UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN LABORATORIO CLÍNICO, COHORTE 2023

TEMA: RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN ENTEROBACTERIAS PRODUCTORA DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO BLEE AISLADA DE AGUAS RESIDUALES.

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del Título de Cuarto Nivel de Magister en Laboratorio Clínico mención Microbiología Clínica, Cohorte 2023, modalidad presencial.

Modalidad del Trabajo de Titulación: Proyecto de desarrollo**.**

Autora: Licenciada Gabriela Estefanía Malán Tacuamán

Director: Licenciado Mario Fernando Vilcacundo Córdova Máster.

Ambato – Ecuador

2024

A la Unidad Académica de Titulación de la Facultad Ciencias de la Salud.

El Tribunal receptor del Trabajo de Titulación, presidido por: Licenciada Victoria Estefanía Espín Pastor Magister, e integrado por los señores: Licenciada Dolores Krupskaya Salazar Garces Magister y Licenciada Daniela Alexandra Rosero Freire Máster, designados por la Unidad Académica de Titulación de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato, para receptar el Trabajo de Titulación con el tema: *"Resistencia antimicrobiana en enterobacterias productora de β-lactamasas de espectro extendido BLEE aislada de aguas residuales"*, elaborado y presentado por la Licenciada Gabriela Estefanía Malán Tacuamán, para optar por el Título de cuarto nivel de Magíster en Laboratorio Clínico mención Microbiología Clínica ; una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Titulación, el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la Universidad Técnica de Ambato.

Firmado electrónicamente por:
VICTORIA ESTEFANIA
ESPIN PASTOR

Lcda. Victoria Estefanía Espín Pastor MSc.
Presidente y Miembro del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
DOLORES KRUPSKAYA
SALAZAR GARCES

Lcda. Dolores Krupskaya Salazar Garces Mg.
Miembro del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
DANIELA ALEXANDRA
ROSERO FREIRE

Lcda. Daniela Alexandra Rosero Freire Máster MSc.
Miembro del Tribunal

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Titulación presentado con el tema: “Resistencia Antimicrobiana en Enterobacterias productora de β-lactamasas de espectro extendido BLEE aislada de aguas residuales”, le corresponde exclusivamente a: Lcda. Gabriela Estefanía Malán Tacuamán, Autor bajo la Dirección de Lcdo. Mario Fernando Vilcacundo Córdova MSc. director del Trabajo de Titulación, y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.

Firmado electrónicamente por:
GABRIELA ESTEFANIA
MALAN TACUAMAN

_____

Licenciada Gabriela Estefanía Malán Tacuamán
c.c.: 1804406922
AUTORA

Firmado electrónicamente por:
MARIO FERNANDO
VILCACUNDO CORDOVA

_____

Licenciado Mario Fernando Vilcacundo Córdova Master
c.c.: 1802932580
DIRECTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Titulación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad Técnica de Ambato.

Firmado electrónicamente por:
GABRIELA ESTEFANIA
MALAN TACUAMAN

_____

Licenciada. Gabriela Estefanía Malán Tacuamán
c.c.: 1804406922

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

Portada.....i
A la Unidad Académica de Titulación de la Facultad Ciencias de la Salud. ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
AUTORA iii
DIRECTOR iii
DERECHOS DE AUTOR ix
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS x
ÍNDICE DE TABLAS xiv
ÍNDICE DE FIGURAS xiii
AGRADECIMIENTO xiii
DEDICATORIA xiii
RESUMEN EJECUTIVO xiv
ABSTRACT xv
CAPÍTULO I 1
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 1
1.1. Introducción 1
1.2. Justificación 2
1.3. Objetivos 3
1.3.1. General 3
1.3.2. Específicos 3
CAPITULO II MARCO TEÓRICO 5
2.1. Antecedentes investigativos 5
2.2. Fundamentación científica 7
2.2.1. Generalidades de las aguas residuales 7
2.2.3. Géneros predominantes hallados en aguas residuales. 9
2.2.4. Mecanismos de resistencia en las bacterias. 11
2.2.5. Transferencia horizontal de genes en las bacterias. 12
2.3. Clasificación de las β-lactamasas 12
2.3.1. Clasificación funcional 12
2.3.2. Tipos de BLEE 13
- TEM 14

B-lactamasas resistentes a inhibidores..... 14
2.3.3. B-lactamasas de espectro extendido BLEE 15
2.4. Métodos fenotípicos para la detección de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido. 15
2.4.1. Medios de cultivo. 16
- Placas sensititre Gram negativa para microdilución. 16
2.4.2. Métodos Genotìpicos para la detección de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido. 17
2.5. Manejo de desechos biológicos 18
2.5.1. Recomendaciones generales 19
2.5.2. Normativas y reglamentos 20
CAPITULO III 21
MARCO METODOLÓGICO 21
3.1. Ubicación 21
3.2. Tipo de investigación Descriptiva 21
Transversal 21
Cuasi 21
Experimental 21
3.3. Población y muestra: 22
3.4. Criterios de inclusión y de exclusión 22
3.4.1. Criterios de inclusión: 22
3.4.2. Criterios de exclusión: 22
3.5. Prueba de Hipótesis - pregunta científica – idea a defender 23
3.6. Recursos 23
- Materiales: 23
-Reactivos: 24
3.7. Recursos humanos: 24
3.8. Recolección de información: Fase pre analítica. 24
Transporte y almacenamiento. 25
Fase analítica: 25
Serie 1 25
Serie 2 25
Serie 3 25

Serie 4..... 25
Cuantificación de UFC por número más probable (NMP). 26
Aislamiento de las bacterias en agar MacConkey. 28
Resiembra en agar CHROMagar BLEE..... 28
Análisis molecular:..... 30
Extracción de ADN bacteriano por Buffer Lisis. 30
Reconstitución de los primers..... 31
Fase post-analítica Interpretación de resultados. 34
3.9. Procesamiento de la información y análisis estadístico: 35
3.10. Aspectos bioéticos del estudio..... 35
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN 36
4.1. Resultados..... 36
4.1.1. Descripción de las muestras. 36
4.1.2. Cuantificación de UFC por NMP..... 37
4.1.3. Aislamiento de bacterias en agar MacConkey. 40
Perfil de susceptibilidad antimicrobiana. 42
4.1.2. Cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE identificadas en las muestras de aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad. 51
4.1.3. Evaluación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las enterobacterias aisladas de aguas residuales. 51
4.1.4. Genes blaCTX-M, blaTEM y blaSHV, asociados a cepas productoras de β- lactamasas de espectro extendido BLEE mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). 53
4.2. Discusión 55
Prueba de Hipótesis 60
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 61
5.1. Conclusiones..... 61
5.2. Recomendaciones 62
BIBLIOGRAFÍA..... 63
ANEXOS..... 67
CAPÍTULO VI 72
PROPUESTA 72

6.1. Título: 72
6.2. Descripción 72
6.2.1. Objetivo 72
6.2.3. Alcance 73
6.2.4. Responsables 73
6.2.5. Definiciones y términos básicos 73
6.3. Desarrollo de la propuesta 74
Disposiciones generales del Acuerdo Interministerial 74
Gestión interna 74
Clasificación de los residuos 75
Procedimiento para la inactivación de residuos biológicos infecciosos. 75
 Preparación para la inactivación: 76
 Inactivación o neutralización: 76
 Manejo de derrames: 76
Tratamiento de desechos infecciosos líquidos: 76
Inactivación de cultivos infecciosos 77
Vertido 77
Desinfección de los almacenamientos, recipientes y contenedores 78
Referencias 79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Aspecto típico de colonias de microorganismos productores de BLEE. 29
Tabla 2 Componentes del Kit de Extracción de ácido nucleico (Método de Calentamiento) 30
Tabla 3. Lista de primers utilizados para la amplificación de blaCTX-M, blaTEM, 32
Tabla 4. Concentración de reactivos para el mix de PCR..... 33
Tabla 5. Muestreo y toma de muestras..... 36
Tabla 6. Niveles de coliformes totales 38
Tabla 7. Diferenciación óptica de las colonias en agar Macconkey 40
Tabla 8. Identificación en agar CHROMagar BLEE 42
Tabla 9. Perfil de sensibilidad de E. coli2AM frente a diferentes antibióticos..... 44
Tabla 10. Perfil de sensibilidad de E. coli3AMPM frente a diferentes antibióticos.. 45
Tabla 11. Perfil de sensibilidad de E. coli4PM frente a diferentes antibióticos. 46
Tabla 12. Perfil de sensibilidad de E. coli5PM frente a diferentes antibióticos. 47
Tabla 13. Perfil de sensibilidad de Pseudomonas1AM frente a diferentes antibióticos. 48
Tabla 14. Perfil de sensibilidad de KEC1PM8 frente a diferentes antibióticos..... 49
Tabla 15. Enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE aisladas en aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad..... 51
Tabla 16. Frecuencia de cepas resistentes a betalactámicos de las enterobacterias aisladas de aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad..... 51
Tabla 17. Frecuencia de cepas resistentes de enterobacterias aisladas de aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad. 52
Tabla 18. Nivel de susceptibilidad antimicrobiana según CMI de las enterobacterias aisladas de aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad..... 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de la PCR: desnaturalización, apareamiento y elongación. 17
Figura 2. Determinación de concentración Número Más Probable (MNP). 26
Figura 3. Calculadora del número más probable (NMP) 27
Figura 4. Diferenciación de colonias bacterianas en muestras 28
Figura 5. Determinación de concentración mínima inhibitoria a betalactámicos. 29
Figura 6. Extracción del ADN por Buffer Lisis 31
Figura 7. Reconstitución de primes 32
Figura 8. Perfil de Ciclos de PCR para Amplificación del Gen blaCTX-M. 33
Figura 9. Perfil de Ciclos de PCR para Amplificación del Gen blaTEM 34
Figura 10. Perfil de Ciclos de PCR para Amplificación del Gen blaSHV. 34
Figura 11. Análisis de la (CMI) de antibióticos contra bacterias aisladas. 43
Figura 12. Placa sensititre de E. coli2AM frente a diferentes antibióticos. 44
Figura 13. Placa sensititre de E. coli3AMPM frente a diferentes antibióticos. 45
Figura 14. Placa sensititre de E. coli4PM frente a diferentes antibióticos. 46
Figura 15. Placa sensititre de E. coli5PM frente a diferentes antibióticos. 47
Figura 16. Placa sensititre de Pseudomonas1AM frente a diferentes antibióticos. ... 48
Figura 17. Placa sensititre de KEC1PM8 frente a diferentes antibióticos. 49
Figura 18. Distribución de cepas productoras de BLEE. 50
Figura 19. Gen CTXM. 54
Figura 20. Gen TEM 54
Figura 21.Gen SHV 55

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a Dios por su amor inagotable y sus abrazos reconfortantes, que han disipado cada miedo y temor, su constante guía ha sido mi faro en cada paso de mi vida, infundiendo sabiduría y fortaleza en mi mente y corazón.

A la Universidad Técnica de Ambato, a la Facultad Ciencias de la Salud, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y adquirir nuevos conocimientos.

Al Laboratorio de Especialidades Médicas Ochoa & Ochoa, extiendo mi más sincero agradecimiento por abrirme las puertas de tan prestigiosa institución para llevar a cabo la parte experimental de este proyecto de investigación.

A mi tutor empresarial Ing. Luis Domínguez, mi mentor en este proceso, por compartir generosamente su vasto conocimiento, su orientación experta y su apoyo a lo largo de esta travesía académica.

Un agradecimiento especial a mi director de tesis Mario Vilcacundo Mg, por su valiosa contribución y orientación fueron invaluables para alcanzar los objetivos planteados.

A mis compañeros de estudio Andrés, Jessy, Rosita, Ery, Taty, les agradezco por su compañerismo me ayudaron a sobrellevar de mejor manera la difícil situación que atravesé tras la muerte de mi esposo.

A las personas que contribuyeron en este proyecto, directa o indirectamente, les expreso mi agradecimiento.

DEDICATORIA

Con todo mi corazón agradezco A mi Creador, Mi Dios, Mi Padre Celestial por su infinito amor, por derramar fortaleza en cada uno de mis días y por guiar mis pasos en el camino de la vida. ¡Gracias por ser mi luz y mi roca en todo momento!

A mi padre Luis Malán, por los valores que has forjado en mí a lo largo de los años. A pesar de la distancia Física, siempre has estado presente en mi corazón y en mis pensamientos. Gracias por todo lo que has hecho y sigues haciendo por mí.

A mi Madre Nelly Tacuamán, por el amor y paciencia, has sido mi roca en los momentos más difíciles, brindándome tu apoyo y cariño inquebrantable. Tu presencia constante en mi vida ha sido mi mayor fortaleza.

A mi amado esposo Jorge Luis Supe, que ahora brilla en lo más alto del cielo, quiero expresar mi eterno agradecimiento por ser una fuente constante de inspiración en mi vida. Aunque tu ausencia física es dolorosa, tu legado perdura en cada paso que doy. Te llevo siempre en mi corazón.

A mi Ángel Zoe Camila, tu llegada ha traído consigo una profunda sensación de paz. Cada risa es una inspiración que me impulsa a seguir adelante. Confío en Dios, quien permanecerá como un poderoso gigante delante de nosotras, guiándonos con su amor y protegiéndonos en cada paso del camino.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi querido hermano Richard Malán por su constante apoyo, disposición y dedicación en la realización de este proyecto de investigación ¡Gracias por estar siempre a mi lado!

RESUMEN EJECUTIVO

La resistencia antimicrobiana causada por enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en aguas residuales representa un problema crítico de salud pública a nivel mundial. La presencia de antibióticos y microorganismos patógenos en aguas residuales no tratadas, especialmente aquellas provenientes de entornos clínicos, crea condiciones ideales para el desarrollo y diseminación de cepas bacterianas resistentes, lo que amplifica el riesgo de propagación de infecciones resistentes a múltiples fármacos. En este contexto, se realizó un estudio cuasi-experimental, transversal y descriptivo, cuyo objetivo fue analizar la resistencia antimicrobiana en enterobacterias productoras de BLEE aisladas de aguas residuales recolectadas de un laboratorio clínico de alta complejidad. Para ello, se recolectaron 16 muestras de aguas residuales, las cuales fueron procesadas siguiendo los lineamientos establecidos en la Norma NTE INEN 2169:2013. La identificación microbiológica de las enterobacterias productoras de BLEE se llevó a cabo utilizando el medio de cultivo diferencial CHROMagar BLEE, y los patrones de resistencia a los antimicrobianos se evaluaron mediante el uso de la placa Sensititre para bacterias Gram negativas. De las muestras analizadas, el 37.6% (n=6) resultaron positivas para enterobacterias productoras de BLEE, siendo Escherichia coli la especie más frecuentemente aislada, con un 57.1% de los casos (n=4), seguida por Pseudomonas sp, Klebsiella sp y Enterobacter sp. Se observó una alta resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y a los monobactámicos, lo que evidencia la capacidad de estas bacterias para evadir tratamientos antimicrobianos comunes. Los resultados de este estudio indican que las aguas residuales provenientes de laboratorios clínicos contienen una cantidad significativa de enterobacterias productoras de BLEE con resistencia multimicrobiana, lo que constituye un riesgo latente para la salud pública. En respuesta a esta problemática, es imperativo desarrollar e implementar un manual de procedimientos para el adecuado manejo y tratamiento de las aguas residuales en estos entornos, con el fin de evitar la propagación de microorganismos resistentes y proteger tanto la salud pública como el medio ambiente, reduciendo así la diseminación de patógenos multirresistentes en la comunidad.

DESCRIPTORES: *AGUAS RESIDUALES, ANTIMICROBIANA, B-LACTAMASAS, ENTEROBACTERIAS, RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS.*

ABSTRACT

Antimicrobial resistance caused by extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria in wastewater represents a critical public health problem worldwide. The presence of antibiotics and pathogenic microorganisms in untreated wastewater, especially those from clinical settings, creates ideal conditions for the development and dissemination of resistant bacterial strains, which amplifies the risk of spreading multidrug-resistant infections. In this context, a quasi-experimental, cross-sectional and descriptive study was carried out, whose objective was to analyze antimicrobial resistance in ESBL-producing enterobacteria isolated from wastewater collected from a high-complexity clinical laboratory. For this purpose, 16 wastewater samples were collected, which were processed following the guidelines established in the NTE INEN 2169:2013 Standard. Microbiological identification of ESBL-producing enterobacteria was carried out using the CHROMagar BLEE differential culture medium, and antimicrobial resistance patterns were assessed using the Sensititre plate for Gram-negative bacteria. Of the samples analyzed, 37.6% (n=6) were positive for ESBL-producing enterobacteria, with Escherichia coli being the most frequently isolated species, with 57.1% of cases (n=4), followed by Pseudomonas sp, Klebsiella sp and Enterobacter sp. High resistance to third-generation cephalosporins and monobactams was observed, which shows the ability of these bacteria to evade common antimicrobial treatments. The results of this study indicate that wastewater from clinical laboratories contains a significant amount of ESBL-producing enterobacteria with multimicrobial resistance, which constitutes a latent risk for public health. In response to this problem, it is imperative to develop and implement a manual of procedures for the proper management and treatment of wastewater in these environments, in order to prevent the spread of resistant microorganisms and protect both public health and the environment, thus reducing the dissemination of multi-resistant pathogens in the community.

KEYWORDS: *WASTEWATER, ANTIMICROBIAL, β-LACTAMASE, ENTEROBACTERIA, RESISTANCE TO BETALACTAMICS.*

CAPÍTULO I
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Introducción

A nivel mundial, el desarrollo y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA), y genes de resistencia a los antibióticos (ARG), se han extendido ampliamente en diversas matrices ambientales, incluyendo las aguas residuales, convirtiéndose en un problema de salud pública y ambiental. Esta resistencia representa una amenaza creciente lo que resulta en mayores riesgos médicos, costos económicos y aumento de la mortalidad (1).

Según el Grupo de Coordinación Interinstitucional sobre Resistencia a los Antimicrobianos (IACG) impulsado por las Naciones Unidas, las infecciones resistentes a antimicrobianos provocarán en el año 2050 cerca de 10 millones de muertes anuales. Para abordar este creciente problema, es importante conocer cómo las bacterias adquieren y transmiten genes resistentes en entornos clínicos (2).

La resistencia a los antibióticos puede surgir a través de dos mecanismos principales: mutaciones genéticas dentro del genoma bacteriano o la adquisición de genes resistentes mediante plásmidos, los cuales se transfieren entre bacterias (3). Este fenómeno se ve exacerbado por el uso generalizado de antibióticos en entornos clínicos y agrícolas, lo que contribuye a la selección de cepas resistentes y la aparición de nuevos mecanismos de resistencia; estos antimicrobianos no se metabolizan completamente en el uso terapéutico por tal motivo terminan siendo excretados como sustancias activas en aguas residuales; lo que influye en la contaminación ambiental y se correlaciona con la aparición y rápida propagación de bacterias multirresistentes (4).

Las aguas residuales provenientes del laboratorio clínico son un hábitat donde pueden encontrarse bacterias patógenas y resistentes a múltiples medicamentos, incluidas las enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Los laboratorios clínicos de la ciudad de Ambato son instituciones dedicadas a brindar atención continua a la comunidad. Debido a las actividades diarias realizadas en dichas

organizaciones, se generan residuos líquidos que contienen una considerable cantidad de materia orgánica, como sangre, heces, orina y fluidos corporales, lo que los convierte en un foco de enfermedades y contribuyen en gran medida a la resistencia antimicrobiana (5).

La resistencia BLEE está codificada por genes que pertenecen principalmente a tres grupos llamados blaCTX-M, blaTEM y blaSHV, localizados mayormente en plásmidos conjugativos, lo que facilita la transferencia horizontal de genes entre diferentes grupos bacterianos (6). Esta transferencia de genes juega un papel importante en la adquisición de nuevas características fenotípicas, como la patogenicidad y la resistencia a los antibióticos, lo que demuestra la notable capacidad adaptativa de las bacterias (7).

El objetivo de este proyecto de investigación es analizar la resistencia antimicrobiana en enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de aguas residuales.

1.2. Justificación

Los laboratorios clínicos de alta complejidad, encargados de manejar muestras biológicas en las áreas de uroanálisis y microbiología pese a los tratamientos convencionales aplicados a estas aguas, no se logran eficazmente la eliminación completa de los contaminantes microbianos, además de la falta de estudios relacionados con la carga microbiana y su resistencia a antibióticos agravan la situación.

Por este motivo se ha identificado la necesidad de realizar esta investigación para establecer la presencia de enterobacterias que producen enzimas de tipo BLEE en las aguas residuales generadas por laboratorios, además de determinar el perfil de susceptibilidad de estos microorganismos, proporcionando información necesaria para enfrentar y reducir este problema ambiental y de salud.

Así, se requiere elaborar un manual de procedimientos para la inactivación adecuada de residuos líquidos provenientes del laboratorio clínico, y reducir la carga de

microorganismos resistentes en las aguas residuales, contribuyendo así a la protección de la salud pública y ambiental.

Ello resuelve problemas de diversas naturalezas como la gestión sostenible de desechos, la prevención de la contaminación ambiental y la salvaguarda de la salud pública, la elaboración del procedimiento puede incidir positivamente la seguridad microbiológica y ambiental, proporcionando prácticas para la gestión responsable de residuos líquidos en laboratorio y mitigando riesgos asociados a la resistencia antimicrobiana.

La presente investigación es factible realizarla porque se dispone de todos los recursos necesarios para su ejecución, como es el caso de los recursos humanos, económicos, materiales y bibliográficos.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Analizar la resistencia antimicrobiana en enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aislada de aguas residuales.

1.3.2. Específicos

- Identificar cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE en muestras de aguas residuales.
- Evaluar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las enterobacterias aisladas de aguas residuales.
- Identificar los genes blaCTX-M, blaTEM y blaSHV, asociados a cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).
- Elaborar un manual de procedimientos para la inactivación adecuada de residuos líquidos provenientes del Laboratorio Clínico.

CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

En los últimos años, se ha evidenciado un incremento significativo en la resistencia antimicrobiana, vinculado al desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las enterobacterias, estos microorganismos portan genes transmitidos por plásmidos siendo la resistencia por β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) el principal foco de preocupación, en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, son resistentes a todos los antibióticos β-lactámicos, excepto carbapenems, las cefamicinas y las combinaciones de β- lactámicos con inhibidores de β-lactamasas. Las enterobacterias que producen de forma natural este tipo de β-lactamasas se encuentran *Yersinia enterocolitica, Klebsiella oxytoca, Citrobacter diversus* y distintas especies del género *Kluyvera sp*, contribuyendo a altas tasas de mortalidad y morbilidad, estancias hospitalarias prolongadas, generando una carga económica sustancial. Las cepas de enterobacterias que producen una β-lactamasa de espectro extendido, se han convertido en una gran amenaza en bacteriología médica en lo que respecta tanto al tratamiento antimicrobiano como al control de infecciones en los hospitales.

En un estudio reciente sobre la alta frecuencia de bacilos Gram negativos de importancia clínica resistente a betalactámicos en efluentes de aguas residuales hospitalarias Téllez-Sara, 2022 señala: las aguas residuales se han investigado porque actúan como depósitos de antibióticos, bacterias resistentes y genes de resistencia, son contaminantes emergentes y focos críticos para el desarrollo y propagación de la resistencia antimicrobiana en el medio ambiente, (8) este hallazgo plantea un serio problema de salud pública en todo el mundo, la presencia de estas bacterias resistentes en las aguas residuales hospitalarias subraya la necesidad de elaborar un manual de eliminación adecuada de residuos líquidos provenientes del laboratorio clínico, con el propósito de reducir los riesgos asociados a la resistencia antimicrobiana.

En Medellín, Colombia, durante el año 2019 se llevó a cabo un análisis microbiológico de las aguas residuales de un hospital de alta complejidad mediante sistema automatizado Vitek2, se evidenció la presencia de enterobacterias, los géneros identificados fueron: *Citrobacter freundii* (30%), *Klebsiella pneumoniae* (25%), *Escherichia coli* (17,5%), *Enterobacter cloacae complex* (2.5%), *Kluyvera intermedia* (2.5%), *Raoutella planticola* (2.5%). Con respecto al análisis de resistencia a antimicrobianos en las enterobacterias se encontraron altos porcentajes de resistencia a cefalosporinas de 3 y 4 generación, y en menor frecuencia a amikacina, tigeciclina, y nitrofurantoina (9)

En un estudio que se realizó en dos hospitales de nivel II y III de Lima, Perú por Soriano, 2021; mediante el sistema automatizado MicroScan y el uso de paneles para bacterias gramnegativas, se utilizaron 18 antimicrobianos en el cual se identificó el perfil de resistencia de las bacterias aisladas, de las cuales corresponde a enterobacterias en un (62,5%), siendo la más frecuente *Enterobacter cloacae* (30%), *Escherichia coli* (25%), y *Citrobacter freundii complex (20%);* con respecto al fenotipo de resistencia, el 100% de los aislados de ambos hospitales presentó multirresistencia, incluyendo resistencia a las ampicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos, la amikacina y la tigeciclina fueron los antibióticos más sensibles (10).

Esta realidad no es ajena a nivel nacional, en Ecuador en un estudio realizado en aguas residuales provenientes del rio Chimbo del Cantón San Miguel Provincia de Bolívar se detectó la presencia de *Escherichia coli* productora de BLEE con mayor resistencia a betalactámicos, lo cual alerta sobre la contaminación en los ríos por enterobacterias productoras de BLEE en nuestro país y la necesidad de su estudio para evaluar el riesgo que representan para la salud humana y ambiente (11), considerando estos antecedentes, y habiendo sido demostrado que la propagación ambiental de enterobacterias productoras de BLEE representa un problema de salud global es importante identificar los posibles reservorios potenciales en nuestra área geográfica.

2.2. Fundamentación científica

2.2.1. Generalidades de las aguas residuales

Las enterobacterias, son bacilos Gram negativos, normalmente residen en el tracto gastrointestinal humano, en la familia enterobacterales se encuentra: *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii* y *Proteus mirabilis* (12). Estas bacterias producen una enzima llamada β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) con la capacidad de inactivar penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación y aztreonam. Este mecanismo de resistencia implica cambios en la estructura de las enzimas, particularmente en la forma de los aminoácidos, conocido como sitio activo (13).

Actualmente, la resistencia de los patógenos bacterianos a las cefalosporinas de tercera generación está relacionada con la adquisición de genes β-lactamasas de espectro (BLEE) y hoy en día se detecta a menudo en diversos entornos; la transmisión de AR a humanos puede producirse a través de la cadena alimentaria o el contacto directo con el medio ambiente (14).

En los países en desarrollo, del 80 al 90 % de las aguas residuales generadas se vierten sin tratamiento adecuado en cuerpos de agua naturales, en la ciudad con sistema de alcantarillado deficientes, el desborde de estas aguas durante las lluvias, y el escurrimiento, arrastra microorganismos (15).

Esta situación ha facilitado la propagación de bacterias Gram negativas multirresistentes, entre ellas bacterias productoras de BLEE, las aguas residuales, pueden funcionar como un nicho favorable para bacterias resistentes que se originan en una población (16). Estos microorganismos son especialmente comunes en instituciones de salud, desde donde pueden llegar a las plantas de tratamiento de aguas residuales (17), proporcionando así información valiosa para identificar los genes en enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE mediante análisis de reacción de cadena de polimerasa (PCR).

La producción de enzimas β-lactamasas, con capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenemes, e inhibidores de β-lactamasas (18), se

encuentran predominantemente entre las enterobacterias, son habitantes de la flora intestinal y patógenos importantes en entornos comunitarios (19), la mayoría de las BLEE derivan de las β-lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV- 1, sin embargo, otra familia de BLEE, la CTX-M, ha iniciado una rápida expansión, aislándose en la actualidad con mayor frecuencia en diversas áreas epidemiológicas y en ambientes naturales (20).

La vigilancia actual de la resistencia a los antimicrobianos se enfoca solo en pocos agentes patógenos y se basa en que la notificación pasiva de resultados fenotípicos de laboratorio para patógenos específicos. Desde el punto de vista de vigilancia, las aguas residuales generadas por laboratorios clínicos son atractivas porque proporcionan material de muestreo de una población extensa, además el análisis de aguas residuales no requiere consentimiento informado, lo que limita las preocupaciones éticas y tiene barreras prácticas y logísticas limitadas para el muestreo. Estudios microbiológicos en este contexto han abordado problemas como el vertido sin tratamiento adecuado y la detección de patógenos, no obstante, es importante destacar que la alta presencia de resistencia antimicrobiana se correlaciona con factores socioeconómicos, de salud y ambientales (21).

La contaminación del agua es un desafío ambiental y de salud pública creciente, siendo un vector importante para la transmisión de enfermedades infecciosas, las aguas residuales generadas por los laboratorios consisten en un 99,9 % de agua y de un 0,1 % por peso de sólidos, estas aguas se producen en actividades como el análisis de muestras biológicas, la limpieza de equipos, y materiales contaminados, entre otras labores propias del funcionamiento del laboratorio. Sus características físicas y químicas pueden variar considerablemente según los procesos específicos llevados a cabo, abarcando factores como el pH, la temperatura, y la concentración de sólidos disueltos, entre otros. Además, pueden contener diversos contaminantes, como microorganismos patógenos y productos químicos utilizados en pruebas y análisis clínicos. Ante la presencia de estos contaminantes, se destaca la importancia crítica de un tratamiento adecuado de las aguas residuales generadas por laboratorios clínicos, no solo para evitar la contaminación ambiental, sino también para salvaguardar la salud pública y proteger el entorno natural (22).

2.2.2. Características de la familia *Enterobacteriaceae*.

Las enterobacterias (familia *Enterobacteriaceae*) son bacterias Gram negativas entéricas del orden enterobacterales, son anaerobias facultativas cultivándose mejor a una temperatura entre 22 ºC a 37 ºC y ricos en materia orgánica; estas bacterias son heterogéneas en cuanto a su hábitat y capacidad patógena, pero se agrupan debido a la similitud en sus características estructurales y fisiológicas, así como su homología genética (23), poseen la capacidad de desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos, ya sea mediante mutaciones en los sitios de acción de los antibióticos o adquiriendo genes a través de la transferencia horizontal por conjugación.

2.2.3. Géneros predominantes hallados en aguas residuales.

En un estudio en Medellín, Colombia, se encontraron altos niveles de bacterias resistentes a betalactámicos en aguas residuales; las bacterias más prevalentes fueron: *Citrobacter freundii,* seguida de *Klebsiella pneumoniae. Escherichia coli, Enterobacter cloacae* (24).

- *Especie Escherichia coli*

Escherichia coli, es un tipo de bacterias que pertenece al grupo de las Gram negativas, no formadora de esporas, capaz de desarrollarse en ausencia o presencia de oxígeno, puede crecer en medios selectivos como McConkey además produce indol a partir de triptófano, útil para identificarla (25). Las bacterias se consideran coliformes fecales y están muy presentes en el tracto intestinal de animales y humanos.

Las diferentes cepas de *Escherichia coli* pueden definirse por los antígenos encontrados en su superficie celular, como el antígeno O, en la membrana externa; antígeno H, derivado del flagelo bacteriano y el antígeno K, derivado de las cápsulas de polisacárido que lo envuelven (26).

Las vías comunes de transmisión son: la preparación de alimentos insalubres, la contaminación agrícola, debido a la fertilización con estiércol, el riego de los cultivos contaminados con aguas residuales, o el consumo directo de agua contaminada con restos fecales.

- *Género Klebsiella sp.*

Es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no móvil, fermenta la lactosa, anaerobia facultativa. Se encuentra en la flora normal de la boca, la piel y los intestinos. El género *Klebsiella sp*, tiene la capacidad de producir enzimas de espectro extendido beta-lactamasas BLEE, que son resistentes a penicilinas, cefalosporinas de 1^{era}, 2^{da}, 3^{era} y 4^{ta} generación y monobactams (27).

Los miembros del género *Klebsiella sp*, expresan 2 tipos de antígenos en su superficie celular. El primer antígeno, S, es un componente del lipopolisacárido (LPS), de los cuales existen 9 variedades. El segundo es el antígeno K, un polisacárido capsular con más de 80 variedades. Ambos contribuyen a la patogenicidad y constituyen la base para serogrupos. Las infecciones por esta bacteria han causado altas tasas de morbimortalidad, especialmente entre las personas con hospitalización prolongada, que hayan recibido múltiples esquemas de antibióticos de amplio espectro, enfermos críticos y expuestos a dispositivos invasivos (por ejemplo, los ventiladores o los catéteres venosos centrales).

- *Género Enterobacter sp.*

Enterobacter sp, es un patógeno oportunista común en entornos hospitalarios capaz de desarrollarse en ausencia o presencia de oxígeno, no forman esporas, son móviles y sus flagelos les permiten formar biopelículas, exportar proteínas y adherirse, su género incluye 22 especies. Las infecciones más frecuentes causadas por *Enterobacter sp,* incluyen las urinarias, de torrente circulatorio, respiratorias, de herida quirúrgica, quemaduras, endocarditis, artritis séptica y osteomielitis. El *Enterobacter* se ha identificado como resistente a los antibióticos, en parte debido a su capacidad para producir β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) (28).

- *Género Citrobacter sp.*

Es un tipo de bacteria en forma de cocobacilo, Gram negativa y anaerobia facultativa. Presenta motilidad debido a la presencia de flagelos periféricos y pueden fermentar el manitol, produciendo gas y H_2S. Además, pueden usar el citrato como fuente de

carbono. Este género se divide en 43 serogrupos basados en el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y en 20 quimiogrupos basados en la composición de los carbohidratos del LPS (29).

2.2.4. Mecanismos de resistencia en las bacterias.

La resistencia a los antibióticos no solo está presente en humanos, sino que su prevalencia es cada vez más frecuente en el medio ambiente (30). La aparición de las β-lactamasas de espectro extendido, son utilizadas por diversas especies de bacterias Gram negativas especialmente, por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (31).

La resistencia a los antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida, la primera es una propiedad natural, presente en la bacteria, permitiéndole un alto grado de adaptabilidad en el entorno, se fundamenta en la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos (32), mientras que la resistencia adquirida puede obtenerse por la adquisición de nuevo material genético procedente de otras bacterias.

Los mecanismos de resistencia son adquiridos a través de transferencia horizontal de genes, se produce cuando dos bacterias no emparentadas se transfieren material genético. La transferencia horizontal es rápida y eficaz para la adquisición de genes por parte de bacterias receptoras que les permiten vivir en un ambiente hostil (33).

Las β-lactamasas de *Enterobacteriaceae* son el mecanismo de resistencia más importante contra los fármacos β-lactámicos. Dos tipos de β-lactamasas pueden conferir resistencia contra las cefalosporinas de tercera generación. Las β-lactamasas mediadas por cromosomas son inducibles y no son inhibidas por el ácido clavulánico. La resistencia debida a estas enzimas es intransferible. El segundo tipo de enzima son las β-lactamasas mediadas por plásmidos, que son inhibidas por el ácido clavulánico. Estas enzimas son más importantes clínicamente ya que pueden transferirse entre varias especies de *Enterobacteriaceae*. Estas enzimas se denominan β-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las enterobacterias productoras de BLEE han sido responsables de numerosos brotes de infección en todo el mundo y plantean problemas desafiantes para el control de infecciones.

Las BLEE pueden conferir resistencia contra todos los fármacos β-lactámicos, excepto los carbapenémicos y las cefamicinas. Los pacientes de residencias de ancianos pueden ser un reservorio importante de organismos resistentes a múltiples antibióticos que contienen BLEE. El uso de antibióticos orales de amplio espectro y probablemente prácticas deficientes de control de infecciones pueden facilitar la propagación de esta resistencia mediada por plásmidos. Además de las poblaciones conocidas en riesgo, los pacientes ambulatorios con enfermedades crónicas representan otra población de pacientes que puede albergar organismos productores de BLEE (34).

2.2.5. Transferencia horizontal de genes en las bacterias.

Las bacterias consiguen un nivel adecuado de diversidad genética empleando mecanismos de transferencia horizontal de genes, ésta es muy común entre diferentes especies y géneros de bacterias en ambientes naturales.

Se trata de un intercambio genético con otras bacterias, ya sea de la misma especie o de especies diferentes en un ambiente adecuado. En las bacterias, el mecanismo más común para esta transmisión es la conjugación, un proceso de recombinación genética en la que hay una transferencia de ADN de una bacteria donante viva a una bacteria receptora viva por contacto célula a célula a través de una estructura específica llamada pilus (35).

2.3. Clasificación de las β-lactamasas

2.3.1. Clasificación funcional

En 1995, Bush-Jacoby-Medeiros presentó el último esquema de clasificación basado en cuatro grupos (1–4) y subgrupos (a – f) de la siguiente manera:

- **Grupo 1** consta de cefalosporinasas no inhibidas por ácido clavulánico, presentan un residuo de serina en el centro activo; según su secuencia de aminoácidos pertenece a la clase C.

- **Grupo 2** son penicilinasas, cefalosporinasas y son inhibidas por ácido clavulánico, correspondiente a las clases moleculares A y D que reflejan el TEM original y genes SHV. Todas presentan un residuo de serina en el centro activo. Sin embargo, debido al aumento de β-lactamasas derivadas de TEM y SHV, se dividieron en dos subclases, 2a y 2b. El 2a contiene sólo penicilinasas, mientras que el 2b son β-lactamasas de amplio espectro, lo que significa que son capaces de inactivar penicilinas y cefalosporinas respectivamente. Este subgrupo 2b cuenta a su vez con nuevos subsubgrupos:
  - El subgrupo 2be, donde la letra "e" significa espectro de actividad extendido, representa las BLEE, que son capaces de inactivar las cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefotaxima y cefpodoxima), así como monobactámicos (aztreonam).
  - Las enzimas 2br, donde la letra "r" indica enzimas reducidas con la unión al ácido clavulánico y al sulbactam, también son llamadas enzimas derivadas de TEM resistentes a inhibidores; sin embargo, todavía son susceptibles al tazobactam.

  Las enzimas del subgrupo 2d inactivan la cloxacilina más que a la bencilpenicilina, y mantiene cierta actividad contra la carbenicilina; Estas enzimas son poco inhibidas por el ácido clavulánico y algunos de ellos son BLEE.

  Las enzimas del subgrupo 2e son cefalosporinasas que pueden también hidrolizar monobactamas y son inhibidos por ácido clavulánico.

- **Grupo 3** está compuesto por las metalo-β-lactamasas a base de zinc, correspondientes a la clase molecular B, son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, no se inhiben por ácido clavulánico.
- **Grupo 4** incluye penicilinasas que no son inhibidas por ácido clavulánico (36).

2.3.2. Tipos de BLEE

La mayoría de las BLEE son derivados de las enzimas TEM o SHV. En la actualidad existen más de 90 β-lactamasas de tipo TEM y más de 25 enzimas tipo SHV. Las BLEE de tipo TEM y SHV se encuentran principalmente en *E. coli y K. pneumoniae*; sin

embargo, también se han encontrado en *Proteus spp*., y otros géneros de enterobacteria (37).

- ***TEM***

TEM-1 es la β-lactamasa más común en bacterias Gram negativa y hasta el 90% de la resistencia a la ampicilina en *E. coli* se debe a la producción de esta enzima.

B-lactamasas resistentes a inhibidores

Los inhibidores de β-lactamasas se desarrollaron para superar la resistencia causada por la adquisición de TEM y β-lactamasas mediadas por plásmidos de tipo SHV. La mayoría de las cepas de *Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae* producen las β-lactamasas TEM-1, TEM-2 o SHV-1 sensibles a combinaciones de fármacos inhibidores de β-lactamasas y β-lactámicos.

Según Martínez-Martínez & Lepe, (2022) estas bacterias han desarrollado resistencia contra los inhibidores y la mayor parte de esta resistencia se debe a la hiperproducción de β-lactamasas TEM-1, TEM-2 o SHV-1. Estas variantes de TEM son resistentes a la inhibición por ácido clavulánico y sulbactam, mostrando así resistencia clínica a las combinaciones inhibidoras de β-lactámico-β-lactamasa de amoxicilina-clavulanato, ticarcilina-clavulanato, y ampicilina-sulbactam, sin embargo, siguen siendo susceptibles a la inhibición por tazobactam y a la combinación de piperacilina y tazobactam (38).

- *SHV*

La β-lactamasa SHV-1 se encuentra más comúnmente en *Klebsiella pneumoniae*; sin embargo, estas enzimas también se han encontrado en *Citrobacter diversus, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa* y es responsable de hasta el 20% de la resistencia a ampicilina mediada por plásmidos en esta especie (39).

- *CTX-M*

Consiste en una resistencia mediada por plásmidos y son capaces de hidrolizar cefotaxima, se encuentran principalmente en cepas de *Salmonella entérica* serotipo *typhimurium* y *Escherichia coli* y en otras especies de *Enterobacteriaceae*.

Sabeté et al., informaron en su investigación que 23 cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella sp* aisladas en España, expresaron el CTX-M-9 β-lactamasa, lo que sugiere que puede haber un foco endémico de esta enzima en Europa occidental, adicionalmente, una cepa de *Enterobacter cloacae* productora de CTX-M-3 se aisló recientemente en Francia (40).

2.3.3. B-lactamasas de espectro extendido BLEE

En la década de 1980 y 1990 se originaron las β-lactamasas de espectro extendido BLEE, las cuales surgieron a través de cambios en los aminoácidos de las enzimas TEM-1, TEM-2, y SHV-1. Las bacterias con este tipo de resistencia están principalmente entre las enterobacterias, que son habitantes de la flora intestinal y patógena importante en entornos nosocomiales y comunitaria. La forma de transmitirse es a través de agua o alimentos contaminados. Además, pueden desarrollar resistencia a los antibióticos adquiriendo elementos de resistencia en plásmidos, transposones u otros vectores móviles. Las BLEE, son enzimas fenotípicamente conferidas por resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Las BLEE son susceptibles a los inhibidores de β-lactamasas como ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam (41).

2.4. Métodos fenotípicos para la detección de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido.

La mayor prevalencia de BLEE productoras de enterobacterias ha creado una necesidad urgente de métodos de pruebas de laboratorio que identifiquen con precisión la presencia de estas enzimas en aislados clínicos (42). La sensibilidad y especificidad de una prueba de susceptibilidad para detectar BLEE varían según la cefalosporina analizada.

2.4.1. Medios de cultivo.

Los componentes cromogénicos del medio ChromID ESBL proporcionan una identificación rápida preliminar de cepas de enterobacterias resistentes a cefpodoxima mediante la coloración de colonias.

En este sentido, *Escherichia.coli* (colonias productoras de b-glucuronidasa) muestran una coloración de rosa a vino; *Klebsiella sp, Enterobacter sp, Serratia sp y Citrobacter sp* (colonias productoras de b-glucosidasa) muestran una coloración de verde azulado a verde pardo; y finalmente, *Proteeae* (*Proteus, Morganella*) muestran una coloración marrón oscura a clara debido a la actividad de la desaminasa (43).

- **Placas sensititre Gram negativa para microdilución.**

La concentración inhibitoria mínima (CIM) en las placas sensititre se define como la concentración más baja en μg/mL de un fármaco que inhibe el desarrollo visible de crecimiento bacteriano en un pocillo. A menudo, se observa crecimiento turbio en concentraciones de fármaco más altas que las que bloquean completamente la formación de crecimiento.

El sistema sensititre ofrece una amplia selección de antibióticos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), dispuestos en placas con antibióticos secos que conservan su estabilidad durante 12 meses a temperatura ambiente. Estudios previos han demostrado un rendimiento superior en la sensibilidad en comparación con otros métodos de microdilución en caldo, además de una alta reproducibilidad de resultados entre diferentes laboratorios. La interpretación de los resultados obtenidos mediante métodos cuantitativos puede ser tanto numérica como cualitativa, categorizando al microorganismo como sensible, intermedio, resistente, según los rangos establecidos en tablas por centros de referencia científica como Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (44).

2.4.2. Métodos Genotìpicos para la detección de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido.

- *QRT-PCR*

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una técnica para la amplificación de un segmento conservado de ADN. Cualquier segmento de ADN o de ARN puede ser amplificado siempre que se conozcan las secuencias flanqueantes de la región diana o, lo que es lo mismo, podemos amplificar cualquier porción de ácido nucleico, conocido o no, siempre que quede comprendido entre dos secuencias conocidas con las que podrán hibridar oligonucleótidos complementarios que actuarán como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las hebras molde.

Para que la reacción se produzca los componentes básicos e indispensables de esta son: ADN molde amplificado, ADN polimerasa, cebadores de secuencia específica, nucleótidos para la síntesis de nuevo ADN y tampón de reacción que incluye las sales requeridas por la enzima (45).

La PCR es una reacción que ocurre en un único tubo tras mezclar en él los componentes necesarios e incubarlos en un termociclador, aparato que permite variar la temperatura de incubación a lo largo del tiempo de forma programada. Los protocolos básicos de PCR constan de los siguientes pasos fundamentales como se detalla en la figura 1:

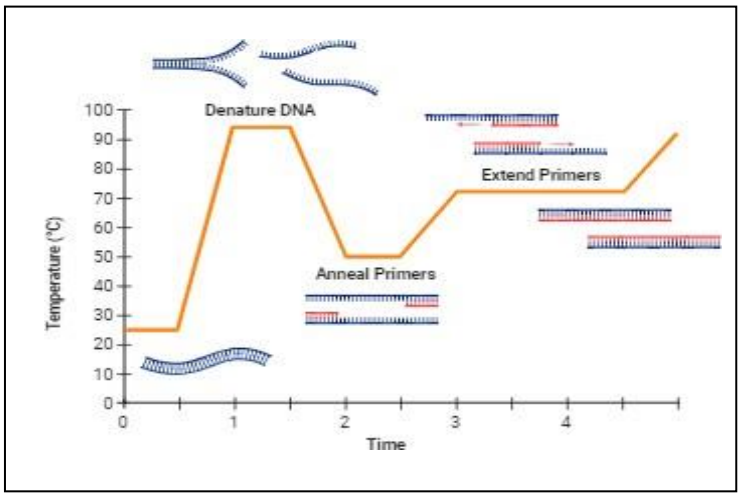


Figura 1. *Fases de la PCR: desnaturalización, apareamiento y elongación.*

Fuente: Elaborado por el autor

Fase de desnaturalización: las cadenas de ADN se calientan aproximadamente a 95 ºC durante 20-30 s. Este proceso rompe los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las hebras del ADN, resultando en dos cadenas separadas de ADN. La duración del calentamiento depende de la composición de bases de la secuencia: cadenas con mayor contenido de G-C requieren más tiempo debido a sus tres enlaces de hidrógeno en comparación con los dos enlaces de A-T (46).

Fase de apareamiento o annealing: los primers se unen específicamente a las secuencias de ADN que fueron previamente separadas durante la desnaturalización. La temperatura en esta fase es mucho más baja y dependerá de los primers utilizados (45-55 ºC).

Fase de extensión y elongación: después de que el primer se une a su cadena complementaria, la ADN polimerasa se activa añadiendo nuevos nucleótidos complementarios a la hebra molde. Este proceso conduce a la formación de una nueva cadena de ADN de doble hélice. La temperatura óptima para la actividad de la Taq polimerasa, alrededor de 72º C, se mantiene constante durante esta fase. La duración de esta etapa varía según la longitud del fragmento que se amplifica (47).

2.5. Manejo de desechos biológicos

Los residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) han sido conceptualizados como materiales generados en todos los sectores de salud, laboratorios clínicos o centros de investigación producto de la atención médica. Se trata de elementos infecto-contagiosos, por lo que representan un riesgo para la salud y para el medio ambiente, aspecto que exige un manejo y control adecuado. Estas instituciones deben disponer de un programa institucional de gestión de RPBI para gerenciar la recolección y almacenamiento temporal hasta su entrega a la empresa responsable que se encargará de la disposición final. La recomendación es que cada laboratorio que genere RPBI debe recolectarlos, etiquetarlos y envasarlos adecuadamente para evitar cualquier riesgo biológico (48).

La generación de residuos es inevitable, esto representa la fase final de las actividades productivas, sin embargo, es posible gestionar de forma organizada la reducción de los residuos. Asimismo, es necesario elaborar un programa de minimización, monitorear su eficiencia y evaluar los costos de los procesos empleados (49). El Ecuador es signatario del Convenio de Basilea para el Control de los Movimientos Transfronterizos de los Desechos Peligrosos y su Eliminación, este convenio compromete al país a reducir al mínimo la generación de desechos peligrosos, con la adopción de metodología de producción limpia y la disposición final de los desechos de forma ambientalmente adecuada.

Los desechos sanitarios peligrosos generados en los establecimientos de salud, presentan potenciales riesgos para el ser humano y ambiente, es por ello que el Instituto Nacional de Estadística y Censos a través de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias y Ambientales (DEAGA) evalúa los desechos sanitarios peligrosos, en el registro de recursos y actividades de salud (RAS) con el fin de obtener estadísticas ambientales referentes a los desechos peligrosos generadas en los establecimientos de salud en el Ecuador. Para el año 2016 se produjo un total de 10’864.289 Kg de desechos sanitarios peligrosos a nivel nacional, de los cuales, el 58,2% son entregados al Municipio para su tratamiento y disposición final, se evidenció que el 92,1 % de establecimientos de salud a nivel nacional conocen el reglamento de manejo de desechos sanitarios peligrosos en el Ecuador, de igual forma, indica que el 91,9 % de establecimientos llevan registro de los desechos peligrosos que producen (50).

2.5.1. Recomendaciones generales

Entre las recomendaciones para el tratamiento de residuos en el laboratorio, de acuerdo con el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene del Trabajo, (1998), se encuentran:

- Tener presente los lineamientos especificados en las normativas legales vigentes.
- Entre las indicaciones principales tomar en cuenta el recipiente de basura en el cual deben depositarse cada desecho de acuerdo a su clasificación.
- Neutralizar previamente los desechos.

- Separar los productos de tipo inflamable.
- Las botellas deben guardarse con sus respectivas tapas.
- Programar la recuperación de los metales pesados.
- Realizar la neutralización de las sustancias previo a su descarte en el desagüe.
- Tomar las medidas de acción inmediata al ocurrir un derrame para evitar contaminación del personal y de las áreas cercanas al laboratorio (51).

2.5.2. Normativas y reglamentos

El "Reglamento para la gestión integral de los residuos y desechos generados en los establecimientos de salud" en Ecuador, comprende una serie de normativas para regular la gestión integral de los residuos y desechos generados por los establecimientos de salud, donde se ordena la elaboración de un "Plan de Gestión Integral de Desechos Sanitarios", acorde con los lineamientos de la Norma Técnica. Para ello recomienda que se disponga, entre otras cosas, con una infraestructura y materiales para adecuar esta gestión, así como personal capacitado para su implementación y programar una vigilancia permanente para que se cumpla.

Esta normativa señala, además, que todos los establecimientos que generen desechos sanitarios deben cumplir con la Normativa Sanitaria y Ambiental vigente, describiendo en los capítulos II y III los pasos a seguir para la gestión de estos desechos infecciosos y en el capítulo IV señala cual debe ser la disposición final de los mismos (52).

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Ubicación

Laboratorio Clínico de alta complejidad en la ciudad de Ambato.

3.2. Tipo de investigación Descriptiva

El presente trabajo de investigación fue de tipo descriptivo, permitió obtener información detallada sobre la resistencia antimicrobiana de las enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido obtenidas en las aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad. Se utilizó métodos de recolección de datos, como el aislamiento y la identificación de las enterobacterias, y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Transversal

Presentó un diseño transversal con el cual permitió recopilar muestras de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido aisladas de aguas residuales de un Laboratorio Clínico en un punto específico en el tiempo.

Cuasi

La investigación presentó un enfoque cuasi debido a que se fundamenta en el análisis de muestras de aguas residuales contaminadas con enterobacterias productoras de BLEE, sin la asignación aleatoria de sujetos o muestras a grupos de control y tratamiento.

Experimental

La investigación fue experimental porque se utilizaron procedimientos, es decir técnicas microbiológicas llevadas a cabo en el laboratorio para tratar de comprobar la hipótesis, relacionada con el tema a investigar.

3.3. Población y muestra:

La población de estudio fue el conjunto completo de las muestras obtenidas de aguas residuales de un Laboratorio Clínico con aislamiento de Enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Esta población representó todas las bacterias de este tipo presentes en las aguas residuales del laboratorio.

3.4. Criterios de inclusión y de exclusión

3.4.1. Criterios de inclusión:

- Muestras de aguas residuales recolectadas en diferentes momentos para permitir la evaluación de la variabilidad temporal en la presencia de enterobacterias productoras de BLEE y su resistencia antimicrobiana.
- Muestras que cubran las áreas de Uroanálisis y Microbiología para capturar la variabilidad espacial en la distribución de estos microorganismos.
- Técnicas de muestreo estandarizadas y bien descritas para garantizar la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados.

3.4.2. Criterios de exclusión:

- Muestras que contengan elementos que afecten el crecimiento bacteriano como jabón visible, presencia de cloro, pH ácido y altas temperaturas.
- Muestras fuera del horario estipulado, puesto que disminuye la posibilidad de presencia de bacterias.
- Muestras con sólidos, pues éstos pueden dificultar la separación y concentración de las bacterias presentes en la muestra, lo cual es crucial para su posterior identificación y estudio.

3.5. Prueba de Hipótesis - pregunta científica – idea a defender

- Hi: Existe resistencia antimicrobiana en enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de aguas residuales de un Laboratorio Clínico.
- H0: No existe resistencia antimicrobiana en enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de aguas residuales de un Laboratorio Clínico.

3.6. Recursos

- Equipos:

Cámara de Bioseguridad. Estufa.
Densitómetro.
Refrigeradora.
Termohigrómetro.
Pipeta 1000 µL.
Asas de siembra.
Autoclave.
Mechero.
Termociclador

- Materiales:

Equipo Protección Personal Frascos ámbar 250 ml.
Frascos de plástico estériles. Coolers.
Tiras de pH Puntas para pipeta. Hielos.

Gradillas.

Tubo de vidrio

Alcohol Antiséptico

-Reactivos:

Tiosulfato de Sodio Agua estéril.

Caldo Lactosa.

CHROMagar BLEE.

Placas AST Sensititre™ Gram Negative

FastGene 2X IC Green Universal with separate Rox, 1mL

3.7. Recursos humanos:

- Autora: Lcda. Gabriela Estefanía Malán Tacuamán
- Tutor: Mg Mario Vilcacundo

3.8. Recolección de información: Fase pre analítica.

Preparación de material estéril y Muestreo.

Se prepararon frascos de vidrio ámbar estériles, autoclavando previamente el material para garantizar la esterilidad. Luego, se añadió una solución de 100 mg/mL de tiosulfato de sodio, el cual permite declorar, reducir metales pesados, y neutralizar ciertos contaminantes químicos presentes en la muestra. Posteriormente, se recolectaron muestras de aguas residuales del desagüe final del laboratorio clínico en estos frascos estériles, asegurando así la conservación y manipulación adecuada de las muestras.

El personal encargado para la recolección de las muestras, antes de su vertimiento al sistema de alcantarillado utilizó un equipo de protección personal. Se obtuvieron 4 muestras en frasco ámbar estéril de 250 mL de agua residual, dos en la mañana y dos en la tarde, siguiendo para ello los criterios indicados por la norma ecuatoriana

(NTE INEN 2169: 2023), que establece las directrices para el muestreo destinado a los análisis microbiológicos, selección de los envases para la recolección de las muestras, esterilización del material de vidrio, transporte y almacenamiento. Se realizó un análisis físico in situ donde se observó la apariencia, se midió el pH y se tomó la temperatura.

Transporte y almacenamiento.

Las muestras fueron transportadas en condiciones de cadena de frío (2-8ºC) en *coolers* hasta el área de microbiología del laboratorio.

Fase analítica:

Preparación de tubos con medio de cultivo y diluyentes.

Se preparó 4 series de tubos de ensayo con el siguiente contenido:

Serie 1.

a. En ocho tubos de ensayo previamente esterilizados, se colocó 4.500 µL de agua destilada.

Serie 2.

b. Para realizar la segunda dilución, se tomó como base la dilución obtenida del tubo 10^{-6} de la primera dilución, y se adicionó en cinco tubos de ensayo 2250 µL de caldo lactosa por concentrado.

Serie 3.

c. En cinco tubos de ensayo se añadió 2500 µL de caldo lactosa a concentración simple.

Serie 4

d. Para la cuarta dilución se realizó de manera idéntica a la serie 3. En cinco tubos de ensayo se añadió 2500 µL de caldo lactosa a concentración simple (Figura 2).

e. Posteriormente, estos tubos se autoclavaron a 121ºC por 15 min, se dejaron enfriar y se almacenaron en refrigeración para su uso en la continuación del proceso de dilución al día siguiente.

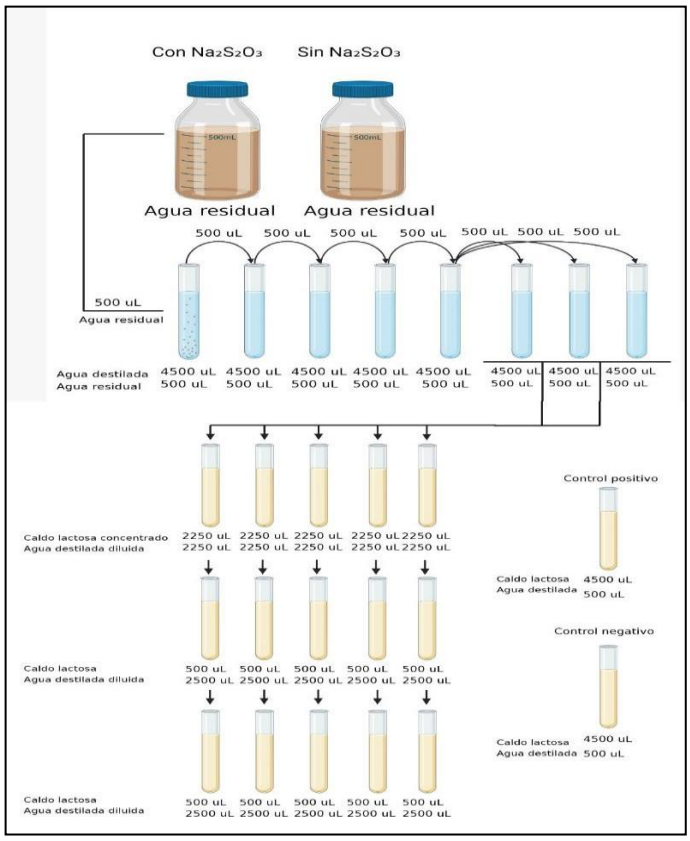


Figura 2. *Determinación de concentración Número Más Probable (MNP).*

Fuente: Elaborado por el autor.

Cuantificación de UFC por número más probable (NMP).

En la cámara de bioseguridad, se trabajó con los frascos ámbar con tiosulfato de sodio, mientras que los frascos que contenían este compuesto se reservaron como muestras madre.

Debido a la alta carga microbiana en las muestras de agua residual, se realizaron diluciones seriadas en agua destilada, caldo lactosa por concentrado y

concentración simple para facilitar la identificación y conteo de UFC (unidades formadoras de colonias) mediante el método de (NMP).

Se inició las diluciones seriadas con una relación 1:1, mezclando 4.500 µL de agua destilada con 500 µL de agua residual en ocho tubos de ensayo. Este proceso permitió evaluar el crecimiento microbiano, el cual se observó hasta el quinto tubo. A partir de este punto, se realizó una segunda dilución en relación 1:10, combinando 2.250 µL de caldo lactosa concentrado con 2.250 µL de la dilución 10^{-6} obtenida en la primera serie. Posteriormente, se efectuó una tercera dilución en relación 1:100, mezclando 2.500 µL de caldo lactosa a concentración simple con 500 µL del agua residual diluida de la serie 2. Finalmente, se realizó una cuarta dilución en relación 1:1000, combinando 2.500 µL de caldo lactosa a concentración simple con 500 µL del agua residual de la serie 3.

Los tubos inoculados se incubaron durante 24 horas a 37 ºC. Al finalizar el periodo de incubación, se verificó la presencia de turbidez y se cuantificó el (NMP) contando el número de tubos positivos y negativos. Los resultados fueron registrados y analizados en la calculadora del NMP (figura 3).

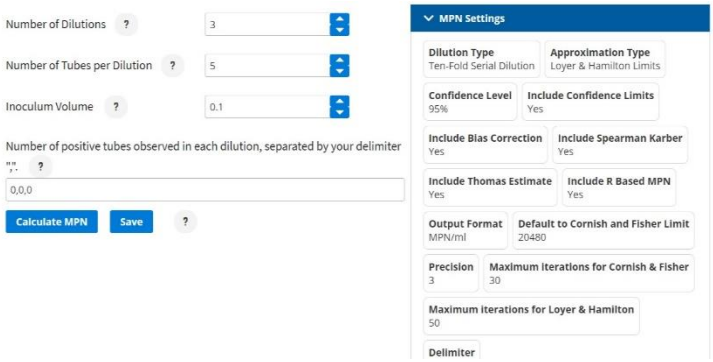


Figura 3. *Calculadora del número más probable (NMP)*

Aislamiento de las bacterias en agar MacConkey.

A partir de una muestra positiva obtenida mediante la cuantificación del número más probable, se inoculó 100 µL del crecimiento bacteriano del caldo lactosa en agar MacConkey y se incubó a 37ºC durante 24h para favorecer el crecimiento y desarrollo de las bacterias. Al día siguiente se realizó una evaluación óptica como: el tamaño, la forma, el color, la textura superficial y el borde de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo (figura 4).

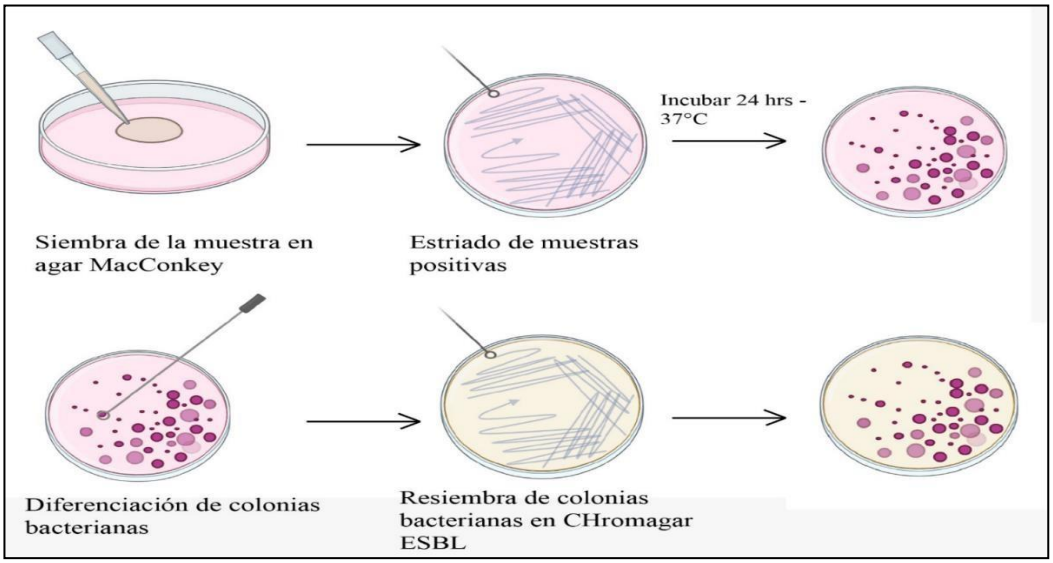


Figura 4. *Diferenciación de colonias bacterianas en muestras*

Fuente: Elaborado por autor.

Resiembra en agar CHROMagar BLEE.

Se seleccionó colonias con distintas características en el agar MacConkey, tales como: colonias rosadas, de forma redonda y no mucoides, las cuales son fermentadoras de lactosa; colonias incoloras, redondas y no fermentadoras de lactosa; así como colonias rosadas, grandes y mucoides. Con un asa estéril, se tomó una colonia pura de cada tipo y se resembró en agar CHROMagar BLEE. Las placas se incubaron en condiciones aerobias a 35-37 °C durante 18-24 horas. Al día siguiente, se realizó la lectura semicuantitativa e interpretación de placas Petri (Tabla 1).

Tabla 1.*Aspecto típico de colonias de microorganismos productores de BLEE.*

Microorganismo	**Aspecto típico de las colonias**
Gram (-)	
Escherichia coli BLEE	rosa oscuro a rojo
Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp BLEE	azul metálico (+/- halo rojo)
Proteus sp BLEE	halo marrón
Pseudomonas sp. BLEE	crema translúcida a azul
Acinetobacter sp BLEE	crema, opaco

Se realizó mediante el uso de placa sensititre Gram negative; con un asa estéril se tomó 5 colonias puras del CHROMagar, las cuales fueron suspendidas en agua estéril ajustada a una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente se homogenizó la suspensión en un vórtex y se tomó 30 µL de esta solución para su transferencia al caldo Mueller Hinton. Luego se dispensó 50 µL de suspensión bacteriana en cada pocillo, la distribución de los antimicrobianos en la placa contenía las concentraciones específicas en cada pocillo mostrados en la figura 5:

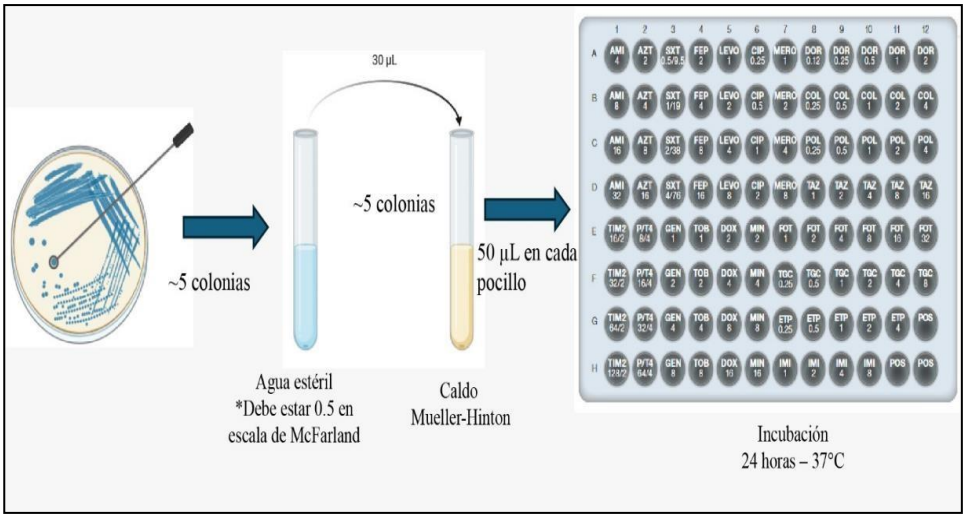


Figura 5. *Determinación de concentración mínima inhibitoria a betalactámicos.*

Fuente: Elaborado por autor.

Para prevenir que los paneles se deshidraten durante la incubación, se colocó un sello plástico. Finalmente, a las 24 horas de incubación a 37 °C se determina la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada antibiótico. La CMI se define como

la menor concentración de antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento del organismo detectado por observación directa. Las bacterias positivas para BLEE son aquellas que mostraron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación: (cefotaxime, ceftazidima), y cefalosporinas de cuarta generación (cefepime) incluyendo monobactámicos (aztreonam). Las concentraciones específicas de antibióticos para las cefalosporinas en el panel son: cefotaxime (1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/mL), Ceftazidima (1, 2, 4, 8, 16 µg/mL), cefepime (2, 4, 8, 16µg/mL), Aztreonam (2, 4, 8, 16 µg/mL). En los pocillos donde existe crecimiento, se formó un botón de sedimentación, indicativo de la resistencia del microrganismo a la concentración de antibiótico presente en el pocillo. La (CMI) se determinó como la menor concentración de antibiótico en la que se observó crecimiento bacteriano. Para facilitar la interpretación de los resultados, se utilizó como referencia el crecimiento observado en los pocillos de control positivo. Se observó la presencia o ausencia de crecimiento en cada pocillo, mediante el punto de sedimentación, sin interpretar los puntos de corte según los criterios del CLSI.

Análisis molecular:

Para la detección de genes codificantes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta metodología permite amplificar específicamente los fragmentos de ADN que codifican para las enzimas BLEE, proporcionando así una confirmación molecular precisa de la presencia de resistencia antimicrobiana en las enterobacterias analizadas.

Extracción de ADN bacteriano por Buffer Lisis.

Tabla 2 *Componentes del Kit de Extracción de ácido nucleico (Método de Calentamiento)*

Componente	**Contenidos principales**
Tampón de lisis	EDTA. NP-40. CHELEX 100.

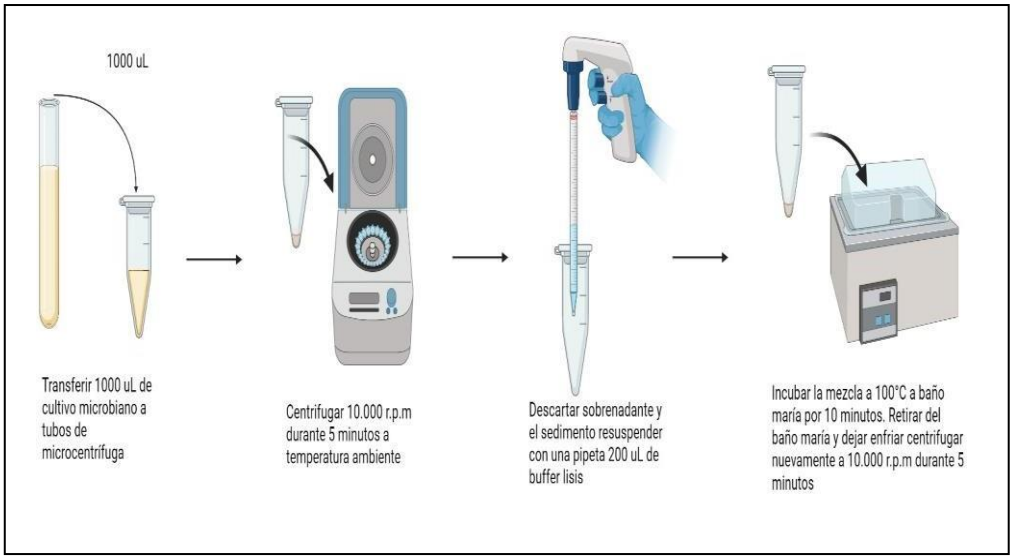


Figura 6. *Extracción del ADN por Buffer Lisis*

Fuente: Elaborado por autor.

En tubos de microcentrífuga se transfirió 1 mL de cultivo bacteriano de cada una de las cepas positivas para BLEE, estos tubos fueron centrifugados a 10.000 RPM durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con una pipeta añadiendo 200 µL de tampón lisis que contiene EDTA, NP-40, y chelex-100. La mezcla resultante se incubó a 100ºC en un baño maría durante 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró del baño maría y se dejó enfriar. Finalmente, se centrifugó nuevamente a 10.000 RPM durante 5 min. Se extrajo el sobrenadante en un tubo eppendorf para eliminar los residuos celulares y chellex en la mezcla. El sobrenadante corresponde a la fracción acuosa que contiene el ADN extraído (Figura 6).

Reconstitución de los primers

Los primers, para la amplificación específica de los genes $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{TEM}, bla_{SHV}, fueron seleccionados tras una revisión bibliográfica (Tabla 3).

Tabla 3. *Lista de primers utilizados para la amplificación de blaCTX-M, blaTEM,*

Oligo #	Nombre Oligo	Secuencia -5' - 3'	Referencia
1	BlaCTXM-F	ATGTGCAGCACCAGTAA	(53)
2	BlaCTXM-R	TCACCCAATGCTTTACCCAG	(53)
3	BlaTEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG	(54)
4	BlaTEM-R	TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	(54)
5	BlaSHV-F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	(55)
6	BlaSHV-R	GATTTGCTGATTTCGCTCGG	(55)

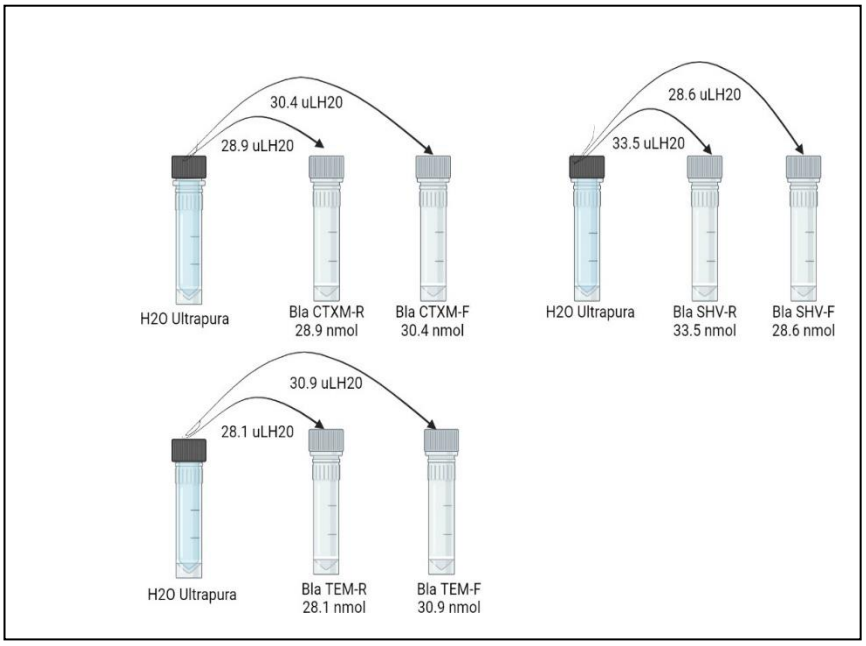


Figura 7. *Reconstitución de primes*

Fuente: Elaborado por el autor.

Para reconstituir los primers con el objetivo de obtener una concentración 1 µM, se calculó el volumen de agua ultrapura necesario para cada uno según sus pesos moleculares (Figura 7).

Posteriormente, se mezcló cada muestra suavemente para asegurar la completa disolución. Finalmente, los primers reconstituidos se almacenaron a -20ºC para su posterior uso en la PCR.

Al día siguiente se preparó una solución stock de los primers reconstituidos, esto se hace para prevenir cualquier posibilidad de contaminación de los tubos originales. Se preparó una solución de trabajo a una concentración de 1 mM para cada primer utilizando agua ultrapura (tabla 4).

Tabla 4. *Concentración de reactivos para el mix de PCR*

Componentes	**Concentración inicial**	**Volumen requerido por reacción**	**Concentración final**
Agua ultrapura	N/A	3 µL	N/A
2x FastGene IC Green	2x	10 µL	1x
Forward Primer	1mM	1 µL	50 µM
Reverse Primer	1mM	1 µL	50 µM
Template DNA	N/A	5 µL	N/A

Después, en un pocillo se coloca una mezcla de 15 µl del master mix y 5 µl del ADN bacteriano, el cual se sella con film óptico para evitar cualquier contaminación (Tabla 4). Luego, este pocillo se coloca en el termociclador C1000 CFX96. Por último, se corre la PCR con el protocolo especificado en las (figuras 8, 9, 10) para cada set de primer estudiado:

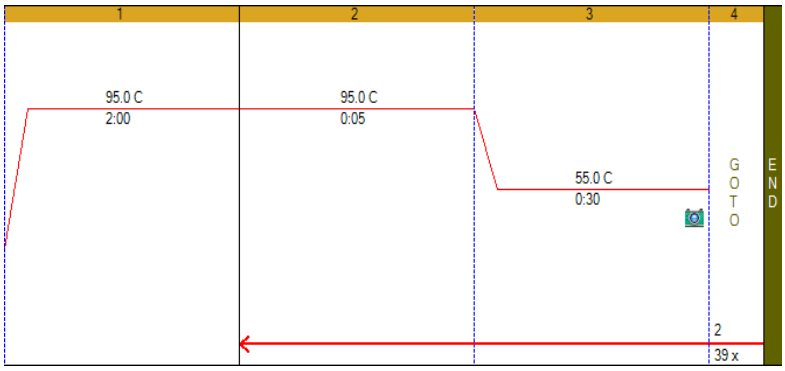


Figura 8. *Perfil de Ciclos de PCR para Amplificación del Gen blaCTX-M.*

Fuente: CFX96 Manager

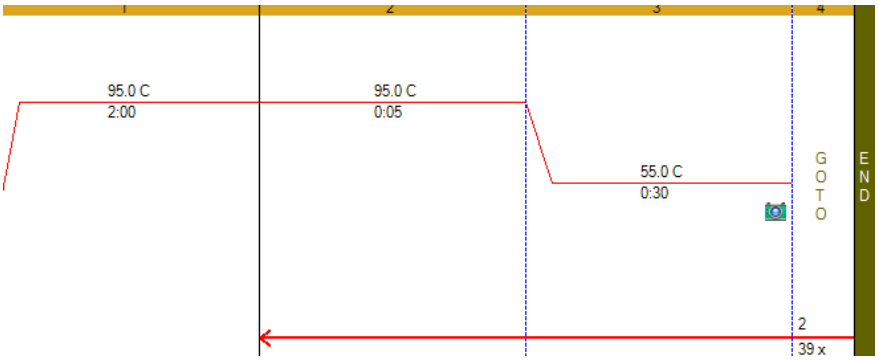


Figura 9. *Perfil de Ciclos de PCR para Amplificación del Gen blaTEM*

Fuente: CFX96 Manager

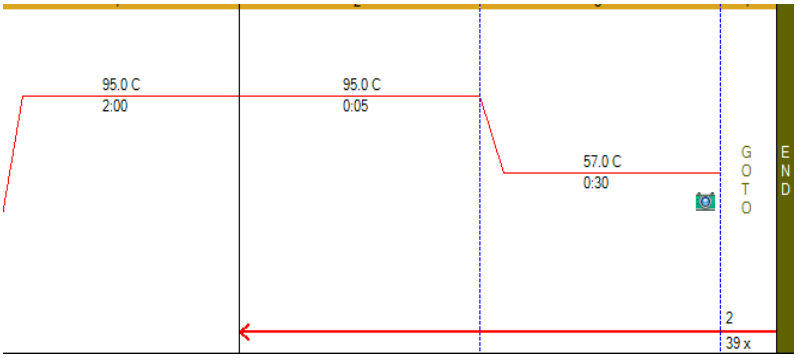


Figura 10. *Perfil de Ciclos de PCR para Amplificación del Gen blaSHV.*

Fuente: CFX96 Manager

Fase post-analítica Interpretación de resultados.

En el análisis microbiológico se identificó las enterobacterias productoras de BLEE a partir de la observación macroscópica de las colonias en agar CHROMagar BLEE. Estas colonias fueron seleccionadas por su apariencia diferencial en el medio de cultivo, donde se destacaron por colores como rosa oscuro a rojo, azul metálico y crema translúcida a azul. Además, se llevó a cabo un perfil de susceptibilidad antimicrobiana utilizando placas sensititre GNX2F, donde se observó que las enterobacterias positivas para BLEE, mostraron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación: cefotaxime, ceftazidima, incluyendo las de cuarta generación cefepime y monobactámicos aztreonam. Esta resistencia se confirmó mediante

análisis molecular dirigido a los genes blaCTX-M, blaTEM, y blaSHV mediante la técnica PCR confirmando la presencia de estos genes que codifican para enterobacterias BLEE.

3.9. Procesamiento de la información y análisis estadístico:

Los datos obtenidos de la identificación y perfil de susceptibilidad antibiótica de las bacterias aisladas fueron recopilados en una base de datos de Excel para posteriormente ser analizados, aplicando estadística descriptiva.

3.10. Aspectos bioéticos del estudio

El estudio se clasificó como una investigación sin riesgo puesto que los datos fueron obtenidos de muestras de aguas residuales sin involucrar a pacientes por lo que no se requiere consentimiento informado.

Esta investigación fue evaluada y aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Técnica de Ambato, con la autorización del laboratorio clínico donde fueron recolectadas las muestras.

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Se realizó el análisis de aguas residuales del desagüe final del edificio del laboratorio, obteniendo muestras en el periodo abril y mayo del año 2024 para verificar la presencia de BLEE.

4.1.1. Descripción de las muestras.

Durante el período del 15 de abril al 9 de mayo de 2024, se tomaron dieciséis muestras de agua residual de un mismo punto del desagüe final del laboratorio clínico, según se detalla en la tabla 5. Las muestras fueron analizadas físicamente in situ para evaluar su apariencia, pH y temperatura (Tabla 5).

Tabla 5. *Muestreo y toma de muestras*

Fecha toma de muestra	Hora	Muestra	Apariencia	pH	Temperatura
15/4/2024 Muestreo 1	10:00 am	Muestra 1	Abundante espuma, presencia visible de materia fecal.	6	20.6 ºC
	16:00 pm	Muestra 2	Presencia moderada de espuma, Escasa materia fecal, cloro abundante	5	21.3 ºC
18/4/2024 Muestreo 2	10:00 am	Muestra 3	Escasa espuma, Densa, olor fuerte.	5	19.5 ºC
	16:00 pm	Muestra 4	Cloro abundante, transparente.	7	19.6 ºC
22/4/2024 Muestreo 3	10:00 am	Muestra 5	Escasa espuma, transparente	7	20.2 ºC
	16:00 pm	Muestra 6	Sin espuma, transparente	5	23.2 ºC
25/4/2024 Muestreo 4	10:00 am	Muestra 7	Abundante espuma, Escasa agua, Cloro	6	18.5 ºC

	16:00 pm	Muestra 8	Sin espuma, transparente.	5	20.4ºC
29/4/2024 Muestreo 5	10:00 am	Muestra 9	Sin espuma, Cloro, escasa agua.	6	21.3ºC
	16:00 pm	Muestra 10	Sin espuma, Transparente.	6	20.8ºC
2/5/2024 Muestreo 6	10:00 am	Muestra 11	Escasa espuma, presencia visible de materia fecal, transparente, escasa agua.	6	19.2ºC
	16:00 pm	Muestra 12	Escasa espuma, presencia visible de materia fecal, transparente. Cloro	6	19.2ºC
6/5/2024 Muestreo 7	10:00 am	Muestra 13	Presencia visible de materia fecal, transparente	7	19.9ºC
	16:00 pm	Muestra 14	Presencia visible de materia fecal, transparente.	7	20.7ºC
9/5/2024 Muestreo 8	10:00 am	Muestra 15	Presencia visible de materia fecal, transparente, escasa agua.	6	18.7ºC
	16:00 pm	Muestra 16	Escasa espuma, Presencia visible de materia fecal, transparente.	7	20.7ºC

4.1.2. Cuantificación de UFC por NMP.

Se cuantificó el número más probable (NMP) de coliformes totales en dieciséis muestras de agua residual, cada una de 250 mL. Para ello, se partió de la dilución 10^{-6} y se prepararon diluciones seriadas de 1:1, 1:10, 1:100 en caldo lactosa. Luego, se incubaron y se registraron los resultados, que se presentan en la tabla 5. En esta tabla, se detalla el número de tubos positivos para cada dilución y se calculó el NMP/ mL para cada muestra.

Los resultados del método del NMP mostraron la presencia de coliformes totales en las muestras: M1, M3, M5, M8, M13, M16, identificados por la turbidez y la producción

de gas en el caldo lactosa. Estos niveles de carga microbiana excedieron los límites permitidos para coliformes totales según la guía TULSMA (56), que establece un máximo de > 1100 NMP para aguas muy contaminadas.

En las muestras M6, M10, M11, las concentraciones de coliformes totales estuvieron siempre por debajo de la normativa ambiental, mientras que, en las muestras M2, M4, M7, M9, M12, M14, M15, no se observó turbidez, ni producción de gas mediante el método del número más probable (NMP), lo que indica la ausencia de coliformes totales.

De las 16 muestras de agua residual recolectadas en frasco ámbar estéril con tiosulfato de sodio, se obtuvo crecimiento de coliformes totales en 10 de ellas (Tabla 6), evidenciado por la positividad en las diluciones 1:1, 1:10, 1:100 en la mayoría de las muestras.

Tabla 6. *Niveles de coliformes totales*

Fecha de lectura	**Muestra**	**Dilución 10^{-6}**			**Resultado Total NMP/ mL**	**Límite máximo permitido**
16/4/2024 Muestreo 1		1:1	1:10	1:100		
	Muestra 1	5/5	4/5	0/5	129.933 NMP/ mL	>1100 aguas muy contaminadas
	Muestra 2	0/5	0/5	0/5	0.000 NMP/ mL	
19/4/2024 Muestreo 2	Muestra 3	4/5	0/5	0/5	12.993 NMP/ mL	
	Muestra 4	0/5	0/5	0/5	0.000 NMP/ mL	
23/4/2024 Muestreo 3	Muestra 5	5/5	1/5	1/5	45.620 NMP/ mL	
	Muestra 6	1/5	1/5	2/5	8.126 NMP/ mL	
26/4/2024 Muestreo 4	Muestra 7	0/5	0/5	0/5	0.000 NMP/ mL	
	Muestra 8	4/5	1/5	0/5	16. 888 NMP/ mL	
30/4/2024 Muestreo 5	Muestra 9	0/5	0/5	0/5	0.000 NMP/ mL	
	Muestra 10	2/5	0/5	0/5	4.520 NMP/ mL	

03/5/2024 Muestreo 6	Muestra 11	1/5	1/5	2/5	8.126 NMP/ mL	
	Muestra 12	0/5	0/5	0/5	0.000 NMP/ mL	

07/5/2024 Muestreo 7	Muestra 13	5/5	5/5	2/5	542.242 NMP/ mL	
	Muestra 14	0/5	0/5	0/5	0.000 NMP/ mL	
10/5/2024 Muestreo 8	Muestra 15	0/5	0/5	0/5	0.000 NMP/ mL	
	Muestra 16	5/5	5/5	2/2	542.242 NMP/ mL	

4.1.3. Aislamiento de bacterias en agar MacConkey.

Se obtuvieron 10 aislados de enterobacterias provenientes de aguas residuales del laboratorio clínico. Las colonias predominantes se caracterizaron por ser redondas de borde circular, con un tamaño de 2-4 mm y color rosa-rojo; la coloración del medio se debe a la producción de ácidos que descienden el pH por la fermentación de lactosa. Además, se observaron colonias rosa-pálido, de aspecto mucoide como se detalla en la (tabla 7).

Tabla 7. *Diferenciación óptica de las colonias en agar Macconkey*

Fecha de lectura	**Muestra**	**Colonias de bacterias diferentes**	**Características de las colonias**	**Crecimiento en agar**
17/04/2024	Muestra 1 AM	1	**1.**Colonias de color rosa-rojo, borde circular, redonda	+
	Muestra 2 PM	0	Sin crecimiento bacteriano	-
20/04/2024	Muestra 3 AM	1	**1.**Colonias rosa-rojo, borde circular, redonda.	+
	Muestra 4 PM	0	Sin crecimiento bacteriano.	-
24/04/2024	Muestra 5 AM	1	**1.**Colonias rosa-rojo, borde circular, redonda.	+
	Muestra 6 PM	1	**1.**Colonias rosa-rojo, borde circular, redonda.	+
27/04/2024	Muestra 7 AM	0	Sin crecimiento bacteriano.	-

	Muestra 8 PM	1	**1.**Colonias rosa-rojo, borde circular, redonda.	+
01/05/2024	Muestra 9 AM	0	Sin crecimiento bacteriano	-
03/05/2024	Muestra 10 PM	1	**1.** Colonia rosa-rojo, borde circular, redonda.	+
	Muestra 11 AM	1	**1.** Colonia incoloras, borde circular, redonda.	+
	Muestra 12 PM	0	Sin crecimiento bacteriano	-
08/05/2024	Muestra 13 AM	2	**1.** Colonias incoloras, borde circular, redonda.	+
			2.Colonias rosa-pálido, mucoide, borde circular, redonda.	+
	Muestra 14 PM	0	Sin crecimiento bacteriano	-
11/05/2024	Muestra 15 AM	0	Sin crecimiento bacteriano	-
	Muestra 16 PM	1	**1.**Colonias rosa-pálido, borde circular, mucoide, redonda.	+

Resiembra en agar *CHROMagar* BLEE

Con las cepas aisladas se realizó una selección de los morfotipos más abundantes para realizar la inoculación de las aguas residuales. De los 10 aislados en agar MacConkey, se procedió a la resiembra en agar *CHROMagar* BLEE, observando que solo 6 de ellos presentaron crecimiento de enterobacterias productoras de BLEE. Los criterios de identificación para las bacterias se basaron en su crecimiento con medio de cultivo *CHROMagar* BLEE, teniendo en cuenta las características macroscópicas donde se describe la morfología de la colonia, se observó una presencia predominante de *Escherichia coli* BLEE en la mayoría de las muestras, caracterizada por colonias de

color rosa-rojo, identificadas mediante la coloración proporcionada por el *CHROMagar* BLEE. Sin embargo, también se identificaron otras cepas de bacterias, como *Pseudomonas sp.* BLEE y *Klebsiella sp., Enterobacter sp. y Citrobacter sp.* BLEE, según se detalla en la tabla 8:

Tabla 8. *Identificación en agar CHROMagar BLEE*

Fecha de lectura	Muestra	Coloración de las colonias	Microorganismo identificado
***21*/04/2024**	Muestra 2 AM	rosa oscuro a rojo	*Escherichia coli BLEE*
25/04/2024	Muestra 3 AM	rosa oscuro a rojo	*Escherichia coli BLEE*
28/04/2024	Muestra 4 PM	rosa oscuro a rojo	*Escherichia coli BLEE*
05/05/2024	Muestra 5 PM	rosa oscuro a rojo	*Escherichia coli BLEE*
05/05/2024	Muestra 6 AM	crema translúcida a azul	*Pseudomonas* BLEE
12/05/2024	Muestra 8 PM	azul metálico	*Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp,*BLEE

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana.

De un total de 16 muestras de aguas residuales recolectadas, se analizaron perfiles de susceptibilidad antimicrobiana para 10. Los 10 aislados seleccionados representan una muestra diversa que incluye cepas productoras y no productoras de BLEE, proporcionando una visión completa de los perfiles de resistencia antimicrobiana en las aguas residuales analizadas. Entre estos aislados, se identificaron cinco especies bacterianas: *Escherichia coli, Pseudomonas sp, Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp.* Las otras seis muestras no presentaron crecimiento bacteriano, por lo que no se les realizó perfil de susceptibilidad antimicrobiana (Figura 11).

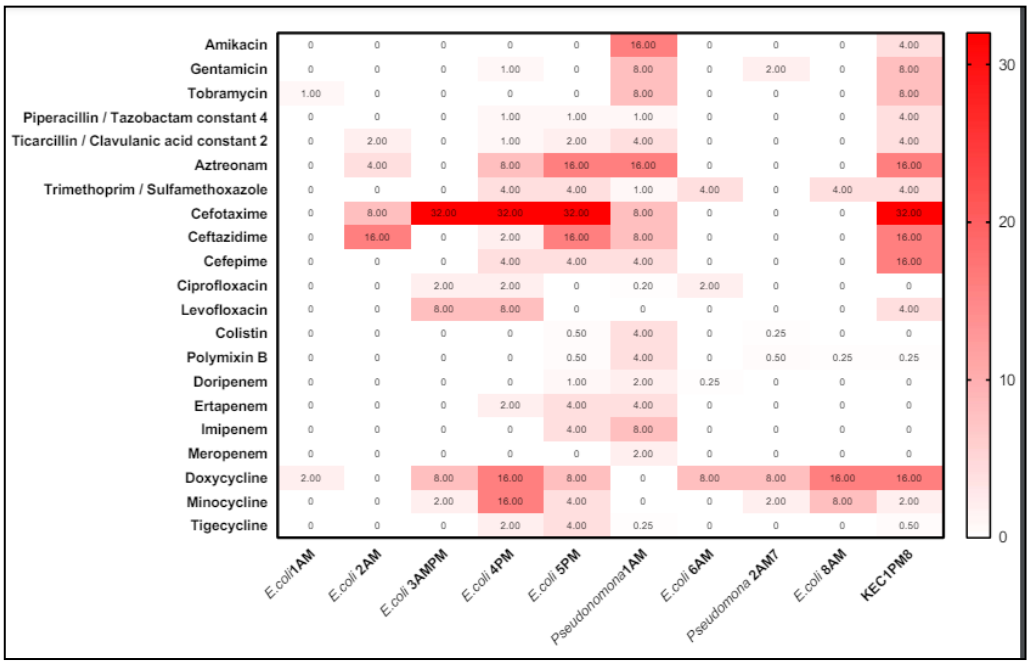


Figura 11. *Análisis de la (CMI) de antibióticos contra bacterias aisladas.*

Fuente: Elaborado por el autor.

- Los tonos más intensos de rojo representan los valores más altos de (MIC).
- Los valores con numeración 0 se han mostrado con un color claro, indicando sensibilidad o efectividad del antibiótico frente a las cepas bacterianas.
- Las diferencias en la intensidad de los colores permiten identificar fácilmente las áreas con mayor resistencia (valores más altos) en las diferentes combinaciones de antibióticos y cepas bacterianas.

Análisis de susceptibilidad antimicrobiana mediante placas sensititre para 6 cepas de bacterias productoras de BLEE (*E. coli*2AM, *E. coli*3AMPM, *E. coli*4PM, *E. coli*5PM, *Pseudomonas*1AM, KEC1PM8).

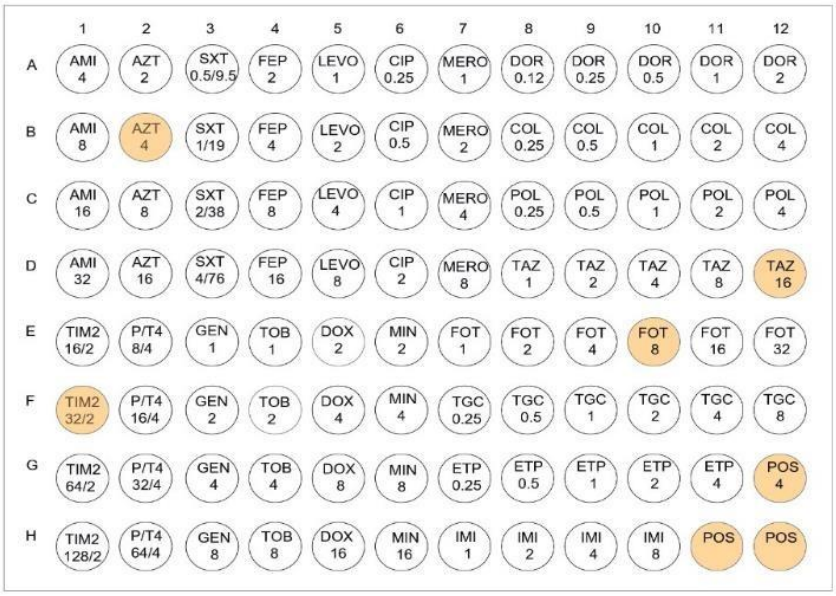


***Figura 12**. Placa sensititre de E. coli2AM frente a diferentes antibióticos.*

Fuente: Elaborado por el autor.

Grupo	Abreviatura	Antibiotico	MIC µg/mL	Categoria Interpretativa
Bacteria	***E. coli* 2AM**			
Agentes de combinación β-lactámicos	P/T4	Piperacilina Tazobactam	<8/4	S
	TIM2	Ticarcilina/ Clavulanato	32/2	I
	FEP	Cefepime	<2	S
	TAZ	Ceftazidime	16	R
	FOT	Cefotaxima	8	R
Monobactams	AZT	Aztreonam	4	S
Carbapenems	DOR	Doripenem	<1	S
	ETP	Ertapenem	<0.5	S
	IMI	Imipenem	< 1	S
	MERO	Meropenem	< 1	S
Lipopeptidos	COL	Colistin	<0.25	S
Aminoglucosidos	POL	Polimixina B	<0.25	S
	GEN	Gentamicina	<1	S
	TOB	Tobramicina	<1	S
	AMI	Amikacina	<4	S
Tetraciclinas	DOX	Doxiciclina	<2	S
	TGC	Tigeciclina	<0.25	S
	MIN	Minociclina	<2	S
Quinolonas y Fluoroquinolonas	CIP	Ciprofloxacina	<0.25	S
	LEVO	Levofloxacina	<1	S
Inhibidores de la sintesis de ácido fólico	SXT	Trimetropin sulfamethoxazole	0.5/9.5	S
S= Sensible R= Resistente I= Intermedio SDD= Sensible dependiente de la dosis				

***Tabla 9.** Perfil de sensibilidad de E. coli2AM frente a diferentes antibióticos.*

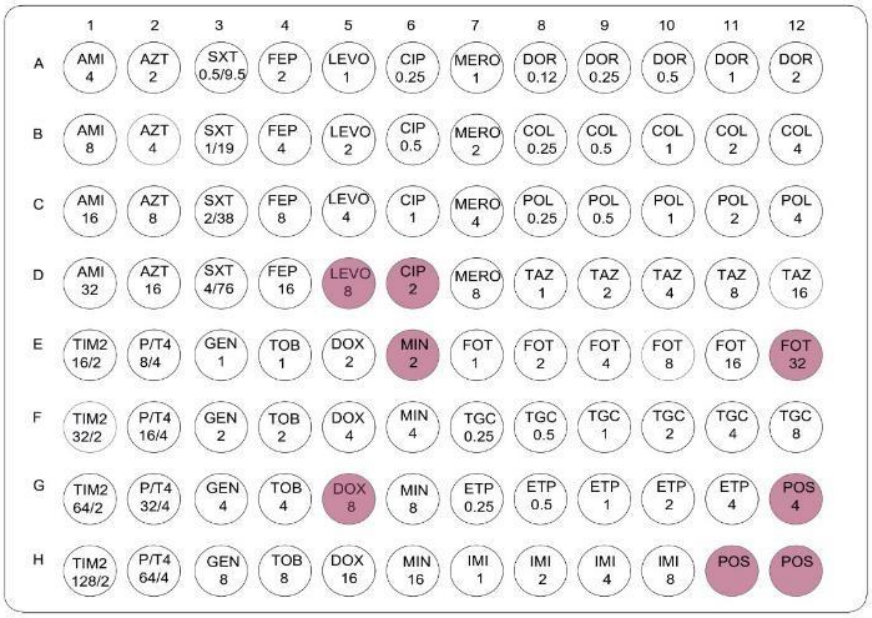


Figura 13. *Placa sensititre de E. coli3AMPM frente a diferentes antibióticos.*

Fuente: Elaborado por el autor.

Grupo	Abreviatura	Antibiotico	MIC µg/mL	Categoria Interpretativa
Bacteria	***E. coli3AMPM***			
Agentes de combinación β-lactámicos	P/T4	Piperacilina Tazobactam	<8/4	S
	TIM2	Ticarcilina/ Clavulanato	32/2	I
	FEP	Cefepime	<2	S
	TAZ	Ceftazidime	16	R
	FOT	Cefotaxima	32	R
Monobactams	AZT	Aztreonam	4	S
Carbapenems	DOR	Doripenem	<1	S
	ETP	Ertapenem	<0.5	S
	IMI	Imipenem	< 1	S
	MERO	Meropenem	< 1	S
Lipopeptidos	COL	Colistin	<0.25	S
Aminoglucosidos	POL	Polimixina B	<0.25	S
	GEN	Gentamicina	<1	S
	TOB	Tobramicina	<1	S
	AMI	Amikacina	<4	S
Tetraciclinas	DOX	Doxiciclina	8	I
	TGC	Tigeciclina	<0.25	S
	MIN	Minociclina	<2	S
Quinolonas y Fluoroquinolonas	CIP	Ciprofloxacina	2	R
	LEVO	Levofloxacina	8	R
Inhibidores de la sintesis de ácido fólico	SXT	Trimetropin sulfamethoxazole	0.5/9.5	S
S= Sensible R= Resistente I= Intermedio SDD= Sensible dependiente de la dosis				

Tabla 10. *Perfil de sensibilidad de E. coli3AMPM frente a diferentes antibióticos.*

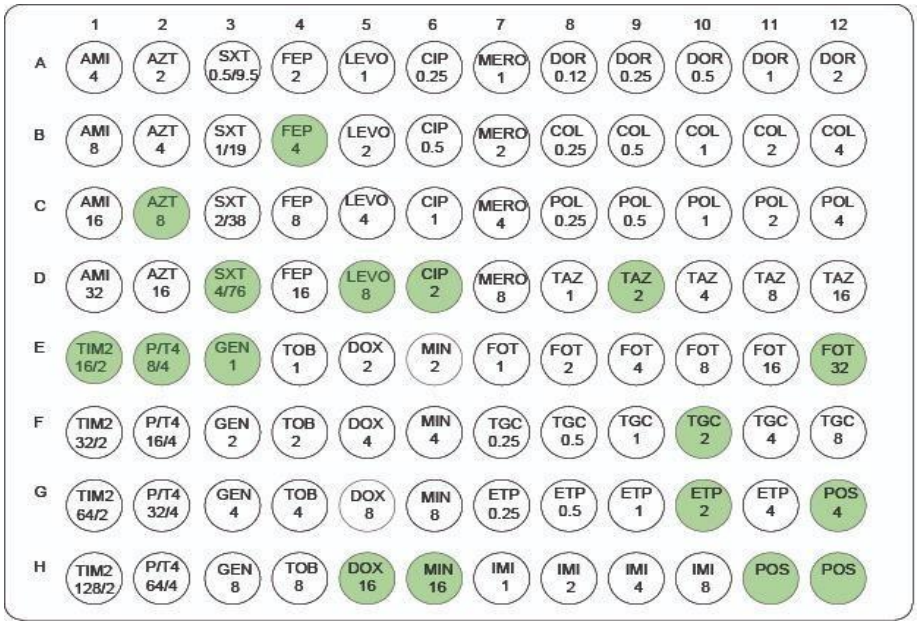


Figura 14. *Placa sensititre de E. coli4PM frente a diferentes antibióticos.*

Fuente: Elaborado por el autor.

Grupo	Abreviatura	Antibiotico	MIC µg/mL	Categoria Interpretativa
Bacteria	***E. coli4PM***			
Agentes de combinación β-lactámicos	P/T4	Piperacilina Tazobactam	<8/4	S
	TIM2	Ticarcilina/Clavulanato	16./2	S
	FEP	Cefepime	4	SDD
	TAZ	Ceftazidime	2	S
	FOT	Cefotaxima	32	R
Monobactams	AZT	Aztreonam	8	I
Carbapenems	DOR	Doripenem	<1	S
	ETP	Ertapenem	2	R
	IMI	Imipenem	< 1	S
	MERO	Meropenem	< 1	S
Lipopeptidos	COL	Colistin	<0.25	S
Aminoglucosidos	POL	Polimixina B	<0.25	S
	GEN	Gentamicina	<1	S
	TOB	Tobramicina	<1	S
	AMI	Amikacina	<4	S
Tetraciclinas	DOX	Doxiciclina	16	R
	TGC	Tigeciclina	2	S
	MIN	Minociclina	16	R
Quinolonas y Fluoroquinolona	CIP	Ciprofloxacina	2	R
	LEVO	Levofloxacina	8	R
Inhibidores de la sintesis de ácido fólico	SXT	Trimetropin sulfamethoxazole	4./16	S
S= Sensible R= Resistente I= Intermedio SDD= Sensible dependiente de la dosis				

Tabla 11. *Perfil de sensibilidad de E. coli4PM frente a diferentes antibióticos.*

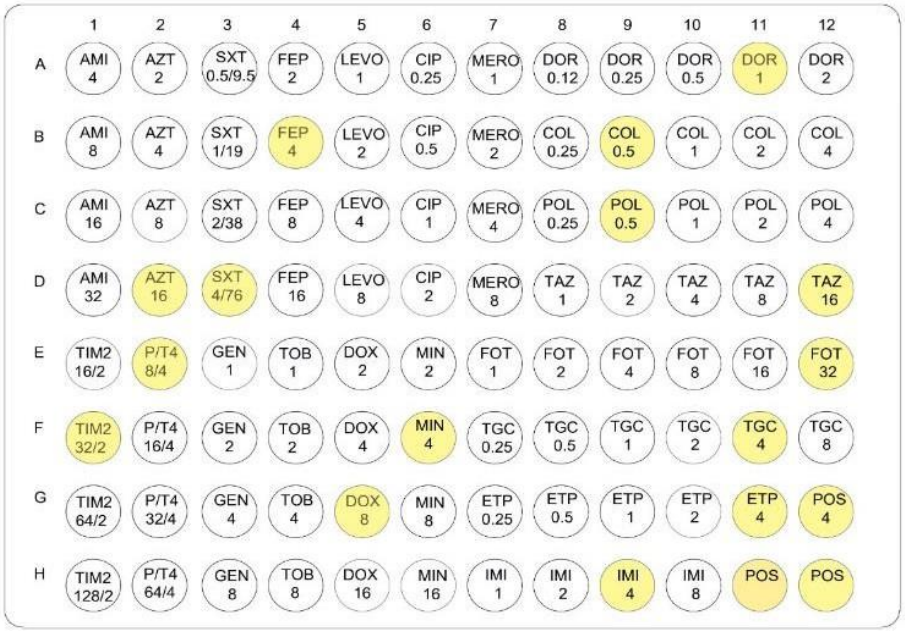


Figura 15. *Placa sensititre de E. coli5PM frente a diferentes antibióticos.*

Fuente: Elaborado por el autor.

Grupo	Abreviatura	Antibiótico	MIC µg/mL	Categoria Interpretativa
Bacteria	***E. coli5PM***			
Agentes de combinación β-lactámicos	P/T4	Piperacilina Tazobactam	<8/4	S
	TIM2	Ticarcilina/ Clavulanato	32./2	I
	FEP	Cefepime	4	SDD
	TAZ	Ceftazidime	16	R
	FOT	Cefotaxima	32	R
Monobactams	AZT	Aztreonam	16	R
Carbapenems	DOR	Doripenem	<1	S
	ETP	Ertapenem	4	R
	IMI	Imipenem	4	R
	MERO	Meropenem	< 1	S
Lipopéptidos	COL	Colistin	0.5	S
Aminoglucósidos	POL	Polimixina B	0.5	S
	GEN	Gentamicina	<1	S
	TOB	Tobramicina	<1	S
	AMI	Amikacina	<4	S
Tetraciclinas	DOX	Doxiciclina	8	I
	TGC	Tigeciclina	4	S
	MIN	Minociclina	4	S
Quinolonas y Fluoroquinolonas	CIP	Ciprofloxacina	<0.25	S
	LEVO	Levofloxacina	<0.5	S
Inhibidores de la sintesis de ácido fólico	SXT	Trimetropin sulfamethoxazole	4./76	R
S= Sensible R= Resistente I= Intermedio SDD= Sensible dependiente de la dosis				

Tabla 12. *Perfil de sensibilidad de E. coli5PM frente a diferentes antibióticos.*

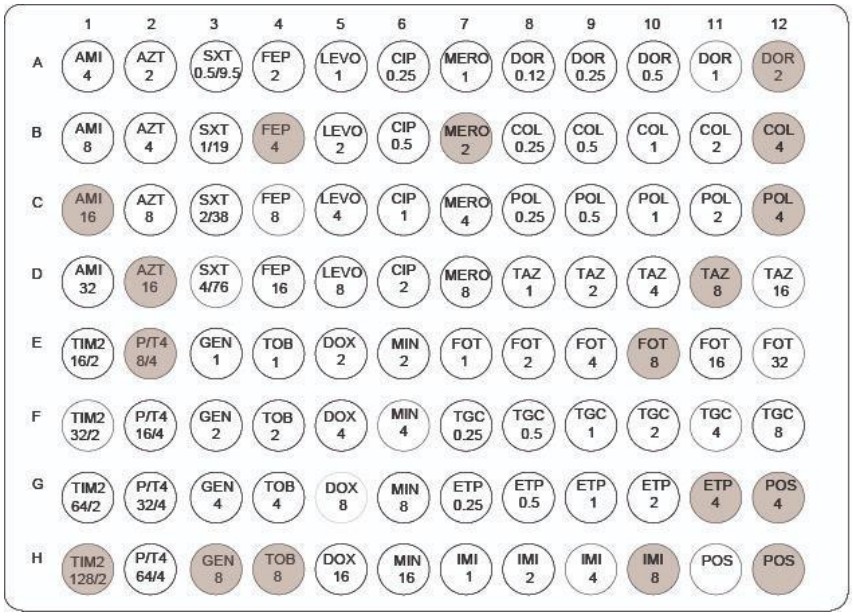


Figura 16. *Placa sensititre de Pseudomonas1AM frente a diferentes antibióticos.*

Fuente: Elaborado por el autor.

Grupo	Abreviatura	Antibiotico	MIC µg/mL	Categoria Interpretativa
Bacteria	***Pseudomonas1AM***			
Agentes de combinación β-lactámicos	P/T4	Piperacilina Tazobactam	<8/4	S
	TIM2	Ticarcilina/ Clavulanato	128./2	R
	FEP	Cefepime	4	SDD
	TAZ	Ceftazidime	8	I
	FOT	Cefotaxima	8	R
Monobactams	AZT	Aztreonam	16	R
Carbapenems	DOR	Doripenem	2	I
	ETP	Ertapenem	4	R
	IMI	Imipenem	8	R
	MERO	Meropenem	2	I
Lipopeptidos	COL	Colistin	4	R
Aminoglucosidos	POL	Polimixina B	4	R
	GEN	Gentamicina	8	R
	TOB	Tobramicina	8	R
	AMI	Amikacina	16	R
Tetraciclinas	DOX	Doxiciclina	4	S
	TGC	Tigeciclina	4	S
	MIN	Minociclina	4	S
Quinolonas y Fluoroquinolonas	CIP	Ciprofloxacina	<0.25	S
	LEVO	Levofloxacina	<0.5	S
Inhibidores de la sintesis de ácido fólico	SXT	Trimetropin sulfamethoxazole	<2./38	S
S= Sensible R= Resistente I= Intermedio SDD= Sensible dependiente de la dosis				

Tabla 13. *Perfil de sensibilidad de Pseudomonas1AM frente a diferentes antibióticos.*

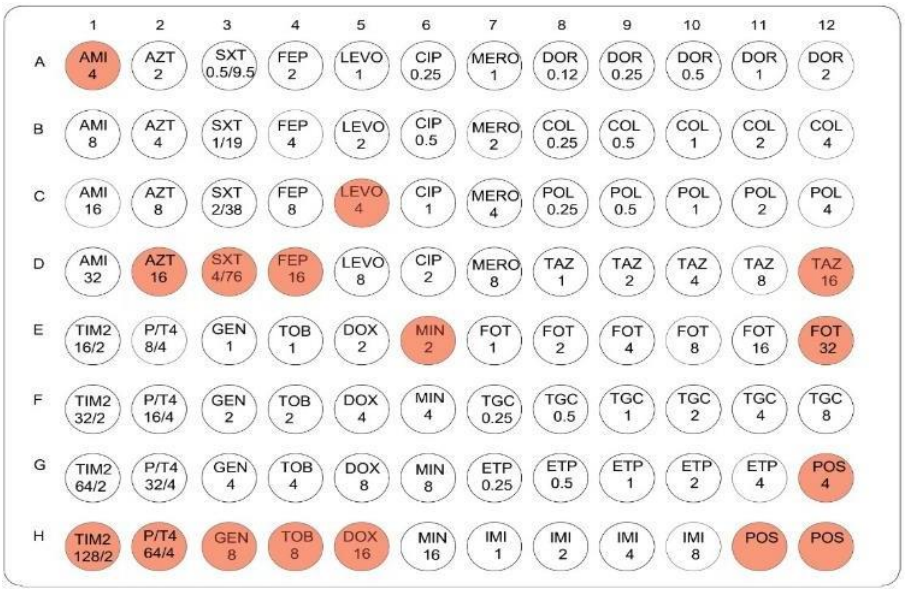


Figura 17. *Placa sensititre de KEC1PM8 frente a diferentes antibióticos.*

Fuente: Elaborado por el autor.

Grupo	Abreviatura	Antibiotico	MIC µg/mL	Categoria Interpretativa
Bacteria	***KEC1PM8***			
Agentes de combinación β-lactámicos	P/T4	Piperacilina Tazobactam	64./4	R
	TIM2	Ticarcilina/ Clavulanato	128./2	R
	FEP	Cefepime	16	R
	TAZ	Ceftazidime	16	R
	FOT	Cefotaxima	32	R
Monobactams	AZT	Aztreonam	16	R
Carbapenems	DOR	Doripenem	<1	S
	ETP	Ertapenem	<0.5	S
	IMI	Imipenem	<1	S
	MERO	Meropenem	< 1	S
Lipopeptidos	COL	Colistin	0.5	S
Aminoglucosidos	POL	Polimixina B	0.5	S
	GEN	Gentamicina	8	R
	TOB	Tobramicina	8	R
	AMI	Amikacina	<4	S
Tetraciclinas	DOX	Doxiciclina	16	R
	TGC	Tigeciclina	4	S
	MIN	Minociclina	2	S
Quinolonas y Fluoroquinolonas	CIP	Ciprofloxacina	<0.25	S
	LEVO	Levofloxacina	<0.5	S
Inhibidores de la sintesis de ácido fólico	SXT	Trimetropin sulfamethoxazole	<2./38	S
S= Sensible R= Resistente I= Intermedio SDD= Sensible dependiente de la dosis				

Tabla 14. *Perfil de sensibilidad de KEC1PM8 frente a diferentes antibióticos.*

Se evaluaron 21 antibióticos con diferentes concentraciones. La determinación de la (CMI) se realizó mediante visualización óptica, observando la turbidez y el punto de

sedimento en los pocillos, lo que indicó la capacidad de cada antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano. El perfil de sensibilidad se estableció según los criterios del (CLSI), utilizando los puntos de corte recomendados para cada antibiótico. Los resultados muestran resistencia a cefalosporinas de tercera generación y variabilidad en la sensibilidad a otros antibióticos. Ver Figuras 12-13-14-15-16-17 para detalles de (CMI) para cada cepa y antibiótico.

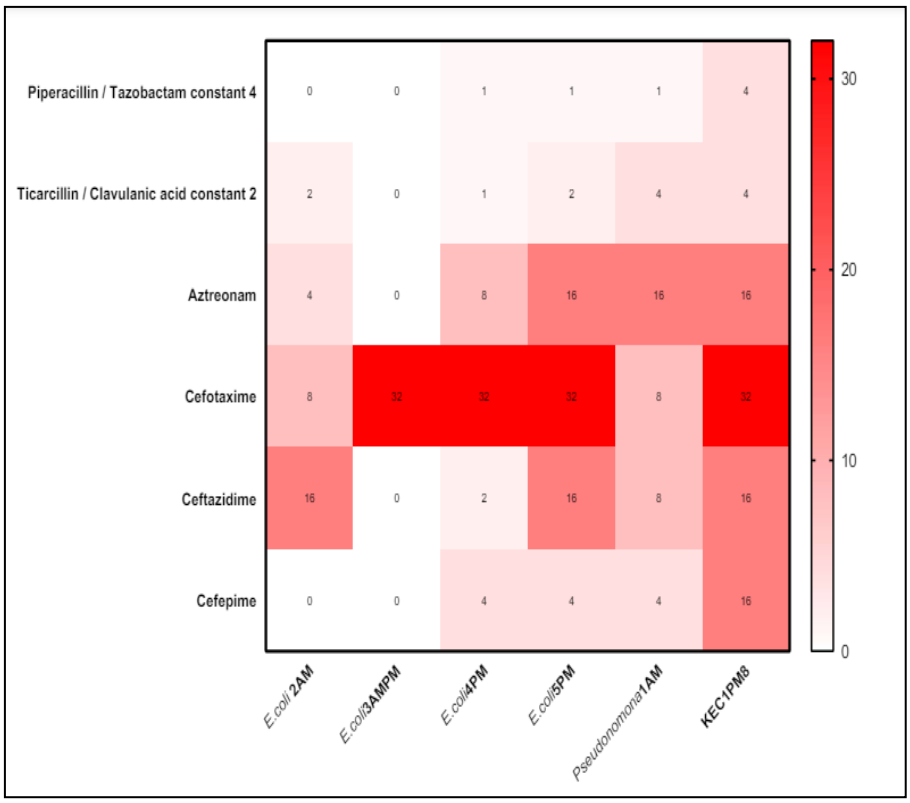


Figura 18. *Distribución de cepas productoras de BLEE.*

Fuente: Elaborado por el autor.

De los 21 antibióticos probados, se destacan 4 debido a que los aislados muestran mayor resistencia. Entre estos antibióticos se encuentran: ceftazidima, cefepime, cefotaxima y aztreonam (figura 22). Estos resultados coinciden con los referenciados en la bibliografía, en cuanto a la susceptibilidad frente a los antimicrobianos testeados,

se determinó que respecto a las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxime, ceftazidima, y cuarta generación (cefepime) la mayoría de las especies presentan resistencia (57).

4.1.2. Cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE identificadas en las muestras de aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad.

Tabla 15. *Enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE aisladas en aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad.*

Bacteria	**Frecuencia (N)**	**Porcentaje (%)**
Escherichia coli	4	57.1 %
Pseudomonas sp.	1	14.3%
Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp.	1	28.6%
Total, bacterias	6	100%

Del total de 16 muestras de agua residuales analizadas, 6 (37.6%) de las muestras recolectadas del desagüe final del edificio del laboratorio fueron positivas para enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE, siendo el género más frecuente *Escherichia coli*, en el 57.1 % (n=4) de los casos (Tabla 15)

4.1.3. Evaluación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las enterobacterias aisladas de aguas residuales.

Tabla 16. *Frecuencia de cepas resistentes a betalactámicos de las enterobacterias aisladas de aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad.*

Enterobacterias N=6	**Cefalosporinas**			**Penicilina**		**Monobactámicos**
Género	**3era FOT N**	**3era TAZ N**	**4ta FEP N**	**P/T4 N**	**TIM2 N**	**AZT N**
***Escherichia coli* (N=4)**	4	2	0	0	0	2
***Pseudomonas sp.* (N=1)**	1	1	0	0	0	1

***Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp* (N=1)**	1	1	1	0	0	1
TOTAL	**6**	**4**	**1**	**0**	**0**	**4**

FOT: Cefotaxime, TAZ: Ceftazidime, FEP: Cefepime, P/T4: Piperacilina/Tazobactam, TIM2: Ticarcilina/ ácido clavulánico, AZT: aztreonam

Entre las bacterias analizadas, se presentó mayor frecuencia de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, seguidas de los monobactámicos. En la agrupación por clase, 4 muestras bacterianas con identificación de *Escherichia coli*, fueron resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación. De manera más específica, el cefotaxime fue el antimicrobiano probado que tuvo el 100% de cepas resistentes (N=6), seguido de la ceftazidima (N=4), y aztreonam (N=4). Las especies *Pseudomonas sp. Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp,* mostraron mayor resistencia a todos los β-lactámicos (Tabla 16).

Tabla 17. *Frecuencia de cepas resistentes de enterobacterias aisladas de aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad.*

	DOX N	**LEVO N**	**MINO N**	**TOBRA N**	**IMIP N**	**GENTA N**	**AMIK N**
Escherichia coli (N=4)	4	24	0	0	0	0
Pseudomona sp. (N=1)	1	00	1	1	1	1
Klebsiella, Enterobacter, (N=1)	1	00	1	0	1	0
TOTAL	6	24	2	1	2	1

DOX: Doxiciclina, LEVO: Levofloxacino, MINO: Minocicline, TOBRA: Tobramicina, IMIP: Imipenem, GENTA: Gentamicina. AMIK: Amikacina

En este grupo de fármacos, la doxiciclina mostró la mayor frecuencia de resistencia, con el 100% de las bacterias aisladas, seguida de minocicline con el total de las *E. coli*. *Pseudomonas sp.* mostró resistencia a doxiciclina, tobramicina, imipenem,

gentamicina, amikacina; la *Klebsiella sp*, y *Enterobacter sp*, demostraron resistencia a la doxiciclina, tobramicina, gentamicina. (Tabla 17).

Tabla 18. *Nivel de susceptibilidad antimicrobiana según CMI de las enterobacterias aisladas de aguas residuales de un laboratorio clínico de alta complejidad.*

Enterobacterias	**Cefalosporinas**			**Penicilina**		**Monobactámicos**
	3era	**3era**	**4ta**			
Género	**FOT** µg/Ml	**TAZ** µg/mL	**FEP** µg/mL	**P/T4** µg/mL	**TIM2** µg/mL	**AZT** µg/mL
Escherichia coli 2AM	8	16	0	0	2	4
Escherichia coli 3AMPM	32	0	0	0	0	0
Escherichia coli 4PM	32	2	4	1	1	8
Escherichia coli 5PM	32	16	4	1	2	16
Pseudomona sp.1AM	8	8	4	1	4	16
Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter,1PM	32	16	16	4	4	16

FOT: Cefotaxime, TAZ: Ceftazidime, FEP: Cefepime, P/T4: Piperacilina/Tazobactam, TIM2: Ticarcilina/ ácido clavulánico, AZT: aztreonam

La CMI más alta se presentó con *Escherichia coli, Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp,* ante cefotaxime con 32 µg/ mL y la más baja se registró *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp* con 1 µg/ mL en presencia de penicilina (Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina/ ácido clavulánico).

4.1.4. Genes blaCTX-M, blaTEM y blaSHV, asociados a cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido BLEE mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

Mediante el uso de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se identificaron los genes blaCTX-M, blaTEM, blaSHV. Cada curva en la figura representa una de las colonias que se procesó, y en la amplificación, la forma de la curva indica positividad para la presencia del gen. (Figuras 19, 20, 21).

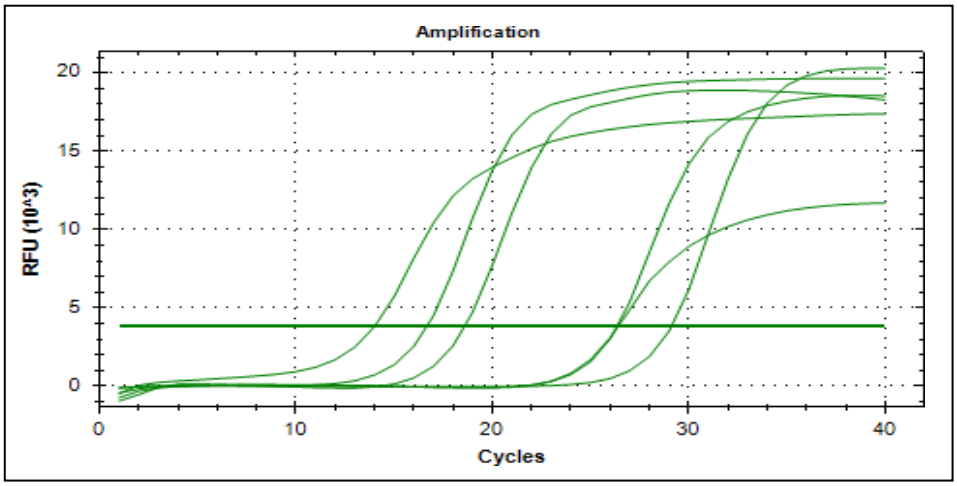


Figura 19. *Gen CTXM.*

Fuente: CFX96 Manager

Interpretación: Con el análisis de PCR se evidenció que las 6 cepas dieron positivas para BLEE, en todas se detectó el gen CTXM.

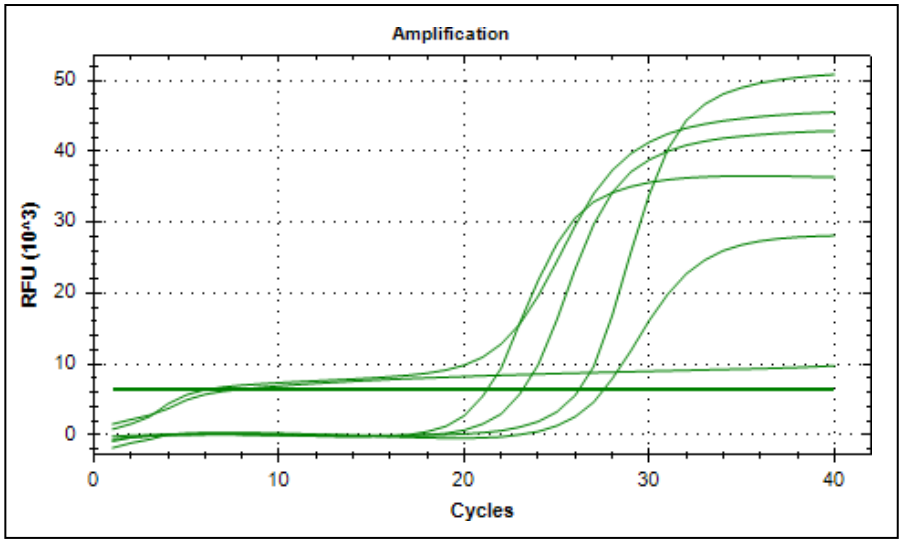


Figura 20. *Gen TEM*

Fuente: CFX96 Manager

Interpretación: Con el análisis de PCR se evidenció que las 6 cepas dieron positivas para BLEE, en todas se detectó el gen TEM.

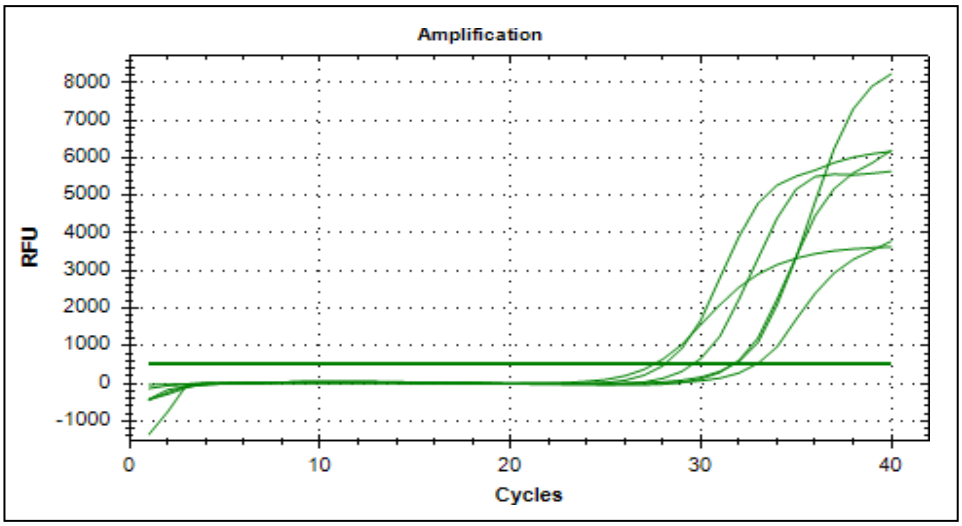


Figura 21.*Gen SHV*

Fuente: CFX96 Manager

Interpretación: Con el análisis de PCR se evidenció que las 6 cepas dieron positivas para BLEE, en todas se detectó el gen SHV.

4.2. Discusión

En esta investigación, se detectó presencia de materia fecal en varias muestras de agua residual proveniente del laboratorio, algunas de estas presentaron altos niveles de contaminación bacteriana, tal como lo menciona Beltran, et al (1), quien destaca que la contaminación de aguas residuales con bacterias es un problema ampliamente diseminada a nivel mundial, donde las aguas residuales contienen gran cantidad de

bacterias que amenazan la salud, siendo un factor de riesgo para aumentar la mortalidad, en especial porque estas aguas residuales se vierten sin tratamiento adecuado, según Sáenz, et al., (15), lo que se complica a su vez con sistemas de alcantarillado deficientes y desbordes de sistemas de drenaje durante las lluvias de acuerdo con las afirmaciones de Pallares-Ega, et al. (16).

Estas aguas residuales son un nicho que contribuye a propagar las bacterias Gram negativas multirresistentes, entre ellas bacterias productoras de BLEE que se originan en la población.

En las muestras analizadas se cuantificó el número más probable (NMP) de coliformes totales por 250mL, siendo el máximo de 542.242 NMP/ mL seguido de 129.933 NMP/ mL, niveles de carga microbiana por encima de los límites permitidos para coliformes totales según la guía TULSMA, que establece un máximo de 1100 NMP para aguas muy contaminadas. Es importante destacar que los días de muestreo, especialmente los lunes puede presentar una mayor carga microbiana debido a la eliminación de muestras almacenadas durante la semana y el aumento de la actividad en el laboratorio, provocado por un mayor número de pacientes y la consiguiente generación de grandes volúmenes de agua residual.

En algunas muestras, las concentraciones de coliformes totales estuvieron siempre por debajo de la normativa ambiental, esto podría atribuirse a la escasa cantidad de agua encontrada en el punto de muestreo, posiblemente a la baja afluencia de pacientes, y como resultado, de una menor cantidad de actividades realizadas por los analistas, lo que generó un volumen reducido de agua residual. En otro grupo de muestras no se observó turbidez, ni producción de gas mediante el método del número más probable (NMP), lo que indica la ausencia de coliformes totales detectables, la presencia abundante de cloro, durante el muestreo pudo limitar la recuperación de bacterias en estas muestras.

Al evaluar las muestras de aguas residuales del laboratorio clínico se observó la presencia predominante de *Escherichia coli* BLEE en la mayoría de estas, así como *Pseudomonas* sp, BLEE y *Klebsiella sp, Enterobacter sp y Citrobacter sp* BLEE, evidenciando la diversidad de microorganismos presentes en estas aguas, hallazgo que concuerda con Guy (5), Saenz-Arias et al (15) y Pallares-Vega, et al (16), quienes aseguran que las aguas residuales provenientes del laboratorio clínico y otras instituciones de salud, suelen contener bacterias patógenas y resistentes a múltiples medicamentos, como por ejemplo las enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) debido a las actividades que se realizan en estos

laboratorios y en especial por el mal manejo de los residuos generados que no reciben el tratamiento adecuado antes de verterlos en los desagües.

Al comparar estos resultados con los registros del estudio de Soriano (10), se coincide también con que la bacteria *Escherichia coli* fue detectada con mayor frecuencia, presentando además una alta resistencia a cefalosporinas, puesto que se trató de una bacteria productora de BLEE, siendo principalmente resistente a las cefalosporinas. A su vez, estudios realizados a nivel nacional como el desarrollado por Romero (11), evidenciado contaminación de ríos por enterobacterias productoras de BLEE, demuestran una alta concordancia con los resultados evidenciados en esta investigación.

Entre las bacterias analizadas, se presentó mayor frecuencia de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, siendo el cefotaxime el antimicrobiano probado de mayor frecuencia de resistencia con el 100% de cepas resistentes seguidas de los monobactámicos. Las especies *Pseudomonas sp. Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp,* mostraron mayor resistencia a todos los β lactámicos, precisamente por la presencia de enzimas que actúan degradando el anillo betalactámico. Estos resultados coinciden con el estudio realizado en Colombia por Soriano-Moreno, et al, (9) y Tellez-Carrasquilla,et al (8), donde el análisis de aguas residuales de un hospital evidenció enterobacterias con altos porcentajes de resistencia a cefalosporinas de 3er y 4ta generación, quienes además resaltan que entre las bacterias con resistencia por β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) las principales son *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli,* siendo resistentes a todos los antibióticos β lactámicos, capacidad que las caracteriza. Es por ello que se recomienda que los residuos biológicos provenientes de establecimientos de salud deben inactivarse neutralizarse antes de ser vertidos en los desagües.

De acuerdo Paulshus et al (17), el análisis de la reacción de cadena de polimerasa PCR, proporciona información valiosa para identificar los genes en enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido. Las cepas identificadas en este estudio presentaron blaCTX-M, blaTEM y blaSHV, principales y más comunes entre las bacterias BLEE, adquiridos mediante plásmidos conjugados, como mecanismo

principal de desarrollo de resistencia de estas bacterias según Cerecedo (3), aspecto en el que concuerdan a su vez autores como Reinthaler, et al (6) y Barroso et al (20), quienes afirman que la presencia de estos genes se relaciona con una mayor facilidad de transferencia horizontal entre distintos grupos bacterianos, además, de acuerdo con Flores (7) y Hendriksen (21),les permite adquirir mayor patogenicidad y la resistencia a los antibióticos, característica evidenciada en este estudio. La selección de primers y la reconstitución adecuada de acuerdo a la revisión bibliográfica, permitió la amplificación de los genes blaCTX-M blaTEM y blaSHV.

Según Chiriboga (33), Urquizo et al, (34) y Sánchez et al. (35), esta transferencia horizontal de genes entre bacterias sucede a través de un proceso de recombinación genética en la que hay una transferencia de ADN mediante plásmidos, es rápida y eficaz, permitiendo a las bacterias receptoras, no solo aumentar su patogenicidad sino también vivir en ambientes hostiles, lo que puede explicar que las bacterias identificadas aun siendo de géneros diferentes presenten similitud en la resistencia bacteriana.

El desarrollo de la alta resistencia evidenciada en este estudio ante la diversidad de antibióticos en las bacterias identificadas en las muestras de aguas residuales puede estar relacionada con aspectos mencionados por la Organización Mundial de la Salud (4) y Guy (5), cuando afirman que el uso generalizado de antibióticos que no se metabolizan completamente al ser excretados como sustancias activas en aguas residuales, en especial en las provenientes de laboratorios clínicos, se correlaciona con la aparición y rápida propagación de bacterias multirresistentes.

Los autores Aleem, et al, (12) y Rodríguez y Quiceno (13), mencionan que estas bacterias al producir β-lactamasas adquieren la capacidad de inactivar penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación y aztreonam, provocando cambios en la estructura de las enzimas, particularmente en la forma de los aminoácidos.

Las placas sensititre permitieron identificar la CMI de los fármacos empleados ante cada bacteria, siendo en este estudio la más alta concentración la observada por *Escherichia coli, Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp,* ante cefotaxime con

32 µg/ mL y la más baja se registró *Escherichia coli y Pseudomonas* sp con 1 µg/ mL en presencia de Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina/ ácido clavulánico.

Tomando en cuenta las afirmaciones de Urquio, et al (34), la presencia del gen blaTEM y blaSHV, permite explicar el espectro de actividad extendido de estas bacterias, siendo capaces de inactivar las cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefotaxima y cefpodoxima), y monobactámicos (aztreonam), genes que suelen estar presentes en bacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae* sensibles a combinaciones de fármacos inhibidores de β-lactamasa y β-lactámicos. Según Lepe y Martínez (38), presentan resistencia contra los inhibidores por la hiperproducción de β-lactamasas y en concordancia con Yauri (40) la presencia del gen blaCTXM, les confiere a las bacterias la capacidad de hidrolizar la cefotaxima, aspecto evidenciado en este estudio.

Prueba de Hipótesis

Se comprueba la hipótesis alternativa que afirma la existencia de resistencia antimicrobiana en enterobacterias productora de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de aguas residuales de un laboratorio clínico con evidencia directa obtenida del análisis detallado de muestras específicas recolectadas. Los resultados revelan la presencia de *E coli*, *Pseudomonas* y *Klebsiella sp*, resistentes a cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos. Además, la identificación de genes específicos (blaCTX-M, blaTEM, y blaSHV) mediante RT-PCR ratificando la presencia de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en las cepas evaluadas.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se analizó la resistencia antimicrobiana en enterobacterias productoras de βlactamasas de espectro extendido (BLEE) aislada de muestras de aguas residuales, obteniendo:

- En las muestras analizadas se cuantificó el número más probable (NMP) de coliformes totales por 250mL, por encima de los límites permitidos según la guía TULSMA. Se identificaron cepas productoras de βlactamasas de espectro extendido BLEE en las muestras de aguas residuales, siendo la más frecuente la *E coli*, seguida de *Pseudomonas* y *Klebsiella sp.*
- El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las enterobacterias aisladas demostró mayor frecuencia de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, seguidas de los monobactámicos. El cefotaxime fue el antimicrobiano probado que tuvo el 100% de cepas resistentes y las especies *Pseudomonas sp. Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp*, mostraron mayor resistencia a todos los β lactámicos.
- Se identificaron los genes blaCTX-M, blaTEM y blaSHV en las cepas productoras de βlactamasas de espectro extendido BLEE empleando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).
- Se desarrolló una manual de procedimientos para la inactivación adecuada de residuos líquidos provenientes del laboratorio clínico, detallando los pasos necesarios para garantizar el manejo seguro y conforme a las normativas vigentes.

5.2. Recomendaciones

- Realizar una secuenciación filogenética de los resultados obtenidos en este estudio con el fin de determinar el origen de la mutación.
- Realizar un estudio con un mayor número de muestras en diferentes centros para comparar resultados.
- Cambiar la evaluación óptica por una técnica molecular o bioquímica.
- Realizar una secuenciación filogenética de los resultados obtenidos en este estudio.
- Desarrollar y socializar un manual de procedimiento que describa los pasos necesarios para cumplir con los lineamientos estipulados en el reglamento emitido por el Ministerio de Salud Pública en materia de manipulación y descarte de desechos infecciosos provenientes de instituciones de salud que permita evitar la contaminación de las aguas residuales con bacterias multiresistentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beltrán Dávalos A, Escudero Vilema M, Córdova Morales S, Rosero Erazo CR. Monitoreo microbiológico para la gestión ambiental de Aguas Residuales Hospitalarias. Ciencia Digital. 2019 Sep 10;3(3.4.):342–53.
2. Martins A, Silva RA, Ferreira LO, Licate MM, Delafiori CR, Pôrto SF. Resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. Rev Panamazonica Saude. 2019 Nov;10(0).
3. Cerecedo Bretal R. Las aguas residuales como reservorio y vehículo de transmisión de determinantes de resistencia a antibióticos. 2021.
4. Mundial De La Salud O. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. 2001.
5. Guy R. Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos, 2017. 2017.
6. Fernando Reinthaler F, Melkes A, Posch J, Feierl G, Galler H, Haas D, et al. E. coli productora de BLEE en lodos de depuradora de Austria. 2009; Available from: www.sciencedirect.com
7. Flores Reyes Sección Bacteriología Subdepartamento Enfermedades Infecciosas Héctor Galeno Araya R, Jiménez Salgado M, Parra Rivas B, Ramírez Muñoz V, Micobacterias S, Bioseguridad Para Laboratorios Clinicos G DE. GUÍA DE BIOSEGURIDAD PARA LABORATORIOS CLÍNICOS
Angélica Scappaticcio Bordón. GUÍA DE BIOSEGURIDAD PARA LABORATORIOS CLÍNICOS. 2019.
8. Tellez-Carrasquilla S, Rodríguez EA, Natalia Jiménez J. Alta frecuencia de bacilos Gram negativos de importancia clínica resistentes a betalactámicos en efluentes de aguas residuales hospitalarias. 2022.
9. Soriano-Moreno DR, Yareta J, Rojas-Cosi AF, Fajardo-Loyola A, León-Luna D, Castillo-Quezada I, et al. Hospital effluents as a reservoir of beta-lactamase- and carbapenemase-producing enterobacteriaceae. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2021 Apr 1;38(2):302–7.
10. Soriano-Moreno DR, Yareta J, Rojas-Cosi AF, Fajardo-Loyola A, León-Luna D, Castillo-Quezada I, et al. Los efluentes hospitalarios como reservorio de beta-lactamasas y carbapenemasas productoras. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2021 Apr 1;38(2):302–7.
11. Romero E. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES. 2020.
12. Aleem M, Azeem AR, Rahmatullah S, Vohra S, Nasir S, Andleeb S. Prevalencia de bacterias y antimicrobianos Genes de resistencia en agua y superficies hospitalarias. Cureus. 2021 Oct 13;

13. Rodríguez EA, Quiceno JNJ. Resistencia bacteriana a los antibióticos en ambientes acuáticos: origen e implicaciones para la salud pública. Vol. 41, Revista Facultad Nacional de Salud Pública. Universidad de Antioquia; 2023.
14. Martínez-Orgániz Á, Garza-Ramos U, Sampedro-Rosas ML, González-González J, Nava-Faustino G, Toribio-Jiménez J. Patotipos y resistencia a antibióticos de Escherichia coli en aguas residuales. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. Revista Internacional de Contaminacion Ambiental. 2020;36(4):957–66.
15. Sáenz-Arias S, Garcés-Ordóñez O, Córdoba-Meza T, Blandon L, Espinosa Díaz L, Vivas-Aguas L, et al. Contaminación por vertidos de aguas residuales: Una revisión de las interacciones microorganismos–microplásticos y sus posibles riesgos ambientales en aguas costeras colombianas. Ecosistemas [Internet]. 2023 Apr 29;32(1):2489. Available from: https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/2489
16. Pallares-Vega R, Blaak H, van der Plaats R, de Roda Husman AM, Hernandez Leal L, van Loosdrecht MCM, et al. Determinantes de la presencia y eliminación de genes de resistencia a antibióticos durante el tratamiento de la EDAR: un estudio transversal. Agua Res. Water Res. 2019 Sep 15;161:319–28.
17. Paulshus E, Kühn I, Möllby R, Colque P, O'Sullivan K, Midtvedt T, et al. Diversidad y resistencia a los antibióticos entre las poblaciones de Escherichia coli en aguas residuales hospitalarias y comunitarias en comparación con las aguas residuales de la planta de tratamiento urbana receptora. Agua Res. Water Res. 2019 Sep 15;161:232–41.
18. Soriano-Moreno DR, Yareta J, Rojas-Cosi AF, Fajardo-Loyola A, León-Luna D, Castillo-Quezada I, et al. Los efluentes hospitalarios como reservorio de enterobacterias productoras de beta-lactamasas y carbapenemasas. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2021 Apr 1;38(2):302–7.
19. Zhang H, Zhou Y, Guo S, Chang W. Resistencia a múltiples fármacos encontrada en enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido de reservorios de agua rurales en Guantao, China. Front Microbiol. 2015;6(MAR).
20. Barroso González P, Bocourt Pérez L, Lugo Moya D, Romeu Álvarez B. Detección de β-lactamasas de espectro extendido en Escherichia coli aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana [Internet]. Available from: https://orcid.org/0000-0002-4265-290X
21. Hendriksen RS, Munk P, Njage P, van Bunnik B, McNally L, Lukjancenko O, et al. Monitoreo global de la resistencia a los antimicrobianos basado en análisis metagenómicos de aguas residuales urbanas. Comuna Nacional. Nat Commun. 2019 Dec 1;10(1).
22. Paz M, Muzio H, Gemini V, Magdaleno A, Rossi S, Korol S, et al. Aguas residuales de un Centro Hospitalario de Buenos Aires, Argentina: Características químicas, biológicas y toxicológicas. Vol. 4, Higiene y Sanidad Ambiental. 2004.
23. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov.

divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2016 Dec 1;66(12):5575–99.
24. Rodríguez EA, Quiceno JNJ. Bacterial Resistance to Antibiotics in Aquatic Environments: Origin and Implications for Public Health. Vol. 41, Revista Facultad Nacional de Salud Pública. Universidad de Antioquia; 2023.
25. Zamira Varela- Perez Liliana. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en colombia. 2016;
26. Calidad L, Agua D, Coli Y Su Salud E, Rock C, Rivera B. ¿Qué es La Calidad del Agua? 2014.
27. Tellez-Carrasquilla S, Rodríguez EA, Natalia Jiménez J. Alta frecuencia de bacilos Gram negativos de importancia clínica resistentes a betalactámicos en efluentes de aguas residuales hospitalarias. 2022.
28. Tártara SG. PATÓGENOS EMERGENTES-TERCERA PARTE "KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUCTORA DE CARBAPENEMASAS (KPN-KPC) " EMERGING PATHOGENS-PART III. Trasplante [Internet]. 2023;33(2):103–9. Available from: www.renal.org.ar
29. Antonio BULLÓN PALOMINO Paola Guadalupe VASQUEZ CERVANTES ASESOR Dra María Elena SALAZAR SALVATIERRA Lima J. Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico AUTORES. 2010.
30. La P, Electa A. LA LuChA CONtRA LAs REsIstENCIAs bACtERIANAs DEsDE EL LAbORAtORIO DE MICRObIOLOGíA CLíNICA. 2022.
31. Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β-lactamases and carbapenemases). Vol. 14, Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2013. p. 199– 210.
32. Alma M, Baires Várguez L. Resistencia antibiótica 21 Capítulo MECANISMOS DE RESISTENCIA. 2012.
33. Chiriboga I. BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN ESTACIONES. 2019.
34. Urquizo Ayala G, Jackeline Arce Chuquimia D, Gladys Alanoca Mamani D. RESISTENCIA BACTERIANA POR BETA LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO: UN PROBLEMA CRECIENTE BACTERIAL RESISTANCE BY EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE: A GROWING PROBLEM. Rev Med La Paz. 2018.
35. Sánchez-B Esp P, Muñoz-M Esp R, Gutiérrez-M Esp NP. Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia 1 Bacterial Resistance to Antibiotics: Mechanisms of Transfer. 2012.
36. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β-lactamases. Vol. 155, Research in Microbiology. 2004. p. 409–21.
37. Sorlózano Puerto Antonio. Betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio aportaciones científicas. Editorial de la Universidad de Granada; 2007.

38. Lepe JA, Martínez-Martínez L. Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas. Med Intensiva. 2022 Jul 1;46(7):392–402.
39. Garza-Ramos U, en MC, Martínez-Romero E, Silva-Sánchez J. Las ß-lactamasas de espectro extendido (BLEE) tipo SHV están codificadas en plásmidos relacionados de aislados clínicos de enterobacterias de México [Internet]. Available from: http://clustalw.genome.jp/
40. Yauri Bucheli MF. Caracterización molecular de genes de resistencia a β-lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia Enterobacteriaceae. Rev Ecuat Med Cienc Biol. 2021 Apr 23;42(1).
41. Abreu Rodríguez R. Prevalencia de enerobacterias productoras de ß-lactamasas de espectro extendido (BLEE), en exudados rectales de pollos de engorde en granjas avícolas en la isla de Tenerife, España. Servicio de Publicaciones, Universidad de La Laguna; 2014.
42. Korzeniewska E, Harnisz M. Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. J Environ Manage. 2013 Jul 5;123:1–7.
43. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Vol. 29, Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica. 2011. p. 524–34.
44. Instrucciones de uso Thermo Scientific™ Sensititre™ Lectura manual de placas de susceptibilidad MIC para aislados gramnegativos no exigentes 035-NFAST IVD-50-100-CID9607 [Internet]. 2019. Available from: www.trekds.com/techinfo.
45. de Dios TL. Tecnología en salud [Internet]. Vol. 2. 2013. Available from: www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx
46. María O, Mellado D. III. Número 30. Vol. 2020, Septiembre. 2020.
47. Jozefczuk J, Adjaye J. Análisis cuantitativo de expresión génica basado en PCR en tiempo real. In: Methods in Enzymology. Academic Press Inc.; 2011. p. 99– 109.
48. Mex-Álvarez RM de J, Garma-Quen PM, León-Reyes W del J. Manejo de residuos peligrosos biológicos e infecciosos en una escuela de química de nivel superior. RIDE Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo. 2020 Apr 22;10(20).
49. Toro ER, Szantó M, Juan N, Pacheco F, Contreras E, Gálvez A. Guía general para la gestión de residuos sólidos domiciliarios.
50. Compendio 2016 DIGITAL.
51. Stellman JMager. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Vol. 1. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales; 1998. 1359 p.
52. AM034.
53. Eckert C, Gautier V, Arlet G. Análisis de secuencia de ADN del entorno genético de varios genes blaCTX-M. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006 Jan;57(1):14–23.
54. Shrief R, Hassan RH, Zaki MES, Rizk MA. Estudio molecular de Klebsiella Oxytoca asociada con infección del tracto urinario en niños. Open Microbiol J. 2022 Feb 3;16(1).

55. Jena J, Sahoo RK, Debata NK, Subudhi E. Prevalencia de los genes TEM, SHV y CTX-M de cepas de Escherichia coli productoras de β-lactamasas de espectro extendido aisladas de infecciones del tracto urinario en adultos. 3 Biotech. 2017 Aug 1;7(4).
56. REVISION DEL ANEXO 1 DEL LIBRO VI DEL TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACION SECUNDARIA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE: NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES AL RECURSO AGUA REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN DE LA NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES : RECURSO AGUA 0 INTRODUCCIÓN.
57. Ochoa Ochoa GE, López Cisneros CL, Martínez León MDR. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido, aisladas en hemocultivos de pacientes atendidos en diferentes áreas hospitalarias. Anatomía Digital. 2022 Sep 20;5(3.3):76–92.

ANEXOS

Desagüe final del laboratorio clínico

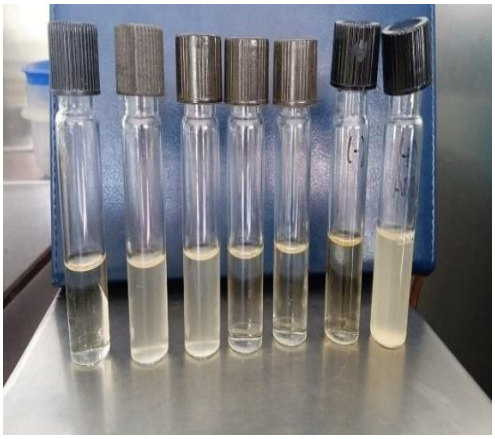


Material para las diluciones

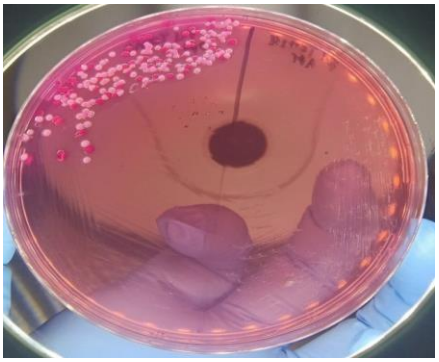


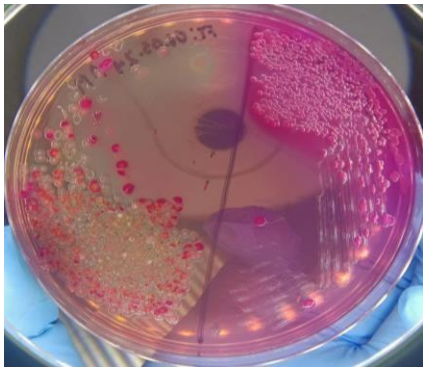
Cuantificación del NMP



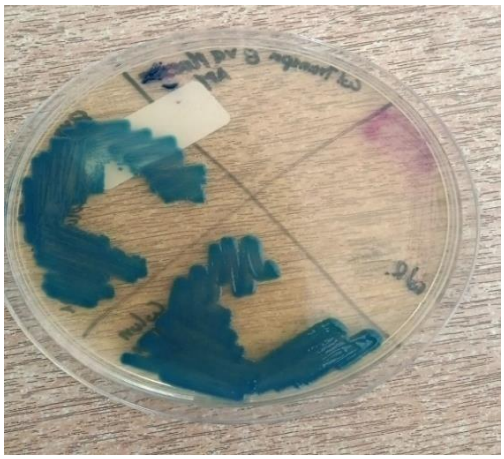


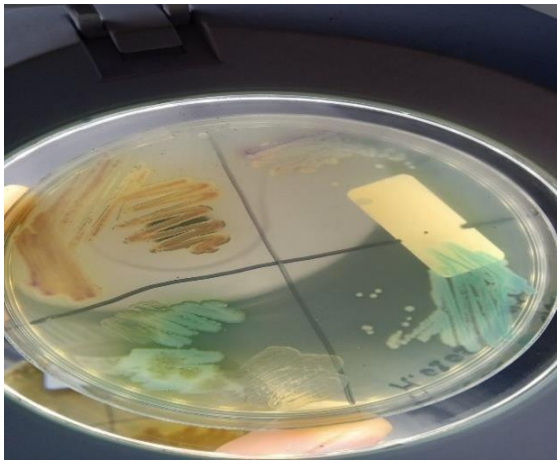
Siembra en agar MacConkey



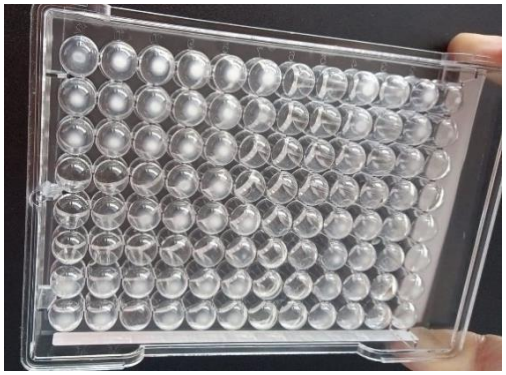


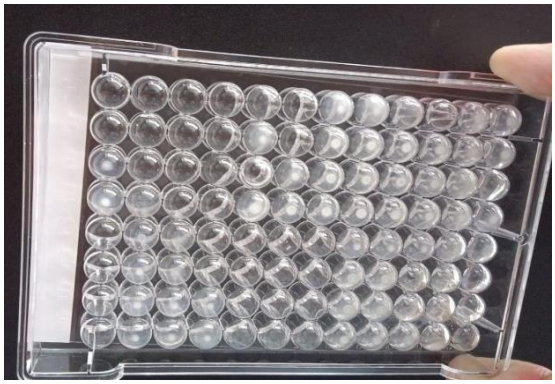
Resiembra en *CHROMagar*



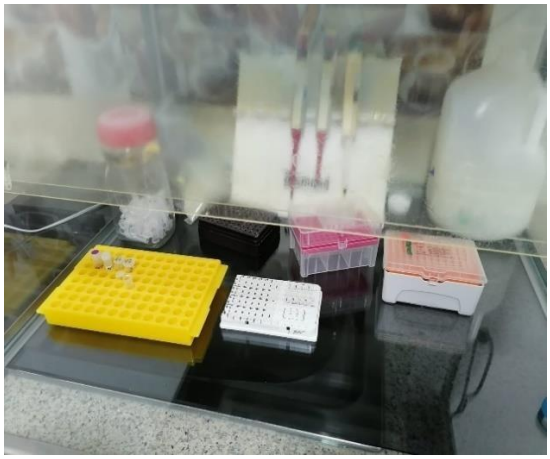


Perfil de susceptibilidad en placa sensititre





Material qPCR



Perfil de susceptibilidad placa sensititre

Grupo	***Antibiótico***	***E.coli 1AM***	***E.coli 2AM***	***E.coli 3AMPM***	***E.coli 4PM***	***E.coli 5PM***	***Pseudomona M***	***1A E.coli 6AM***	***Pseu a 2A***
Aminoglucósido	Amikacin	0	0	0	0	0	16	0	
Aminoglucósido	Gentamicin	0	0	0	1	0	8	0	
Aminoglucósido	Tobramycin	1	0	0	0	0	8	0	
Penicilina	Piperacillin / Tazobactam constant 4	0	0	0	1	1	1	0	
Penicilina	Ticarcillin / Clavulanic acid constant 2	0	2	0	1	2	4	0	
Monobactámico	Aztreonam	0	4	0	8	16	16	0	
Sulfonamida	Trimethoprim / Sulfamethoxazole	0	0	0	4	4	1	4	
Cefalosporina de 3era generación	Cefotaxime	0	8	32	32	32	8	0	
Cefalosporina de 3era generación	Ceftazidime	0	16	0	2	16	8	0	
Cefalosporina de 4ta generación	Cefepime	0	0	0	4	4	4	0	
Fluoroquinolona	Ciprofloxacin	0	0	2	2	0	0,2	2	
Fluoroquinolona	Levofloxacin	0	0	8	8	0	0	0	
Polimixina	Colistin	0	0	0	0	0,5	4	0	0
Polimixina	Polymixin B	0	0	0	0	0,5	4	0	
Carbapenem	Doripenem	0	0	0	0	1	2	0,25	
Carbapenem	Ertapenem	0	0	0	2	4	4	0	
Carbapenem	Imipenem	0	0	0	0	4	8	0	

Carbapenem	Meropenem	00	0	0	0	2	0
Tetraciclina	Doxycycline	20	8	16	8	0	8
Tetraciclina	Minocycline	00	2	16	4	0	0
Tetraciclina	Tigecycline	00	0	2	4	0,25	0

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. Título:

Manual de procedimientos para la inactivación adecuada de residuos líquidos provenientes del Laboratorio Clínico.

6.2. Descripción

En los laboratorios clínicos se genera una cantidad de productos y residuos, siendo alguno de estos peligrosos para la salud y contaminantes para el medio ambiente. Sin embargo, aunque el volumen suele ser pequeño en relación a lo producido en los grandes hospitales, no por ello es menos importante debido a la mayor probabilidad de contener microorganismos altamente patógenos. Por lo que se recomienda un estricto control durante la manipulación y eliminación de los residuos generados en el mismo (1).

En Ecuador, el Ministerio de Salud Pública (MSP), actuando como ente regulatorio, es el encargado de formular los lineamientos y normativa para la gestión de desechos generados en los establecimientos salud, sean estos públicos o privados. Los laboratorios clínicos producen una serie de desechos tanto inofensivos como también altamente peligrosos para la salud que, de no ser manejados de forma adecuada, se puede poner al personal en riesgo de exposición y al ambiente en riesgo de contaminación, generando posibilidad de daño a la salud de la población circundante. Se recomienda considerar un manual de procedimiento para el manejo adecuado de desechos producto de las actividades inherentes al laboratorio que incluya normas de bioseguridad y especificaciones respecto a la disposición final de residuos líquidos con alta probabilidad de contener bacterias con resistencia microbiana (2).

6.2.1. Objetivo

Proporcionar una guía de actividades para mejorar la inactivación de los residuos líquidos provenientes del laboratorio clínico con procedimientos que se rijan por las

normativas vigentes establecidas para el manejo, tratamiento y disposición final de residuos generados y evitar la contaminación de las aguas residuales con bacterias altamente resistentes además de reducir el impacto ambiental y el riesgo de contaminación biológica.

6.2.3. Alcance

El manual podrá ser implementado en cualquier laboratorio clínico y centros de salud que manipulen muestras biológicas potencialmente contaminadas con bacterias resistentes.

6.2.4. Responsables

Los procedimientos señalados en este manual serán de obligado cumplimiento para todos los profesionales que laboran en el Laboratorio Clínico y el jefe del área de microbiología será el principal responsable de vigilar que se cumplan, además de evaluar y asesorar cualquier duda que se presente durante su implementación.

6.2.5. Definiciones y términos básicos

Bacteria: microorganismos procariotas, es decir, unicelulares de pocos micrómetros de tamaño (1).

Bacterias resistentes a betalactamasas de espectro extendido: Son bacterias que producen β-lactamasas, las cuales son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación (1).

Desechos sanitarios: Desechos infecciosos con patógenos que representan un factor de riesgo para la salud y el ambiente, por su potencial peligrosidad biológica (1).

Desechos biológico-infecciosos: Está conformado por materiales utilizados durante la atención de la salud y aquellos contaminados con fluidos corporales, sangre y otros como cultivos de agentes infecciosos (1).

Residuos peligrosos: Son aquellos residuos capaces de provocar daño a la salud y/o al medio ambiente por presenta características específicas, tales como: combustibles, inflamables, explosivos, volátiles, corrosivos y/o tóxicos, así como también los infecciosos, los reactivos y radiactivos. De igual manera se pueden consideran peligrosos los envases donde hayan estado estos elementos (1).

Residuo infeccioso o de riesgo biológico: Son aquellos con concentraciones diferentes de microorganismos patógenos, incluyendo virus, parásitos y bacterias, en cantidades suficientes para producir una enfermedad infecciosa (1).

Residuos biosanitarios: Son aquellos elementos generados de la toma de muestras y procedimientos de laboratorios, incluyen algodones, gasas guantes, tubos de ensayo, frascos de orina y material fecal (1).

Resistencia a los antimicrobianos (RAM): Surge cuando las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos cambian a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos (1).

6.3. Desarrollo de la propuesta

El presente manual describe la gestión interna que debe realizarse en todo establecimiento que genere productos de residuos biológicos, incluyendo las modificaciones a implementar que sean necesarias para reducir el peligro potencial de daño a la salud que representan estos productos. La gestión de los desechos peligrosos, debe incluir el conocimiento de la naturaleza de los diferentes materiales a descartar y los riesgos específicos de estos, para ello existen indicaciones técnicas de clasificación y acopio en la fuente, siendo esta actividad un elemento trascendental para el resto del ciclo. El manual describe los procesos básicos para la gestión interna, entendiendo esta como aquella que se realiza dentro del establecimiento generador para el manejo de los residuos y desechos, tomando en cuenta los procedimientos establecidos en la norma emanada del Ministerio de Salud Pública del Ecuador descrita en el Acuerdo Interministerial N° 323. Se pretende que primordialmente las condiciones de almacenamiento, transporte y disposición final de los residuos del laboratorio clínico sean seguras.

Disposiciones generales del Acuerdo Interministerial

Describe que los establecimientos de salud con capacidad de implementar la inactivación de los desechos sanitarios generados en su actividad, pueden hacerlo tomando en cuenta la normativa pertinente, para lo cual se debe proceder a inactivarlos para poder ser considerados y gestionados como desechos comunes (2).

Gestión interna

Comprende las fases de: clasificación, acondicionamiento, recolección, almacenamiento, transporte, e inactivación en los casos que determine la Autoridad Sanitaria Nacional (2), (3).

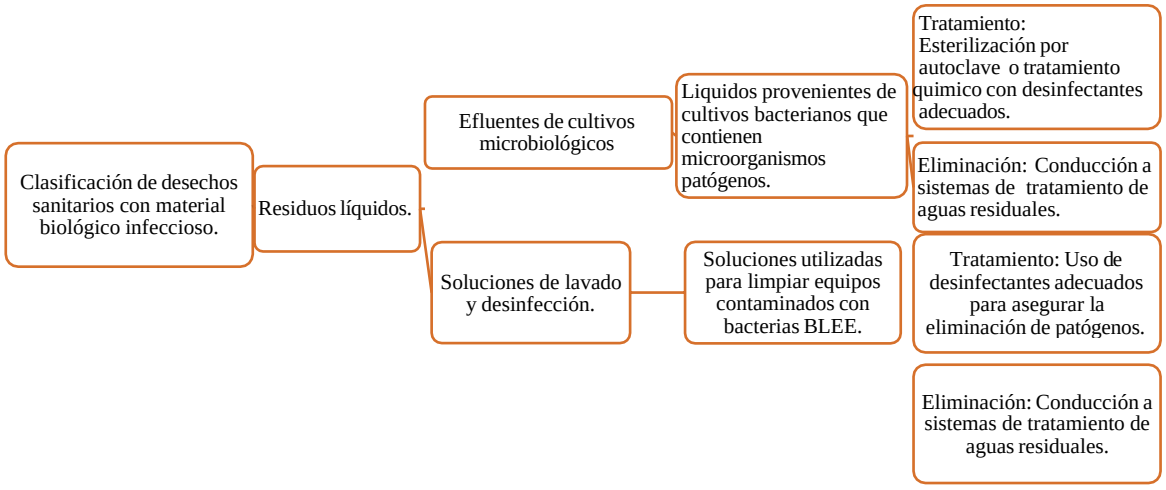
Para la clasificación y acondicionamiento en la fuente se utilizarán recipientes y fundas que cumplan con las especificaciones de la normativa sanitaria emitida para tal efecto. (2), (3).

Clasificación de los residuos

De acuerdo a la peligrosidad se debe iniciar la clasificación según corresponda:

- Residuos no peligrosos: Pueden eliminarse mediante vertidos, directamente a las aguas residuales.
- Residuos químicos peligrosos: Incluye combustibles, explosivos, gases, radioactivos y los biológicos (4).

Los residuos biológicos incluyen sangre, heces y orina los cuales se deben ser almacenados en recipientes específicos, señalizados según la normativa para luego inactivarse y proceder a su descarte en la alcantarilla, tomando en cuenta factores como el volumen, la periodicidad de su generación y facilidad de neutralización. Estos factores permitirán tomar la decisión de la inactivación in situ, o la necesidad de contratar una empresa especializada en la rama (4), (6).



Fuente: Elaborado por el autor

Procedimiento para la inactivación de residuos biológicos infecciosos.

Se describen los procedimientos para la inactivación de los residuos biológicos infecciosos generados en el laboratorio, cuyo volumen sea suficientemente pequeño para permitir su tratamiento en el mismo lugar, antes de su eliminación final, tomando en cuenta:

- **Cumplimiento de disposiciones legales:** se deben seguir las disposiciones legales vigentes, tanto locales como nacionales, para la gestión de residuos infecciosos.
- **Identificación y clasificación del residuo:** se debe identificar y clasificar el residuo como peligroso y biológico-infeccioso.
- **Preparación para la inactivación**:

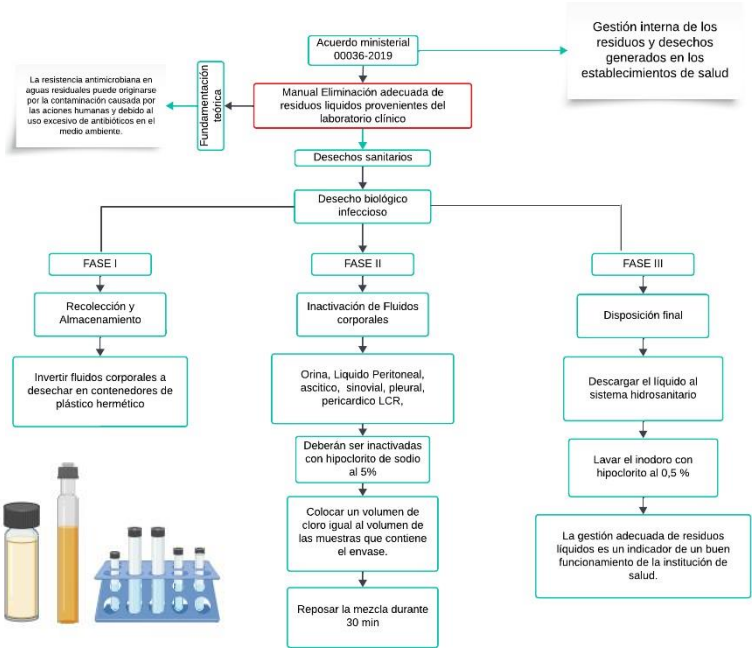
- Retirar los productos inflamables.
- Evitar tirar los recipientes contenedores de las sustancias en la basura habitual.

- **Inactivación o neutralización:**

- Proceder a la inactivación o neutralización del residuo.
- Verter las sustancias inactivadas por los desagües con abundante agua.

- **Manejo de derrames:**

- Actuar rápidamente en caso de derrames para evitar contaminaciones.
- Resguardar la bioseguridad de los empleados y evitar la contaminación de la indumentaria y otras zonas del laboratorio.



Fuente: Elaborado por el autor.

Tratamiento de desechos infecciosos líquidos:

- Restos de orina: añadir hipoclorito de sodio al 5% se colocará un volumen de cloro igual al volumen de orina se dejará por 30 minutos y se descargará en el sistema hidrosanitario.

- Los frascos vacíos que contenían los líquidos infecciosos deben manejarse como desechos infecciosos (1).

Procedimiento	Concentración Requerida	Referencia
Inactivación de fluidos corporales.	5%	(1)
Inactivación de cortopunzantes.	1%	(1)
Limpieza y desinfección de superficies no metálicas, mesones, sillas, paredes.	0,5 %	(1)
Limpieza y desinfección de la parte exterior de equipos de laboratorio y superficies metálicas.	0.1%	(1)

Inactivación de cultivos infecciosos

Los cultivos se inactivarán con esterilización mediante autoclave y de acuerdo con las especificaciones de la Organización Mundial de la Salud, utilizando un ciclo mínimo de 30 minutos a 121 °C y 2,09 kg/cm^2 (205 kPa). De acuerdo a la resistencia microbiana se pueden emplear otras combinaciones hasta 134 °C por 60 minutos a la presión indicada. Los recipientes se deben limpiar y desinfectar antes de devolverlos al laboratorio para un uso posterior (2).

Inactivación de desechos microbiológicos.				
Tipo de esterilización.	**Material**	**Temperatura**	**Tiempo**	**Referencia**
Tratamiento en estufa.	Material de Vidrio	160ºC	2 horas	(1)
Tratamiento en autoclave	Material de vidrio, Acero inoxidable	134ºC	3 minutos	(1)
		126ºC	10 minutos	(1)
		121ºC	15 minutos	(1)
		115ºC	25 minutos	(1)
	Desechos microbiológicos	120ºC	1 hora	(1)

Vertido

Se realiza para residuos no peligrosos y para los peligrosos cuando han sido reducidos o neutralizados de acuerdo al tratamiento adecuado. El vertido se realiza directamente

a las aguas residuales o bien al vertedero, estos deben contar con estructura necesaria para evitar la contaminación de la zona y preservar el medio ambiente (2).

Desinfección de los almacenamientos, recipientes y contenedores

- Se utilizarán soluciones con hipoclorito de sodio con concentraciones que pueden oscilar entre el 0.5 y 1.0% dependiendo de la situación.
- Se debe limpiar y lavar previamente los recipientes.
- Preparar la solución de hipoclorito de sodio y frotar los recipientes con paños de limpieza humedecidos en la solución.
- Dejar actuar por 30 minutos
- Secar al aire libre (1).



Fuente: Elaborado por el autor.



Fuente: Elaborado por el autor

Referencias

1. Contreras, F. (2019). Manual de manejo de desechos biológicos en el laboratorio clínico.
2. Ministra de Salud Pública. Acuerdo-Ministerial-323_Reglamento-para-la-gestión- integral-de-los-residuos-y-desechos-generados-en-los-establecimientos-de-salud. 2019.
3. Espinoza Gabriela. INSTRUCTIVO MANEJO ADECUADO DE DESECHOS.
2020.
4. INSSHT. NTP 276: Eliminación de residuos en el laboratorio: procedimientos generales. 2013.
5. Regan M. agencia protectora del medio ambiente [Internet]. 2020 [cited 2024 Jul 21]. Available from: https://mostprobablenumbercalculator.epa.gov/mpnForm