

Alta frecuencia de bacilos Gram negativos de importancia clínica resistentes a betalactámicos en efluentes de aguas residuales hospitalarias

Sara Tellez-Carrasquilla^{1,2}, Erika A. Rodríguez^{1,3}, J. Natalia Jiménez^{1,4*}

Resumen

Introducción: La resistencia bacteriana es una problemática multifactorial, donde otros escenarios diferentes al hospitalario han cobrado gran importancia.

Objetivo: Determinar la presencia de bacilos Gram negativos resistentes a betalactámicos de importancia clínica en aguas residuales de un hospital de alta complejidad de la ciudad de Medellín, Antioquia.

Materiales y métodos: Estudio descriptivo de corte transversal. Entre noviembre y diciembre de 2018 se realizaron dos muestreos en dos efluentes de agua residual de un hospital de alta complejidad. Las bacterias fueron aisladas empleando medios cromogénicos y posteriormente se realizó caracterización molecular de betalactamasas empleando PCR. La identificación bacteriana y la susceptibilidad se llevaron a cabo por métodos automatizados.

Resultados: Noventa aislados fueron obtenidos, de los cuales el 78,90% (n=71) portaban al menos un gen que codificaba para BLEE ó penicilinasas; y el 78,90% (n=71) al menos un gen para carbapenemasas. *Citrobacter freundii* fue la bacteria predominante (30% n=12), seguida de *Klebsiella pneumoniae* (25% n=10). En todos los aislados seleccionados se encontró Multidrogresistencia (MDR) (100% n=40).

Conclusión: La alta presencia de bacterias resistentes a betalactámicos en aguas residuales hospitalarias evidencia la necesidad de implementar estrategias de manejo de estos desechos, dado el riesgo potencial para la transmisión y diseminación de bacterias resistentes.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, bacilos Gram negativos, aguas residuales hospitalarias, betalactamasas.

High frequency of clinically important Gram-negative bacilli resistant to beta-lactams in hospital wastewater effluents.

Abstract

Introduction: Bacterial resistance is a multifactorial phenomenon, where scenarios other than the hospital setting have gained significant importance.

Objective: To determine the presence of beta-lactam-resistant Gram-negative bacilli of clinical importance in wastewater from a highly complex hospital in Medellín, Antioquia.

Materials and methods: A descriptive cross-sectional study was carried out. Two wastewater samples were taken from two effluents from a highly complex hospital between November and December 2018. Bacteria were isolated from chromogenic agar, and subsequently, molecular PCR characterization of beta-lactamasas of clinical importance was performed. Bacterial identification and susceptibility were determined by automated method.

Results: Ninety isolates from hospital effluents were obtained, of which 78.90% (n=71) had at least one gene that encoded for ESBL or penicillinase; and 78.90% (n=71) at least one gene coding for carbapenemases. *Citrobacter freundii* was the predominant bacteria in the evaluated isolates (30% n=12), followed by *Klebsiella pneumoniae* (25% n=10). In the isolates selected for susceptibility determination, all (100% n=40) were found to have multidrug resistance (MDR).

Conclusion: The high presence of bacteria resistant to beta-lactams in wastewater from hospital, evidences the need to implement management strategies for these wastes, given the potential risk for the transmission and spread of resistant bacteria.

Keywords: Bacterial resistance, Gram negative bacilli, hospital wastewater, betalactamasas.

Introducción

La resistencia bacteriana se ha convertido en un problema grave de salud pública en todo el mundo, con serias implicaciones clínicas relacionadas con altas tasas de mortalidad, morbilidad, estancias hospitalarias prolongadas y además que trae consigo una carga económica seria¹.

Entre los antimicrobianos de mayor prescripción a nivel intra-hospitalario y comunitario se encuentran los Betalactámicos, debido a su alta estabilidad y baja toxicidad. A este grupo pertenecen antibióticos como las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenémicos. Sin embargo, durante las últimas décadas un número importante de microorganismos, como los bacilos Gram negativos han desarrollado diferentes me-

1 Línea de Epidemiología Molecular y Resistencia Bacteriana. Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

2 <https://orcid.org/0000-0001-7188-5676>

3 <https://orcid.org/0000-0002-8582-8776>

4 <https://orcid.org/0000-0002-9183-1912>

* Autor para correspondencia:

Correo electrónico: jnatalia.jimenez@udea.edu.co

Recibido: 20/09/2022; Aceptado: 20/12/2022

Cómo citar este artículo: S. Tellez-Carrasquilla, et al. Alta frecuencia de bacilos Gram negativos de importancia clínica resistentes a betalactámicos en efluentes de aguas residuales hospitalarias. Infectio 2023; 27(2): 78-85

canismos de resistencia a este grupo de antibióticos, los cuales pueden ser enzimáticos y no enzimáticos, siendo los más frecuentes aquellos mediados por enzimas denominadas betalactamasas incluyendo las penicilinasas, betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas que degradan todos los betalactámicos incluyendo carbapenémicos².

Tradicionalmente la resistencia bacteriana se ha asociado a entornos hospitalarios, los cuales fueron considerados durante muchos años como sus principales reservorios debido al alto uso de antibióticos. Sin embargo, la resistencia bacteriana no está restringida a estos lugares. El uso inadecuado de antibióticos en la comunidad y en otras actividades humanas, como la ganadería, la agricultura, la acuicultura, la medicina veterinaria, entre otras, ha mostrado que la resistencia bacteriana es una problemática de carácter multifactorial donde recientemente, el ambiente ha cobrado gran importancia³.

En particular, las aguas residuales hospitalarias se han convertido en blanco de estudio al ser reservorios de antibióticos, bacterias resistentes, y genes de resistencia, considerados contaminantes emergentes y puntos calientes de diseminación de la resistencia hacia el ambiente^{4,5}. Varios autores sugieren que la presencia de estos contaminantes en los cuerpos de agua podría alterar la microbiota natural presente en los ecosistemas acuáticos y favorecer procesos de transferencia horizontal entre bacterias de importancia clínica y ambiental⁶. A pesar de que la liberación de aguas residuales hospitalarias no tratadas podría representar un peligro para el medio ambiente y la salud humana, existen pocos estudios a nivel local dirigidos a evidenciar la problemática.

Teniendo en cuenta que Colombia, es uno de los países en Latinoamérica con mayores porcentajes de bacterias resistentes a betalactámicos, en este trabajo se propuso determinar la presencia de bacilos Gram negativos resistentes a betalactámicos de importancia clínica en aguas residuales de un hospital de alta complejidad de la ciudad de Medellín, Antioquia.

Lo anterior con el fin de dar a conocer la necesidad de generar alternativas para el control de la diseminación de la resistencia bacteriana en la ciudad.

Materiales y métodos

Tipo y lugar de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en un hospital de alta complejidad ubicado en la ciudad de Medellín, con 754 camas. Se realizaron 2 muestreos durante los meses de noviembre y diciembre del año 2018, donde se evaluó el efluente de dos puntos del hospital: Punto 1: correspondiente a efluentes provenientes de los servicios de hospitalización general adultos y pediatría, medicina interna y servicio de alimentación. Punto 2: perteneciente a efluentes de Urgencias, hospitalización quirúrgica, unidad de cuidados intensivos (UCI) y unidad de cuidados especiales (UCE) de adultos y pediátrica.

Recolección de la muestra

Se tomaron aproximadamente 500 mL de agua residual proveniente de los dos puntos de muestreo en frascos de vidrio estériles. Posterior a la recolección, las muestras fueron transportadas al laboratorio a 4°C. El análisis microbiológico fue realizado dentro de las primeras 4 horas luego de la recolección.

Tamizaje de Bacilos Gram Negativos (BGN) resistentes a los betalactámicos

A partir de las muestras obtenidas se tomó 1 mL y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada al 1% hasta 10^{-2} , posteriormente, se tomaron 100 μ L de las diluciones previamente preparadas y se sembraron por triplicado en los agares cromogénicos ChromID® ESBL y ChromID® Carba respectivamente. Todas las muestras se incubaron a 37°C (\pm 2) durante 18 a 24 horas aproximadamente. El tamizaje de BGN resistentes a betalactámicos se realizó siguiendo el protocolo detallado por Aristizábal et al⁷; brevemente, del ChromID® ESBL y ChromID® Carba se seleccionaron aleatoriamente aproximadamente 5 colonias de cada morfotipo bacteriano de acuerdo a lo establecido por la casa comercial: *Escherichia coli* productora de una coloración rosada, *Proteae* (*Proteus* spp, *Providencia* spp, *Morganella* spp) coloración marrón oscuro a claro y microorganismos del grupo KESC (*Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp y *Citrobacter* spp) coloración verde/azul. Las colonias fueron aisladas en agar MacConkey y agar nutritivo. A partir del agar nutritivo, se realizó la prueba de la oxidasa, empleando Bactident® Oxidasa para diferenciar enterobacterias y no enterobacterias.

Caracterización molecular de penicilinasas, BLEE y carbapenemasas de importancia clínica

A los bacilos Gram negativos sospechosos de presentar resistencia a betalactámicos, seleccionados a partir del ChromID® ESBL y ChromID® Carba, se les realizó una extracción de DNA utilizando el kit comercial "DNA Wizard Genomic Purification kit" (Promega, Madison, WI, USA). La caracterización molecular de penicilinasas, BLEE y carbapenemasas de mayor importancia clínica fue llevada a cabo usando diferentes protocolos de PCR multiplex. Para la detección de betalactamasas tipo cefalosporinasas y penicilinasas se emplearon los protocolos establecidos por Dallenne et al⁸, en este sentido, se detectaron las betalactamasas tipo *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} del grupo 1, *bla*_{CTX-M} del grupo 2, *bla*_{CTX-M} del grupo 9 y *bla*_{CTX-M} del grupo 8/25 y para el caso de las carbapenemasas se implementó el protocolo descrito por Poirel et al y Ellington et al^{9,10} para detectar *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA-48}.

Identificación y perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización molecular, se seleccionó una muestra representativa (n=40) de estos aislados para realizar la identificación de especie y determinar el perfil de susceptibilidad. De estas cepas seleccionadas el 50% (n=20) provenían del punto de muestreo 1 y el 50% restante del punto de muestreo 2. La identifica-

ción de especie de los aislados seleccionados se llevó a cabo empleando el sistema automatizado Vitek-2 y la tarjeta GN, para el perfil de susceptibilidad a los antibióticos se utilizó la tarjeta AST GN93. La interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) se hizo de acuerdo a lo establecido en el M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Edición 30th¹¹ y la M45-A2 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, 2da Edición¹² ambos de CLSI (Institute of Clinical and Laboratory Standards) y la interpretación de la tigeciclina (TG) de acuerdo a EU-CAST 2020¹³. El perfil de resistencia de los BGN aislados se realizó en aislamientos que tenían datos completos para los antibióticos evaluados. Los aislados cuya interpretación de susceptibilidad fue intermedio, fueron considerados como resistentes. La multidrogorresistencia fue definida como la resistencia de un aislado a 3 o más categorías de antibióticos, las categorías se establecieron de acuerdo a lo propuesto por Magiorakos et al¹⁴.

Análisis de la información

Se realizó un análisis univariado para la descripción de las betalactamasas detectadas, especies identificadas y del perfil de resistencia a los betalactámicos y carbapenémicos; para lo cual se emplearon frecuencias relativas y absolutas. La información fue analizada empleando Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation).

Resultados

Caracterización molecular de genes que codifican para penicilinasas, BLEE y carbapenemasas

Se caracterizaron molecularmente un total de 90 bacilos Gram negativos sospechosos de resistencia a betalactámicos (30 provenientes del punto de muestreo 1 y 60 del punto de muestreo 2). Con relación a las betalactamasas el 100% de estos aislados presentaban al menos un gen que codificaba para una de ellas, donde 71/90 aislados (78,9%) contaban con BLEEs y/o penicilinasas (28 del punto de muestreo 1 y 43 del punto de muestreo 2) y 71/90 aislados (78,9%) con carbapenemasas (21 del punto de muestreo 1 y 50 del punto de muestreo 2). El detalle de la frecuencia de los tipos de BLEEs y penicilinas presentes en los aislados por punto de muestreo se describe en la tabla 1, así mismo, y en la tabla 2 se detalla la frecuencia de carbapenemasas.

Ahora bien, es importante considerar que, aunque los aislados caracterizados molecularmente fueron 90, el total de betalactamasas halladas en el trabajo fue de 177, esto debido a que un aislado podía presentar genes que codificaban para diferentes betalactamasas. Al realizar el análisis de los perfiles de betalactamasas se encontró gran variedad siendo el perfil más frecuente *bla*TEM+*bla*KPC en un 26,7% (n=24) (Figura 1). Es de resaltar que se encontraron 5 bacilos Gram negativos que portaban simultáneamente 2 carbapenemasas (*bla*KPC+*bla*VIM).

Tabla 1. Frecuencia de penicilinasas y BLEE presentes en los aislados por punto de muestreo.

Perfiles enzimáticos	Punto de muestreo 1 (n=28) n (%)	Punto de muestreo 2 (n=43) n (%)
TEM	7 (25)	20 (46,5)
SHV	3 (10,7)	1 (2,3)
CTX-M GRUPO 1	10 (35,7)	8 (18,6)
TEM+SHV	0	4 (9,3)
TEM+CTX-M GRUPO 1	1 (3,6)	4 (9,3)
SHV+CTX-M GRUPO 1	0 (0)	5 (11,6)
TEM+SHV+CTX-M GRUPO 1	6 (21,4)	1 (2,3)
TEM+SHV+CTX-M GRUPO 9	1 (3,6)	0

Nota: Punto 1: corresponden a efluentes provenientes de los servicios de hospitalización general adultos y pediátrica, medicina interna y servicio de alimentación. Punto 2: incluye efluentes de hospitalización quirúrgica, UCI y UCE de adultos y pediatría. Nota. En el segundo muestreo del punto 1 no hubo crecimiento de bacterias probablemente por presencia de agentes inhibidores.

Tabla 2. Frecuencia de carbapenemasas presentes en los aislados por punto de muestreo.

Perfiles enzimáticos	Punto de muestreo 1 (n=21) n (%)	Punto de muestreo 2 (n=43) n (%)
KPC	21 (100)	44 (88)
VIM	0	1 (2)
KPC+VIM	0	5 (10)

Nota: Punto 1: corresponden a efluentes provenientes de los servicios de hospitalización general adultos y pediátrica, medicina interna y servicio de alimentación. Punto 2: incluye efluentes de hospitalización quirúrgica, UCI y UCE de adultos y pediatría. *Nota. En el segundo muestreo del punto 1 no hubo crecimiento de bacterias probablemente por presencia de agentes inhibidores.

Con respecto a las diferencias entre los puntos de muestreo, se observó que en el punto 1 fue más frecuente la presencia de genes de las betalactamasas tipo *bla*CTX-M y *bla*SHV y en el punto 2 fueron frecuentes las betalactamasas tipo *bla*TEM, *bla*KPC y *bla*VIM (Tabla 1 y Tabla 2). Así mismo, en el punto de muestreo 2 se observó mayor variabilidad de perfiles de betalactamasas, presentándose 19 de los 22 perfiles hallados, mientras que en el punto de muestreo 1 se hallaron sólo 9 perfiles (Figura 1).

Identificación de especie y distribución de las betalactamasas tipo penicilinasas, BLEE y carbapenemasas en los aislados identificados

De los 40 Bacilos Gram Negativos seleccionados para realizar la identificación y susceptibilidad a antibióticos, el 80% (n=32) correspondían a enterobacterias y el 20% restante a no enterobacterias (n=8). Los géneros identificados fueron *Escherichia coli* (n=7; 17,5%), *Citrobacter freundii* (n=12; 30%), *Klebsiella pneumoniae* (n=10; 25%), *Aeromonas hydrophila/caviae* (n=4; 10%), *Acinetobacter baumannii complex* (n=1; 2,5%), *Enterobacter cloacae complex* (n=1; 2,5%), *Kluyvera intermedia* (n=1; 2,5%), *Raoultella planticola* (n=1; 2,5%), *Vibrio cholerae* (n=2; 5%) y *Pseudomonas aeruginosa* (n=1; 2,5%). En general se encontró una mayor variedad de microorga-

nismos en el punto de muestreo 2, donde se encontró mayor cantidad de no enterobacterias (25%) en comparación con el punto de muestreo 1 (15%), así mismo en el punto de muestreo 2 se detectaron otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii* complex, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 2).

Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos y multidrogresistencia en los aislados identificados:

Respecto al análisis de resistencia a antimicrobianos en las enterobacterias se encontraron altos porcentajes de resistencia a cefalosporinas, carbapenémicos y en menor frecuencia a amikacina, tigeciclina y nitrofurantoína. Al comparar el porcentaje de resistencia entre los puntos de muestreo, se observó que las muestras del punto 1 mostraron mayor porcentaje de resistencia para la mayoría de los antibióticos evaluados, a excepción de las fluoroquinolonas y trimetoprima/sulfametoxazol, para los cuales fue mayor el porcentaje de resistencia en el punto de muestreo 2. En el caso de las no enterobacterias (*Aeromonas hidrophila/caviae*, *Acinetobacter baumannii* complex, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*) se encontraron altos porcentajes de resistencia a cefalosporinas y bajos porcentajes de resistencia a amikacina, tigeciclina y nitrofurantoína (Figura 3). Al comparar estos porcentajes por punto de muestreo, observamos una resistencia importante a carbapenémicos y cefalosporinas de 3 y 4 generación en los aislados del punto 1; no obstante, los aislados del punto 2 presentaron resistencia a todos los antibióticos evaluados, cabe anotar que el análisis de resistencia a antibióticos en las no enterobacterias no es concluyente esto debido a la baja cantidad de aislados de este grupo (n=8), a la diversidad de microorganismos que se agruparon en este y a la presencia de resistencias intrínsecas en ellos.

El análisis de los perfiles de resistencia encontrados mostró que el 100% de los aislados (n=40) eran resistentes a más de un agente antimicrobiano, siendo *Klebsiella pneumoniae* el microorganismo que presentó mayor resistencia a los antibióticos donde el 70% (n=7) de estos aislados mostró resistencia a todos los antibióticos evaluados. Se obtuvieron un total de 20 perfiles de resistencia a las categorías de anti-

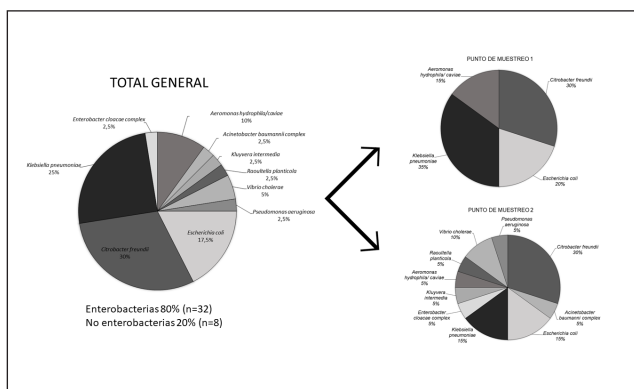


Figura 2. Bacilos Gram negativos portadores de betalactamasas tipo penicilinas, BLEE y carbapenemasas en los puntos de muestreo evaluados en el hospital. Nota: El número de aislados identificados en cada punto de muestreo fue de n=20.

bióticos, los cuales se describen en la Figura 4. En esta figura, otros perfiles corresponden a aquellos perfiles que solo estaban presentes en un aislado, así mismo se observa que los perfiles del punto de muestreo 2 fueron muy variados ya que el 50% de los aislados se agruparon en la categoría de otros perfiles, mientras que en el punto de muestreo 1 este correspondió sólo al 15%.

En lo que respecta a la multidrogresistencia (MDR), definida por Magiorakos et al. 2012 como la resistencia de un aislado a tres o más categorías de antimicrobianos, se encontró que el 100% (n=40) de los aislados fueron MDR, con la siguiente distribución: el 2,5% (n=1) resistente a cuatro categorías de antimicrobianos, 2,5% (n=1) a cinco categorías de antimicrobianos, 5% (n=2) a seis categorías, 15% (n=6) a siete, 35% (n=14) a ocho, 12,5% (n=5) a nueve, 5% (n=2) a diez y finalmente el 22,5% (n=9) fue resistente a las once categorías de antimicrobianos evaluadas.

Discusión

En este trabajo se encontró una frecuencia importante de bacterias resistentes a cefalosporinas y carbapenémicos, 100% multidrogresistentes, en un efluente hospitalario, principalmente provenientes de unidades de cuidado crítico como son hospitalización quirúrgica, UCI y UCE de un hospital de tercer nivel. Estos resultados evidencian la necesidad de plantear estrategias de desinfección de efluentes provenientes de unidades hospitalarias y particularmente aquellas provenientes de unidades de cuidado crítico en hospitales de la región (Figura 5).

En Colombia, el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible presentó en el 2015 la resolución 0631 de vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público, que busca reducir y controlar las sustancias contaminantes que llegan a los ríos, embalses, lagunas, cuerpos de agua naturales o artificiales de agua dulce, y al sistema de alcantarillado público, para de esta forma, aportar al

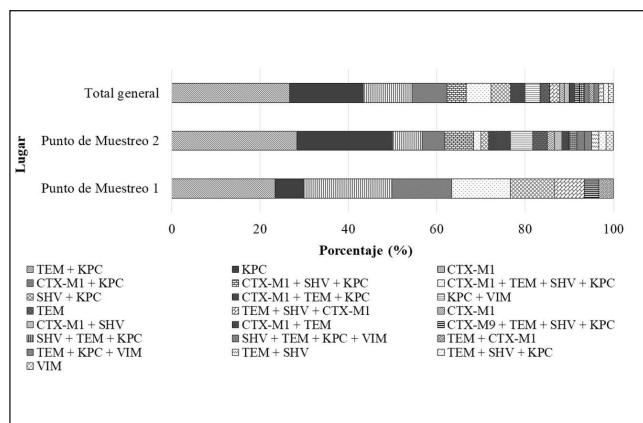


Figura 1. Distribución de los perfiles de betalactamasas tipo penicilinas, BLEE y carbapenemasas en los puntos de muestreo evaluados en el hospital.

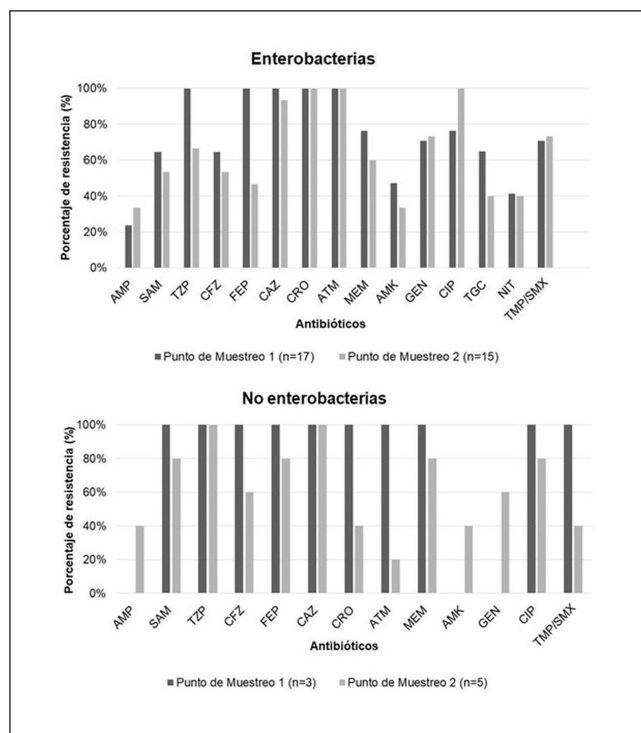


Figura 3. Porcentaje de resistencia de bacilos Gram Negativos portadores de betalactamasas tipo penicilinas, BLEE y carbapenemasas en los puntos de muestreo evaluados en el hospital. Se identificaron como no enterobacterias *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Acinetobacter baumannii* complex, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. Abreviaciones: ampicilina (AMP), ampicilina sulbactam (SAM), piperacilina tazobactam (TZP), cefazolina (CFZ), cefepime (FEP), ceftazidime (CAZ), ceftriaxona (CRO), aztreonam (ATM), meropenem (MEM), amikacina (AMK), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), tigeciclina (TGC), nitrofurantoína (NIT) y trimetoprima/sulfametoxazol (TMP/SMX).

mejoramiento de la calidad del agua y trabajar en la recuperación ambiental de las arterias fluviales del país, sin embargo los parámetros evaluados en las aguas residuales hospitalarias no involucran la presencia de contaminantes emergentes como antibióticos, bacterias resistentes y genes de resistencia¹⁵.

Los efluentes hospitalarios se han considerado como una de las principales fuentes de diseminación de bacterias resistentes a antibióticos al ambiente ya que son lugares donde confluyen bacterias sensibles y resistentes, así como solventes, desinfectantes y antibióticos, que al mezclarse pueden favorecer la selección, transferencia y procesos de diseminación de la resistencia antimicrobiana^{16,17}. Estudios a nivel local han descrito el alto impacto de la resistencia antimicrobiana en los hospitales de la ciudad de Medellín, mostrando alta endemicidad de mecanismos de resistencia de impacto clínico y evidenciando un alto consumo de antibióticos tanto en el hospital como en la comunidad^{18,19}. Esta situación evidenciaba la necesidad de evaluar otros escenarios diferentes al hospitalario con el objetivo de comprender el problema de la resistencia a nivel local.

Aunque de forma directa la mayoría de la población humana no entra en contacto con las aguas residuales, los resultados de este trabajo son motivo de gran preocupación ya que la

mayoría de las aguas residuales de hospitales en los países en desarrollo no reciben tratamiento y, junto con el agua municipal, pueden ir a ríos o lagos donde luego pueden usarse para otras actividades humanas²⁰. Los altos niveles de resistencia a antibióticos encontrado en los aislados bacterianos de este estudio son un indicador del comportamiento de la resistencia bacteriana en los hospitales de la ciudad. La resistencia a múltiples fármacos es por lo tanto un problema global importante y señala la necesidad de que existan procesos capaces de contrarrestar la carga bacteriana y la presencia de antibióticos en las aguas residuales hospitalarias debido al potencial daño que pueden ocasionar. Así mismo, estos hallazgos ponen en manifiesto que, en una era en la que la evolución y diseminación de la resistencia a los antimicrobianos no están acompañadas por el desarrollo de nuevos antimicrobianos, controlar la diseminación de bacterias resistentes a estos medicamentos es absolutamente necesario. En este contexto, el tratamiento de aguas residuales hospitalarias, las regulaciones sobre la propagación de bacterias y/o genes de resistencia podría contribuir a desacelerar la evolución de la resistencia a los antimicrobianos más allá de los hospitales²¹. Uno de los datos que cobra mayor interés dentro de los hallazgos obtenidos es el alto porcentaje de aislados que portaban al menos un gen que codificaba para una carbapenemasa (78,9% n=71) y que en su mayoría era la carbapenemasa *blaKPC* (77% n=70); un valor muy cercano a la frecuencia detectada de aislados que portaban al menos un gen que codificara una BLEE o penicilinas (78,9% n=71). En aguas residuales y en el ambiente acuático los genes de resistencia que codifican para BLEEs o penicilinasas generalmente son descritos en mayor frecuencia que los genes *blaKPC*⁷. Por lo cual este hallazgo puede estar evidenciando una alta presión de selección por antibióticos en el medio hospitalario y una alta presencia de bacterias resistentes a carbapenémicos ya sea colonizando o infectando los pacientes hospitalizados de la ciudad cercano a las BLEEs y penicilinasas.

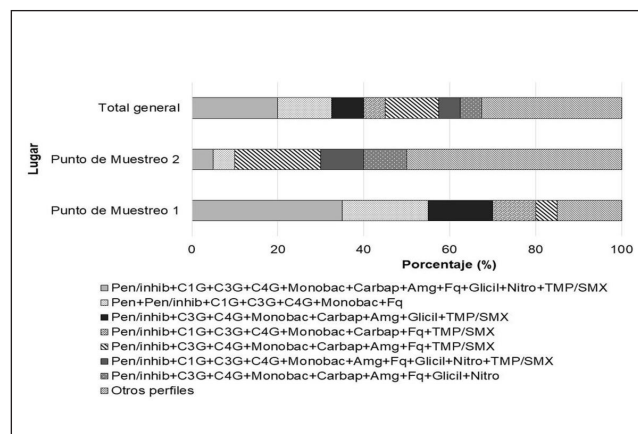


Figura 4. Perfil de resistencia a las categorías de antibióticos evaluadas. Pen (penicilinas), Pen/inhib (penicilinas+inhibidor de betalactamasas), C1G (cefalosporinas de primera generación), C3G (cefalosporinas de tercera generación), C4G (cefalosporinas de cuarta generación), Monobac (monobactámicos), Carbap (carbapenémicos), Amg (aminoglucósidos), Fq (fluoroquinolonas), Glicil (gliciliclinas), Nitro (nitrofuranos), TMP/SMX (trimetoprima-sulfametoxazol).

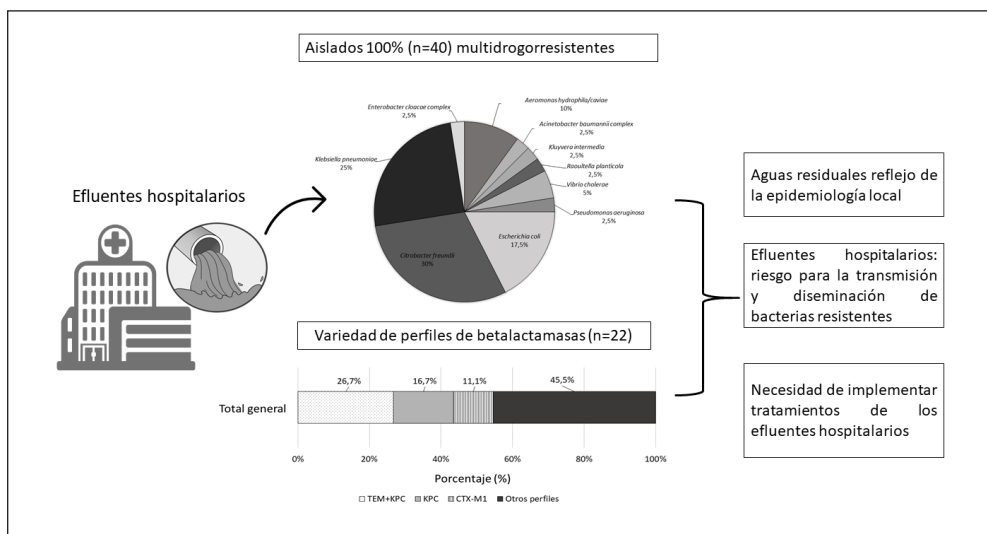


Figura 5. Gráfica integradora de resultados obtenidos.

De igual forma, en este trabajo se detectó la presencia de bacilos Gram negativos portadores de otras carbapenemasas de importancia clínica como *blaVIM* (n=6). Este mecanismo de resistencia fue detectado en 5 aislados en combinación con el gen *blaKPC*. Este es un hallazgo que se asemeja a lo reportado para el año 2018 en los aislados bacterianos de los pacientes hospitalizados de la ciudad y de Colombia, donde las carbapenemasas *blaKPC* y *blaVIM* mostraban alta frecuencia y donde cada vez es más común encontrar este perfil de resistencia^{19,22,23}. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros estudios en Europa donde los genes de tipo *blaNDM* y *blaOXA-48* se detectan en porcentajes superiores en BGN aislados de efluentes de aguas residuales de los hospitales^{24,25}. La diferencia en los hallazgos responde entonces al comportamiento epidemiológico local de la resistencia bacteriana, razón por la cual es importante continuar la vigilancia epidemiológica en cada región de este tipo de efluentes y evaluar su impacto en el ambiente.

Por otro lado, para el caso de las penicilinasas y BLEE, se observó el predominio de las betalactamasas tipo *blaCTX-M* grupo 1 y *blaTEM* en los dos efluentes evaluados. Las bacterias productoras de enzimas betalactamasas tipo *blaCTX-M* son las más prevalentes en los entornos hospitalarios y en la comunidad¹⁸. A nivel de aguas residuales hospitalarias también se ha descrito dentro de las familias de BLEE dominantes²⁶ lo que sugiere que *blaCTX-M* es una de las betalactamasas más comunes en este entorno probablemente por la mayor circulación en comunidad de microorganismos con este mecanismo de resistencia o también por el uso de cefalosporinas en hospitalización. A nivel local estos resultados tienen mucha similitud con lo reportado por Aristizábal et al. (2019) en una planta de tratamiento de aguas residuales en Antioquia, donde las betalactamasas *blaCTX-M* grupo 1 y *blaTEM* fueron las más prevalentes⁷.

En cuanto a los hallazgos de microorganismos obtenidos se resalta la presencia de bacterias de importancia clínica como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

Reportes del grupo GERMEN, durante el año en el cual se realizó el estudio (2018), encontraron que los microorganismos que se aislaron con mayor frecuencia en los hospitales de Antioquia fueron: *Escherichia coli*, el cual estuvo presente en un 27% en unidades no UCI, mientras que en UCI en un 15% seguido de *Klebsiella pneumoniae* que se aisló en un 10% en unidades no UCI y 15% en UCI²⁷, resultados similares han sido descritos en otras zonas del país²⁸. Estos hallazgos demuestran que, la carga de las bacterias resistentes a los antibióticos presentes en los efluentes de las aguas residuales hospitalarias, como se esperaba, concuerda con la prevalencia local de estos microorganismos en el hospital. Además, confirma la liberación de los residuos de los hospitales portando desechos humanos y bacterias patógenas (resistentes y susceptibles) y la importancia de reducir estos contaminantes a un mínimo para evitar el intercambio de material genético²⁹.

Adicionalmente, en el trabajo también se detectaron bacterias saprofitas ambientales y con potencial patogénico, como *Raoultella planticola*, *Aeromonas* spp y *Kluyvera* spp, las cuales se han descrito como reservorios ambientales de genes de resistencia dentro de ellos *blaKPC*. Estudios previos señalan que estos microorganismos adquieren estos genes de resistencia en las aguas residuales hospitalarias, posiblemente por la presión selectiva ejercida por los antimicrobianos presentes y actúan como reservorios ambientales de mecanismos de resistencia antimicrobiana, que podría compartir con patógenos de mayor relevancia clínica mediante transferencia horizontal de genes²¹.

Este estudio también permitió resaltar las diferencias encontradas entre los puntos muestreados en el hospital; por ejemplo, se observó una tendencia de un problema de resistencia mayor en los aislamientos provenientes del punto de muestreo 2 (hospitalización quirúrgica, UCI y UCE de adultos y pediatría). Se observó que los aislados obtenidos de este punto de muestreo presentaron una mayor diversidad

de carbapenemasas y perfiles de betalactamasas. Así mismo, se encontró que los BGN en este efluente eran más diversos (incluían otros microorganismos como BGN no fermentadores), mostraban resistencia a todos los antibióticos evaluados y presentaban gran variabilidad de perfiles de resistencia. Como se mencionó previamente, en hospitalización quirúrgica, UCI y UCE de adultos y pediátrica, se suele presentar con mayor frecuencia infecciones por bacterias altamente resistentes debido en parte a que en estos espacios hay un alto uso de antibióticos y por lo tanto alta presión de selección²⁸. Así mismo, los pacientes suelen complicarse ya sea por infecciones por patógenos endógenos oportunistas y/o de origen hospitalario. Estos pacientes igualmente pueden colonizarse por bacterias resistentes y en el hospital pueden ser fuentes o reservorios de bacterias resistentes permitiendo una transmisión cruzada de paciente a paciente³⁰.

Por lo anteriormente mencionado, la cantidad de bacterias resistentes detectadas en las UCIs suele ser mayor que en otras áreas hospitalarias y su presencia es significativamente importante debido a la severidad de los pacientes que allí se encuentran. Entre los factores que promueven el auge y el esparcimiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos se encuentran el uso inadecuado de antibióticos de amplio espectro, la presencia de instrumental médico invasivo en un paciente con los mecanismos de defensas disminuidas, como es el paciente de la UCI, así como la falta de programas de vigilancia para detectar infecciones resistentes a antibióticos³¹.

En cuanto a la multidrogorresistencia se obtuvo que el 100% (n=40) de los aislados fueron MDR; los resultados obtenidos en el estudio son similares a lo reportado en investigaciones realizadas en aguas hospitalarias en Nigeria donde se encontró que la prevalencia de bacterias multidrogorresistentes (MDR) fue del 100%³². Los aislados MDR tienen una seria implicación en el ambiente hospitalario ya que son microorganismos que cuando producen infección no responden a los tratamientos antimicrobianos de elección y llevan a la falla terapéutica produciendo así aumento en los costos médicos, en la morbilidad y mortalidad, así como también implicaciones económicas¹. Por otro lado la presencia de estos microorganismos en el ambiente es un tema de preocupación, debido a que se propicia la diseminación de bacterias multidrogorresistentes en el medio ambiente, además pone de manifiesto el éxito de la transmisión de mecanismos de resistencia, los cuales pueden persistir durante largos periodos de tiempo en el ambiente acuático³³.

En general, el impacto de la diseminación de la resistencia bacteriana a partir del agua residual es un tema de gran preocupación. Se requiere determinar con mayor precisión en qué medida fenómenos naturales, como la dilución y la degradación en grandes fuentes hídricas, pueden ayudar a mitigar la presencia y diseminación de bacterias resistentes

provenientes de aguas residuales tratadas o sin tratar³⁴. Así mismo, falta más información sobre la forma como las bacterias resistentes presentes en las aguas contaminadas pueden diseminarse, transmitirse, colonizar o infectar a animales o al hombre. No obstante, existen reportes que señalan estos procesos a partir de agua contaminada con bacterias resistentes, principalmente en modelos como *Escherichia coli* resistente a betalactámicos³⁵ y bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas como *bla*NDM-1 o *bla*IMI-2^{36,37} se requieren estudios más completos para confirmar su transmisión.

Finalmente, hallazgos en este trabajo señalan la importancia de articular la vigilancia tradicional de la resistencia bacteriana, a partir de aislados provenientes de pacientes hospitalizados, con el análisis de aguas residuales hospitalarias o de la comunidad, abordándolo desde la llamada vigilancia epidemiológica basada en aguas residuales³⁷. Este tipo de enfoques epidemiológicos son de gran utilidad para comprender la diseminación de la resistencia a los antibióticos e identificar áreas potenciales de intervención³⁸. Futuros estudios podrían llevarse a cabo en aguas residuales hospitalarias de diversas regiones del país, con el objetivo de evidenciar cambios epidemiológicos en la resistencia bacteriana, por ejemplo, ante problemas de salud pública como la pandemia por la COVID-19 que trajo consigo un aumento considerable en el uso de antibióticos.

En conclusión, se determinó una alta frecuencia de bacilos Gram negativos productores de betalactamasas en muestras de agua residual de un hospital de alta complejidad de la ciudad de Medellín. Mediante la caracterización molecular se evidenció que las aguas residuales son un reflejo de la situación epidemiológica de la región, con predominio de carbapenemasas tipo KPC y betalactamasas de espectro extendido TEM y CTX-M 1.

En este contexto, surge la necesidad de una pronta intervención para el tratamiento de los efluentes hospitalarios, dado el riesgo de propagación de bacterias y/o genes de resistencia y las posibles consecuencias para la salud pública.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que en este artículo no se hicieron experimentos con humanos o animales.

Financiación. Estrategia de Sostenibilidad 2020-2021

Conflicto de interés. Los autores declaran que no existen conflictos de interés de ninguna índole.

Contribución de los autores. JNJ, EAR contribuyeron a la conceptualización de la investigación, ST y EA realizaron los experimentos, JNJ, EAR, ST llevaron a cabo el análisis de datos, y JNJ, EAR, ST escribieron el borrador y el manuscrito final.

Referencias

- Muto CA. Why Are Antibiotic-Resistant Nosocomial Infections Spiraling Out of Control? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005;26(1):10-2. doi: 10.1086/502481.
- De Angelis G, Giacomo P Del, Posteraro B, Sanguinetti M, Tumbarello M. Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of β -lactam resistance in enterobacteriaceae. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):1-22. doi: 10.3390/ijms21145090.
- Stuart M, Lapworth D, Crane E, Hart A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci Total Environ* [Internet]. 2012;416:1-21. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.072.
- Hassoun-Kheir N, Stabholz Y, Kreft JU, et al. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Sci Total Environ*. 2020;743. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140804.
- Lépesová K, Olejníková P, Mackulak T, Cverenkárová K, Krahulcová M, Břošová L. Hospital Wastewater—Important Source of Multidrug Resistant Coliform Bacteria with ESBL-Production. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 26 de octubre de 2020;17(21):7827. doi: 10.3390/ijerph17217827.
- Marti E, Variatza E, Balcázar JL, Balcázar JL. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol*. enero de 2014;22(1):36-41. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.001.
- Aristizábal-Hoyos AM, Rodríguez EA, Arias L, Jiménez JN. High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant. *J Environ Manage* [Internet]. 2019;245(May):37-47. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.05.073.
- Dallenne C, da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):490-5. doi: 10.1093/jac/dkp498.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2011;70(1):119-23. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(4):351-3. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004.
- Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed. CLSI supplement M100. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- Wayne PA. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
- EUCAST. Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [Internet]. 2020. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/B%0Abreakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2012;18(3):268-81. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible. Resolución 0631 de 2015. 2015.
- Hocquet D, Muller A, Bertrand X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J Hosp Infect* [Internet]. 2016;93(4):395-402. doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.010.
- Aristizábal-Hoyos AM, Rodríguez EA, Torres-Palma RA, Jiménez JN. Concern levels of beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in hospital wastewater: hotspot of antimicrobial resistance in Latin-America. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. septiembre de 2022;115819. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115819.
- Hernández-Gómez C, Blanco VM, Mota G, Correa A, Maya JJ, de la Cadena E, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomedica*. 2014;34(SUPPL.1):91-100. doi: 10.7705/biomedica.v34i0.1667.
- Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, et al. A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Distinct Clinical Characteristics. *Am Soc Microbiol*. 2016;60(1):332-42. doi: 10.1128/AAC.01775-15.
- Nadimpalli ML, Marks SJ, Montealegre MC, et al. Urban informal settlements as hotspots of antimicrobial resistance and the need to curb environmental transmission. *Nat Microbiol*. 2020;5(6):787-95. doi: 10.1038/s41564-020-0722-0.
- Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: Focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2013;76(1):80-5. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.001.
- Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, et al. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2014;52(11):3978-86. doi: 10.1128/JCM.01879-14.
- Instituto Nacional de Salud. Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) 2018 [Internet]. Vol. 5, Instituto Nacional de Salud. 2020. p. 48. Disponible en: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf)
- Flach CF, Hutinel M, Razavi M, Åhrén C, Larsson DGJ. Monitoring of hospital sewage shows both promise and limitations as an early-warning system for carbapenemase-producing Enterobacterales in a low-prevalence setting. *Water Res*. 2021;200. doi: 10.1016/j.watres.2021.117261.
- Makowska N, Phillips A, Dabert M, Nowis K, et al. Metagenomic analysis of β -lactamase and carbapenemase genes in the wastewater resistome. *Water Res*. 2020;170. doi: 10.1016/j.watres.2019.115277.
- Rozman U, Duh D, Cimerman M, Turk SŠ. Hospital wastewater effluent: Hot spot for antibiotic resistant bacteria. *J Water Sanit Hyg Dev*. 2020;10(2):171-8. doi: 10.2166/washdev.2020.086.
- GERMEN G. Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos en instituciones hospitalarias y sus laboratorios clínicos en el Valle de Aburrá, año 2019 [Internet]. 2020. p. 1-25. Disponible en: [http://www.grupogermen.org/pdf/PERFILES GERMEN 17 MARZO 2020.pdf](http://www.grupogermen.org/pdf/PERFILES%20GERMEN%2017%20MARZO%2020.pdf)
- Gómez-González JF, Sánchez-Duque JA. Perfil microbiológico y resistencia bacteriana en una unidad de cuidados intensivos de Pereira, Colombia, 2015. *Rev Médicas UIS*. 2018;31(2):9-15. doi: 10.18273/revmed.v31n2-2018001.
- Leonor R, Barrios A, Alberto C, Sierra S, Del J, Jaimes C. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Prod + Limpia* [Internet]. 2015;10(2):160-72. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/906/629>
- Abbott IJ, Jenney AWJ, Spelman DW, Pilcher D V., Sidjabat HE, Richardson LJ, et al. Active surveillance for multidrug-resistant Gram-negative bacteria in the intensive care unit. *Pathology*. 2015;47(6):575-9. doi: 10.1097/PAT.0000000000000302.
- Magira EE, Islam S, Niederman MS. Multi-drug resistant organism infections in a medical ICU: Association to clinical features and impact upon outcome. *Med Intensiva* [Internet]. 2018;42(4):225-34. doi: 10.1016/j.medint.2017.07.006.
- Mustapha, Adam, Tijani, Isa, Bello, S H, et al. Resistance Profiles of Bacteria Isolated from Wastewater in the University of Maiduguri Teaching Hospital. *J Biotechnol Res*. 2016;2(7):49-54.
- Czekalski N, Gascón Díez E, Bürgmann H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J*. 2014;8(7):1381-90. doi: 10.1038/ismej.2014.8.
- Nnadozie CF, Odume ON. Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environ Pollut* [Internet]. 2019;254:113067. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113067.
- Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, et al. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de febrero de 2018;73(2):339-47. doi: 10.1093/jac/dkx397.
- Mills MC, Lee J. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. Vol. 255, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd; 2019. p. 113143. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113143.
- Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. mayo de 2011;11(5):355-62. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7.
- Majlander J, Anttila V-J, Nurmi W, Seppälä A, Tiedje J, Muziasari W. Routine wastewater-based monitoring of antibiotic resistance in two Finnish hospitals: focus on carbapenem resistance genes and genes associated with bacteria causing hospital-acquired infections. *J Hosp Infect* [Internet]. noviembre de 2021;117:157-64. doi: 10.1016/j.jhin.2021.09.008.