	0,5		820	(Barrantes et al., 2014)
		10 min a 95 °C		
<i>intl-1</i>	0,4	30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, y 1 min a 72 °C	899	(Barrantes et al., 2014)
		5 min a 72°C		
<i>intl-2</i>	0,4		789	(Peirano et al., 2005)
		10 min a 95 °C		
<i>sul1</i>	0,5	30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 50 °C, y 1 min a 72 °C	839	(Volz Lopes et al., 2015)
		5 min a 72°C		
<i>sul2</i>	0,5		293	(Kern et al., 2002)

Se trabajó con agua libre de nucleasas como control blanco, y como controles positivos se utilizaron cepas de la bacterioteca del INISA cuyos genes de resistencia a antibióticos ya

han sido analizados. Estas cepas corresponden a i) *E. coli* A1539-1 para *tet(A)* y *tet(C)* ii) *E. coli* 973-2 para *tet(B)* y *blaTEM*, iii) *E. coli* 431-1 para *blaCTX-M*, iv) *Klebsiella pneumoniae* 569-1 para *blaSHV*, v) *Shigella flexneri* 84.490-2 (INISA 03) para *blaOXA*, *intl-1*, *intl-2* y *sul2*, vi) *Morganella morganii* 266-1 para *sul1*.

b) Identificación de los genes de resistencia:

Los productos obtenidos a partir del PCR de punto final fueron identificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (7 V/cm, 75 min) con buffer 1X TBE (pH 8.3) y tinción con GelRed™ Nucleic Acid (Biotium), para lo cual, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). El tamaño del amplicón para cada gen se detalla en la **tabla 2**.

4) Análisis estadístico de resultados

El análisis estadístico y gráfico de los resultados se realizó utilizando Microsoft Excel para Microsoft 365 MSO versión 2210 compilación 16.0.15726.20188 y R versión 4.2.3 con los paquetes dplyr v1.1.1, ggplot v3.4.2, ggpubr v0.6.0, scales v1.2.1 y psych v2.3.3, empleando el IDE RStudio 2023.03.0. Se trabajó con la prueba Wilcoxon para muestras no pareadas para la comparación de los valores de coliformes fecales y *E. coli* entre los momentos de muestreo y los puntos de recolección.

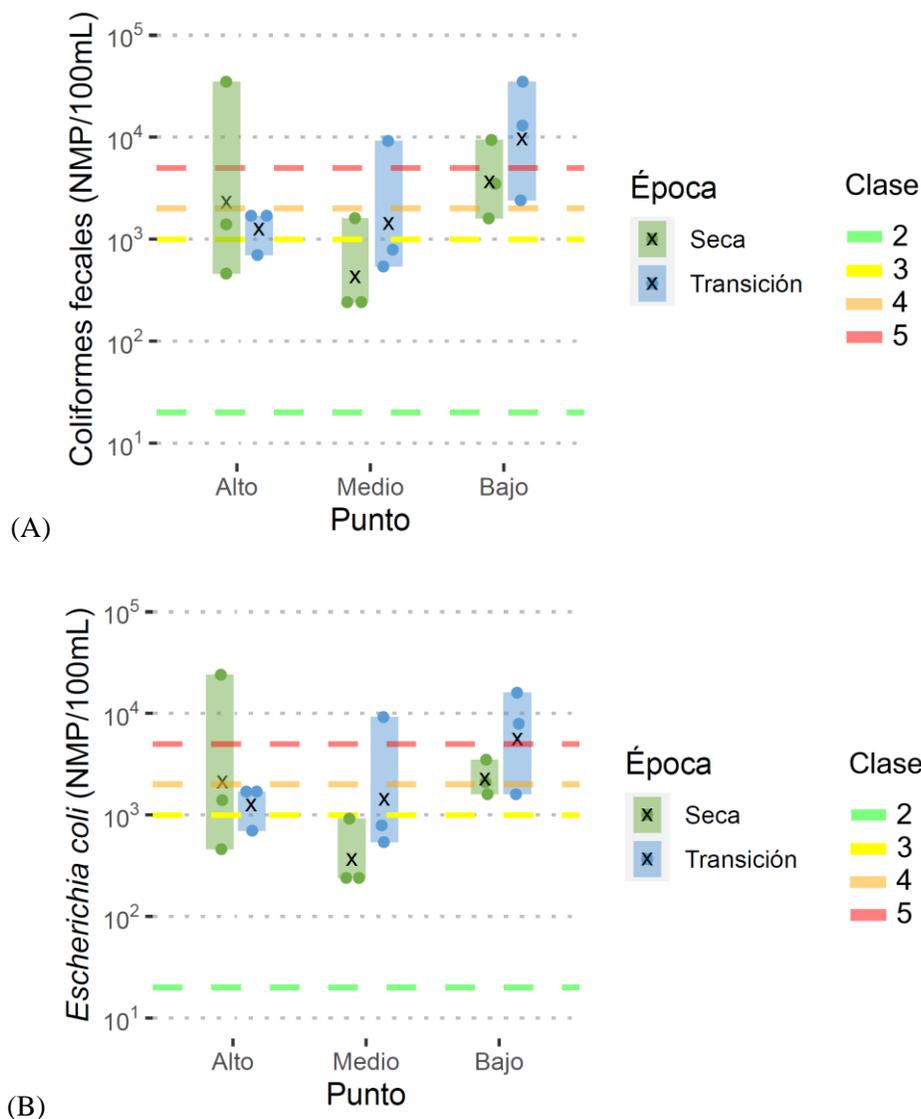
## **Resultados**

En la **tabla 3** y en la **figura 4** se muestran los resultados de coliformes fecales y *E. coli* según el momento de muestreo y los puntos de recolección. En estas se puede observar una tendencia a mayores niveles de coliformes fecales y *E. coli* en el punto más bajo de la microcuenca, tanto para la época seca como para la época de transición. Además, según el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Aguas Superficiales (Decreto N° 33903), en la **figura 4** se puede ver que la calidad de las muestras de agua analizadas se ubica dentro de las categorías 2 y 5, evidenciando una tendencia a peor calidad en el punto más bajo.

**Tabla 3.** NMP/ 100 mL de coliformes fecales y *Escherichia coli* identificados en las muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno.

Momento de muestreo <sup>1</sup>	Punto de recolección	Muestra	Coliformes fecales (NMP/ 100 mL)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/ 100 mL)
Época seca	Alto	1	3,5x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>
		4	4,6x10 <sup>2</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>
		7	1,4x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>
	Medio	2	1,6x10 <sup>3</sup>	9,2x10 <sup>2</sup>
		5	2,4x10 <sup>2</sup>	2,4x10 <sup>2</sup>
		8	2,4x10 <sup>2</sup>	2,4x10 <sup>2</sup>
	Bajo	3	9,4x10 <sup>3</sup>	2,1x10 <sup>3</sup>
		6	3,5x10 <sup>3</sup>	3,5x10 <sup>3</sup>
		9	1,6x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>
Época de transición seca lluviosa	Alto	10	1,7x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>
		13	7,0x10 <sup>2</sup>	7,0x10 <sup>2</sup>
		16	1,7x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>
	Medio	11	7,9x10 <sup>2</sup>	7,9x10 <sup>2</sup>
		14	5,4x10 <sup>2</sup>	5,4x10 <sup>2</sup>
		17	9,2x10 <sup>3</sup>	9,2x10 <sup>3</sup>
	Bajo	12	1,3x10 <sup>4</sup>	7,9x10 <sup>3</sup>
		15	3,5x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>
		18	2,4x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>

<sup>1</sup>No hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos para coliformes fecales y *E. coli* al comparar entre la época seca y de transición seca lluviosa, y entre los puntos de recolección, aplicando la prueba Wilcoxon para muestras no pareadas (p>0,05).



Nota= Clase 2: 20 a 1000 NMP/100 mL, apta para abastecimiento de agua para uso y consumo humano después de un tratamiento convencional. Clase 3: 1000 a 2000 NMP/100 mL, apta para abastecimiento de agua para uso y consumo humano posterior a un tratamiento avanzado. Clase 4: 2000 a 5000 NMP/100 mL, no apta para abastecimiento de agua para uso y consumo humano. Clase 5: mayor a 5000 NMP/100 mL, no apta para abastecimiento de agua para uso y consumo humano.

**Figura 4.** Resultados de coliformes fecales (A) y *E. coli* (B) para los diferentes puntos de la microcuenca según la época de muestreo y su clasificación de acuerdo con las clases establecidas en el Decreto N° 33903-MINAE-S, Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales (2007).

Los resultados para el crecimiento de las muestras en CMH suplementado con antibióticos se muestran en la **tabla 4**. En esta se evidencia un mayor crecimiento en la época de transición seca lluviosa en relación con la época seca, principalmente para el caso de cefotaxima. Además, se observa una mayor prevalencia de resistencia a tetraciclina que a cefotaxima.

**Tabla 4.** Crecimiento las muestras en Caldo Müller Hinton (CMH) suplementado con tetraciclina (4 µg/mL) y CMH suplementado con cefotaxima (0,25 µg/mL).

Momento de muestreo	Punto de recolección	Muestra	Tetraciclina (4 µg/mL) <sup>1</sup>	Cefotaxima (0,25 µg/mL) <sup>1</sup>
Época seca	Alto	1	+	+
		4	-	-
		7	+	-
	Medio	2	-	-
		5	+	-
		8	+	-
	Bajo	3	+	-
		6	+	-
		9	+	-
Época de transición seca lluviosa	Alto	10	+	+
		13	+	+
		16	+	+
	Medio	11	+	-
		14	+	+
		17	+	+
	Bajo	12	+	+
		15	+	+
		18	+	+

<sup>1</sup> +: crecimiento, -: sin crecimiento

Del total de 18 muestras, se continuó la línea de trabajo con 16 de estas, pues en 2 casos no hubo crecimiento en ninguno de los dos medios suplementados con antibióticos. Para las 16 muestras restantes se seleccionó un aislamiento sugestivo de *E. coli*. y se confirmó su identidad. Los 16 aislamientos escogidos presentaron un crecimiento caracterizado por colonias lactosa positivas tanto en Agar MacCokey como en Agar Levine, a excepción del

aislamiento 9, el cual evidenció colonias lactosa negativas en ambos medios de cultivo. Para todos estos se obtuvo un crecimiento positivo en caldo EC-MUG, y la banda correspondiente para el análisis del gen *16S rRNA* de *E. coli* por medio de PCR de punto final.

Los resultados del perfil fenotípico y genotípico de resistencia de los aislamientos de *E. coli* para los distintos antibióticos se presentan en la **tabla 5**. En esta se observa que los 16 aislamientos analizados evidenciaron resistencia ante al menos un antibiótico, y en la mayoría de los casos se detectó al menos un gen asociado a esa resistencia. Las imágenes de los resultados de los geles de agarosa obtenidos por electroforesis para cada uno de los genes asociados a resistencia a antibióticos se presentan en el **anexo 1**.

**Tabla 5.** Resultados del perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antibióticos de los aislamientos de *E. coli*.

Momento de muestreo	Punto de recolección	Asilamiento	Perfil fenotípico de resistencia a <sup>1</sup>	Genes encontrados	
Época seca	Alto	1	TE, CTX, KF, AMP, AML, AK, CN, C, SXT	<i>tet(C)</i> , <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>intl-1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>	
		7	TE	<i>tet(A)</i> , <i>intl-1</i>	
	Medio	5	TE, KF, AMP, AML	<i>tet(A)</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>intl-1</i>	
		8	TE, KF, NA, CIP	<i>tet(A)</i> , <i>intl-1</i>	
	Bajo		3	TE, KF, AMP, AML	<i>tet(A)</i> , <i>intl-1</i>
			6	TE	<i>tet(A)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>intl-1</i> , <i>sul2</i>
			9	TE, KF, AMP, AML, NA, CIP, NOR, SXT	<i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>intl-1</i> , <i>sul2</i>

<sup>1</sup> TE: tetraciclina, CTX: cefotaxima, KF: cefalotina, AMP: ampicilina, AML: amoxicilina, AK: amikacina, CN: gentamicina, NA: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, NOR: norfloxacina, C: cloranfenicol, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol.

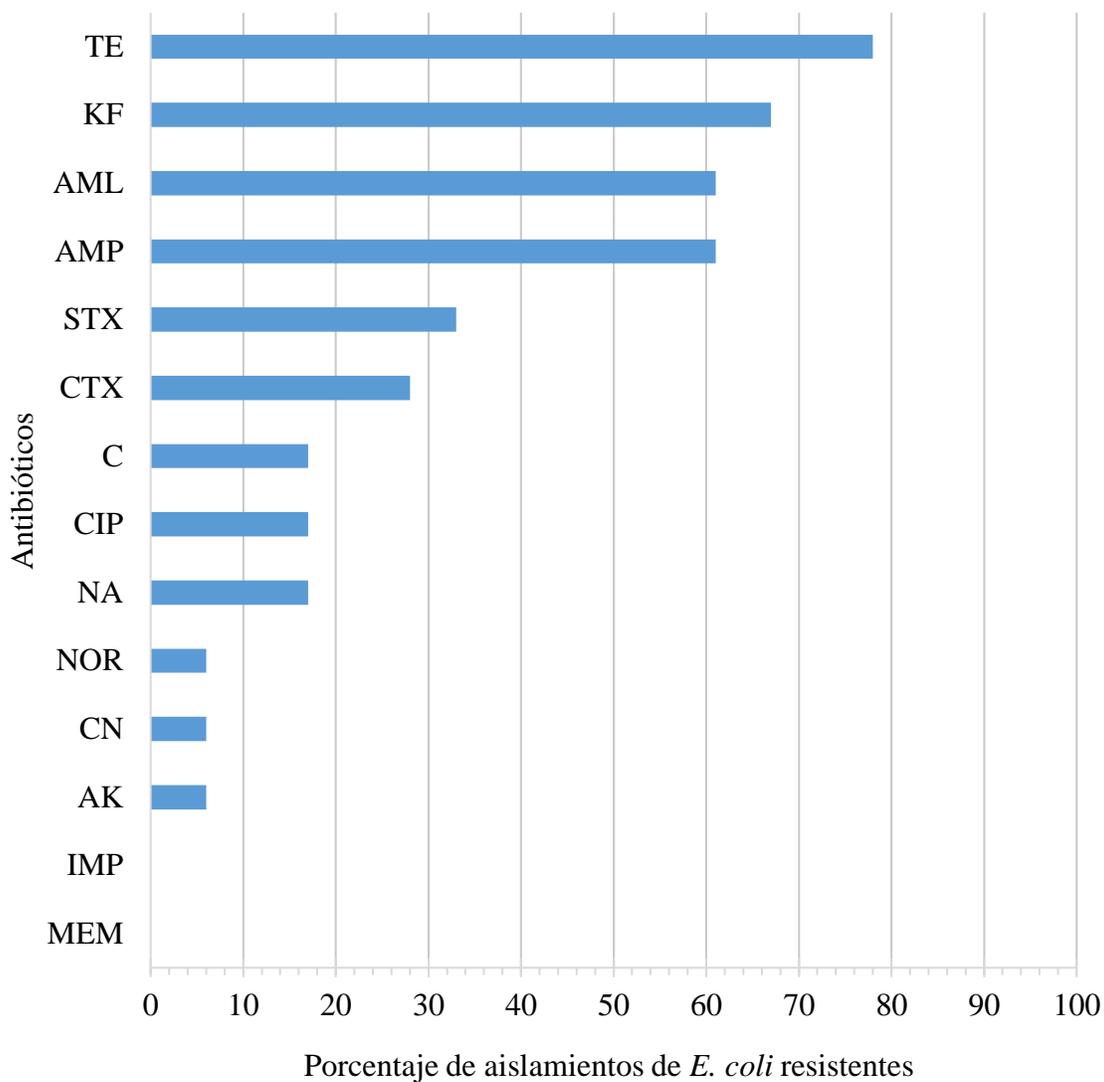
**Continuación tabla 5.** Resultados del perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antibióticos de los aislamientos de *E. coli*.

Momento de muestreo	Punto de recolección	Aislamiento	Perfil fenotípico de resistencia a <sup>1</sup>	Genes encontrados
Época de transición seca-lluviosa	Alto	10	TE, CTX, KF, AMP, AML, SXT	<i>tet(B)</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>intl-1</i> , <i>sul2</i>
		13	TE	<i>intl-1</i>
		16	CTX, KF, AMP, AML	-
	Medio	11	TE, KF, AMP, AML, C	<i>tet(B)</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>intl-1</i>
		14	TE, KF, AMP, AML, C	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>intl-1</i> , <i>sul2</i>
		17	TE, SXT	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>intl-1</i>
Bajo	12	CTX, KF, AMP, AML	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>intl-1</i>	
	15	TE, KF, AMP, AML, NA, CIP, SXT	<i>tet(A)</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>intl-1</i> , <i>sul2</i>	
	18	TE, CTX, KF, AMP, AML, SXT	<i>tet(A)</i> , <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>intl-1</i>	

<sup>1</sup> TE: tetraciclina, CTX: cefotaxima, KF: cefalotina, AMP: ampicilina, AML: amoxicilina, AK: amikacina, CN: gentamicina, NA: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, NOR: norfloxacina, C: cloranfenicol, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol.

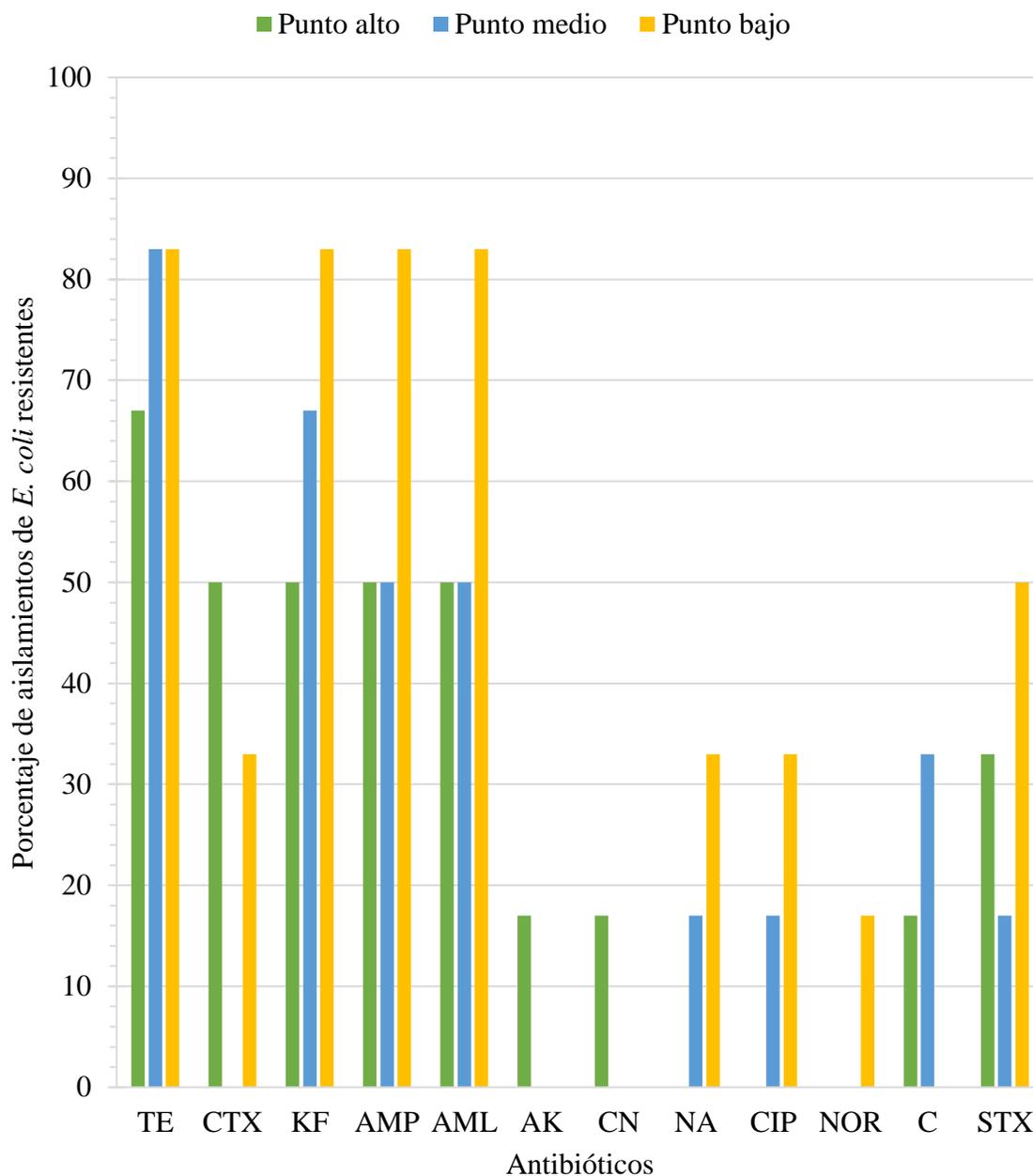
El porcentaje de aislamientos resistente a cada uno de los antibióticos se muestra en la **figura 5**, y su porcentaje según el punto de muestreo se detalla en la **figura 6**. De acuerdo con esto, se observa que la tetraciclina representa la mayor prevalencia en cuanto a resistencia

en esta microcuenca, seguida por el grupo de betalactámicos. Además, se muestran mayores porcentajes de resistencia para estos antibióticos en el punto más bajo de muestreo.



Nota= TE: tetraciclina, KF: cefalotina, AML: amoxicilina, AMP: ampicilina, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol, CTX: cefotaxima, C: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidíxico, NOR: norfloxacina, CN: gentamicina, AK: amikacina, IMP: imipenem, MEM: meropenem.

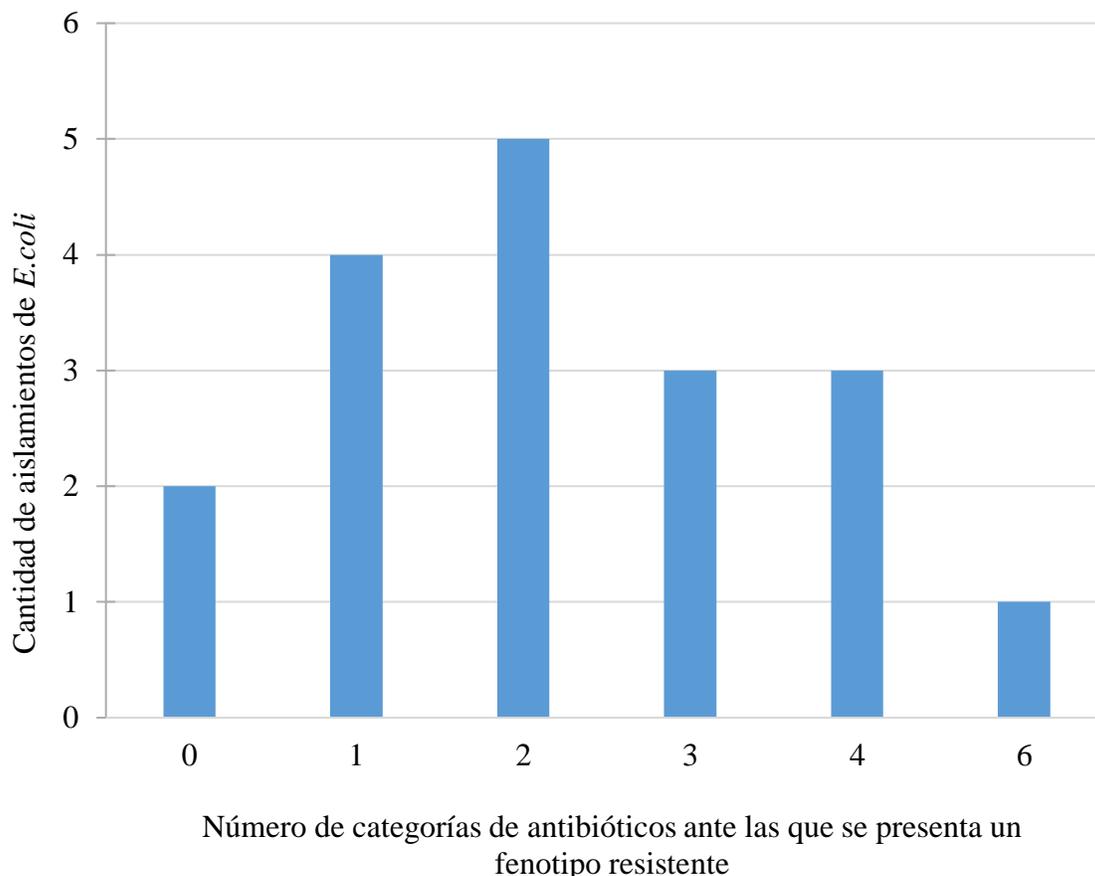
**Figura 5.** Porcentaje de aislamientos de *E. coli* resistentes para cada uno de los antibióticos analizados.



Nota= TE: tetraciclina, CTX: cefotaxima, KF: cefalotina, AMP: ampicilina, AML: amoxicilina, AK: amikacina, CN: gentamicina, NA: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, NOR: norfloxacina, C: cloranfenicol, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol.

**Figura 6.** Porcentaje de aislamientos de *E. coli* resistentes para cada uno de los antibióticos según el punto de muestreo.

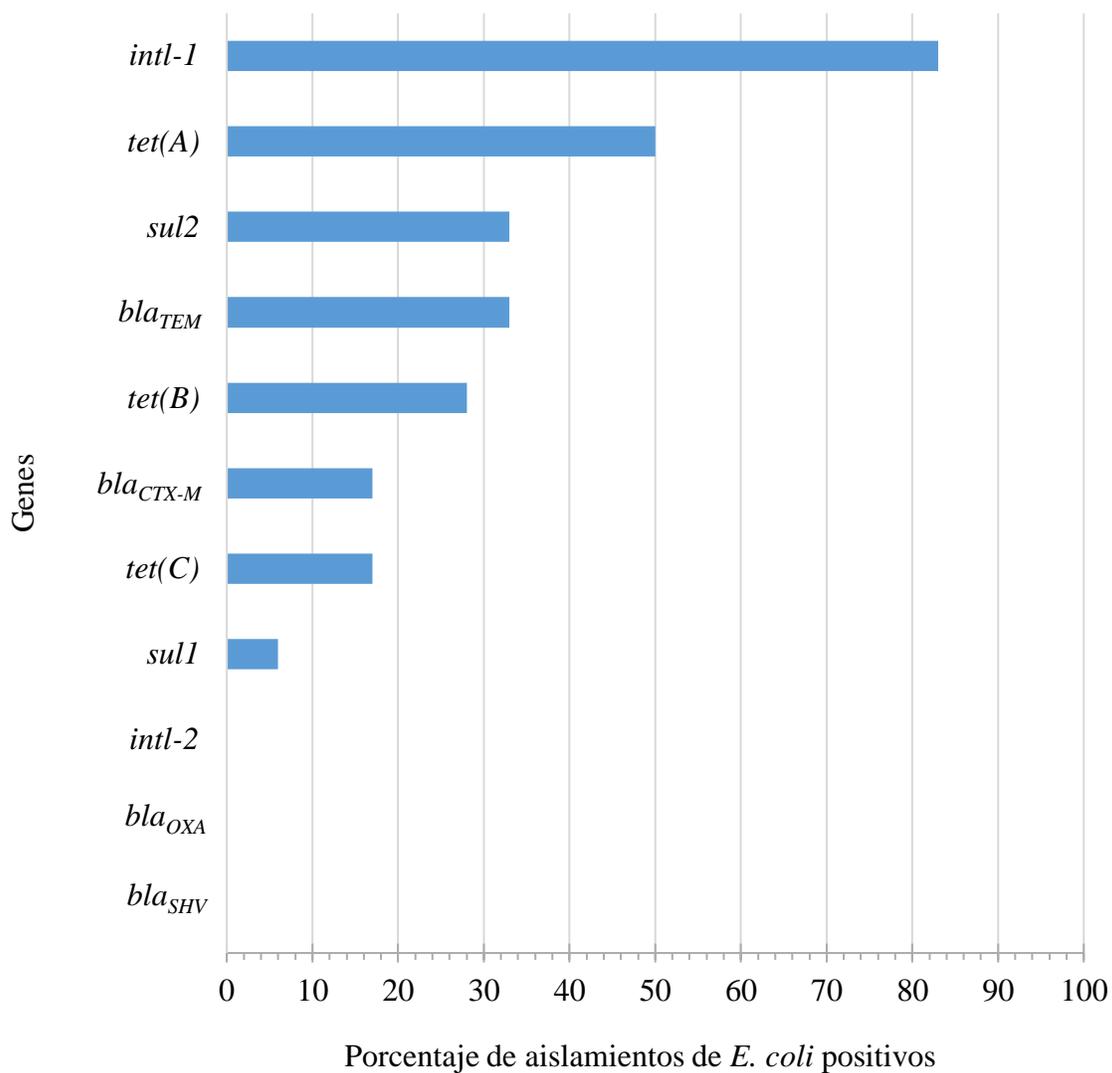
En la **figura 7** se observa la cantidad de aislamientos de *E. coli* que evidencian un fenotipo resistente ante distinto número de categorías de antibióticos. En esta se muestra que la mayoría de los aislamientos presentaron resistencia ante al menos una categoría.



**Figura 7.** Cantidad de aislamientos de *E. coli* que presentan un fenotipo de resistencia ante diverso número de categorías de antibióticos.

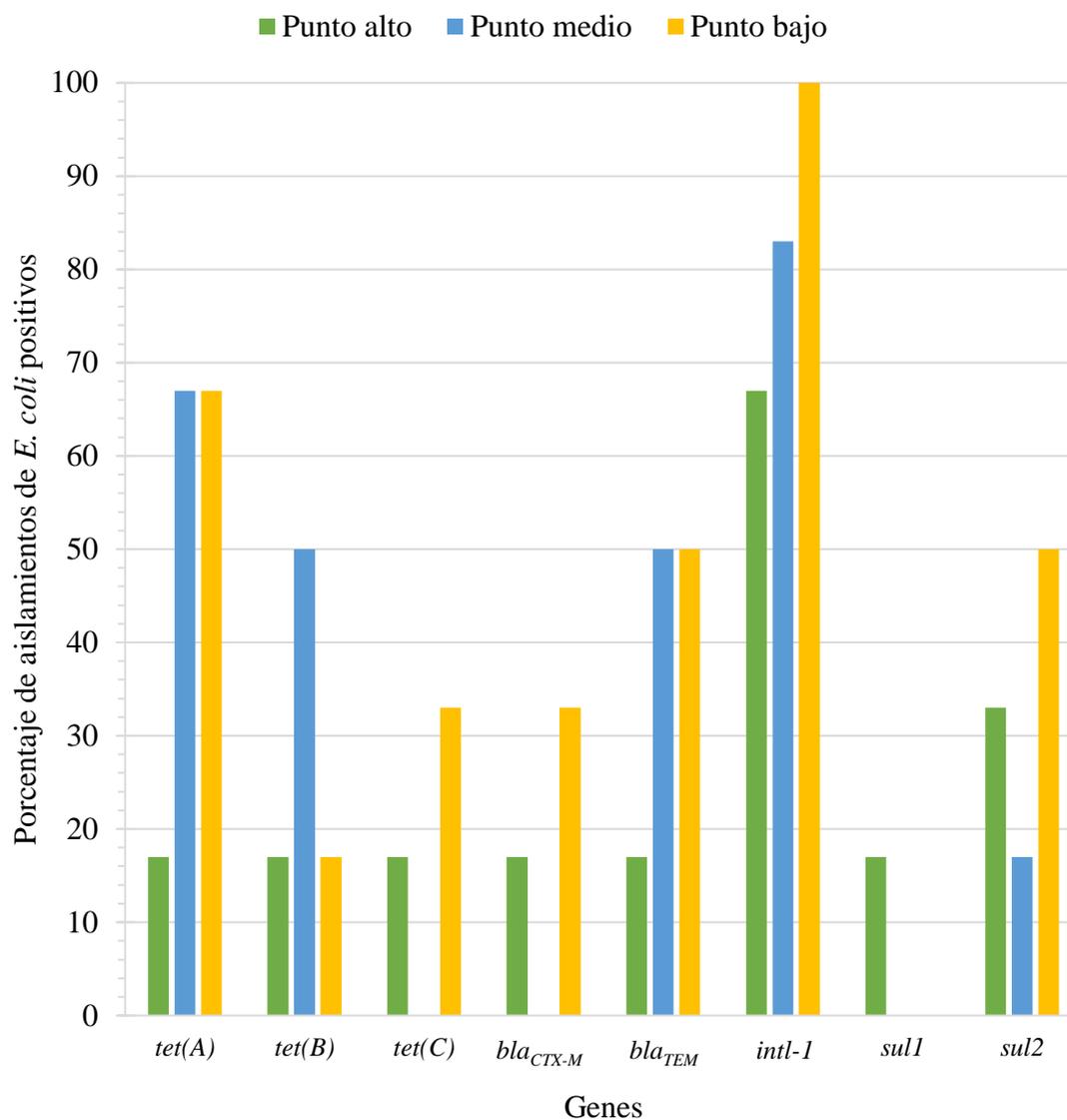
En cuanto al perfil genotípico de resistencia identificado (**figura 8**), el gen detectado con mayor frecuencia corresponde a *intl-1*, el cual se encontró presente en alrededor del 83% de los aislamientos totales de *E. coli*, y en el 94% de aquellos que presentaban resistencia ante algún antibiótico. A este gen lo sigue en frecuencia el gen *tet(A)*, detectado en el 50% de los aislamientos totales y en el 64% aquellos resistentes a tetraciclina. Y en tercer lugar se encuentra tanto el gen *sul2* como el gen *bla<sub>TEM</sub>*, ambos detectados en aproximadamente el 33% de los aislamientos totales; donde el gen *bla<sub>TEM</sub>*, fue positivo para el 58% de los aislamientos con resistencia a cefalosporinas y en el 40% de los aislamientos resistentes a

cefotaxima. Por el contrario, los genes que presentaron la menor frecuencia corresponden a *intl-2*, *bla<sub>OXA</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>*, los cuales no fueron detectados en ninguno de los aislamientos. En el caso del gen *bla<sub>CTX-M</sub>*, a pesar de no obtenerse un alto porcentaje de positividad en los aislamientos totales, este se evidenció en el 60% de aquellos con resistencia a cefotaxima.



**Figura 8.** Porcentaje de aislamientos de *E. coli* positivos para cada uno de los genes analizados.

En la **figura 9** se presenta el porcentaje de detección de los genes según el punto de muestreo. En esta se observa que, para la pluralidad de los casos, el mayor porcentaje de aislamientos positivos para estos genes corresponde al punto más bajo de la microcuenca.



**Figura 9.** Porcentaje de aislamientos de *E. coli* positivos para cada uno de los genes según el punto de muestreo.

## Discusión

Referente a la detección de coliformes fecales y *Escherichia coli* en las muestras de agua superficial obtenidas de la microcuenca del río Durazno (**tabla 3**), es posible apreciar que, en la mayoría de los casos, se obtuvo valores de *E. coli* (NMP/100 ml) muy similares al resultado obtenido para coliformes fecales, lo cual sugiere que gran parte de esta población corresponde específicamente a *E. coli*. Esto señala una implicación más severa del componente fecal en términos de contaminación; pues al ser *E. coli* un indicador específico de la presencia de materia fecal, habría un mayor riesgo de la presencia de patógenos intestinales en este cuerpo de agua (Khan & Gupta, 2020; Rodríguez Cavallini et al., 2016; Torres et al., 2010).

De la mano con lo anterior, no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en estas variables al comparar entre la época seca y la época de transición seca lluviosa (prueba de Wilcoxon,  $p > 0,05$ ). Esto se podría relacionar con el volumen de precipitación y el caudal presentado por el río, pues no se presentaron precipitaciones abundantes entre los muestreos y el caudal se mantuvo similar en ambos casos; o podría estar influenciado por posibles descargas no puntuales constantes en la zona, ocasionado que la contaminación se mantuviera indistintamente de la época. Cabe destacar que, se ha observado un comportamiento similar en la microcuenca IV del río Virilla, correspondiente a la microcuenca del río Tibás, donde se ha evidenciado una disminución de indicadores de contaminación de las aguas tanto en la época seca como en la de transición, aumentando estos en la época lluviosa (Leandro et al., 2010).

Por otra parte, de acuerdo con el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Aguas Superficiales (Decreto N° 33903), según el número de coliformes fecales hallado en las muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno, la calidad de estas aguas se ubica entre las clases 2 y 5 (**figura 4**). Siendo así que, las aguas superficiales ubicadas dentro de la clase 2 pueden ser utilizadas para abastecimiento de agua para uso y consumo humano después de un tratamiento convencional y la clase 3 posterior a un tratamiento avanzado; mientras que, las clases 4 y 5 no se consideran aptas para este uso (Decreto N° 33903-MINAE-S. Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales, 2007). No obstante, es importante destacar

que con base en este estudio no es posible otorgar una clasificación definitiva a este cuerpo de agua. Esto pues, al tratarse de un análisis puntual no es certero que esta tendencia se mantenga a través del tiempo. Por lo tanto, es recomendable realizar una evaluación de esta microcuenca utilizando mayor cantidad de muestreos en el tiempo, para así poder categorizar correctamente estas aguas superficiales según el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Aguas Superficiales (Decreto N° 33903).

Aunado a esto según los puntos de muestreo es posible observar una tendencia donde las aguas correspondientes al punto más bajo de la microcuenca se consideran de peor calidad, empeorando aún más su estado en la época de transición seca lluviosa, en comparación a la época seca. Esto es preocupante pues el agua de esta microcuenca se utiliza para una planta de tratamiento de agua para consumo humano para diversos cantones, como Goicoechea, Montes de Oca, Curridabat y parte de San José, ubicándose la zona de captación de agua específicamente entre los puntos de recolección 2 y 3. La tendencia anterior sigue un comportamiento esperable, pues se ha evidenciado que los contaminantes en las aguas suelen aumentar conforme se disminuye en altitud, acercándose a zonas más urbanizadas e industrializadas (Leandro et al., 2010). Así mismo, el aumento de estos al estar en época de transición seca lluviosa puede deberse a un leve incremento en precipitaciones, donde la escorrentía se asocia con un mayor arrastre de contaminantes a los ríos (Leandro et al., 2010; Morales Mora, 2018).

Según los resultados obtenidos, particularmente para la época de transición, se puede apreciar una ligera tendencia en donde en el punto más bajo de la microcuenca se presentan valores mayores de NMP/100 mL tanto para coliformes fecales como para *E. coli* (**figura 4**). Lo anterior corresponde con lo esperado, pues comúnmente los indicadores de contaminación de las aguas suelen aumentar conforme disminuye la altitud en los diferentes puntos de una cuenca, asociado a la presencia de asentamientos humanos y su relación con la actividad antropogénica; tal como lo plantean Leandro et al. (2010) quienes evaluaron la calidad del agua de la microcuenca IV del río Virilla, obteniendo una tendencia creciente en parámetros asociados a la contaminación de las aguas, tales como sólidos totales y turbiedad, al disminuir la altitud.

No obstante, a pesar de obtenerse mayores valores de coliformes fecales y *Escherichia coli* en el punto más bajo de la cuenca, los resultados obtenidos para los diferentes puntos no

concuerdan del todo con la tendencia mencionada anteriormente, esto pues, los menores valores se presentaron en el punto medio de la microcuenca, y no en el punto más alto como era de esperarse. Este hecho podría verse influenciado por diversos factores propios de la microcuenca que afectan este punto particularmente, los cuales deberían ser analizados. Por ejemplo, en caso de que se presentase alguna descarga de desinfectantes al río, como alguna tubería de drenaje u otros, podría verse afectados los coliformes fecales y *E. coli*, pues si en el punto medio de la microcuenca justo se tuviera ingreso de alguna sustancia con actividad microbiocida, se verían disminuidas ambas poblaciones al enfrentarse a una mayor concentración de este agente adverso, el cual al diluirse conforme avanza por la microcuenca no presentaría los mismos efectos en el punto más bajo de la misma. Análogamente, en caso de presentarse afluentes cercanas a este punto de muestreo se podría tener un efecto dilucional sobre estos parámetros microbiológicos, de manera que, afectaría la observación del patrón esperado (Leandro et al., 2010). Además, cabe mencionar que al momento de realizar el muestro, en el punto medio se observó un menor caudal aparente en comparación con los otros dos puntos, lo cual podría afectar en la distribución de las bacterias en este punto y en su recuperación a partir de las muestras.

Estudios anteriores, realizados entre febrero de 2017 y marzo de 2018, evidencian una media para coliformes fecales y *E. coli* de 2400 NMP/100 mL y 1700 NMP/100 mL respectivamente para el punto más bajo de la microcuenca del río Durazno (Morales et al., 2019; Morales-Mora et al., 2022); datos que representan niveles menores al compararlos con el presente estudio. Esto sugiere que durante el tiempo transcurrido entre ambos análisis se ha deteriorado la calidad del agua en esta microcuenca; lo cual podría implicar que no se han tomado medidas para un control adecuado sobre el vertido de aguas residuales e incluso podría significar mayores descargas difusas de residuos líquidos al cuerpo de agua.

Con relación al tamizaje inicial realizado en CMH suplementado con los antibióticos (**tabla 4**), es posible observar que en la época de transición seca-lluviosa se obtuvo un mayor crecimiento de *E. coli* potencialmente resistente a cefotaxima, en comparación con la época seca; mientras que, en el caso del medio adicionado con tetraciclina se presentaron resultados semejantes en ambas épocas, siendo la cantidad de tubos con crecimiento levemente mayor para la época de transición. Además, se obtuvo un mayor crecimiento de *E. coli* potencialmente resistente a tetraciclina que a cefotaxima; lo cual podría asociarse con un

aplicación más amplia de la tetraciclina en la ganadería, donde estas se encuentran dentro de los antibióticos más utilizados por los productores ganaderos (Trujillo Pillajo, 2019). Lo anterior se podría relacionar particularmente con las actividades agropecuarias que se desarrollan en la zona, pues se sabe que uno de los principales usos del suelo corresponde al pastoreo (Morales Mora, 2018).

Para el crecimiento obtenido en agar MacConkey y agar Levine, y su posterior confirmación de la presencia de *E. coli* mediante el análisis del gen *16S rRNA*, es interesante resaltar el resultado presentado por el aislamiento correspondiente a la muestra 9, el cual evidenció ser lactosa negativa. Lo anterior, difiere de lo esperado, pues *E. coli* suele poseer la capacidad de utilizar la lactosa, resultado que sí se presentó en los demás aislamientos analizados. Sin embargo, a pesar de no obtenerse el resultado esperado para el crecimiento en los medios selectivos y diferenciales, sí se detectó el gen *16S rRNA* de *E. coli* en este aislamiento. Este tipo de resultado, a pesar de no ser frecuente, tampoco se considera sumamente extraño, pues se describe que *E. coli* tiene un porcentaje de positividad para la fermentación de la lactosa del 95%, por lo cual el otro 5% refleja la posibilidad de encontrar aislamientos de *E. coli* no fermentadoras de lactosa (Rodríguez-Angeles, 2002).

Por otra parte, existe un patotipo de *E. coli* que se caracteriza por ser lactosa negativa, este corresponde a *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (Rodríguez-Angeles, 2002). Esta bacteria genera una invasión inflamatoria de la mucosa intestinal, ocasionando un cuadro de disentería similar al que se presenta en una shigelosis, el cual se manifiesta como una diarrea aguda sanguinolenta con malestar general, dolor abdominal, fiebre y cefalea (Carroll et al., 2016). Por lo tanto, el encontrar esta cepa lactosa negativa y comprobar que se trataba de una *E. coli* mediante el análisis del gen *16S rRNA*, podría sugerir la eventual presencia de patotipos de *E. coli*, particularmente de EIEC, quien al ser un posible agente causal de diarrea resalta un riesgo para la salud pública al emplear esta fuente de agua para diversas actividades (Romeu Alvarez et al., 2019). Sin embargo, esto es poco probable, dado que en estudios realizados a partir de muestras recolectadas en afluentes y efluentes de PTARs de la GAM no se detectaron los genes de virulencia referentes a EIEC (Chacón-Jiménez et al., 2022).

Con respecto al perfil fenotípico de resistencia, 16 de las 18 muestras mostraron resistencia ante al menos uno de los antibióticos analizados (**tabla 5**). La mayoría de los aislamientos de *E. coli* presentaron resistencia ante tetraciclina, obteniéndose un fenotipo

resistente en el 78% de los casos. Seguido, los antibióticos ante los cuales se presentó un mayor porcentaje de resistencia corresponden a cefalotina con un 67% y ampicilina y amoxicilina, ambos con un 61%. En contraposición, no se obtuvo ninguna muestra con un perfil resistente para imipenem y meropenem (**figura 5**). De esta manera, se observa una alta prevalencia de resistencia ante tetraciclina y betalactámicos en esta microcuenca.

Al analizar el porcentaje de muestras que presentaron resistencia ante los diversos antibióticos según la altura del punto de muestreo (**figura 6**), es posible observar que en el punto más bajo de la microcuenca se presentan mayores porcentajes de resistencia para tetraciclina y betalactámicos; viéndose particularmente una tendencia para la cefalotina de aumento de resistencia conforme se disminuye en altura. Es importante resaltar que, al tratarse de comunidades presentes en estos ambientes acuáticos se puede ver como conforme se disminuye la altitud de los puntos, hay incremento tanto en las poblaciones bacterianas como en la resistencia a antimicrobianos. En el caso de otros antibióticos ante los cuales se obtuvieron porcentajes menores de resistencia, como amikacina y gentamicina, no es posible apreciar tendencia alguna en los puntos muestreados. Esto podría explicarse por el bajo número de muestras, así como baja prevalencia de resistencia ante estos antibióticos en esta microcuenca.

Por otra parte, al analizar la cantidad de aislamientos que presentan un fenotipo resistente ante diversas categorías de antibióticos (**figura 7**), se observó que la mayoría resultaron resistentes ante al menos 1 categoría. Adicionalmente, 7 aislamientos fueron resistentes ante al menos 1 agente de 3 categorías o más. Por lo tanto, el 39% de los aislamientos se consideran MDR según lo definido por Magiorakos et al. (2012). De la mano con esto, el encontrar aislamientos de *E. coli* MDR en aguas superficiales de esta microcuenca es de gran relevancia. Esto debido a que, por tratarse de aguas que podrían utilizarse en diversas actividades humanas, tales como agricultura, ganadería o incluso en sistemas de captación para abastecimiento de agua, representa un riesgo como posible fuente de una infección (Morales et al., 2019). Las mismas, podrían ser causadas por alguna *E. coli* patogénica multirresistente o inclusive de alguna otra bacteria patógena que adquiriera por transferencia horizontal ciertos genes que le confieran el fenotipo MDR, provocando así cuadros infecciosos difíciles de tratar con los antibióticos disponibles en el mercado. Además, estos

cuerpos de agua actúan como reservorios de determinantes de resistencia y propician su diseminación en el ambiente.

Para la mayoría de los genes analizados, el mayor porcentaje de aislamientos de *E. coli* que presentaron el gen corresponden a las del punto más bajo de la microcuenca (**figura 9**). Esto es de especial relevancia en el caso del gen *intl-1* (integrasa del integrón de clase 1), donde se puede observar una tendencia en la que se incrementa la presencia de este gen conforme disminuye la altura del punto de muestreo. *intl-1* se ha relacionado con la presencia de contaminantes asociados a antibióticos en cuerpos de agua, evidenciándose una asociación entre su detección y el grado de presión antropogénica presente en el área. Este gen es considerado un biomarcador al analizar su presencia en muestras ambientales, pues forma parte de los integrones de clase 1 que se caracterizan por otorgar resistencia a diversos antibióticos, desinfectantes y metales pesados; además de que puede variar rápidamente ante presiones ambientales, y puede transferirse entre bacterias debido a su frecuente localización en elementos móviles (Cano Larrotta, 2019).

Con base en lo anterior, el alto porcentaje de muestras que fueron positivas para el gen *intl-1* (83%) es preocupante (**figura 8**), pues correlaciona con un alto grado de contaminación antropogénica de estas aguas superficiales, dado principalmente por la presencia de antibióticos en estas fuentes de agua. Además, es muy importante considerar que al ser este gen parte de un integrón móvil, se relaciona con mecanismos THG de resistencia, pudiendo ser una fuente de transferencia de resistencia ante diversos agentes antimicrobianos hacia patógenos que habitan en las mismas fuentes de agua (Cano Larrotta, 2019). Cabe destacar que, no se encontraron referencias previas sobre la detección de *intl-1* en aguas superficiales en Costa Rica.

Por otro lado, relacionado a la resistencia a tetraciclina, en un estudio realizado por Ramírez Bayard (2016) sobre el análisis de genes de resistencia a tetraciclina en *E. coli* proveniente de muestras tanto ambientales como humanas de Panamá, se detectó resistencia a tetraciclina en el 62.9% de las muestras analizadas, porcentaje relativamente similar a lo que se obtuvo en este caso para la microcuenca del río Durazno. Además, se encontró con mayor frecuencia la presencia del gen *tet(A)* sobre el *tet(B)*, lo cual concuerda con lo obtenido para esta microcuenca, presentándose un 50% de positividad par *tet(A)* y un 28% para *tet(B)* (**figura 8**).

En cuanto a la detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), se observó una predominancia de *bla*<sub>TEM</sub>, positivo en el 33% de las muestras totales (**figura 8**) y en el 58% de las muestras con resistencia a cefalosporinas. Esto va de la mano con lo reportado hace algunos años, donde estudios realizados en Suecia, Uruguay y Perú evidenciaron en muestras humanas una preponderancia de *bla*<sub>TEM</sub> sobre *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>OXA</sub>, tanto en cepas comensales de *E. coli* como en cepas diarreogénicas (Mosquito et al., 2011). Los hallazgos en muestras provenientes de personas tienen gran relevancia, pues como se sabe la descarga de aguas residuales que contienen materia fecal humana es una de las principales fuentes de contaminación bacteriana en ríos; de manera que, cepas con determinantes genéticos de resistencia como estas pueden funcionar como diseminadoras en ambientes acuáticos (Leandro et al., 2010; Mena-Rivera et al., 2018).

Además, en un análisis realizado a una cepa de *E. coli* recuperada de una PTAR en Alajuela, Costa Rica, se detectaron diversos genes de resistencia a antibióticos, dentro de los que sobresalen *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>; siendo estos dos concordantes con aquellos que presentaron mayor frecuencia dentro de las BLEEs identificadas en los aislamientos de *E. coli* provenientes de la microcuenca del río Durazno en el presente estudio (Barrantes Jiménez et al., 2020). Esto se asocia a su vez con el hecho de que las PTARs se consideran una de las principales fuentes antropogénicas de liberación de antibióticos hacia el ambiente (Martí et al., 2014). Lo cual, sumado a tratamientos deficientes de las aguas, no diseñados para la eliminación efectiva de antibióticos y microorganismos, ocasionan la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos junto con sus genes de resistencia a otros cuerpos de agua naturales (Momtaz et al., 2012).

Es importante resaltar que, en algunos casos a pesar de obtener un fenotipo resistente no se detectó un perfil genotípico asociado. Específicamente, para el aislamiento 13 se observó un perfil resistente ante tetraciclina, pero no se obtuvieron resultados positivos para los genes conocidos por otorgar resistencia ante este antibiótico, como lo son *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)*. De manera análoga, el aislamiento 16 mostró resistencia ante cefotaxima sin evidenciar la presencia de BLEEs codificadas por los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>OXA</sub> (**tabla 5**). Lo anterior, podría deberse a la presencia de otros determinantes genéticos de resistencia que no fueron analizados en este estudio. Dentro de estas, se encuentran genes como *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(I)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(X)* y *tet(Y)*, entre otros, los cuales se han descrito asociados a

resistencia ante tetraciclina. Así mismo, para el caso de las cefalosporinas, se han descrito genes de BLEEs como, *bla<sub>CARB</sub>* y *bla<sub>GES</sub>*, entre otros, que conforman uno de los principales mecanismos de resistencia contra este grupo (Mosquito et al., 2011). Además, es importante mencionar que pueden existir variantes de estos genes, o inclusive genes diferentes, que aún no se han descrito, por lo que en estos casos sería necesario utilizar herramientas como secuenciación para realizar su identificación y caracterización (Marcos-Carbajal et al., 2021).

## Conclusiones

En primer lugar, la población de coliformes fecales presente en las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno se encuentra conformada en su mayoría por *Escherichia coli*. Los valores detectados para ambos parámetros no evidenciaron un cambio significativo a través del tiempo transcurrido entre la época seca y la época de transición seca lluviosa, ni entre los diferentes puntos de muestreo. Según el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Aguas Superficiales (Decreto N° 33903) y el número de coliformes fecales obtenido, las aguas del punto más bajo de esta microcuenca en su mayoría se consideran de mala calidad y no son aptas para el abastecimiento de agua para uso y consumo humano, ni siquiera posterior a la realización de algún tratamiento de estas. Además, se observó un aumento en los niveles de coliformes fecales y *E. coli* en el punto más bajo de la microcuenca en comparación con estudios anteriores realizados entre 2017 y 2018. Esto es relevante, debido a que *E. coli* es un indicador de contaminación fecal; por lo que, a partir de estos datos se concluye que no existe un adecuado control sobre el vertido de aguas residuales en esta microcuenca o sobre la disposición de las heces del ganado ubicado cerca de la misma; y más bien los niveles de contaminación presentan una tendencia de aumento. Lo anterior, incide en que un alto contenido de materia fecal llegue a las aguas superficiales de la microcuenca del río Durazno, lo cual es alarmante dado que se utiliza como captación superficial para la planta de tratamiento de agua para consumo humano en los cantones de Goicoechea, Montes de Oca, Curridabat y parte de San José, y la zona de captación se ubica hacia la parte baja de la microcuenca.

En segundo lugar, en este trabajo se detectaron aislamientos de *E. coli* resistentes a tetraciclina y/o cefotaxima, además de identificar los genes asociados a esa resistencia. Más

aún, se encontraron aislamientos de *E. coli* con fenotipos multirresistentes (MDR), siendo el caso más severo resistente ante agentes antimicrobianos de 6 categorías distintas. Se observó un mayor porcentaje de resistencia a tetraciclina que a cefotaxima; donde la mayoría de los aislamientos de *E. coli* fueron resistentes a este y presentaron al menos un gen asociado a resistencia contra tetraciclina, representado mayormente por el *tet(A)*. No obstante, la resistencia observada contra cefotaxima no es despreciable, y se encuentra en un número alto de los aislamientos de *E. coli*, cuyo gen asociado corresponde en su mayoría a *bla<sub>CTX-M</sub>*, quien codifica por una betalactamasa de espectro extendido (BLEEs). Cabe destacar que, en algunas muestras se evidenció un fenotipo resistente pero no se detectó un perfil genotípico de resistencia asociada, por lo que se sugiere realizar más estudios para identificar los determinantes genéticos asociados que circulan en la microcuenca.

En línea con lo anterior, se evidenció propensión a un aumento de la resistencia a los antibióticos en el punto más bajo de la microcuenca en algunos casos, tanto asociado a los perfiles fenotípicos como a los genotípicos. Sin embargo, esto no se cumple para todos los antibióticos analizados, dado que, para aquellos en los que no se presentó un número alto de aislamientos resistentes no fue posible analizar si se exhibía alguna proclividad. Por esto, se recomienda para futuros estudios trabajar con un número mayor de muestras, de manera que, se puedan identificar mayor cantidad de patrones y a su vez permitan mejorar la potencia estadística de los análisis realizados.

En tercer lugar, asociado a los perfiles genotípicos detectados, se observó una mayor prevalencia de los genes *tet(A)*, *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>* implicados en resistencia ante tetraciclina, betalactámicos y cefotaxima respectivamente. Lo cual, es concordante con resultados descritos en estudios previos relacionados a la circulación de estos determinantes genéticos en cuerpos de agua.

En último lugar, se observó un alto grado de contaminación antropogénica en esta microcuenca, evidenciado por el biomarcador genético *intl-1*, quien implica una alta presencia de contaminantes asociados a antibióticos en cuerpos de agua. Por lo anterior, se deduce la necesidad de un programa de educación y control sobre el uso de antibióticos en la zona y/o su descarte; además de una mejora en la distribución de residuos, tanto sólidos como de aguas residuales. Pues la llegada de los antibióticos a los ríos se ve influenciada por mala disposición de estos tras un tratamiento no finalizado o la excreción de estos en heces tanto

humanas, que terminan en los ríos a través de un inadecuado acomodo de aguas residuales, o animales, particularmente por un uso excesivo de los antibióticos en la ganadería.

Por tanto, se comprobó la hipótesis planteada, afirmando que existen fenotipos de *E coli* resistentes a tetraciclina y cefotaxima en muestras de agua superficial de la microcuenca del río Durazno en Vázquez de Coronado, San José; lo cual, es muy preocupante, pues es una problemática potenciada por acciones humanas, que han llevado a la presencia no solo de bacterias resistentes a antibióticos, sino MDR, en aguas superficiales. Estas bacterias eventualmente pueden por medio de mecanismos como la transferencia horizontal de genes compartir estos determinantes genéticos con bacterias más virulentas; y en consecuencia, dado que el agua de esta microcuenca se utiliza como captación superficial para una planta de tratamiento de agua para consumo humano, o mediante la presencia de tomas para el uso de estas aguas con fines de riego en agricultura, estas bacterias podrían llegar a ser las causantes de infecciones y debido a su alta resistencia ante antimicrobianos, se contaría con terapias muy limitadas y/o con fuertes efectos de toxicidad.

## Bibliografía

- Aarestrup, F. M. (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96(4), 271-281.
- Alonso Fernández, B. (2019). *Bacteriemia relacionada con el catéter y neumonía asociada a ventilación mecánica: Nuevas estrategias de erradicación del biofilm* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/56658/>
- Arce-Villalobos, K., Sánchez-Gutiérrez, R., Centeno-Morales, J., Marín-León, R., & Rodríguez-Rodríguez, J. A. (2022). Calidad del agua superficial y presiones socioambientales en la microcuenca alta del río Poás. *Uniciencia*, 36(1), 382-404. <https://doi.org/10.15359/ru.36-1.24>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645-1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L. M., Morales Mora, E., & Ramírez Carvajal, L. (2020). Draft Genome Sequence of an *Escherichia coli* Strain Harboring *bla*<sub>CTX-M-115</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, Aminoglycoside, Tetracycline, and Sulfonamide Resistance Genes, Isolated from a Costa Rican Wastewater Treatment Plant. *Microbiology Resource Announcements*, 9(1), 1-3. <https://doi.org/10.1128/MRA.01015-19>
- Barrantes Jiménez, K., McCoy, C. B., & Achí, R. (2010). Detection of *Shigella* in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 993-1000.

- Barrantes, K., Chacón, L., Solano, M., & Achí, R. (2014). Class 1 integrase and genetic cassettes *bla<sub>OXA</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* among multi-drug resistant *Shigella* isolates in Costa Rica. *International Journal of Biological Sciences and Applications*, 1, 24-27.
- Biyela, P. T., Lin, J., & Bezuidenhout, C. C. (2004). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Water Science and Technology*, 50(1), 45-50. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0014>
- Calvo Brenes, G. de J. (2013). *Modelo de predicción de la calidad del agua en ríos basado en índices e indicadores del recurso hídrico y el entorno socio ambiental*. [Tesis Doctoral, Universidad Estatal a Distancia]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/3928>
- Cambray, G., Guerout, A.-M., & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44, 141-166.
- Cano Larrotta, A. M. J. C. (2019). *Detección de genes bacterianos como Biomarcadores moleculares asociados a la contaminación antropogénica de un cuerpo de agua superficial* [Grado]. Universidad de Santander.
- Carmona Jerez, M. (2022). *Inhibidores de bombas de eflujo: Nueva estrategia frente a la resistencia a los antibióticos*.
- Carroll, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Mieller, S., Hobden, Jeffery A., Detrick, Barbara, Mitchell, Thomas G., McKerrow, James H., & Sakanari, Judy A. (2016). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick & Adelberg* (27.<sup>a</sup> ed.). McGraw Hill.
- Cavalieri, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., Sharp, S. E., & Spiegel, C. A. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Seattle: University of Washington.

- Chacón J., L. M., Taylor C., L., Valiente A., C., Alvarado P., I., & Cortés B., X. (2012). A DNA pooling based system to detect *Escherichia coli* virulence factors in fecal and wastewater samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1319-1326.
- Chacón-Jiménez, L., Hall Loría, K., Rivera Navarro, P. C., Reyes Lizano, L., Achí Araya, R., & Barrantes Jiménez, K. (2022). Circulación de genes de virulencia asociados a *Escherichia coli* diarrogénica en aguas residuales del Gran Área Metropolitana de Costa Rica. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2), 330-354. <https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.48037>
- Chow, L. K. M., Ghaly, T. M., & Gillings, M. R. (2021). A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.05.030>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- De los Santos Silva, E. (2019). *Estudio de la compatibilidad entre el integrón de clase 1 y factores de virulencia de Escherichia coli uropatógeno* [Tesis de grado]. Universidad de la República.
- Decreto N° 33903-MINAE-S. Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales, (2007), Diario Oficial La Gaceta N° 178, 17 de diciembre de 2007.

- Domínguez, D. C., Chacón, L. M., & Wallace, D. (2021). Anthropogenic Activities and the Problem of Antibiotic Resistance in Latin America: A Water Issue. *Water*, 13(2693), Art. 19. <https://doi.org/10.3390/w13192693>
- EUCAST. (2021a). *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*. MIC EUCAST. [https://mic.eucast.org/search/show-registration/2588?back=https://mic.eucast.org/search/?search%255Bmethod%255D%3Dmic%26search%255Bantibiotic%255D%3D38%26search%255Bspecies%255D%3D-1%26search%255Bdisk\\_content%255D%3D-1%26search%255Blimit%255D%3D50](https://mic.eucast.org/search/show-registration/2588?back=https://mic.eucast.org/search/?search%255Bmethod%255D%3Dmic%26search%255Bantibiotic%255D%3D38%26search%255Bspecies%255D%3D-1%26search%255Bdisk_content%255D%3D-1%26search%255Blimit%255D%3D50)
- EUCAST. (2021b). *Antimicrobial wild type distributions of microorganisms*. MIC EUCAST. [https://mic.eucast.org/search/show-registration/3351?back=https://mic.eucast.org/search/?search%255Bmethod%255D%3Dmic%26search%255Bantibiotic%255D%3D183%26search%255Bspecies%255D%3D-1%26search%255Bdisk\\_content%255D%3D-1%26search%255Blimit%255D%3D50](https://mic.eucast.org/search/show-registration/3351?back=https://mic.eucast.org/search/?search%255Bmethod%255D%3Dmic%26search%255Bantibiotic%255D%3D183%26search%255Bspecies%255D%3D-1%26search%255Bdisk_content%255D%3D-1%26search%255Blimit%255D%3D50)
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2009). *Diagnostico Microbiologico de Bailey & Scott* (12a ed.). Ed. Médica Panamericana.
- García-Álvarez, L., & Oteo, J. A. (2010). Efectos no antimicrobianos de las tetraciclinas. *Revista Española de Quimioterapia*, 23(1), 4-11.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLOS Pathogens*, 7(7), e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Haudiquet, M., de Sousa, J. M., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2022). Selfish, promiscuous and sometimes useful: How mobile genetic elements drive horizontal gene transfer in

- microbial populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 377(1861), 20210234. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0234>
- Herrera, J., Rodríguez, S., Rojas, J. F., Herrera, É., & Chaves, M. (2013). Variación temporal y espacial de la calidad de las aguas superficiales en la subcuenca del río Virilla (Costa Rica) entre 2006 y 2010. *Revista de Ciencias Ambientales*, 45(1), 51-62.
- Jesser, K. J., & Levy, K. (2020). Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 33(5), 372-380. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000665>
- Jiang, H., Cheng, H., Liang, Y., Yu, S., Yu, T., Fang, J., & Zhu, C. (2019). Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* Isolates From *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01787>
- Jiménez Cisneros, B. E. (2010). *Soluciones tecnológicas a la contaminación del agua*. En A. Aguilar Ibarra (Eds), *Calidad del Agua: Un enfoque multidisciplinario* (pp. 177-198) (Primera edición). UNAM, Instituto de Investigaciones Económicas.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kern, M. B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N., & Espersen, F. (2002). Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4), 513-516. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf164>

- Khan, F. M., & Gupta, R. (2020). *Escherichia coli* (*E. coli*) as an Indicator of Fecal Contamination in Groundwater: A Review. *Sustainable Development of Water and Environment*, 225-235. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45263-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45263-6_21)
- Leandro, H., Salgado, V., & Coto, J. M. (2010). Calidad del agua de los ríos de la Microcuenca IV del río Virilla. *Uniciencia*, 24(1), 69-74.
- Lee Ventola, C. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis, Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Maguiña-Vargas, C., Ugarte-Gil, C. A., & Montiel, M. (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Médica Peruana*, 23(1), 15-20.
- Marcos-Carbajal, P., Salvatierra, G., Yareta, J., Pino, J., Vásquez, N., Diaz, P., Martínez, I., Asmat, P., Peralta, C., Huamani, C., Briones, A., Ruiz, M., Nicomedes, L., Luque, Á., Arapa, L., & Tsukayama, P. (2021). Caracterización microbiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógenas de hospitales públicos peruanos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 38(1), 119-123.
- Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>

- Martínez Torres, D. (2023). *Caracterización de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Escherichia coli aisladas de humanos y cerdos* [Tesis de grado, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]. <http://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/3190>
- Maynard, C., Fairbrother, J. M., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., Lariviere, S., & Harel, J. (2003). Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3214-3221. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3214-3221.2003>
- Mena-Rivera, L., Vásquez-Bolaños, O., Gómez-Castro, C., Fonseca-Sánchez, A., Rodríguez-Rodríguez, A., & Sánchez-Gutiérrez, R. (2018). Ecosystemic Assessment of Surface Water Quality in the Virilla River: Towards Sanitation Processes in Costa Rica. *Water*, 10(7), Art. 7. <https://doi.org/10.3390/w10070845>
- Mirzaei, A., Nasr Esfahani, B., Raz, A., Ghanadian, M., & Moghim, S. (2021). From the Urinary Catheter to the Prevalence of Three Classes of Integrons,  $\beta$ -Lactamase Genes, and Differences in Antimicrobial Susceptibility of *Proteus mirabilis* and Clonal Relatedness with Rep-PCR. *BioMed Research International*, 2021, 10. <https://doi.org/10.1155/2021/9952769>
- Momtaz, H., Farzan, R., Rahimi, E., Safarpour Dehkordi, F., & Souod, N. (2012). Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/231342>
- Morales, E., Solano, M., Morales, R., Reyes, L., Barrantes, K., Achí, R., & Chacón, L. (2019). Evaluación de la influencia de la estacionalidad climática en calidad del agua

de consumo humano en un sistema de abastecimiento en San José, Costa Rica, periodo 2017-2018. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 28(1), 48-58.

Morales Mora, E. (2018). *Análisis cuantitativo de riesgo microbiológico por Cryptosporidium spp. y Giardia spp. En un sistema de abastecimiento de agua para consumo humano del Gran Área Metropolitana de Costa Rica en el periodo 2017-2018* [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Costa Rica.

Morales-Mora, E., Reyes-Lizano, L., Barrantes-Jiménez, K., & Chacón-Jiménez, L. (2022). Evaluación temporal y espacial en la calidad microbiológica del agua superficial: Caso en un sistema de abastecimiento de agua para consumo humano en Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), Art. 1. <https://doi.org/10.15359/rca.56-1.6>

Morejón García, M., Salup Díaz, R., & Cué Brugueras, M. (2003). Actualización en tetraciclinas. *Revista Cubana de Farmacia*, 37(3), 1-1.

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28(4), 648-656.

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. 4(2), 1-24. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

Ng, L.-K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4), 209-215. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>

Organización Mundial de la Salud. (2001). *Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos*. Organización Mundial de la Salud.

Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M. M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., & Rossolini, G. M. (2003). Multiple CTX-M-type extended-

- spectrum  $\beta$ -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4264-4269.
- Peirano, G., Agersø, Y., Aarestrup, F. M., & dos Prazeres Rodrigues, D. (2005). Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. From Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 301-305. <https://doi.org/10.1093/jac/dki012>
- Pérez, M. A., Peña, M. R., & Alvarez, P. (2011). Agro-industria cañera y uso del agua: Análisis crítico en el contexto de la política de agrocombustibles en Colombia. *Ambiente & Sociedade*, 14, 153-178. <https://doi.org/10.1590/S1414-753X2011000200011>
- Quesada, M. E. (2012). Dinámica territorial en el uso de la tierra y el régimen hidrológico: Región central, Costa Rica. *Espacio y Desarrollo*, 24, 45-56.
- Ramírez Bayard, I. E. (2016). *Detección molecular de genes de resistencia a tetraciclina en ADN plasmídico de Escherichia coli en muestras ambientales y humanas de Panamá* [Masters, Universidad de Panamá.]. <http://up-rid.up.ac.pa/165/>
- Ramírez-Morales, D., Masís-Mora, M., Montiel-Mora, J. R., Cambronero-Heinrichs, J. C., Pérez-Rojas, G., Tormo-Budowski, R., Méndez-Rivera, M., Briceño-Guevara, S., Gutiérrez-Quirós, J. A., Arias-Mora, V., Brenes-Alfaro, L., Beita-Sandí, W., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2021). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in water samples by liquid chromatography- mass spectrometry: Quality assessment and application to the risk assessment of urban-influenced surface waters in a metropolitan area of Central America. *Process Safety and Environmental Protection*, 153, 289-300. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.07.025>

- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rice, E. W., Baird, R. B., & Eaton, A. D. (2017). *Standard Methods for Examination water and wastewater* (23.<sup>a</sup> ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M. del M., López Ureña, D., Quesada Gómez, C., & Rodríguez Sánchez, C. (2016). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio* (Segunda edición). Editorial UCR.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44, 464-475. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011>
- Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Martí, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Barceló, D., & Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Romeu Alvarez, B., Bello González, A. C., Lugo Moya, D., & Larrea Murrell, J. A. (2019). Perfiles bioquímicos atípicos de cepas de *Escherichia coli* de origen ambiental mediante el empleo del sistema Entero Well D–One. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 7(2), 1-8.
- Ryan, K. J., Ahmad, N., Reller, L. B., Alspaugh, J. A., Reller, M. E., Drew, W. L., Sterling, C. R., Lagunoff, M., Weissman, S., & Pottinger, P. (2018). *Sherri's: Medical Microbiology* (7.<sup>a</sup> ed.). McGraw Hill.

- Scott, G. I., Porter, D. E., Norman, R. S., Scott, C. H., Uyaguari-Diaz, M. I., Maruya, K. A., Weisberg, S. B., Fulton, M. H., Wirth, E. F., Moore, J., Pennington, P. L., Schlenk, D., Cobb, G. P., & Denslow, N. D. (2016). Antibiotics as CECs: An Overview of the Hazards Posed by Antibiotics and Antibiotic Resistance. *Frontiers in Marine Science*, 3(24). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2016.00024>
- Spongberg, A. L., Witter, J. D., Acuña, J., Vargas, J., Murillo, M., Umaña, G., Gómez, E., & Perez, G. (2011). Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. *Water Research*, 45(20), 6709-6717. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.004>
- Torres, A. G., Arenas-Hernández, M. M., & Martínez-Laguna, Y. (2010). Overview of *Escherichia coli*. *Pathogenic Escherichia coli in latin America*, 1-7.
- Tribunal Ambiental Administrativo. (2014). *Manual de buenas prácticas ambientales marino costeras en Costa Rica*.
- Trujillo Pillajo, A. C. (2019). *Identificación de factores que predisponen el uso de antibióticos en la producción ganadera bovina* [Tesis de grado, Universidad Central de Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/18005>
- Valcárcel Rojas, L., Borroto Portela, J., Alberro Macías, N., Griffith Martínez, J., Derivet Zarzabal, M., Flores Juan, P., Cuesta Borges, J., Rodríguez González, M., Herrero, Z., Rodríguez Garcez, A., & Domínguez Catasus, J. (2010). Modelación de la calidad del agua en el segmento medio del río Luyanó. *Nucleus*, 47, 16-23.
- Venegas González, D. A., Morales Mora, E., Barrantes Jiménez, K., Gómez Ramírez, E., Fuentes Schweizer, P., & Irías Mata, A. P. (2023). Contaminación del agua del río Durazno, Costa Rica: Más allá del índice holandés de calidad del agua. *Cuadernos de Investigación UNED*, Vol.15(1), pp. 1-12. <https://doi.org/10.22458/urj.v15i1.4339>

- Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(2), 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>
- Volz Lopes, G., Pissetti, C., da Cruz Payao Pellegrini, D., Da Silva, L. E., & Cardoso, M. (2015). Resistance phenotypes and genotypes of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* isolates from feed, pigs, and carcasses in Brazil. *Journal of Food Protection*, 78(2), 407-413. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-274>
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., & Costanzo, S. D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment*, 407(8), 2711-2723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>
- Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Leung, K. M. Y., Lai, R. W. S., Galbán-Malagón, C., Adell, A. D., Mondon, J., Metian, M., Marchant, R. A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Cara, M., Moermond, M., Luarte, T., ... Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8), e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>
- Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., & Jensen, L. B. (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47>
- Yucailla Baltazar, D. E. (2019). *Evaluación del uso de antibióticos betalactámicos en el Servicio de Hospitalización del Hospital General Andino en el periodo Enero 2017*

*a Julio de 2018*. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/13073>

Zhang, A. N., Li, L.-G., Ma, L., Gillings, M. R., Tiedje, J. M., & Zhang, T. (2018). Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class 1 integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection. *Microbiome*, 6(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0516-2>

Zhang, S., Yang, H., Rehman, M. U., Yang, K., Dong, M., Yang, J., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Liu, M., Zhu, D., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, L., Liu, Y., Yu, Y., Tian, B., Pan, L., ... Cheng, A. (2019). Class 1 integrons as predominant carriers in *Escherichia coli* isolates from waterfowls in Hainan, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183, 109514. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109514>

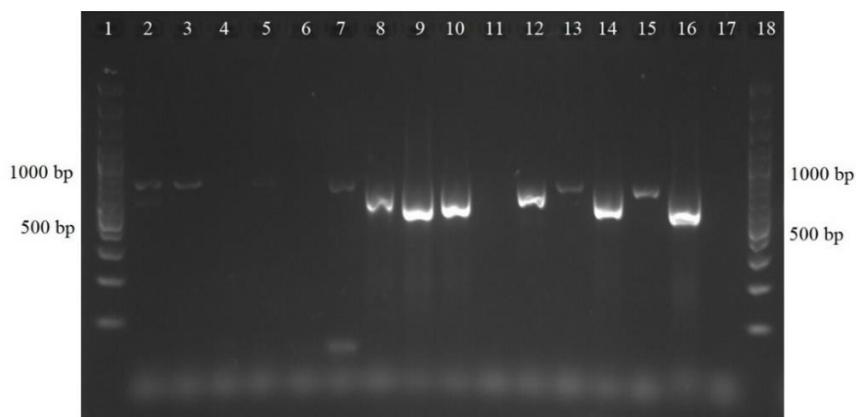
## Anexos

**Anexo 1.** Resultados de los geles de agarosa obtenidos por electroforesis para cada uno de los genes asociados a resistencia a antibióticos.



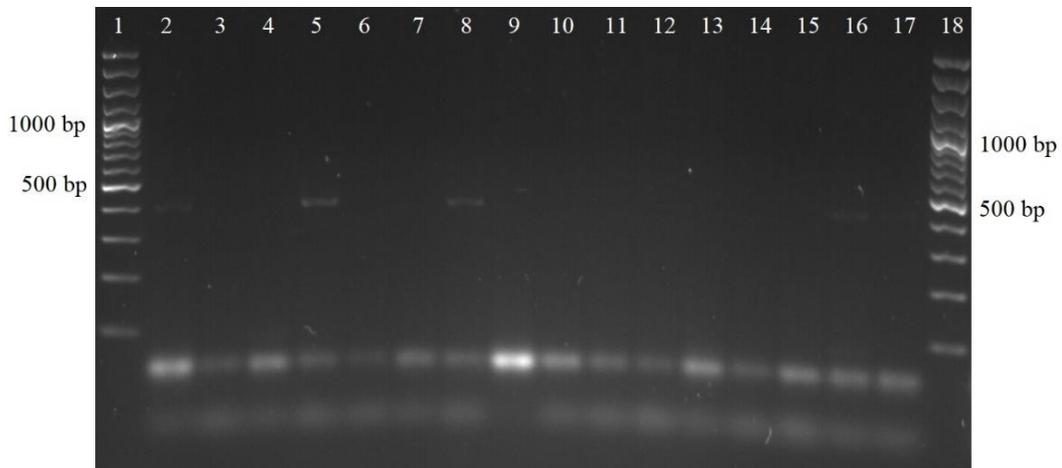
Nota= Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 3, 4) Muestra 5, 5) Muestra 6, 6) Muestra 7, 7) Muestra 8, 8) Muestra 9, 9) Muestra 10, 10) Muestra 11, 11) Muestra 13, 12) Muestra 14, 13) Muestra 15, 14) Muestra 17, 15) Muestra 18, 16) Control blanco, 17) Control positivo (*E. coli* 1539-1), 18) Marcador de peso molecular.

**Figura 10.** Amplicones del PCR para el gen *tet(A)*, en geles de agarosa al 2%.



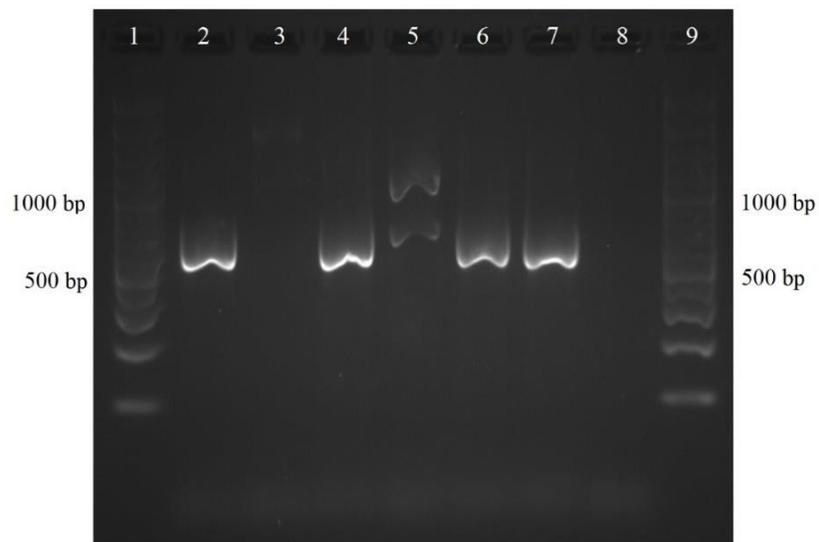
Nota= Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 3, 4) Muestra 5, 5) Muestra 6, 6) Muestra 7, 7) Muestra 8, 8) Muestra 9, 9) Muestra 10, 10) Muestra 11, 11) Muestra 13, 12) Muestra 14, 13) Muestra 15, 14) Muestra 17, 15) Muestra 18, 16) Control positivo (*E. coli* 973-2), 17) Control blanco, 18) Marcador de peso molecular.

**Figura 11.** Amplicones del PCR para el gen *tet(B)*, en geles de agarosa al 2%.



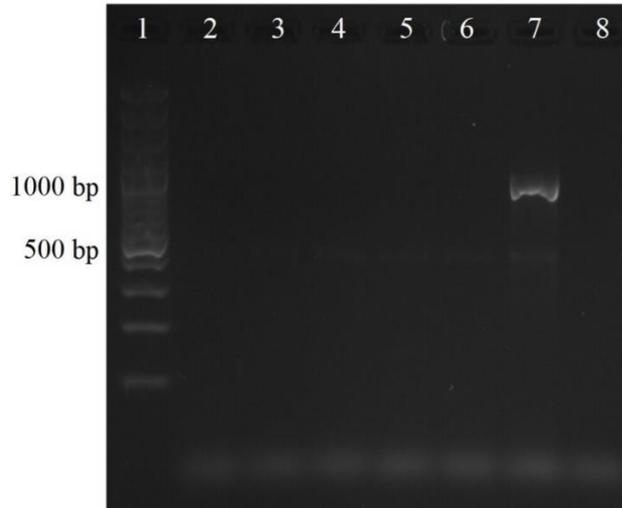
Nota= Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 3, 4) Muestra 5, 5) Muestra 6, 6) Muestra 7, 7) Muestra 8, 8) Muestra 9, 9) Muestra 10, 10) Muestra 11, 11) Muestra 13, 12) Muestra 14, 13) Muestra 15, 14) Muestra 17, 15) Muestra 18, 16) Control positivo (*E. coli* 1539-1), 17) Control blanco, 18) Marcador de peso molecular.

**Figura 12.** Amplicones del PCR para el gen *tet(C)*, en geles de agarosa al 2%.



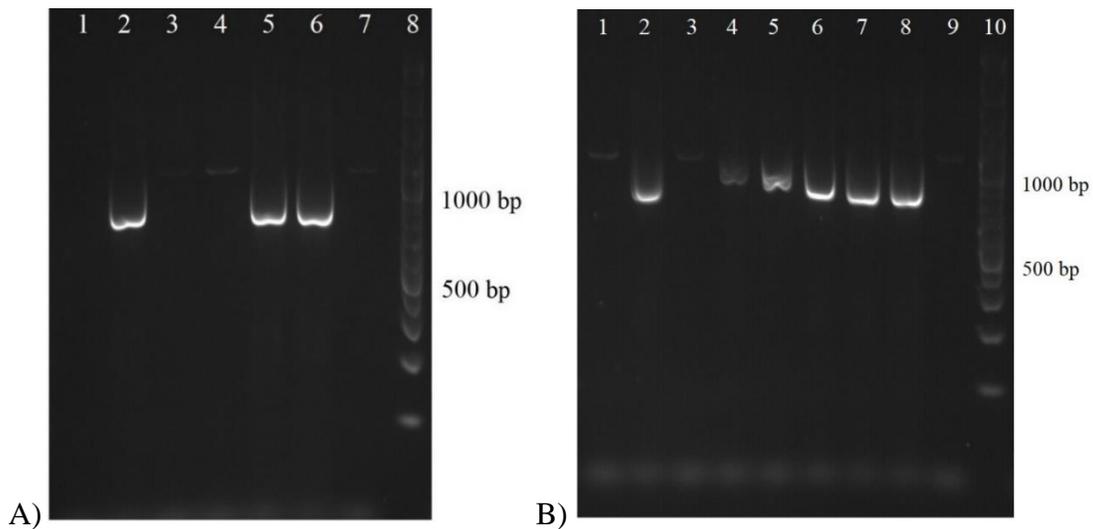
Nota= Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 10, 4) Muestra 12, 5) Muestra 16, 6) Muestra 18, 7) Control positivo (*E. coli* 431-1), 8) Control blanco, 9) Marcador de peso molecular.

**Figura 13.** Amplicones del PCR para el gen *bla<sub>CTX-M</sub>*, en geles de agarosa al 2%.



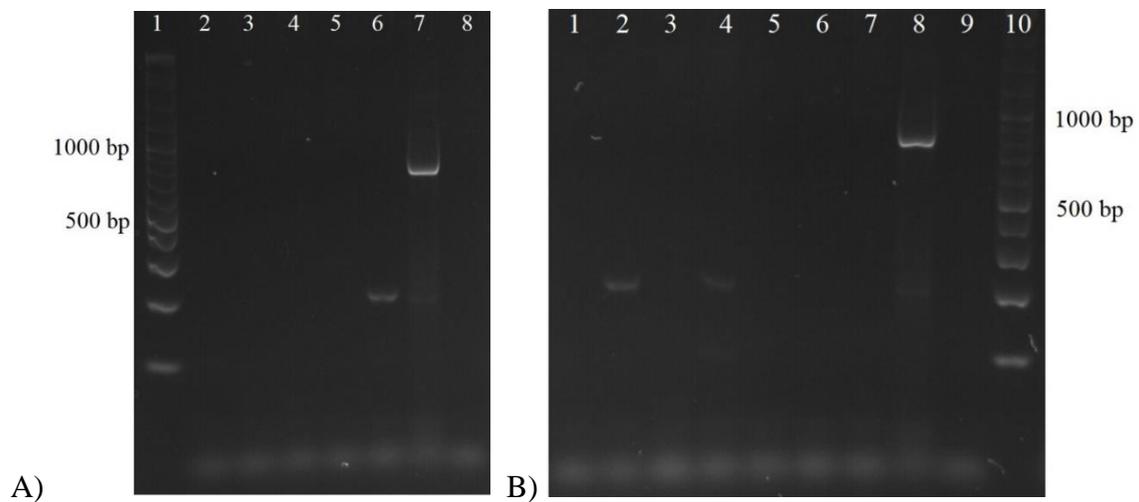
Nota= Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 10, 4) Muestra 12, 5) Muestra 16, 6) Muestra 18, 7) Control positivo (*Klebsiella pneumoniae* 569-1), 8) Control blanco.

**Figura 14.** Amplicones del PCR para el gen *bla<sub>SHV</sub>*, en geles de agarosa al 2%.



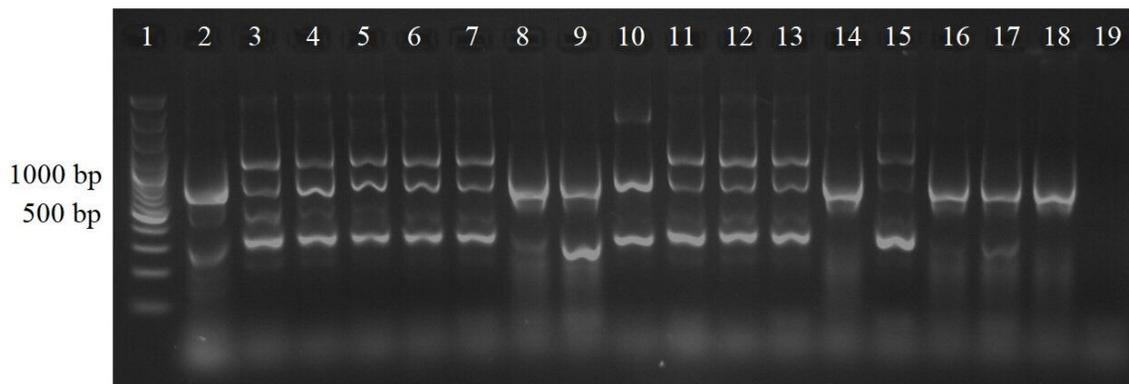
Nota= A) Cepas resistentes a cefotaxima. Carriles: 1) Muestra 1, 2) Muestra 10, 3) Muestra 12, 4) Muestra 16, 5) Muestra 18, 6) Control positivo (*E. coli* 973-2), 7) Control negativo, 8) Marcador de peso molecular. B) Cepas resistentes a otras cefalosporinas o penicilinas. Carriles: 1) Muestra 3, 2) Muestra 5, 3) Muestra 8, 4) Muestra 9, 5) Muestra 11, 6) Muestra 14, 7) Muestra 15, 8) Control positivo (*E. coli* 973-2), 9) Control blanco, 10) Marcador de peso molecular.

**Figura 15.** Amplicones del PCR para el gen *bla<sub>TEM</sub>*, en geles de agarosa al 2%.



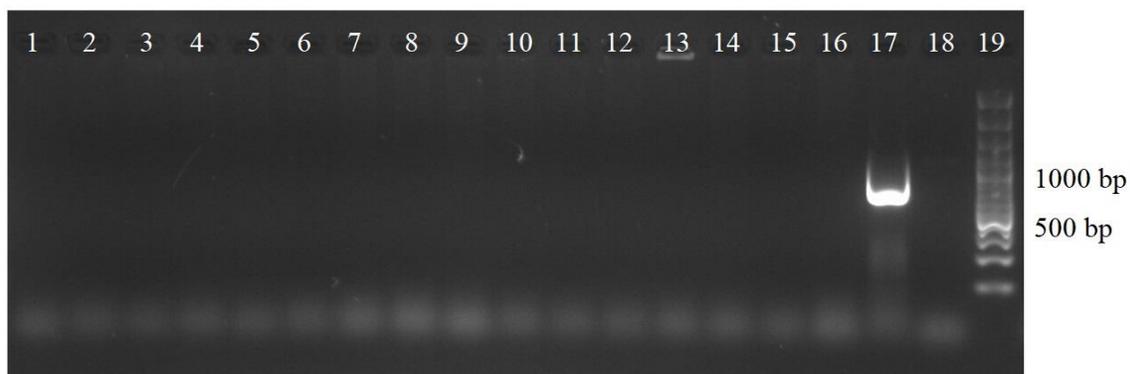
Nota= A) Cepas resistentes a cefotaxima. Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 10, 4) Muestra 12, 5) Muestra 16, 6) Muestra 18, 7) Control positivo (*Shigella flexneri* 84.490-2 / INISA 03), 8) Control negativo. B) Cepas resistentes a otras cefalosporinas o penicilinas. Carriles: 1) Muestra 3, 2) Muestra 5, 3) Muestra 8, 4) Muestra 9, 5) Muestra 11, 6) Muestra 14, 7) Muestra 15, 8) Control positivo (*Shigella flexneri* 84.490-2 / INISA 03), 9) Control blanco, 10) Marcador de peso molecular.

**Figura 16.** Amplicones del PCR para el gen *bla<sub>OXA</sub>*, en geles de agarosa al 2%.



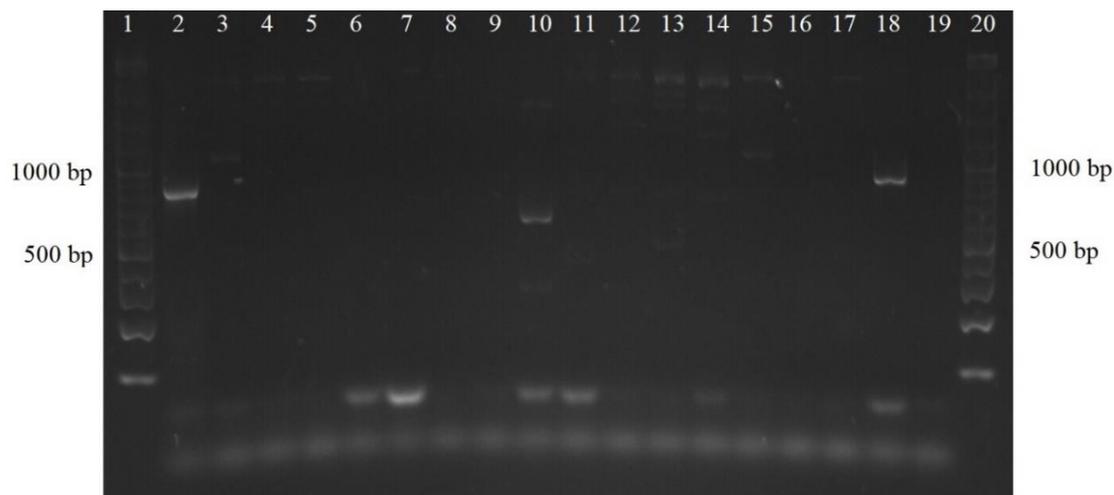
Nota= Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 3, 4) Muestra 5, 5) Muestra 6, 6) Muestra 7, 7) Muestra 8, 8) Muestra 9, 9) Muestra 10, 10) Muestra 11, 11) Muestra 12, 12) Muestra 13, 13) Muestra 14, 14) Muestra 15, 15) Muestra 16, 16) Muestra 17, 17) Muestra 18, 18) Control positivo (*Shigella flexneri* 84.490-2 / INISA 03), 19) Control blanco.

**Figura 17.** Amplicones del PCR para el gen *int1-1*, en geles de agarosa al 2%.



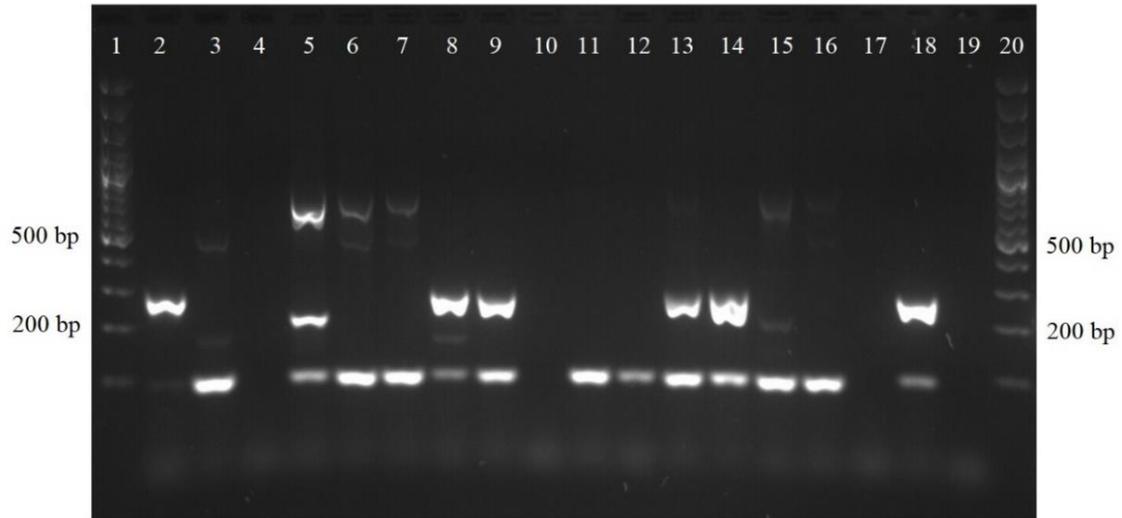
Nota= Carriles: 1) Muestra 1, 2) Muestra 3, 3) Muestra 5, 4) Muestra 6, 5) Muestra 7, 6) Muestra 8, 7) Muestra 9, 8) Muestra 10, 9) Muestra 11, 10) Muestra 12, 11) Muestra 13, 12) Muestra 14, 13) Muestra 15, 14) Muestra 16, 15) Muestra 17, 16) Muestra 18, 17) Control positivo (*Shigella flexneri* 84.490-2 / INISA 03), 18) Control blanco, 19) Marcador de peso molecular.

**Figura 18.** Amplicones del PCR para el gen *intl-2*, en geles de agarosa al 2%.



Nota= Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 3, 4) Muestra 5, 5) Muestra 6, 6) Muestra 7, 7) Muestra 8, 8) Muestra 9, 9) Muestra 10, 10) Muestra 11, 11) Muestra 12, 12) Muestra 13, 13) Muestra 14, 14) Muestra 15, 15) Muestra 16, 16) Muestra 17, 17) Muestra 18, 18) Control positivo (*Morganella morganii* 266-1), 19) Control blanco, 20) Marcador de peso molecular.

**Figura 19.** Amplicones del PCR para el gen *sul1*, en geles de agarosa al 2%.



Nota= Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) Muestra 1, 3) Muestra 3, 4) Muestra 5, 5) Muestra 6, 6) Muestra 7, 7) Muestra 8, 8) Muestra 9, 9) Muestra 10, 10) Muestra 11, 11) Muestra 12, 12) Muestra 13, 13) Muestra 14, 14) Muestra 15, 15) Muestra 16, 16) Muestra 17, 17) Muestra 18, 18) Control positivo (*Shigella flexneri* 84.490-2 / INISA 03), 19) Control blanco, 20) Marcador de peso molecular.

**Figura 20.** Amplicones del PCR para el gen *sul2*, en geles de agarosa al 2%.