

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

Vega-Herrera, Jeemy

Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada, y de Microbiología de Aguas, Universidad de Panamá.
Panamá, Panamá.
jeemy.vega@gmail.com

Adames-Real, Alejandra

Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada, y de Microbiología de Aguas, Universidad de Panamá.
Panamá, Panamá.
alejandra.adamesr@gmail.com

Espino, Carmen I.

Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá.
Panamá, Panamá.
ciespino75@yahoo.com

Moreno, José

Laboratorio de Bacteriología, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud.
Panamá, Panamá.
josmoresearch@gmail.com

Romaña, Sean

Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada, y de Microbiología de Aguas, Universidad de Panamá.
Panamá, Panamá.
sromana202001@gmail.com

Mejía, Fermín

Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada, y de Microbiología de Aguas, Universidad de Panamá.
Panamá, Panamá.
fermejia25@gmail.com

Querol-Audi, Jordi

Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada, y de Microbiología de Aguas, Departamento de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá. Sistema Nacional de Investigación (SNI), SENACYT.
Panamá, Panamá.
jquerolaudi@gmail.com

Martínez-Torres, Alex O.

Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada, y de Microbiología de Aguas, Universidad de Panamá. Sistema Nacional de Investigación (SNI), SENACYT.
Panamá, Panamá.
amartinet13@gmail.com

Abstract

Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter baumannii* represent one of the biggest problems for public health, given that they have developed resistance mechanisms to almost all available antibiotics. When discharged through wastewater, this medium acts as a reservoir and vehicle for the spread of resistance genes between clinical and environmental strains. The objective of this research was to isolate and characterize multidrug-resistant strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* in effluents from the Social Security Fund (CSS), the Wastewater Treatment Plant (WWTP), and Pumping Station 3 (EB3) in Panama City. The methodology included periodic collection of wastewater samples at each site. Selective and differential culture media were used for isolation, and identification was confirmed by biochemical (VITEK®2) and molecular (PCR) tests. Antimicrobial susceptibility profiling was performed using the VITEK®2 system and resistance gene detection by real-time PCR. The results confirmed 75 strains of each species. Susceptibility analysis in *P. aeruginosa* showed resistance to cephalosporins (100 %), penicillins (2.6 %), carbapenems (2.6 %), and fluoroquinolones (1.3 %), with *bla*OXA-48 (97.3 %) and *bla*VIM (2.6 %) resistance genes. In *A. baumannii*, resistance to cephalosporins (100 %) and penicillins (9.3 %) was detected, with no resistance genes present. The detection of these resistant bacterial strains in Panama City effluents highlights a critical problem: the inappropriate use of antibiotics and poor management of hospital waste.

Keywords: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, wastewater, resistance genes, antimicrobial resistance.

Resumen

Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii* representan uno de los mayores problemas para la salud pública, dado que han desarrollado mecanismos de resistencia a casi todos los antibióticos disponibles. Al ser descargadas a través de las aguas residuales, dicho medio actúa como un reservorio y vehículo de propagación de genes de resistencia entre cepas clínicas y ambientales. Esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes en efluentes de la Caja de Seguro Social (CSS), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) y la Estación de Bombeo 3 (EB3) en la Ciudad de Panamá. La metodología incluyó la recolección periódica de muestras de aguas residuales en cada sitio. Para el aislamiento se utilizó medios de cultivos selectivos y diferenciales y la identificación se confirmó mediante pruebas bioquímicas (VITEK®2) y moleculares (PCR). El perfil de susceptibilidad a antimicrobianos se realizó mediante el sistema VITEK®2 y la detección de genes de resistencia mediante PCR en tiempo final. Los resultados confirmaron 75 cepas de cada especie. El análisis de susceptibilidad en *P. aeruginosa* mostró resistencia a cefalosporinas (100 %), penicilinas (2,6 %), carbapenémicos (2,6 %) y fluoroquinolonas (1,3 %); con genes de resistencia *blaOXA-48* (97,3 %) y *blaVIM* (2,6 %). En *A. baumannii* resistencia a cefalosporinas (100 %) y penicilinas (9,3 %), sin presencia de genes de resistencia. La detección de estas cepas bacterianas resistentes en los efluentes de la Ciudad de Panamá subraya un problema crítico, el uso inadecuado de antibióticos y mal manejo de los desechos hospitalarios.

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

1. INTRODUCCIÓN

Millones de muertes en todo el mundo son causadas por microorganismos que han adquirido resistencia a un gran número de antibióticos. La causa principal es el empleo inapropiado de estos fármacos en humanos, la medicina veterinaria e industrias alimentarias, así como el deficiente manejo de las aguas residuales provenientes principalmente de entornos hospitalarios, dado que su liberación directa al ambiente o la falta de un tratamiento adecuado, las convierte en reservorio y vehículo de transmisión de genes de resistencia a bacterias susceptibles, pudiendo diseminarse en plantas, humanos y animales y, por lo tanto, generar brotes difíciles de controlar [1] [2].

Esta problemática se agrava al hablar de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, dos patógenos asociados a una alta tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial [3]. Las características de estas especies, incluyendo la capacidad de producción de una gran cantidad de factores de virulencia, su facultad para obtener múltiples mecanismos de resistencia a una gran variedad de antibióticos, su capacidad para sobrevivir en superficies y en el ambiente durante meses y su facilidad de transmitirse y diseminarse rápidamente dificulta su eliminación en el ambiente y establecer un tratamiento adecuado para tratar la infección, en consecuencia, cada vez se dispone de menos opciones terapéuticas y de control biológico para estas especies [4] [5].

En este sentido, el objetivo de esta investigación fue evaluar las aguas residuales como reservorio de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* multirresistentes, determinar el perfil de resistencia a los antibióticos e identificar los genes causantes de dicha resistencia a partir de muestras obtenidas de la Caja de Seguro Social (CSS), la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) y la Estación de Bombeo 3 (EB3) en la Ciudad de Panamá.

2. MÉTODO

ÁREAS DE ESTUDIO

El estudio se desarrolló en tres puntos de muestreo en la ciudad de Panamá. La PTAR de Juan Díaz, encargada del tratamiento de aguas residuales que convergen desde múltiples cuencas de la ciudad; la CSS del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, que recoge directamente las aguas residuales utilizadas en las diversas áreas clínicas y administrativas del complejo; y la Estación de Bombeo 3 de la Cinta Costera 2, que canaliza las descargas del Hospital Santo Tomás, el Hospital del Niño y el Hospital Nacional. En cada sitio, se recolectaron muestras periódicas de 100 mL de agua residual en envases estériles, bajo condiciones de asepsia, para su posterior traslado en cadena de frío.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA

En cada uno de los tres puntos de muestreo, se aislaron 25 UFC de *P. aeruginosa* y 25 UFC

de *A. baumannii*, obteniendo un total de 150 UFC entre ambas especies.

Para el aislamiento de *P. aeruginosa*, primero se realizó una prueba rápida Pseudalert. Luego, se procedió a un primer estriado en Agar Cetrimida (incubación a 37 °C por 24 h) y un segundo estriado en CHROMagar™ *Pseudomonas* (incubación a 37 °C por 24 h). Para el aislamiento de *A. baumannii*, se realizó un esparcido en superficie en CHROMagar™ *Acinetobacter*, incubado a 37 °C por 24 h. Las colonias típicas fueron seleccionadas, se reestriaron en el mismo medio y reincubaron por 24 h.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

La identificación de los aislados se realizó mediante el sistema automatizado VITEK®2 Compact, siguiendo el protocolo descrito por MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK®2 SYSTEM [6]. Para ello, las UFC se suspendieron en solución salina estéril al 0.45 % hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 McFarland, medida con un densitómetro (DensiCHEK). Las tarjetas GN (Gram negativas) se incorporaron a la suspensión, se escanearon y se procesaron automáticamente por el equipo, arrojando resultados en un periodo de 3 a 6 h. Finalmente, las cepas confirmadas se criopreservaron en glicerol al 20 % y se almacenaron entre -20 °C y -80 °C.

ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Para la prueba de perfil de resistencia, se preparó igualmente una suspensión a 0.5 McFarland. De esta, se mezclaron 145 µL con 3 mL de solución salina estéril al 0.45 %. Se incorporaron tarjetas AST-N402, las cuales fueron escaneadas e introducidas en el equipo VITEK®2 Compact para obtener los resultados en un periodo de 3 a 8 h.

EXTRACCIÓN DE ADN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se preparó una suspensión densa con 500 µL de agua libre de nucleasa y bacterias previamente cultivadas, hasta alcanzar una turbidez equivalente a 3 McFarland. Los tubos fueron agitados en vórtex por 1 min para la lisis celular, y posteriormente, se colocaron en un bloque térmico a 95 °C por 20 min. La mezcla fue centrifugada a 12000 rpm por 10 min y se transfirieron 100 µL del sobrenadante a tubos estériles.

El ADN se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop Lite Plus para evaluar concentración y pureza (260/280 nm). Finalmente, el ADN se almacenó a -80 °C.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La identificación de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se llevó a cabo mediante una PCR en tiempo final, utilizando las metodologías descritas por Choi et al. (2013) [7] y Falah et al. (2019) [8], respectivamente.

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Para la detección de los genes de resistencia, se aplicó PCR múltiple para los genes blaVIM,

blaIMP, blaNDM y blaKPC, y una PCR independiente para blaOXA-48, siguiendo el protocolo de Malbran (2019) [9].

ELECTROFORESIS

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 0.5X, utilizando Sybr Safe. Las muestras se mezclaron con tampón de carga (loading buffer azul/naranja, 6X). Se agregó el marcador de peso molecular de 100 pb y se corrieron a 80 V durante 1 h 30 min. La visualización se llevó a cabo con un fotodocumentador UV (BioDoc-it® 220 Imaging System).



Fig 1. Metodología general utilizada para el aislamiento, identificación y detección de genes de resistencia de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

3. RESULTADOS

A. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR

Se aislaron 75 UFC presuntivas de *P. aeruginosa* y 75 UFC presuntivas de *A. baumannii*, distribuidas equitativamente en 25 UFC de cada punto de muestreo. La identificación tanto bioquímica (VITEK®2) como molecular (PCR), confirmó que el 100 % de los aislados (75/75 de cada especie) pertenecen a las especies *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

B. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Los 75 aislamientos confirmados de *P. aeruginosa* se evaluaron para determinar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana a nueve paneles de antibióticos pertenecientes a cinco familias de antimicrobianos. Los resultados arrojaron que el 100 % de las cepas presentó resistencia a uno o más antibióticos. Específicamente, el 100 % (75/75) de las cepas mostró resistencia intrínseca a cefazolina, el 2,6 % (2/75) exhibió resistencia a piperacilina/tazobactam e imipenem y el 1,3 % (1/75) a ceftazidima, meropenem y ciprofloxacino. Asimismo, el 1,3 % (1/75) de las cepas presentó resistencia intermedia a cefepima y meropenem (Fig. 2).

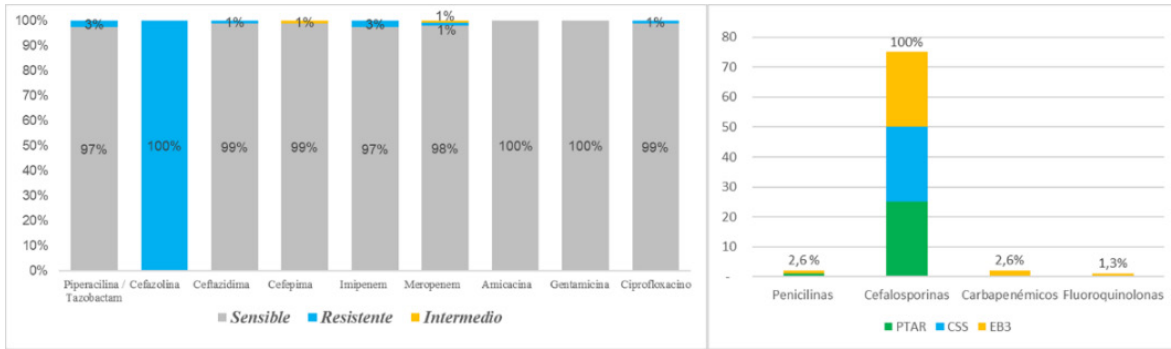


Fig. 2. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos confirmados de *P. aeruginosa*.

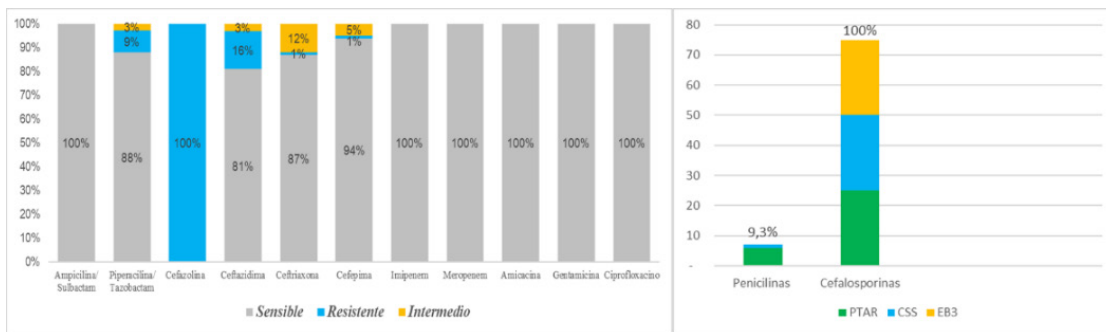


Fig. 3. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos confirmados de *A. baumannii*.

En el caso de *A. baumannii*, los 75 aislamientos se evaluaron para determinar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana a once paneles de antibióticos pertenecientes a cinco familias de antimicrobianos. Los resultados mostraron que el 100 % de las cepas presentaron resistencia a no más de dos familias de antibióticos. Específicamente, el 100 % (75/75) de las cepas mostró resistencia intrínseca a Cefazolina, el 16 % (12/75) presentó resistencia a ceftazidima, el 9,3 % (7/75) exhibió resistencia a piperacilina/tazobactam y el 1,3 % (1/75) a ceftriaxona y cefepima. Además, 2,6 % (2/75) de las cepas presentó resistencia intermedia a piperacilina/tazobactam y ceftazidima, el 12 % (9/75) a ceftriaxona y el 5,3 % (4/75) a cefepima (Fig. 3).

C. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA

De los 75 aislamientos de *P. aeruginosa*, se determinó que el 2,6 % (2/75) de los aislados que exhibieron resistencia a carbapenémicos portaban el gen blaVIM, mientras que el 97,3 % (73/75) portaban el gen blaOXA-48 (Fig. 4). En el caso de *A. baumannii*, no se detectaron genes de resistencia.

aeruginosa. Comportamiento en pacientes críticos con ventilación mecánica,” *Rev. Cubana Med.*, vol. 51, no. 3, pp. 239–246, 2012. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232012000300005

- [5] M. Fariñas y L. Martínez, “Multiresistant Gram-negative bacterial infections: Enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and other non-fermenting Gram-negative bacilli,” *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 31, no. 6, pp. 402–409, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- [6] D. Pincus, “MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM,” *BioMérieux*. [En línea]. https://www.researchgate.net/publication/315832305_MICROBIAL_IDENTIFICATION_USING_THE_BIOMERIEUX_VITEK_R_2_SYSTEM
- [7] H. Choi, M. Kim, M. Cho, B. Kim, J. Kim, C. Kim, y D. Park, “Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 8, pp. 3643–3651, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4709-0>
- [8] F. Falah, L. Shokoohizadeh, y M. Adabi, “Molecular identification and genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients by PCR and ERIC-PCR,” *Scars Burns Heal.*, vol. 5, 2019. <https://doi.org/10.1177/2059513119831369>
- [9] C. Malbran, “Protocolo de PCR múltiple para la detección de los genes blaKPC, blaOXA-48-like, blaVIM, blaIMP y blaNDM en bacilos gram negativos,” *Serv. Antimicrob., Inst. Nac. Enferm. Infecc.-ANLIS*, Buenos Aires, Argentina, 2019. [En línea]. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/10/Detecci%C3%B3n-CBP-Multiplex.pdf>

Autorización y Licencia CC

Los autores autorizan a APANAC XVIII a publicar el artículo en las actas de la conferencia en Acceso Abierto (Open Access) en diversos formatos digitales (PDF, HTML, EPUB) e integrarlos en diversas plataformas online como repositorios y bases de datos bajo la licencia CC:

Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.

Ni APANAC XVIII ni los editores son responsables ni del contenido ni de las implicaciones de lo expresado en el artículo.