

Caracterización de la resistencia a betalactámicos en enterobacterias de importancia clínica presentes en una planta de tratamiento de aguas residuales de Antioquia

ANA MARÍA ARISTIZÁBAL HOYOS

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Microbiología y Bioanálisis con énfasis en microbiología ambiental

Tutora:

Lida Yorlady Arias Marín, BSc, MSc, PhD.

Co-tutora:

Judy Natalia Jiménez Quiceno BSc, MSc, PhD

Comité tutorial:

Erika Andrea Rodríguez Tamayo, BSc, MSc, PhD (c)

Yamilet Arcos Arango, BSc, MSc

Escuela de Microbiología

Universidad de Antioquia

2018

Contenido

1. ABREVIATURAS EMPLEADAS	7
2. RESUMEN	9
3. INTRODUCCIÓN	10
3.1 Resistencia antimicrobiana: un problema global.....	10
3.2 Bacilos Gram negativos resistentes de importancia clínica	11
3.3 Antibióticos betalactámicos	13
3.4 Resistencia a betalactámicos en bacilos Gram negativos	15
3.5 Resistencia antimicrobiana en hospitales	18
3.5.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
3.5.2 <i>Escherichia coli</i>	19
3.5.3 <i>Citrobacter</i> spp	20
3.5.4 <i>Enterobacter cloacae</i> complex	21
3.6 Resistencia antimicrobiana en cuerpos de agua.....	22
3.7 Resistencia antimicrobiana en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR)	23
3.8 Situación de la resistencia antimicrobiana (RAM) en Colombia y el departamento de Antioquia	28
3.9 Epidemiología molecular aplicada en el estudio de la resistencia antimicrobiana.....	29
3.9.1 Técnicas de epidemiología molecular utilizadas en el presente estudio:	32
3.9.1.1. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE):	32
3.9.1.2 Tipificación de secuencias multilocus (MLST):.....	33
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
5. OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos específicos.....	37
6 METODOLOGÍA	38
6.1 Tipo de estudio:.....	38
6.2 Sitio de estudio:.....	38
6.3 Muestreo:.....	38
6.4 Determinación de parámetros ambientales y fisicoquímicos:.....	39

6.5 Cuantificación de microorganismos heterótrofos y de bacilos Gram negativos portadores de betalactamasas:	39
6.6 Tamizaje de bacterias resistentes a betalactámicos:.....	40
6.7 Conservación de las cepas:.....	40
6.8 Identificación de enterobacterias:.....	40
6.9 Detección molecular de genes codificantes para betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y betalactamasas tipo AmpC:	41
6.10 Perfil de susceptibilidad en <i>Escherichia coli</i> :	41
6.11 Tipificación molecular empleando electroforesis de campo pulsado (PFGE):	42
6.12 Tipificación molecular empleando tipificación de secuencias multilocus (MLST):	42
6.13 Plan de análisis:	42
6.14 Prueba piloto:.....	43
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1 Artículo original: Alta frecuencia y diversidad de <i>E. coli</i> resistente a betalactámicos, en una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de Antioquia, Colombia (High clonal diversity of Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> in a wastewater treatment plant).....	44
8. CONCLUSIONES GENERALES.....	56
9. PERSPECTIVAS	57
10. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	59
11. ANEXOS	61
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

AGRADECIMIENTOS

Antes de comenzar, quiero recordar a nuestra compañera de maestría Natali Rincón, pues fue una gran luchadora y signo de perseverancia al afrontar su enfermedad a comienzos del año 2017. Es por ello, que aunque ella ya no nos acompaña físicamente, nos deja una gran sonrisa y lección de esperanza y fe en los momentos más difíciles.

Hay una frase que me ha marcado en mi época de colegio: “La gratitud, es la memoria del corazón”. Es por ello, que todas las personas que mencionaré más adelante, cumplen y han cumplido un papel muy importante en mi vida profesional y personal.

Durante el transcurso de toda mi vida y especialmente durante estos últimos dos años, he tenido la fortuna de contar con personas maravillosas a mi lado, las cuales han contribuido a que yo pueda avanzar en este proceso. Entre esas personas, se encuentran especialmente Dios, la Virgen María, San José, mi familia, mis tutoras de la tesis, mi comité tutorial, el grupo EPIMOL, la Universidad de Antioquia, el equipo de posgrados de la Escuela de Microbiología, mis amigos e instituciones como la Corporación para Investigaciones Biológicas y el Colegio Mayor de Antioquia. Es por ello que a cada uno les quiero dar infinitas GRACIAS por su gran ayuda:

A Dios, a la Virgen María y a San José quienes siempre han estado a mi lado, especialmente en los momentos más difíciles. Han sido ellos, quienes me han acompañado y protegido incondicionalmente y es gracias principalmente a ellos, que he recibido tantas bendiciones, en especial la de estar rodeada de excelentes personas que me han ayudado a crecer personal, profesional y espiritualmente. Son ellos los que me han dado la paz y la sabiduría para poder avanzar. Muchas veces los dejamos de un lado y olvidamos que su presencia en nuestras vidas es de suma importancia y que ser conscientes que ellos están con nosotros, nos ayuda a salir adelante y a no dejarnos derrumbar fácilmente por las dificultades que se nos presentan y se seguirán presentando en este hermoso camino de la vida.

A mis tutoras, las doctoras Lida Arias Marín y Judy Natalia Jiménez. Primero que todo, por haberme dado la oportunidad de poder participar en este proyecto tan lindo y segundo por su gran calidad no sólo a nivel académico sino humano, del cual he aprendido enormemente durante este tiempo que estuvieron asesorándome y acompañándome durante el desarrollo de mi trabajo de grado. En especial, les quiero agradecer la paciencia

que me tuvieron, pues el asesorar a un estudiante en un trabajo de grado, también requiere de vocación, algo que me transmitieron durante este tiempo. Es por ello que me siento muy afortunada de haberlas tenido como mis tutoras durante mi proceso de formación.

A mi comité tutorial conformado por las profesoras Erika Andrea Rodríguez Tamayo y Yamilet Arcos Arango, por su apoyo y dedicación en este trabajo de grado, por sus excelentes aportes y sobre todo disponibilidad para que este trabajo pudiera salir adelante.

A los grupos de investigación MICROBA (Microbiología Básica y Aplicada) y BIOmicro (Bioprospección Microbiana), en donde estuve llevando a cabo mi maestría. Especialmente quiero agradecer a la Línea de Epidemiología Molecular Bacteriana (EPIMOL), por su incondicional apoyo, por haberme acogido desde que comencé a ser parte del proyecto de investigación como auxiliar de investigación y hasta el desarrollo de mi maestría. Sinceramente me siento muy afortunada de poder contar con excelentes compañeros, los cuales hacen que EPIMOL no sea solamente un lugar para compartir el conocimiento de lo que nos apasiona, la resistencia antimicrobiana, sino que también se convierte en un lugar para compartir como familia.

A la Universidad de Antioquia, a Posgrados de la Escuela de Microbiología, al coordinador de la maestría, el doctor Juan Álvaro López, a la Secretaria de posgrados, Adriana Agudelo, y todo el equipo que está detrás coordinando todos los procesos; pues es valiosísimo su esfuerzo y dedicación para que nosotros como estudiantes logremos avanzar durante nuestro proceso académico, especialmente en la búsqueda y asesoría de financiación para la participación en eventos de carácter nacional e internacional los cuales ayudan a la difusión de los avances en investigación que tienen un gran impacto no sólo a nivel local, sino nacional e internacional.

A la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia y el grupo de Biología Celular y Molecular de la Corporación para Investigaciones Biológicas, pues fueron los primeros lugares donde he podido desarrollarme a nivel profesional y donde he adquirido tantas experiencias que han enriquecido mi vida, no sólo a nivel académico sino a nivel personal.

A mis grandes amigos que me han acompañado de manera especial durante este tiempo, en especial a Yuliana Giraldo, Alejandra Jaramillo, Jhonny Alzate y a Mónica Mejía Ochoa a quien he tenido la fortuna de conocer desde que realizamos el pregrado. Definitivamente Dios sabe qué personas permite que estén en nuestro camino

para apoyarnos y motivarnos especialmente en los momentos de angustia cuando se piensa que las cosas tal vez no salen de la manera adecuada pero que se quedan para llenarnos de fe y esperanza para continuar haciendo las cosas de la mejor manera.

A Laurita Montoya, por su constante compañía y enseñarme que se puede salir adelante con la ayuda de Dios y con gran esfuerzo y voluntad para aprender y hacer las cosas.

A toda mi familia por su absoluto apoyo incondicional, especialmente a mi papá (quien falleció a mediados del año 2013), a mi mamá, a mis hermanos y sus familias, los cuales me han dado un gran ejemplo de perseverancia, resiliencia y unión especialmente en los momentos más difíciles que hemos vivido como familia, demostrándome que se puede salir adelante superando cualquier dificultad. También les agradezco su acompañamiento durante el tiempo que estuve realizando mi pregrado y posgrado, pues ellos estuvieron presentes durante las épocas difíciles, de traspaso y de cansancio, y que, aunque lastimosamente mi padre no estuvo presencialmente para mi graduación como profesional a finales del año 2013, estoy segura que su compañía nunca me ha faltado.

Finalmente, quiero terminar con una pequeña historia y reflexión: Recuerdo siempre que, por el nombre poco común de mi pregrado, mi padre me preguntaba: “¿Qué es lo que estudia usted?”, para anotarlo en un pedacito de papel y decirles a las personas la carrera que yo estaba realizando. Me atrevo a contar esto por dos razones principales: (i) muchas veces olvidamos que personas valiosísimas se sienten orgullosos de nosotros (aunque no nos lo digan) y por ende, de la misma manera, esperan lo mejor de nosotros; (ii) muchas veces caemos en cuenta de lo importantes que son las personas para nuestra vida, y esperamos a que partan de este mundo para reaccionar y pensar en todo el cariño que nos faltó demostrarles con un abrazo, una palabra, un detalle. Es por ello que debemos luchar por superar nuestros temores, para que como el poema de Pablo Neruda, hagamos las cosas “*En vida, hermano, en vida*”.

Totus Tuus

Ad Iesum per Mariam

1. ABREVIATURAS EMPLEADAS

AF	Afluente
AIEC	Del inglés adherent invasive <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> invasiva adherente
AMK	Amikacina
AmpC	Betalactamasas tipo AmpC
AMR	Del inglés Antimicrobial Resistance, Resistencia antimicrobiana
APHA	American Public Health Association
ARB	Del inglés Antimicrobial Resistant Bacteria, bacterias resistentes a los antibióticos
ARG	Del inglés inglés Antimicrobial Resistant Genes, Genes de resistencia a los antibióticos
AWWA	American Water Works Association
BGN	Bacilos Gram negativos
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
COL	Colistina
COT	Carbono orgánico total
CRO	Ceftriaxona
DAEC	Del inglés diffusely adherent <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> difusamente adherente
DNA	Del inglés Deoxyribonucleic acid, Ácido desoxirribonucleico
DOR	Doripenem
DQO	Demanda química de oxígeno
EAEC	Del inglés Enteroggregative <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> enteroagregativa
EF	Efluente
EIEC	Del inglés Enteroinvasive <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> / <i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	Del inglés enteropathogenic <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> enteropatogena
ERB	Enterobacterias resistentes a betalactámicos
ETEC	Del inglés enterotoxigenic <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> enterotoxigénica
ETP	Ertapenem
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	Cefepime

FOX	Cefoxitín
GN	Gentamicina
HGT	Del inglés Horizontal gene transfer, Transferencia horizontal de genes
IMP	Imipenem
ITU	Infección del Tracto Urinario
KESC	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia o Citrobacter</i>
LAR	Lodos activados de recirculación
LB	Agar Luria Bertani
MBL	Metalobetalactamasas
MDR	De inglés Multidrug resistance, Multidrogorresistencia
MEM	Meropenem
MLST	Del inglés Multilocus sequence typing, Tipificación de secuencias multilocus
OD	Oxígeno disuelto
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	Del inglés Penicilin binding protein, Proteínas fijadoras de penicilinas
PDR	Del inglés Pandrugresistance, Panresistencia
PFGE	Del inglés Pulsed-field gel electrophoresis, Electroforesis en gel de campo pulsado
PST	Secuencias tipo detectadas por el método de Pasteur
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
PTZ	Piperacilina/Tazobactam
SAM	Ampicilina/Sulbactam
SS	Sólidos suspendidos
ST	Del inglés Sequence Typing, Secuencias tipo
ST	Sólidos totales
STEC	Del inglés, Shiga Toxin <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
TGC	Tigeciclina
UCI	Unidades de Cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPGMA	Del inglés Unweighted pair group method using average linkages

2. RESUMEN

El aumento de la resistencia a betalactámicos ha llevado a explorar espacios diferentes al hospitalario como las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), consideradas recientemente como reservorios y fuentes de diseminación de la resistencia bacteriana. En este trabajo se propuso describir la presencia de enterobacterias de importancia clínica resistentes a betalactámicos (ERB) portadoras de β -lactamasas tipo BLEE y AmpC empleando métodos fenotípicos y moleculares en una PTAR de Antioquia, Colombia

Se realizaron 6 muestreos en el 2017, en afluente (AF), efluente (EF), lodos de recirculación (LAR) y tanques de aireación (TA) de la PTAR. Se detectaron las ERB empleando ChromID-ESBLTM, se seleccionaron aislados sospechosos de portar β -lactamasas. Las enterobacterias se identificaron por 16S-rRNA y mediante PCR se detectaron algunos genes que codifican para BLEE y AmpC plasmídicas. Al microorganismo más frecuentemente detectado se le realizó genotipificación molecular por PFGE y MLST.

De 353 aislados incluidos, 28.3% correspondieron a enterobacterias provenientes de: AF (29%), TA (24%), LA (17%) y EF (30%). Los microorganismos más frecuentes fueron: *Escherichia coli* (83%), *Citrobacter freundii* (11%) y *Enterobacter cloacae* complex (4%). Se detectaron 160 β -lactamasas: 85.6% codificaron para BLEEs siendo más frecuentes las variantes TEM (43.8%, n = 60) y CTX-M-grupo-1 (35.8%, n = 49); y el 14.4% restante codificado para AmpC siendo más frecuentes LAT / BIL / CMY (78.3%, n = 18). De los perfiles de betalactamasas, *E. coli* portó 19 de los 21, siendo el único portador de TEM + CTX-M-1-group en un 24%. La tipificación de *E. coli* por PFGE y MLST mostraron gran diversidad genotípica.

Este trabajo evidencia la diseminación de la resistencia bacteriana en ambientes diferentes al hospitalario. El hallazgo de las BLEEs variantes TEM y CTX-M-1-group en un alto porcentaje, demuestra la capacidad que tienen estos genes de estar simultáneamente en diferentes enterobacterias. Asimismo, este trabajo señala la gran diversidad de *E. coli* portando estos mecanismos de resistencia, lo que evidencia la presión de selección que se presenta al interior de las PTAR y resalta la importancia de este microorganismo como diseminador de β -lactamasas tipo BLEE y AmpC plasmídicas en ambientes acuáticos.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Resistencia antimicrobiana: un problema global

Antes de la aparición de los primeros antibióticos, las muertes por infecciones como neumonía, diarrea y difteria predominaban en el siglo XIX (1). Gracias a Alexander Fleming y el descubrimiento de la penicilina, se lograron salvar muchas vidas durante la segunda guerra mundial, dando origen a la era antibiótica (2). Sin embargo, este científico había alertado sobre las posibles consecuencias que se podrían tener cuando este antibiótico se usara de manera incorrecta, advirtiendo que el mal uso de la penicilina desencadenaría la resistencia en las bacterias cuando estas estuvieran en contacto nuevamente con el medicamento, logrando sobrevivir al tratamiento (3). Esto no sólo se ha evidenciado con este tipo de antibióticos, sino también con la gran mayoría que han venido surgiendo a través de los años. En 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el primer reporte de resistencia a nivel mundial, alertó sobre la llegada de la era post-antibiótica trayendo consecuencias importantes como la muerte (4). De forma generalizada la causa común detrás de las crecientes tasas de resistencia, está dada por el uso inadecuado y excesivo de los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas en los humanos, lo que aumenta la presión selectiva sobre microorganismos comensales y patógenos que pueden propagarse a los seres humanos a través del contacto directo, vía cadena alimentaria o indirectamente del medio ambiente por contaminación de los cuerpos de agua (5,6). Esta actuación, ha traído como consecuencia la aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos (ARB) (7). Hasta hace pocos años se señalaba a los hospitales como una de las principales fuentes o reservorios de bacterias resistentes, sin embargo, recientemente se ha evidenciado que otros sectores como el veterinario, el agropecuario y el alimentario, así como diversas fuentes ambientales, han tomado cada vez más fuerza frente a este tema debido a la liberación de algunos de estos compuestos químicos al medio ambiente, considerando la AMR como un problema multifactorial (8–10).

El problema de la resistencia a los antibióticos se ha convertido en una amenaza para la salud mundial, en donde se requiere una acción interdisciplinaria que involucre las áreas implicadas e interesadas para abordar este problema desde su raíz (5).

3.2 Bacilos Gram negativos resistentes de importancia clínica

En los últimos años, se ha venido reportando la aparición gradual de resistencia antimicrobiana a diversos antibióticos en Bacilos Gram negativos (BGN) en especial a los betalactámicos, la familia de antibióticos más empleadas en la práctica clínica, a la cual pertenecen además de las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenémicos (11). Entre los mecanismos de resistencia a los betalactámicos en BGN se encuentran la alteración de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP, por sus siglas en inglés Penicillin Binding Proteins), el acceso limitado a las dianas de PBP y la producción de betalactamasas, siendo este último el más frecuente (para mayor información, ir al ítem 3.4 *Resistencia a betalactámicos en bacilos Gram negativos*) (12). Adicionalmente, se ha evidenciado que estas bacterias son generalmente resistentes a otras familias de antibióticos, llegándolos a catalogar incluso como microorganismos portadores de multidrogorresistencia (MDR) o panresistencia (PDR) (13,14).

A principios del año 2017, la OMS publicó la lista de “patógenos prioritarios para los que se requieren urgentemente nuevos antibióticos”, en esta lista se incluyen los BGN resistentes a betalactámicos como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia* spp., y *Proteus* spp., evidenciando la amenaza de BGN resistentes a betalactámicos para la salud pública (15).

Entre los géneros y especies resistentes más importantes se encuentran *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomonas* spp y *Acinetobacter* spp. De *E. coli* se afirma que es el primer colonizador del intestino del infante, seguido de *Klebsiella*. Este BGN es el más comúnmente encontrado en el tracto gastrointestinal humano y animal, y aunque ha sido altamente susceptible a los antibióticos, dada su plasticidad genómica, tiene la capacidad para ser receptor y donante de diversas betalactamasas, especialmente las de tipo BLEEs, caracterizándose así, como el principal agente causal de infecciones del tracto urinario (ITU) de las cuales se cree que el 80% de estas infecciones son causadas por este patógeno (16–19). Este microorganismo se puede clasificar por serotipificación o por métodos filogenéticos. Por serogrupos, se clasifican aproximadamente en siete grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC) generalmente presente en diarrea infantil con capacidad para lesionar las células epiteliales del intestino especialmente del intestino delgado las cuales se dividen en dos patotipos: mientras las cepas típicas (tEPEC) poseen el factor de virulencia EAF presente en el plásmido pEAF,

las cepas atípicas (aETEC) no lo tienen (20–22); *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) que puede causar desde diarrea leve a sanguinolenta e incluso síndrome urémico hemolítico, *Shigella* / *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) los cuales son patógenos causantes de la disentería bacilar o shigelosis, *E. coli* enteroagregativa (EAEC) generalmente se encuentra en la diarrea persistente en niños, pacientes con VIH y diarrea del viajero; *E. coli* difusamente adherente (DAEC) que se relaciona con diarrea acuosa y se afirma que los adultos portadores de este microorganismo de forma asintomática, en un futuro podrían desarrollar enfermedades inflamatorias intestinales crónicas; *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) quien es el principal agente etiológico de la diarrea del viajero y es endémico en países subdesarrollados, y *E. coli* invasiva adherente (AIEC) conocido como uno de los agentes causales de la enfermedad de Chron (23). Por métodos filogenéticos, en la actualidad *E. coli* se clasifica en ocho filotipos: A, B1, B2, C, D, E, F y uno correspondiente al clado I de *E. coli*. De estos, se ha determinado que la mayoría de los aislados comensales pertenecen al grupo A, y los aislados más patógenos hacen parte del grupo B2 en el cual se caracteriza además por ser el grupo filogenético más resistente a los antibióticos (21,22).

Al igual que *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* es colonizador frecuente del intestino humano y ha adquirido resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos; adicionalmente, se ha visto involucrado en diferentes infecciones nosocomiales y adquiridas en comunidad, siendo el patógeno más frecuente en infecciones causadas por bacterias resistentes a carbapenémicos en todo el mundo (24). En su genoma se encuentra el gen que codifica para la betalactamasa SHV (25); sin embargo, también puede adquirir resistencia a los antibióticos a través de “la transferencia horizontal de genes o elementos genéticos móviles como transposones o plásmidos” (24). Entre estos genes se encuentran aquellos que codifican para una gran variedad de betalactamasas como BLEEs, KPC y NDM-1 (26).

Por su parte, el género *Enterobacter* spp., se ha hallado tanto en el ambiente como en el ser humano causando infecciones nosocomiales y es considerado como un patógeno oportunista multirresistente. Además de formar biopelículas y producir citotoxinas como hemolisinas, enterotoxinas y toxinas formadoras de poros, este microorganismo tiene la capacidad de obtener elementos genéticos móviles que confieren resistencia a diferentes antibióticos y adicionalmente pueden expresar una gran variedad de enzimas BLEEs y carbapenemasas como KPC, OXA, y algunas metalcarbapenemasas (14,27).

Hay otros bacilos gramnegativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* que no hacen parte de la microbiota humana, pero desempeñan un papel importante como microorganismos oportunistas, pues se encuentran principalmente en infecciones nosocomiales, colonizando el tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística o que tienen tubos endotraqueales (28). Estos microorganismos poseen diversos factores de virulencia como lipopolisacáridos de superficie, sistemas de secreción, formación de biopelículas, etc., que ayudan a su éxito como microorganismos oportunistas (29).

P. aeruginosa se conoce por ser un microorganismo multidrogresistente, pues tiene una alta resistencia intrínseca a los antibióticos debido principalmente a la producción de metalobetalactamasas (MBL) como VIM que confieren resistencia de alto nivel, producción de betalactamasas AmpC, presencia de genes que codifican para diferentes bombas de flujo que confieren resistencia a múltiples fármacos, baja permeabilidad de la membrana externa, y un número importante de genes de resistencia adquiridos para aminoglucósidos (30).

Por su parte, *A. baumannii* ha sido un microorganismo presente principalmente a nivel ambiental, sin embargo durante los últimos años se ha caracterizado por causar infecciones severas a nivel hospitalario gracias a su multidrogresistencia que le ha conferido la capacidad para sobrevivir en reservorios ambientales y humanos. Su resistencia intrínseca a muchos antibióticos es debida a la producción de betalactamasas como AmpC, carbapenemasas como OXA-51 y OXA-69, la expresión de bombas de eflujo y baja permeabilidad de la membrana externa. El éxito de este microorganismo también radica en su plasticidad genética, pues en un aislado francés han encontrado genes de resistencia que anteriormente se habían identificado en microorganismos como *E. coli*, *Salmonella* spp y *Pseudomonas* spp (30).

3.3 Antibióticos betalactámicos

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos altamente diversos que comparten un anillo betalactámico en su estructura molecular que funciona como el sitio activo del medicamento (14). Tienen actividad bactericida porque el anillo betalactámico se une a las proteínas de unión a la penicilina (PBP) o transpeptidasas, en la parte interna de la membrana celular, por lo que se impide la formación de los tetrapéptidos en el proceso de transpeptidación que se da en la última fase de la síntesis de la pared celular bacteriana (14,31,32). Este grupo incluye antibióticos con un amplio espectro de acción contra bacterias aerobias y anaerobias, tanto Gram negativas como Gram positivas, lo que sumado a su baja toxicidad ha llevado a que sean los de primera elección

y los más utilizados en la práctica clínica (14,31). Dentro del grupo de betalactámicos se encuentran más de 28 antibióticos que pertenecen a cinco subgrupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos y combinaciones con inhibidores de betalactamasas (14). La penicilina G o benzilpenicilina fue el primer betalactámico comercializado en el año 1938, diez años después de su descubrimiento por parte de Alexander Fleming (12). Posteriormente, generaciones progresivas de penicilinas con modificaciones estructurales fueron comercializadas a medida que surgían mecanismos de resistencia a estos antibióticos, como la meticilina y oxacilina, estables a la acción de penicilinasas (12,14). Combinaciones de penicilinas con inhibidores de betalactamasas surgieron para revertir la resistencia dada por algunas de estas enzimas y para que pudieran ser utilizados como tratamiento en infecciones graves por BGN, tales como piperacilina/tazobactam y ampicilina/sulbactam (1,33).

Si bien, las penicilinas son antibióticos raramente recomendados para el tratamiento de infecciones graves ocasionadas por BGN, las cefalosporinas han sido de gran utilidad en el tratamiento de infecciones ocasionadas por este tipo de bacterias y en la actualidad se cuenta con cinco generaciones que han sido desarrolladas de forma secuencial para ampliar el espectro de acción hacia bacterias con mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos, como *P. aeruginosa* y *S. aureus* (1,34). Con relación a los monobactámicos, el más utilizado es el aztreonam el cual posee un espectro de acción reducido sólo hacia bacilos Gram negativos aerobios y es resistente a la acción de penicilinasas (1).

Finalmente, los carbapenémicos son antibióticos betalactámicos de amplio espectro con actividad frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, aerobias y anaerobias (33). Estos antibióticos tienen una buena actividad bactericida frente a bacterias Gram negativas porque se unen fuertemente a las PBP 1A, 1B y 2, siendo estables a betalactamasas como las AmpC y las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (35); razón por la cual son el tratamiento de elección en infecciones ocasionadas por bacilos Gram negativos resistentes a penicilinas y cefalosporinas (36).

La resistencia a betalactámicos se ha convertido en una preocupación global, debido a que las infecciones causadas por microorganismos resistentes a menudo fallan en responder al tratamiento estándar, resultando en mayor riesgo de muerte, hospitalización prolongada y altos costos hospitalarios (35). Además la resistencia

favorece el riesgo de transmisión, ya que dada la ineffectividad de la terapia antimicrobiana, los pacientes permanecen infectados por un período mayor de tiempo (37).

3.4 Resistencia a betalactámicos en bacilos Gram negativos

La resistencia a betalactámicos en los bacilos Gram negativos está mediada principalmente por la presencia de enzimas denominadas betalactamasas que hidrolizan el anillo del antibiótico impidiendo su acción (3,12). Estas enzimas difieren en su espectro de hidrólisis y en la actualidad se reportan más de mil variaciones en los bacilos Gram negativos (www.lahey.org/Studies/). Dado el alto número de betalactamasas que han sido reportadas, se han propuesto dos metodologías de clasificación, la funcional descrita por Bush y Jacoby (38) y la molecular descrita por Ambler (Ver tabla 1) (39). La clasificación funcional está basada en la capacidad de hidrólisis de la enzima para cada sustrato betalactámico y los perfiles de inhibición, arrojando diferentes grupos y subgrupos (40). Por su parte, la clasificación molecular de Ambler está basada en la presencia de moléculas en el sitio activo de la enzima, agrupando las betalactamasas en dos grandes clases: las serin betalactamasas, que requieren serina en su sitio activo para su funcionamiento (betalactamasas de clase A, C y D) y las metalo-betalactamasas, las cuales requieren un metal como el Zinc (Zn) para poder funcionar (betalactamasas de clase B) (39). Esta última clasificación ha sido ampliamente utilizada por su facilidad de interpretación y manejo (39).

Las betalactamasas de clase A comprenden una variedad de enzimas con actividad penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas (41,42). Las primeras incluyen solo las de tipo penicilinasas como la PC1, mientras que entre las cefalosporinasas se encuentran: (i) las de amplio espectro (con actividad frente a penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, como TEM-1 y SHV-1) y (ii) las de espectro extendido o BLEE (con un espectro más amplio de acción que incluye cefalosporinas de tercera y cuarta generación, excepto carbapenémicos y cefamicinas y son inhibidas por tazobactam, sulbactam y ácido clavulánico) (41,42). Estas últimas enzimas son producto de mutaciones de otras betalactamasas de clase A como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, que ampliaron su espectro de hidrólisis (39). A partir del año 2000, se presentó un cambio en la distribución de las BLEE, con la emergencia y diseminación de las betalactamasas CTX-M, que a diferencia de las variantes TEM y SHV, su origen se encontró en el cromosoma de *Kluyvera* spp, un género que no presenta importancia clínica, y se movilizan por medio de plásmidos y secuencias de inserción. Esta cefalosporinasasa hidroliza

cefotaxime más rápido que ceftazidima y es más susceptible a la inhibición por tazobactam que por el ácido clavulánico (41,42).

Por su parte, dentro de las carbapenemasas de clase A se encuentran SME, IMI y KPC, las cuales hidrolizan todos los betalactámicos incluyendo los carbapenémicos, considerados como última opción terapéutica dentro de este grupo de antibióticos, limitando en gran medida las opciones de tratamiento (12,43). Particularmente, la carbapenemasa KPC se ha diseminado alrededor del mundo, encontrándose tanto en enterobacterias como en bacilos no fermentadores como *P. aeruginosa* y ha sido asociada con altos porcentajes de mortalidad (12,43). Las betalactamasas de clase B o metalo-betalactamasas incluyen solo carbapenemasas que hidrolizan todos los betalactámicos, excepto el aztreonam, tales como NDM (relacionada con altos valores de MIC a carbapenémicos y con la resistencia simultánea a otros antibióticos como aminoglicósidos) e IMP y VIM, encontradas principalmente en *P. aeruginosa* (44).

Las betalactamasas de clase C son enzimas que hidrolizan cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, incluyendo cefamicinas y no son revertidas por inhibidores de betalactamasas. En este grupo se encuentran enzimas tipo AmpC, como ACT-1 y FOX-1 (14,40). Aunque algunas de ellas están contenidas en plásmidos, la mayoría se encuentran codificadas en el cromosoma bacteriano en microorganismos como *Aeromonas* spp, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* y *Serratia marcescens*. En contraste, enzimas como las BLEE y las carbapenemasas con frecuencia se encuentran codificadas en elementos genéticos móviles que generalmente portan genes de resistencia a otros antibióticos, con alta capacidad de diseminación de una bacteria a otra, limitando así las opciones terapéuticas, lo que ha conducido a que las AmpC no sean evaluadas de rutina (41,44).

Finalmente, las betalactamasas de clase D incluyen enzimas que hidrolizan cloxacilina y oxacilina (OXA-1 y OXA-15) y otras que además tienen actividad carbapenemasa como la OXA-23 encontrada con alta frecuencia en *A. baumannii* y la OXA-48 reportada en diferentes enterobacterias (22,23).

Tabla 1. Clasificación de las betalactamasas según los esquemas de Ambler y Bush-Jacoby (Adaptado de Tang et al, 2014 (12))

AMBLER	BUSH-JACOBY	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLO DE ENZIMAS	SUSTRATO
A	2a	Penicilinasas inhibidas por AC ¹	PC1	Penicilinas
	2b	Enzimas de amplio espectro inhibidas por AC ¹	TEM-1, TEM-2, TEM-13, SHV-1, SHV-11	Penicilinas, cefalotina
	2be	Enzimas de espectro ampliado inhibidas por AC ¹	TEM-3, TEM-10, TEM-26, SHV-2, SHV-3, Klebsiella oxytoca K1, CTXM, PER, VEB	Penicilinas, oximiino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima), monobactamas
	2br	Enzimas de amplio espectro con unión reducida a AC ¹ (TEM resistentes a inhibidores)	TEM-30, TEM-31, SHV-10, SHV-72	Penicilinas, resistentes a AC ¹ , tazobactam y sulbactam.
	2ber	Enzimas de espectro extendido con resistencia relativa a AC ¹	TEM-50, TEM-158	Penicilinas, oximiino-cefalosporinas, monobactamas, resistentes a AC ¹ , tazobactam y sulbactam.
	2c	Enzimas hidrolizadoras de carbenicilina inhibidas por AC ¹	PSE-1, CARB-3	Penicilinas, carbenicilina
	2ce	Carbenicilinasas de espectro extendido	RTG-4 (CARB-10)	Carbenicilina, cefepima
	2e	Cefalosporinasas inhibidas por AC ¹	CepA	Cefalosporinas
	2f	Hidrolización de carbapenem no metalo-β-lactamasas	KPC, SME, GES, IMI-1	Todos los β-lactámicos, incluidos los carbapenems.
B	3	Metallo-β-lactamasas	IMP, VIM, IND	Todos los β-lactámicos, incluidos los carbapenems, con excepción de los monobactamas.
C	1	Cefalosporinasas no inhibidas por AC ¹	ACT-1, FOX-1, MIR-1, CMY	Cefalosporinas de espectro estrecho y extendido, incluidas las cepamicinas.
D	2d	Enzimas hidrolizantes de cloxacilina con inhibición variable por AC ¹	OXA-1, OXA-2, OXA-10	Cloxacilina, oxacilina
	2de		OXA-11, OXA-15	Cloxacilina, oxacilina, oximiinocefalosporinas, monobactamas
	2df		OXA-23, OXA-51, OXA-58	Cloxacilina, oxacilina, carbapenems.
-	4	Penicilinasas no inhibidas por AC ¹	Penicilinasas de Burkholderia cepacia	Penicilinas

3.5 Resistencia antimicrobiana en hospitales

Los costos en atención en salud, la morbi-mortalidad y estancia hospitalaria están asociadas al aumento de la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos (45). Una consecuencia de este problema es que la presión selectiva a los antimicrobianos es particularmente alta en los hospitales ya que estos se constituyen de alguna manera reservorios potenciales de BRA desempeñando entonces un papel fundamental en la aparición y propagación de las mismas (46). Las bacterias son responsables de cerca del 90% de las infecciones adquiridas en los hospitales. Las tasas de incidencia por estas infecciones varían entre el 5% y 15%, involucrando con facilidad a pacientes inmunocomprometidos los cuales tienen una mayor tasa de mortalidad, que aquellos con un sistema inmune saludable (14). Se ha estimado que aproximadamente entre 23 mil a 25 mil pacientes mueren anualmente en Europa y Estados Unidos por infecciones causadas por bacterias multirresistentes, siendo en este último país, las infecciones adquiridas por BGN la sexta causa de muerte (47,48).

Las tasas de resistencia antimicrobiana (RAM) son las más altas en Unidades de Cuidados intensivos (UCI), debido al uso libre de antibióticos, estancia prolongada en clínica, entre otros (49). Como consecuencia, cada vez es más común encontrar cepas multirresistentes, llevando al uso de antibióticos más potentes como colistina. Sin embargo, durante los últimos años también se han reportado cepas resistentes a este antibiótico, limitando las opciones terapéuticas para las infecciones nosocomiales (47). Entre los microorganismos más preocupantes están algunas enterobacterias como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter* spp y *Enterobacter* spp.

3.5.1 *Klebsiella pneumoniae*

Este microorganismo es frecuentemente el agente causal de infecciones especialmente en pacientes de edades extremas y en inmunocomprometidos. Está asociado a la ocurrencia de infecciones del torrente sanguíneo, del tracto urinario y tracto respiratorio (50). La prevalencia de BLEEs producidas por este microorganismo es del 21,5% en la región Asia-Pacífico, 38,9% en Europa, 8,8% en Estados Unidos (50); en Centroamérica y Latinoamérica, la prevalencia de este microorganismo resistente a carbapenémicos en UCI pasó de 9,3% a un 14% durante los años 2012 a 2014 (45). En general, según la OMS, las tasas de resistencia a carbapenémicos por *Klebsiella pneumoniae* son preocupantes pues supera el 50% en Europa y algunos países del Mediterráneo oriental (50).

3.5.2 *Escherichia coli*

Durante el último siglo, *E. coli* se ha convertido en un patógeno importante involucrado en diferentes etiologías como infecciones del tracto urinario (ITU), problemas gastrointestinales e incluso meningitis (51). Al respecto, es bien conocido el papel que cumple este microorganismo en infecciones del tracto urinario (ITU), al ser el más frecuente en infecciones complicadas y no complicadas (52). Adicionalmente, este microorganismo se conoce como el principal agente infeccioso involucrado en bacteriemias, aumentando la incidencia de este tipo de infecciones durante las últimas dos décadas (53). Sumado a esto, en diferentes investigaciones se ha encontrado que la edad avanzada y enfermedades como incontinencia urinaria, anomalías del tracto urinario, diabetes, enfermedad pulmonar crónica, enfermedades cardíacas y neoplasia maligna, pueden constituir un riesgo para la adquisición de infecciones del torrente sanguíneo causadas por *E. coli* (54).

De otro lado, en Europa entre los años 2002 y 2009 se ha observado un incremento en la resistencia antimicrobiana especialmente frente a antibióticos como cefalosporinas el cual pasó del 1.7% al 8% debido a la producción de BLEE como *bla*CTX-M (53) que ha logrado ser tan exitosa en su diseminación, desplazando a otras betalactamasas que previamente eran más frecuentes. Adicionalmente, a nivel mundial (55) se han detectado clones como el ST131 del cual, además de su resistencia a múltiples fármacos como cefalosporinas y fluoroquinolonas, se ha afirmado ser el causante del aumento inesperado de BLEE como CTX-M-15 (56,57). Fue en el año 2008 donde se comenzó la detección de este clon en América del Norte, Europa y Asia (58) y en el 2010 donde se realizó en Latinoamérica la primera caracterización molecular de aislados provenientes de la comunidad (59). En la actualidad, ST131 se sigue considerando como el patógeno extraintestinal promotor de la resistencia a diversos antibióticos (58).

Por su parte, en cuanto a la incidencia de las patovares de *E. coli* diarreogénicas, se ha descrito que ETEC ha sido la causa principal de diarrea a nivel mundial. Sin embargo, EPEC y EAEC cada vez más están presentes en este tipo de patologías. Es muy importante anotar que, se ha encontrado que la epidemiología de las distintas patovares involucradas en enfermedades gastrointestinales, puede variar notoriamente dependiendo del lugar (Figura 1). Así las cosas, en países como Nicaragua, México y Colombia, la patovar ETEC ha sido la más frecuente; en Paraguay, Perú y Brasil ha sido EAEC y en Chile, Argentina, Uruguay y Venezuela ha estado principalmente involucrado la patovar EPEC (51).



Figura 1. Prevalencia de *E. coli* diarreogénica en Latinoamérica. En la figura se ilustra la distribución de las diferentes patovares de *E. coli* presentes en cada región. El tamaño de la letra muestra el tipo de *E. coli* patogénica que está mayormente involucrado en enfermedades intestinales. ETEC, *E. coli* enterotoxigénica; EAEC, *E. coli* enteroagregativa; EPEC, *E. coli* enteropatógena; aEPEC, EPEC atípica; tEPEC, EPEC típico; ECEH, *E. coli* enterohemorrágica; EIEC, *E. coli* enteroinvasiva; DAEC, *E. coli* difusamente adherente. (Imagen tomada de Torres, 2017 (51))

3.5.3 *Citrobacter* spp

Este microorganismo se ha encontrado frecuentemente no sólo en los alimentos, agua y suelo, sino también en el tracto gastrointestinal humano y animal. Previamente se conocían como colonizadores con una virulencia baja, sin embargo, en la actualidad están presentes en infecciones del tracto urinario, de meninges, tejidos blandos, intestinal, entre otras; constituyendo así el 0.8% de las infecciones causadas por BGN. Estos microorganismos se caracterizan por ser portadores de betalactamasas tipo AmpC y BLEE, donde su adquisición entre pacientes que han recibido terapia antimicrobiana previa se ha convertido en un fenómeno más frecuente. A nivel hospitalario, del 3 al 6% de las enterobacterias aisladas, están conformadas por

Citrobacter spp., de las cuales especies como *C. freundii* y *C. koseri* se encuentran involucradas en enfermedades subyacentes o pacientes inmunocomprometidos. Se estima que el 6.8% de las infecciones por este BGN pueden desencadenar en la muerte, aumentando su frecuencia entre 17.8% y 56 % cuando la bacteriemia se encuentra presente y los aislados son multidrogosresistentes. La presencia de este microorganismo en bacteriemia polimicrobiana se convierte en un factor de riesgo para la mortalidad, especialmente cuando el origen de la infección es intra-abdominal (60,61).

3.5.4 *Enterobacter cloacae* complex

El complejo *Enterobacter cloacae* está conformado por especies que tienen una similitud en su genoma entre el 61% y 67%. Estas especies se conocen como *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. dissolvens*, *E. hormaechei*, *E. kobei* y *E. nimipressuralis* (62). Entre los más frecuentes, se encuentra *E. cloacae*, el cual pese a encontrarse en la naturaleza y diferentes cuerpos de agua, también se ha detectado en muestras clínicas humanas donde aislados nosocomiales de este microorganismo portando BLEE plasmídica fueron detectados a partir del año 1989, especialmente en neonatos. Desde entonces los casos siguen aumentando, pues en el año 1998 se reportó un brote en una unidad de cuidados intensivos neonatales de Sudáfrica con nueve muertes, mientras que en 2003 en un hospital de Brasil se presentaron tres brotes en donde 42 neonatos estuvieron involucrados en infecciones sistémicas y de los cuales el 34% de los pacientes fallecieron (62–64).

Es por ello, que este patógeno también es considerado como oportunista y multidrogosresistente contribuyendo a infecciones nosocomiales como endocarditis, artritis séptica, bacteriemia, osteomielitis, ITU, infecciones intraabdominales y en neonatos. *E. cloacae* presenta resistencia natural a betalactámicos como ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefoxitin y cefalotina, puede hiperexpresar la betalactamasa AmpC bloqueando la represión de un gen cromosómico o adquiriendo una AmpC transferible presente en plásmidos los cuales confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación, ocupando el tercer lugar dentro de las enterobacterias que más presentan resistencia a este tipo de antibióticos (64). Sin embargo, de manera preocupante, durante la última década también se ha comenzado a evidenciar aislamientos productores de carbapenemasas como NDM-1 presentes en pacientes de la India y carbapenemasas como IMP, VIM, GIM, KPC y GIM detectadas en aislados del continente asiático catalogando a este microorganismo como la segunda enterobacteria más frecuente portando carbapenemasas (64).

3.6 Resistencia antimicrobiana en cuerpos de agua

Estudios sobre diversidad microbiana en los cuerpos de agua han identificado éstos como hábitats propicios para una gran diversidad de grupos microbianos puesto que las bacterias comúnmente encontradas allí, pertenecen a las familias taxonómicas de las Proteobacterias (especialmente las de clase alpha, beta y gammaproteobacteria), Actinobacterias, Bacteroidetes y Firmicutes, algunas de las cuales se encuentran también en el tracto digestivo (65). Una cualidad importante que tienen las proteobacterias es su capacidad para transferir DNA a otros grupos bacterianos como las actinobacterias, facilitando la propagación de ARG entre bacterias ambientales y comensales en el agua u otro tipo de ambientes (66). Esta información es de gran importancia pues ayuda a comprender la relevancia y participación de algunas bacterias ambientales en la difusión y transferencia de la resistencia a los antibióticos en los seres humanos. Sin embargo, en el medio ambiente y particularmente en los sistemas acuáticos, parecen jugar un papel relevante en la diseminación no solo de BGN resistentes a betalactámicos, sino también de la resistencia bacteriana en general, debido a que son los principales receptores de antibióticos, ARB y ARG provenientes de actividades humanas (67–69), por lo cual, estos compuestos son también considerados como contaminantes emergentes, debido a que tienen capacidad amplificarse, difundirse y persistir en el medio ambiente (16). En este hábitat, los antibióticos ejercen presión de selección sobre las bacterias presentes incluso a concentraciones muy bajas, favoreciendo la ocurrencia de eventos de transferencia genética entre las poblaciones bacterianas resistentes presentes (70–72). Un ejemplo claro de este fenómeno, se evidencia con la betalactamasa CTX-M la cual es codificada por un plásmido comúnmente encontrado en *E. coli*, *K. pneumoniae* y otras Enterobacteriaceae en todo el mundo; sin embargo, en contraste con otras BLEEs de clase A de Ambler como TEM-3, esta enzima no se derivó de TEM o SHV, sino más bien, se sugiere que probablemente fue adquirida del microorganismo *Kluyvera* spp. (una bacteria ambiental sin importancia patogénica para el humano) a través de transferencia horizontal de genes (8).

En general, las enterobacterias productoras de penicilinasas, BLEEs y AmpC se han encontrado con frecuencia en los cuerpos de agua. En un estudio realizado por Bréchet et al., se detectó un 75 % de las betalactamasas tipo CTX-M, pertenecientes a *bla*CTX-M del grupo 1, subgrupos CTX-M-1 (50 %) y CTX-M-15 (25 %) (70). Por su parte también, se ha demostrado que *bla*TEM ha sido el gen más comúnmente reportado en conferir resistencia a antibióticos betalactámicos en donde además se ha evidenciado su gran capacidad para persistir no sólo en las etapas de tratamiento sino incluso corriente abajo de los efluentes de la PTAR (73). Finalmente es

de resaltar que las betalactamasas tipo AmpC han sido reportadas a nivel mundial, sin embargo, aunque su frecuencia ha sido mucho menor a comparación de las BLEE, la AmpC CMY se han catalogado como una de las más comunes a nivel clínico, ambiental e incluso animal (74–76). Así las cosas, es evidente que los cuerpos de agua no son ajenos a esta problemática, pues la constante descarga de contaminantes emergentes, contribuyen también a la aparición y diseminación de bacterias y genes de resistencia a los antibióticos (24,26,77).

3.7 Resistencia antimicrobiana en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR)

Las Plantas de Tratamiento de Aguas residuales son biorreactores a gran escala, que reciben aguas residuales domésticas, hospitalarias e industriales (25,78) y están diseñadas para cumplir dos objetivos esenciales: eliminar o disminuir la cantidad de materia orgánica, y eliminar nutrientes como fósforo y nitrógeno para disminuir la proliferación de microorganismos en el efluente y de esta forma, mejorar la calidad del agua con el fin de reusarla o ser descargada en las fuentes de agua, sin afectar el equilibrio ecosistémico (79,80).

El diseño de la planta de tratamiento cuenta con diferentes etapas que involucran tratamientos físicos, biológicos y químicos (78). La primera etapa corresponde al Tratamiento primario, en ésta se realizan dos pasos: i) Tratamiento preliminar (pretratamiento) para la eliminación del material sólido grande que se encuentra en el afluente, ii) Sedimentación primaria: en la cual los sólidos suspendidos presentes en el afluente se precipitan paulatinamente en el tanque de sedimentación. La segunda etapa involucra el Tratamiento secundario, que corresponde al tratamiento biológico aerobio y/o anaerobio y es aquí donde los microorganismos juegan un papel fundamental, mediante el empleo de consorcios de microorganismos, procariotas y eucariotas, que metabolizan la materia orgánica presente en el agua residual (80). En esta fase del tratamiento se pueden emplear diferentes métodos entre los cuales se encuentran los lodos activados, en donde el agua residual se somete a un proceso de aireación, cuyo objetivo es proveer el oxígeno necesario para garantizar la mezcla y homogeneización del lodo que contiene el consorcio microbiano con el agua que está siendo tratada, y así eliminar gases como el dióxido de carbono, producidos por los procesos de degradación (81,82). Sin embargo, hay otros procesos similares al de los lodos activados con algunas variaciones claves (Ver tabla 2).

Tabla 2. Algunos tipos de tratamiento biológico empleados en el tratamiento de las aguas residuales

(Adaptado de; Ramalho (82))

<p>Aireación prolongada (procesos de oxidación total)</p>	<p>Es una modificación de lodos activos. La idea es disminuir la cantidad de lodo residual aumentando el tiempo de residencia. Cuatro características esenciales:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mayor tiempo de retención en el reactor. 2. Cargas orgánicas menores. 3. Mayores concentraciones de sólidos biológicos en el reactor. 4. Mayor consumo de oxígeno en el proceso de aireación prolongada. <p>Se usa generalmente cuando el tratamiento de aguas residuales recibe un volumen menor a 8 m³/s.</p>
<p>Estabilización por contacto</p>	<p>El agua residual se mezcla con lodo estabilizado la cual posteriormente es sometida a aireación; el tiempo de retención en este momento oscila desde 20 a 40 minutos. Posteriormente, la mezcla va a un clarificador donde se separa el efluente clarificado y la descarga del clarificador; esta descarga va a un tanque de estabilización y es aireada durante 1,5 a 5 horas.</p> <p>Durante este periodo de estabilización los productos orgánicos adsorbidos se rompen mediante degradación aerobia.</p> <p>Este sistema permite una reducción apreciable del volumen de la balsa de aireación.</p>
<p>Lagunaje con aireación</p>	<p>Son balsas con profundidades de 1 a 4 m en las que la oxigenación de las aguas residuales se realiza mediante unidades de aireación bien sea superficiales, turbinas o difusores. Las lagunas aireadas son sistemas sin reciclado de lodos.</p>
<p>Estabilización por lagunaje</p>	<p>No se utiliza equipo de aireación. El oxígeno se obtiene de la superficie natural de aireación y de las algas que producen oxígeno por fotosíntesis.</p>
<p>Filtros biológicos (percoladores)</p>	<p>Es un relleno cubierto de limo biológico a través del cual se percola el agua residual. En algunos casos se emplea este método seguido del tratamiento con lodos activos, siendo esto de gran ventaja.</p>
<p>Tratamientos anaerobios: procesos de contacto, filtros (sumergidos)</p>	<p>El proceso comprende dos etapas: fermentación ácida y fermentación metánica. En la primera no se produce una reducción importante de la DQO ya que las moléculas orgánicas complejas se convierten en ácidos orgánicos de cadena corta; y en la segunda los microorganismos metanogénicos (anaerobios) convierten los ácidos de cadenas más largas a metano, dióxido de carbono y ácidos orgánicos de cadenas más cortas.</p>

Finalmente, en la tercera etapa denominada Tratamiento terciario, se encuentran los procedimientos químicos como cloración, ozonización, entre otros. Cabe anotar que de forma general en Latinoamérica la mayoría de las PTAR llevan el proceso únicamente hasta el tratamiento secundario (78).

Un aspecto importante es que a pesar de que a las PTAR llegan aguas residuales provenientes de diferentes orígenes, el objetivo del tratamiento empleado está enfocado en devolver al ambiente efluentes que cumplan con ciertos parámetros fisicoquímicos establecidos en las normativas ambientales. Debido a la incidencia de la resistencia en la comunidad, ha sido necesario realizar estudios que permitan elucidar las dinámicas de diseminación de los mecanismos de resistencia en la población. En este sentido, recientemente se han venido

considerando a las PTAR como una de las principales fuentes antropogénicas de ARB (67), debido a que allí confluyen la mayoría de los desechos hospitalarios, domésticos e industriales de la población pudiéndose convertir en nichos ecológicos para las ARB, ya que entre los desechos presentes en este espacio se encuentran contaminantes emergentes como compuestos farmacéuticos (entre los que se encuentran antibióticos) y productos para el cuidado personal, fármacos no metabolizados de pacientes (80% de los antibióticos eliminados a través de heces y orina), y gran parte de la microbiota humana compuesta principalmente de enterobacterias y otros BGN, donde pueden encontrarse tanto bacterias sensibles, como resistentes (46,83–87). Todo esto unido a procesos de transformación o degradación ineficiente de los diferentes compuestos, específicamente de moléculas de antibióticos, tiene como consecuencia el desarrollo de ARB en el ambiente (88). Los datos presentados por estudios recientes (89–92) evidencian la presencia de bacterias resistentes y multidrogoresistentes en diferentes etapas del proceso de tratamiento en la PTAR. Entre los microorganismos más frecuentemente detectados están los BGN, evidenciando una vez más la problemática de la resistencia antimicrobiana, pues el agua residual se ha convertido en un ambiente rico en nutrientes para el crecimiento microbiano, creando las condiciones adecuadas para que allí se dé el intercambio de material genético (93,94). Los resultados muestran la detección de enterobacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae*, productoras de betalactamasas tipo BLEE, que han sobrevivido al proceso de tratamiento biológico y han logrado permanecer en la mayoría de las etapas del tratamiento de las aguas residuales (95,96).

A finales del año 2017, el Estudio Sectorial de los servicios públicos domiciliarios de Acueducto y Alcantarillado, señaló que para el año 2016 Colombia contaba con 541 sistemas de tratamiento de aguas residuales presentes en todo el territorio nacional, siendo principales aquellos que se encuentran ubicados en los departamentos de Santander (Río Frío), Cundinamarca (El Salitre), Valle del Cauca (planta de Cañaveralejo) y Antioquia (PTAR San Fernando). De estos, aproximadamente un 10% tiene un funcionamiento adecuado al tratar toda el agua residual que llega allí y un 9,4% incluyen dentro de su sistema de tratamiento, los sistemas de aireación extendida los cuales se caracterizan por altos tiempos de retención con el fin de obtener cambios en la carga orgánica y degradación de compuestos complejos, produciendo menos cantidad de lodos de desecho, como consecuencia de los procesos de digestión de las bacterias en el tanque de aireación (97–99). Por su parte, Antioquia cuenta con alrededor de 90 sistemas de tratamiento de aguas residuales, siendo la Planta de Tratamiento de aguas residuales San Fernando, la principal en el departamento (99). Esta planta, opera desde

el año 2000 y cuenta con una capacidad promedio de 1,8 m³/s; empleando un tratamiento biológico convencional de lodos activados y descargando el efluente a la fuente de agua natural más cercana. Esta PTAR fue diseñada para tratar las aguas residuales domésticas e industriales mediante sistemas preliminares, primarios y secundarios (Ver figura 2).

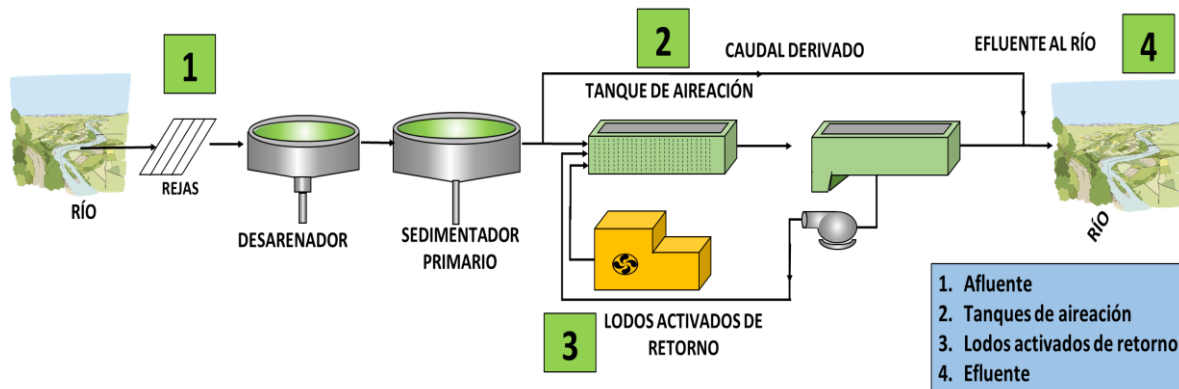


Figura 2. Esquema de la planta de tratamiento de aguas residuales San Fernando. La figura ilustra una parte del tratamiento de aguas residuales que se realiza al interior de la PTAR

De manera general, el diseño de las PTAR no se planteó como objetivo la eliminación de la resistencia antimicrobiana; sin embargo, al cumplir su objetivo principal de reducir la carga orgánica para devolverle al río un efluente con las condiciones adecuadas, contribuye en gran medida a la eliminación de diversos microorganismos que pueden portar resistencia a los antibióticos. Durante el proceso de tratamiento de las aguas residuales al interior de la planta, se realiza el seguimiento de diferentes parámetros fisicoquímicos que permiten evaluar el comportamiento y la eficiencia del mismo:

1. Conductividad: Mide la capacidad de la solución acuosa para transportar corriente eléctrica, por lo cual esto depende de la presencia de iones.

2. Oxígeno disuelto: Su concentración depende de las características fisicoquímicas y la actividad bioquímica de los organismos presentes en el medio acuático. La medición de este parámetro es muy importante en la determinación de la contaminación del agua y en el proceso del tratamiento de los residuos (100,101).

3. pH: Este es uno de los parámetros más importantes empleados en la química del agua, pues muchos procesos bioquímicos como neutralización ácido-base, desinfección, control de la corrosión, entre otros, dependen del pH. Además, junto con la temperatura, se convierten en factores importantes para la evaluación del amonio, amoníaco y demás compuestos relacionados. Se afirma que cuando el pH está neutro, el amoníaco presente se encuentra en forma ionizada, pero cuando ocurre lo contrario, se forma el amoníaco libre que se convierte en un elemento tóxico para los peces (100,102).

4. Demanda química de oxígeno: Es la cantidad de oxígeno necesario para estabilizar químicamente la materia carbonácea, siendo una medida indirecta de la materia orgánica presente en el agua residual (102,103).

5. Carbono orgánico total: Mide de forma directa la materia orgánica carbonácea, a través de la conversión de carbono orgánico en dióxido de carbono (102).

6. Demanda bioquímica de oxígeno: Es la medida del oxígeno consumido después de 5 días por los microorganismos en la estabilización bioquímica de la materia orgánica (102).

7. Sólidos totales: es el término aplicado al residuo de material que queda en el recipiente después de la evaporación de una muestra y su posterior secado en un horno a una temperatura definida. Estos están conformados por los sólidos suspendidos totales y sólidos disueltos totales (Figura 3) (100).

8. Sólidos suspendidos totales: la porción de sólidos totales que quedan retenidas en un filtro de fibra de vidrio de 0.45 micrones. Se dividen en sólidos suspendidos volátiles y sólidos suspendidos fijos (100,104).

9. Sólidos disueltos totales: es la porción de sólidos que pasa a través de un filtro de tamaño de poro aproximado de 2,0 m (o más pequeño) en condiciones específicas. Se dividen en sólidos disueltos volátiles y sólidos disueltos fijos (100).

10. Sólidos sedimentables: Es el material que se sedimenta en una muestra, durante una hora. Su medición se realiza a través del dispositivo cono Imhoff, el cual ayuda a dar una indicación aproximada del asentamiento en un tanque de sedimentación (100,102).

11. Sólidos fijos: Se refiere al residuo de sólidos totales, suspendidos o disueltos que quedan después de incinerar generalmente a una temperatura mayor a $>550^{\circ}\text{C}$ (100).

12. Sólidos volátiles: Es el peso perdido posterior al calentamiento de los sólidos totales, suspendidos o disueltos (100).

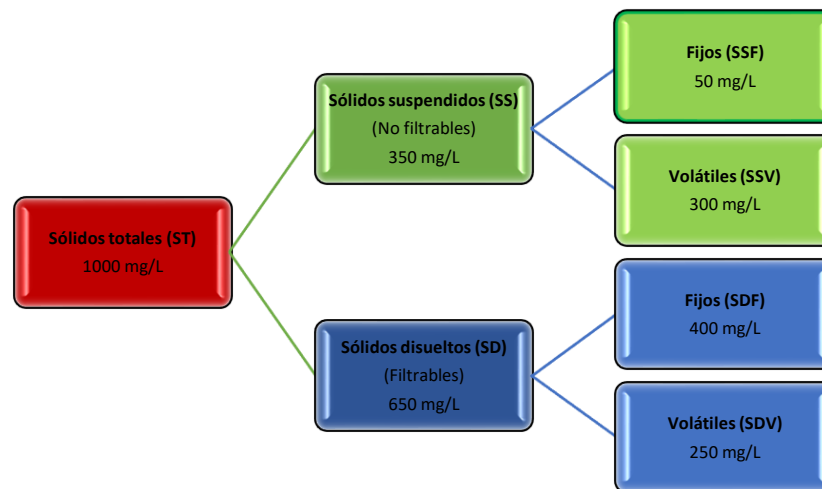


Figura 3. Distribución aproximada de los sólidos en las aguas residuales sin tratar. Adaptada de Von Sperling, 2015 (102)

3.8 Situación de la resistencia antimicrobiana (RAM) en Colombia y el departamento de Antioquia

En Latinoamérica, se afirma que generalmente las infecciones causadas por bacterias resistentes limitan el adecuado tratamiento para los pacientes en el área hospitalaria y comunitaria, convirtiéndose así, como una de las regiones con más altos niveles de resistencia antimicrobiana, por encima de Europa y Estados Unidos. Entre las altas tasas de resistencia, se han visto involucrados bacilos gramnegativos como enterobacterias productoras de BLEE, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* conocidos por ser resistente a carbapenémicos (105). En Colombia, el reporte de la resistencia bacteriana se comenzó a realizar de forma sistemática y consecutiva a partir del año 2001 gracias a la conformación de sistemas de vigilancia presentes en diferentes ciudades del país (106). Diversos estudios epidemiológicos en hospitales de ciudades colombianas como Bogotá, Cali y Medellín, han reportado BGN portadores de genes de resistencia a antibióticos (107,108) evidenciando un incremento de la resistencia antimicrobiana especialmente en microorganismos como *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. cloacae*

y *E. coli*. Al respecto entre los años 2012 y 2014, en unidades de cuidados intensivos del país, se han reportado aislados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas con frecuencias que van desde el 15.9 % y 24.6 %, mientras que para antibióticos como Ampicilina-Sulbactam y trimetoprim-sulfametoxazol los porcentajes de resistencia se encuentran entre 41.4 % y 49.2 %. Por su parte el panorama con *Klebsiella pneumoniae* es similar, ya que mientras los porcentajes de resistencia a cefalosporinas en aislados encontrados en unidades de cuidados intensivos se encuentra entre 23.6 % y 41.2 % la resistencia a otros antibióticos inhibidores de betalactamasas como ampicilina-sulbactam y trimetoprim-sulfametoxazol estuvo entre 30.3 % 48.2 %. Sin embargo esto no se convierte en un asunto exclusivo de la región ya que este fenómeno se ha observado en varios países a nivel mundial (109,110).

Este panorama es similar en la ciudad de Medellín, donde se ha encontrado que la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación en *E. coli* y *K. pneumoniae* puede explicarse principalmente por la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales ya se reportaban desde hace veinte años en el 5,7 y el 40,0 % de los aislamientos, respectivamente, en tres hospitales de Medellín (109). De otro lado, en un estudio realizado por el grupo GERMEN, encontraron con mayor frecuencia bacterias multidrogorresistentes, como *E. coli* en salas de hospitalización (29.8%) y unidades de cuidados intensivos (15.3%), y en un 9% la presencia de *K. pneumoniae*, hallando factores de riesgo como estancia hospitalaria y uso de ventilador mecánico por más de cinco días (105). Además, para el año 2016, la proporción de *K. pneumoniae* productora de BLEE en población adulta en UCI (28,6%) fue mayor que la encontrada en algunos servicios de hospitalización (20,4%) (111).

Sin embargo, en la población pediátrica también se ha observado un patrón similar, en donde el porcentaje de aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE en servicios no UCI, fue mayor al 20% (112), lo que evidencia la preocupante situación de la resistencia antimicrobiana presente en la ciudad.

3.9 Epidemiología molecular aplicada en el estudio de la resistencia antimicrobiana

A través de los años se ha usado la epidemiología como una herramienta eficaz para el estudio de la persistencia y la transmisión de enfermedades infecciosas. Sin embargo no sólo el empleo de los parámetros tiempo, lugar y persona, han sido suficientes para la resolución de la identificación de patógenos involucrados en infecciones o brotes generados tanto en la comunidad como a nivel nosocomial (113). Es allí donde la epidemiología

molecular juega un papel muy importante incluyendo parámetros como identificación a nivel de especie y análisis de los aislados a través de diferentes técnicas moleculares, proporcionando mayor información sobre el comportamiento de los microorganismos y enfermedades infecciosas involucrados en el desarrollo de la enfermedad, brotes, entre otros (113). Entre las diferentes técnicas empleadas se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), Western blot, técnicas de microarreglos, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés), tipificación de secuencias multilocus (MLST, por sus siglas en inglés), secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés, entre otros. En la Tabla 3 se describen otros métodos de tipificación usados en estudios de epidemiología molecular (114,115).

En el estudio de la resistencia antimicrobiana, el empleo de estas técnicas de forma complementaria, en especial de PFGE y MLST, ha llevado a una mayor profundización en la investigación de los brotes y diseminación de patógenos portadores de diferentes mecanismos de resistencia. Entre estos ejemplos, se puede encontrar la caracterización de clones portadores de betalactamasas como *bla*CTX-M, presente en *Escherichia coli* ST131 conocido por portar la betalactamasa CTX-M-15 confiriendo resistencia a cefalosporinas de tercera generación, y detectado en países como Francia, Portugal, España, Suiza, Líbano, India, Corea, Canadá, India, Kuwait y Colombia (59,116–120). Sumado a esto, también se han caracterizado otros bacilos Gram negativos portadores de carbapenemasas, entre los que se encuentra el clon ST258 de *Klebsiella pneumoniae*, exitoso a nivel mundial por su diseminación de KPC en países como Italia (121), Estados Unidos (122), México (123) y Colombia (124), y de *Pseudomonas aeruginosa* ST111 portando carbapenemasas como KPC y VIM presentes en brotes hospitalarios de Colombia e Inglaterra (108,125).

Tabla 3. Métodos de tipificación usados en estudios de epidemiología molecular. (Adaptado de Boccia et

al, 2015 (115))

Métodos de tipificación molecular	Ventajas	Limitaciones	Aplicaciones y comentarios
Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	Excelente poder discriminatorio Reproducibilidad intra e interlaboratorio Alta concordancia epidemiológica Costo moderado	Carece de facilidad de uso y el procedimiento demanda mucho tiempo Baja resolución para tamaño de fragmento similar	Útil para la investigación de brotes y la vigilancia epidemiológica, a nivel local o de gran escala.
Tipificación de secuencias multilocus (MLST)	Excelente reproducibilidad	Carece de facilidad de uso Accesibilidad limitada Alto costo Bajo poder discriminatorio para algunas especies	Utilizado para estudios epidemiológicos a gran escala No es adecuado para estudios locales de investigación y vigilancia de brotes.
Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP)	Excelente poder discriminatorio	Carece de facilidad de uso Alto costo	Útil para la investigación de brotes y la vigilancia epidemiológica, a nivel local o de gran escala.
Amplificación aleatoria de adnpolimórfico (RAPDrapd) y reacción en cadena de polimerasa con primers aleatorios (qp-PCRap-pcr)	Rapidez y facilidad de uso Bajo costo	Bajo poder discriminatorio Baja reproducibilidad intralaboratorio.	Ampliamente adoptado para la investigación de brotes
Reacción en Cadena de la Polimerasa de Elementos Repetitivos (rep-PCR)	Alta rapidez y poder discriminatorio para algunas especies microbianas. Bajo costo	Poca reproducibilidad	Métodos semiautomáticos adoptados para la investigación de brotes y vigilancia epidemiológica a nivel local
Número variable de repeticiones en tándem (VNTR)	Excelente reproducibilidad Fácil de usar Accesibilidad Rápidez Costo moderado	Reproducibilidad interlaboratorio moderada	El análisis multilocus VNTR (MLVA) se adopta para la investigación de brotes, pero no se valida en redes de vigilancia epidemiológica
Tipificación de secuencias de locus únicos (SLST)	Alto poder discriminatorio para algunas especies (por ejemplo, tipificación de spa para <i>S. aureus</i>) Facilidad de uso Rapidez Costo moderado	Posibles errores de clasificación de tipos particulares, debido a la recombinación y / o homoplasia	Se utiliza para determinar las relaciones entre los aislamientos bacterianos para la investigación de brotes y la vigilancia epidemiológica a nivel local e internacional.
Hibridación genómica comparativa (CGH): microarreglos	Técnica de alto rendimiento	La reproducibilidad intra e interlaboratorio de los datos de micromatrices debe establecerse antes de la aplicación. Alto costo Pobre accesibilidad No permite la identificación de secuencias que no están incluidas en la matriz. Aún no es adecuado para la aplicación clínica diaria.	Utilizado en investigaciones de brotes en tiempo real Se han desarrollado ensayos rápidos y de micromatrices para pruebas de diagnóstico e investigaciones epidemiológicas. Adoptado para el genotipado simultáneo y el perfilado para determinar la resistencia a los antimicrobianos y el potencial de virulencia.
Mapeo óptico	Alta precisión Alto poder discriminatorio.	Alto costo Pobre accesibilidad	Utilizado con éxito en investigaciones retrospectivas de brotes para examinar las relaciones genéticas entre aislamientos bacterianos (por ejemplo, <i>E. coli</i> O104: H4)
Secuenciación del genoma completo (WGS)	Técnica de alto rendimiento	Falta de facilidad de uso Accesibilidad limitada	Identificación precisa y caracterización de aislamientos bacterianos. En un futuro próximo, WGS se convertirá en una herramienta muy poderosa para investigaciones de brotes y esquemas de vigilancia en clínicas de rutina.

Sin embargo, el empleo de estas técnicas hoy en día, ya no están limitadas a nivel hospitalario, pues en los últimos años se han caracterizado en países como Brasil República Checa, Francia, Holanda e Irlanda, microorganismos como *Klebsiella* spp, y *E. coli* presentes en plantas de tratamiento de aguas residuales, efluentes hospitalarios, entre otros, lo que contribuye de forma importante al estudio de la resistencia antimicrobiana en otros escenarios que se encuentran involucrados en este tema de gran importancia para la salud pública (92,126–129).

3.9.1 Técnicas de epidemiología molecular utilizadas en el presente estudio:

3.9.1.1. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE):

Esta técnica se ha empleado especialmente en la detección de brotes con el fin de identificar la similitud clonal a través de la generación de la huella dactilar del ADN en los aislados bacterianos involucrados en el problema, a través de la separación de grandes fragmentos de ADN empleando una enzima de restricción (130,131). Aunque este método es ampliamente utilizado, su estandarización es tediosa y requiere de mucho tiempo para realizar el procedimiento (132). A grandes rasgos, esta técnica se realiza a partir de un cultivo bacteriano puro, en donde se mezclan las células bacterianas con agarosa fundida y se vierte en un molde para formar los “plugs”. Las células bacterianas son lisadas con productos químicos para liberar el DNA dentro de los plugs que posteriormente se depositan en un gel de agarosa para adicionar la enzima de restricción que separará los fragmentos de DNA según su tamaño, ayudado del campo eléctrico. Este gel se debe teñir con un intercalante de DNA con el fin de ver bajo la luz ultravioleta el patrón de bandas generado durante el corrido electroforético en cada muestra de ADN. Finalmente la imagen obtenida es analizada a través de programas como BioNumerics que ayuda a buscar las similitudes entre los patrones de las bandas generadas por cada aislado estudiado (Ver figura 4) (130).

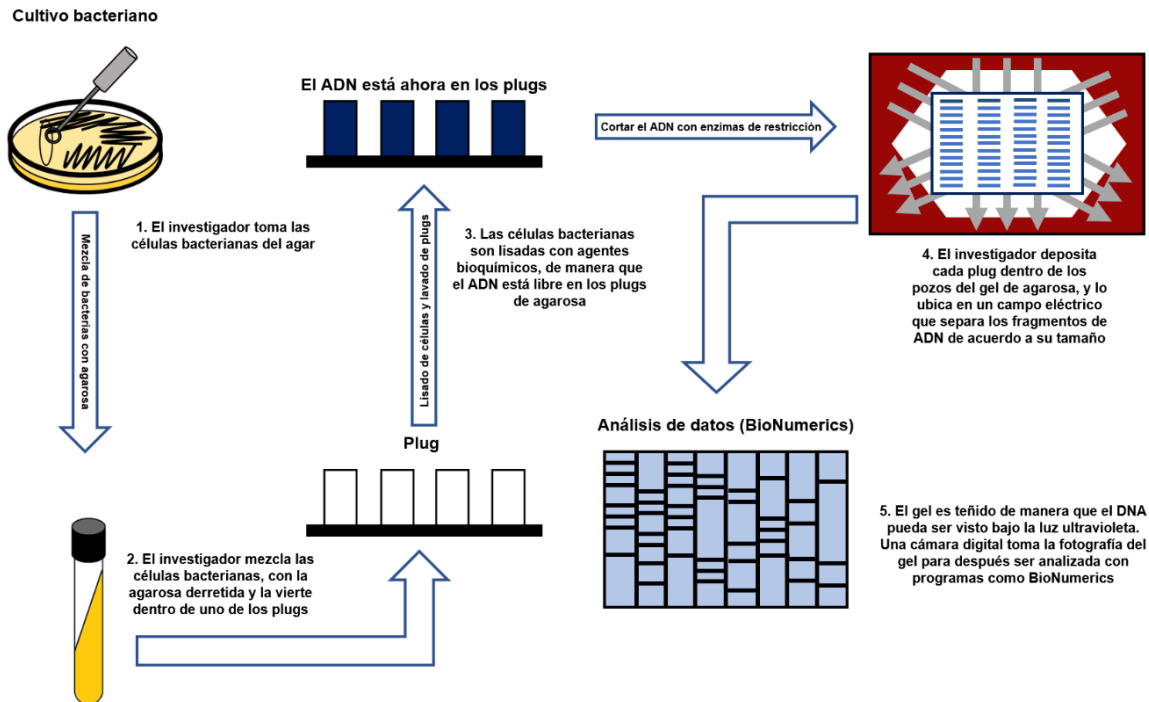


Figura 4. Resumen del procedimiento a realizar para PFGE. (Adaptado de CDC, 2016 (130))

3.9.1.2 Tipificación de secuencias multilocus (MLST):

Esta técnica está basada en la secuenciación de genes altamente conservados en los microorganismos, en donde se emplean aproximadamente 7 u 8 genes los cuales posteriormente son identificados con un número para cada alelo, que finalmente determinará el tipo de secuencia (TS). La ventaja de esta técnica, es que los perfiles alélicos se pueden comparar con una base de datos central que se encuentra en la web, siendo esto de alta precisión para la identificación del microorganismo. En la actualidad, existen más de cien microorganismos entre bacterias y hongos que son estudiados a través de esta técnica, entre los que se encuentran enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, entre otros. Sin embargo, en el caso particular de *E. coli* este microorganismo cuenta con tres diferentes esquemas de tipificación: El método de Warwick, el de Pasteur y el de Michigan, en los cuales cada uno identifica diferentes genes conservados para este microorganismo (Ver tabla 4). De esta manera, aunque el método de Atchman es el más empleado, el método de Pasteur es más específico, pues se ha demostrado que secuencias tipo 131 detectadas por el primer método, corresponden a las secuencias tipo Pasteur 43 y 506; esto

mismo se ha observado con otros aislados caracterizados los cuales pueden observarse en el artículo de Clermont et al (133,134).

Tabla 4. Genes empleados en los tres esquemas, para la determinación de secuencias tipo de *E. coli*. Adaptado de Clermont et al, 2015 (134)

Esquema	Genes	Sitio web
Michigan State University	<i>aspC, clpX, fadD, icd, lysP, mdh, uidA</i>	http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/index
Warwick Medical School	<i>adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA</i>	http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli
Pasteur Institute	<i>dinB, icd, pabB, polB, putP, trpA, trpB, uidA</i>	http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia antimicrobiana (RAM) en Bacilos Gram negativos a antibióticos betalactámicos, la familia de antibióticos más empleada en la práctica clínica, es considerada actualmente como un problema grave de salud pública y ha sido catalogado por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como prioridad crítica (135). El principal mecanismo de resistencia en enterobacterias, resistentes a betalactámicos es mediado por la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico, denominadas betalactamasas, entre las cuales sobresalen por su gran impacto las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) producidas principalmente por *E. coli* y *K. pneumoniae*, debido a que tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, inhibidores de penicilinas y antibióticos betalactámicos de amplio espectro como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos. En la actualidad cientos de BLEE han sido identificadas, siendo los genotipos más prevalentes los pertenecientes a 3 grupos denominados *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*SHV (136). De otro lado, también juegan un papel importante las betalactamasas tipo AmpC, las cuales se encuentran de forma constitutiva en algunas enterobacterias como *Citrobacter freundii* y *Enterobacter* spp, sin embargo algunas enzimas pueden adquirirse de forma plasmídica como CMY, LAT, BIL, ACT, MIR, MOX, FOX, entre otras (8), además tienen la capacidad de hidrolizar desde penicilinas hasta cefalosporinas de tercera generación (137).

La presencia de enterobacterias productoras de estas betalactamasas, se ha descrito principalmente en ambientes hospitalarios, sin embargo en la última década se han venido reportando en otros escenarios como el veterinario (138,139), cultivos agrícolas (140), alimentos (141) y en diferentes cuerpos de agua (91,142), evidenciándose así la capacidad de diseminación de estas enzimas más allá del ambiente hospitalario. De forma particular, los sistemas acuáticos parecen jugar un papel relevante en esta diseminación, no solo de bacilos Gram negativos (BGN) resistentes a betalactámicos, sino también de la resistencia bacteriana en general, debido a que son los principales receptores de antibióticos, bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) y genes de resistencia a los antibióticos (GRA) provenientes de actividades antropogénicas (67,69). Al respecto, diferentes estudios realizados a nivel mundial han descrito la presencia de BGN resistentes a betalactámicos en aguas residuales y plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), razón por la cual estas últimas son consideradas como una de las principales fuentes antropogénicas de BRA debido a que allí confluyen la mayoría de los desechos hospitalarios, domésticos e industriales de la población (67,86,90,143). Adicionalmente, se ha observado que aunque los tratamientos biológicos en las plantas de tratamiento, reducen de forma significativa el número de

bacterias, no logran disminuir completamente las BRA y GRA pues su objetivo principal está orientado a la remoción de la carga orgánica, nutrientes y microorganismos (incluyendo algunos patógenos), por lo que es de esperarse que en el efluente aún se encuentren bacterias resistentes (67,73,144).

En Latinoamérica, los estudios de la resistencia antimicrobiana en PTAR son casi nulos, sin embargo, se han realizado algunas aproximaciones en este tema en efluentes de ríos y vertimientos de agua residual en donde se han hallado algunos microorganismos como cocos Gram positivos y bacilos gram negativos portando diferentes genes de resistencia (145–147). En Colombia, estudios realizados en dos PTAR (incluyendo una en el departamento de Antioquia) se ha detectado la presencia de antibióticos que pueden influir en la presión de selección y promover el intercambio de material genético entre bacterias (148). Teniendo en cuenta lo anterior, y con el propósito de determinar la contribución de las PTAR en la problemática de la resistencia antimicrobiana en una región endémica, como Colombia, se propuso determinar la presencia de enterobacterias portadoras de betalactamasas, en diferentes puntos de una PTAR en el departamento de Antioquia, el segundo en importancia en Colombia, donde el uso de antibióticos no es regulado y los estudios realizados en hospitales de la ciudad reportan una frecuencia alta de BGN resistentes a betalactámicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Describir la presencia de enterobacterias de importancia clínica resistentes a betalactámicos (ERB) portadoras de β -lactamasas tipo BLEE y AmpC empleando métodos fenotípicos y moleculares en una PTAR del departamento de Antioquia, Colombia

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos de control, en la planta de tratamiento de aguas residuales, durante el tiempo de muestreo.
2. Evaluar la presencia de enterobacterias de importancia clínica resistentes a betalactámicos empleando métodos fenotípicos y moleculares.
3. Evaluar la relación entre los perfiles de susceptibilidad y los genes de resistencia a betalactámicos presentes en las enterobacterias detectadas.

6 METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio:

Descriptivo de corte transversal.

6.2 Sitio de estudio:

El estudio se llevó a cabo en una Planta de Tratamiento de aguas residuales (PTAR) del departamento de Antioquia, Colombia, que opera desde el año 2000, cuenta con una capacidad promedio de 1,8 m³/s en su primera fase con tratamiento biológico convencional de lodos activados y cuyo efluente resultante es descargado a la fuente de agua natural más cercana. Esta PTAR se diseñó para tratar mediante sistemas preliminares, primarios y secundarios las aguas residuales domésticas e industriales generadas en los municipios del sur del Valle de Aburrá.

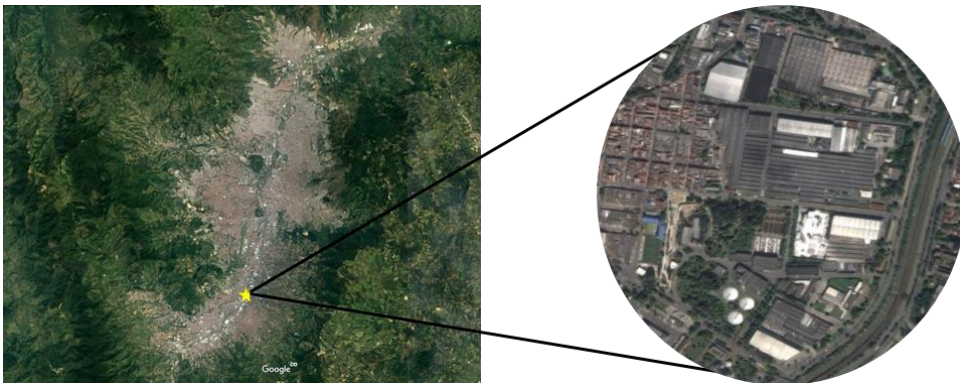


Imagen tomada de Google Earth

6.3 Muestreo:

Los muestreos se realizaron durante los meses de febrero a julio de 2017, con un total de 6 muestreos, una vez al mes. Se evaluaron 4 puntos de la PTAR: afluente, tanques de aireación, lodos de recirculación y efluente. Estas muestras se recolectaron en recipientes de vidrio previamente esterilizados con capacidad de 0.5 L para los análisis microbiológicos, para los análisis fisicoquímicos se emplearon recipientes de polietileno con 2,5

litros de capacidad para la determinación de sólidos totales y demanda química de oxígeno (DQO), y recipientes de vidrio de 1 litro y 10 mL para la medición de sólidos suspendidos y carbono orgánico total (COT), respectivamente. Las muestras fueron almacenadas a 4° C y procesadas durante las 4 horas posteriores a su recolección.

6.4 Determinación de parámetros ambientales y fisicoquímicos:

La medición de los parámetros fisicoquímicos se realizó en tres puntos de la PTAR: afluente, tanques de aireación y efluente. Los parámetros físico-químicos pH, oxígeno disuelto (OD), temperatura de la muestra, porcentaje de saturación de oxígeno y conductividad fueron determinados *in situ* y por triplicado con el multímetro digital HACH® HQ40D multi. Para la medición del carbono orgánico total, demanda química de oxígeno, sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos (SS), las muestras fueron evaluadas siguiendo los procedimientos sugeridos por el Standard Methods de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA-AWWA) (100). La información de la determinación de los parámetros *in situ* se recolectó a través de un formulario para salidas de campo diseñado dentro del proyecto (Anexo 1).

6.5 Cuantificación de microorganismos heterótrofos y de bacilos Gram negativos portadores de betalactamasas:

Se tomó 1 mL de cada muestra recolectada y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada estéril hasta la dilución 10^{-7} . Se sembraron por triplicado alícuotas de 100 μ L en agar Luria Bertani (LB), diluciones de 10^{-4} y 10^{-6} para las muestras obtenidas de afluente, tanques de aireación y efluente final, diluciones de 10^{-5} y 10^{-7} para las muestras obtenidas de lodos activados de recirculación. Las muestras se incubaron a 37 °C (± 2) durante 18 a 24 horas. Posteriormente se realizó el recuento de UFC obtenidos en cada medio de cultivo.

Para la cuantificación y detección de BGN sospechosos de ser resistentes a β -lactámicos, se empleó el medio ChromID™ ESBL el cual consiste en una rica base nutritiva incluyendo una variedad de peptonas, una mezcla de antibióticos incluyendo la cefpodoxima, que permite el crecimiento selectivo de enterobacterias productoras de BLEEs; dos sustratos cromogénicos y un sustrato natural que permite la identificación directa de las enterobacterias productoras de BLEEs más frecuentemente encontradas (149). De las diluciones realizadas previamente, a partir de la dilución 10^{-1} de todas las muestras obtenidas en los cuatro puntos de muestreo se

sembraron por triplicado alícuotas de 100 μ L en agar ChromID™ ESBL (BioMérieux, France). Las muestras se incubaron a 37 °C (\pm 2) durante 18 a 24 horas. Posteriormente se realizó el recuento de UFC obtenidos en cada medio de cultivo de acuerdo a la reacción de color del cromoagar (149).

6.6 Tamizaje de bacterias resistentes a betalactámicos:

Del medio cromogénico ChromID™ ESBL, se seleccionaron de forma aleatoria un promedio de 5 colonias de cada morfotipo bacteriano detectado en el medio, así: *colonias color verde*, correspondientes a *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* o *Citrobacter* (KESC); colonias color rosa burdeos correspondiente a *E. coli* y *colonias color marrón claro a marrón oscuro correspondientes a Proteae* (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*) de acuerdo a las especificaciones técnicas del medio. Las colonias se sembraron en agar MacConkey (Merck Millipore) y en agar nutritivo (Merck Millipore). Así mismo se realizó la prueba de la oxidasa (BioMérieux) para la selección de enterobacterias (90,150).

6.7 Conservación de las cepas:

La conservación de las cepas se realizó empleando el método de crioconservación a -80 °C, en medio BHI al 15% de glicerol (151).

6.8 Identificación de enterobacterias:

Todos los aislamientos clasificados como enterobacterias, de acuerdo a la prueba de la oxidasa, fueron seleccionados para identificación bacteriana mediante detección del gen 16S rRNA (152). Previamente, la extracción de DNA se realizó empleando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, según las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI, USA). La detección del gen 16S rRNA, se llevó a cabo empleando PCR simple, usando los primers universales 27F- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y 1492R- GGTTACCTTGTTACGACTT según el protocolo descrito por Dunbar et al., (153). Los productos de amplificación fueron secuenciados y las secuencias analizadas en el software Geneious© versión R8 (<https://www.geneious.com>, Kears et al., 2012), posteriormente se compararon con secuencias disponibles en el GenBank, empleando el programa BLAST [Basic Local Alignment Search Tool] del National Center for Biotechnology Information de los Estados Unidos (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

6.9 Detección molecular de genes codificantes para betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y betalactamasas tipo AmpC:

A todos los aislados identificados por 16S rRNA se les realizó la caracterización molecular de las betalactamasas de mayor importancia en la familia *Enterobacteriaceae*, empleando diferentes protocolos de PCR multiplex de acuerdo a las condiciones descritas por Dallenne (136). Se evaluaron los genes que codifican para las variantes de las betalactamasas variantes *bla*_{TEM} (TEM-1 y TEM-2), *bla*_{SHV} (SHV-1), *bla*_{CTX-M grupo 8/25} (el cual incluye las variantes CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26 y CTX-M-39 hasta CTX-M-41), *bla*_{CTX-M grupo 1} (CTX-M-1, CTX-M-3 y CTX-M-15), *bla*_{CTX-M grupo 2} (CTX-M-2) y *bla*_{CTX-M grupo 9} (CTX-M-9 y CTX-M-14). Así mismo, se detectaron las variantes de betalactamasas tipo AmpC mediadas por plásmidos denominadas LAT, BIL, CMY, DHA, ACT y MIR; las cuales se organizaron en tres grupos: LAT/BIL/CMY (incluyendo las variantes LAT-1 hasta LAT-3, BIL-1, CMY-2 hasta CMY-7, CMY-12 hasta CMY-18 y CMY-21 hasta CMY-23), DHA (DHA-1 y DHA-2) y ACT/MIR (ACT-1 y MIR-1).

6.10 Perfil de susceptibilidad en *Escherichia coli*:

La susceptibilidad antimicrobiana se llevó a cabo en aproximadamente el 50 % de los aislados de *E. coli* (enterobacteria detectada con mayor frecuencia), empleando el sistema automatizado Vitek2® (bioMérieux Clinical Diagnostics). Los aislados de *E. coli* se seleccionaron cuidando la proporción de la distribución obtenida en cada punto de muestreo con el total de aislados (n= 83).

Los antibióticos evaluados fueron Ampicilina/Sulbactam (SAM), Piperacilina/Tazobactam (PTZ), Cefoxitín (FOX), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Cefepime (FEP), Doripenem (DOR), Ertapenem (ETP), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Amikacina (AMK), Gentamicina (GN), Ciprofloxacina (CIP), Tigeciclina (TGC) y Colistina (COL). Los controles de calidad y la interpretación de los perfiles de sensibilidad fueron realizados de acuerdo a los lineamientos del CLSI 2018, y EUCAST para la interpretación de tigeciclina (154,155).

6.11 Tipificación molecular empleando electroforesis de campo pulsado (PFGE):

La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) se realizó en un número representativo de aislados de *Escherichia coli* (85%), debido a que fue la enterobacteria más frecuente detectada en el estudio. Para la selección de los aislados se tuvo en cuenta, el punto de muestreo y el perfil enzimático de los genes de betalactamasas. Para la realización de PFGE se empleó un protocolo estandarizado en la Línea de epidemiología molecular bacteriana, del grupo Microba. Para la restricción se emplearon 50 UI de la enzima Xba I (Thermo Scientific, United States) y para normalizar los patrones de los fragmentos de DNA se empleó el bacteriófago Lambda ladder (New England Biolabs, UK). Para el corrido electroforético se utilizó el sistema Chef-DR III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con las siguientes condiciones: temperatura de 11 °C, ángulo de 120 ° y un voltaje de gradiente de 6 V/cm. El grado de relación de los aislados se determinó empleando el coeficiente de similitud de Dice, en el software BioNumerics version 6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Para definir los aislados genéticamente relacionados, se empleó un punto de corte > al 80 %. Los dendogramas fueron generados por el método UPGMA (unweighted pair group method using average linkages), con 1 % de tolerancia y 0,5 % de optimization.

6.12 Tipificación molecular empleando tipificación de secuencias multilocus (MLST):

Esta técnica fue realizada en un número representativo de *E. coli* para lo cual se secuenciaron en todos los aislados ocho genes conservados, empleando los primers sugeridos en la página del Instituto Pasteur (http://bigsddb.pasteur.fr/ecoli/primers_used.html) y de acuerdo al protocolo descrito por Clermont et al (134). Los tipos de alelos y determinación de ST se realizaron a través de la página de MLST del Instituto Pasteur (https://bigsddb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsddb/bigsddb.pl?db=pubmlst_ecoli_seqdef_public&page=profiles).

6.13 Plan de análisis:

Para las variables cualitativas se realizó su descripción calculando las frecuencias absolutas y relativas. Se calculó la mediana y el rango intercuartílico para todas las variables y se emplearon las pruebas de ANOVA y Kruskal Wallis para detectar las diferencias estadísticamente significativas de las variables entre los puntos de muestreo ($p < 0.005$). El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el paquete estadístico SPSS® v20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Los perfiles de susceptibilidad fueron construidos teniendo en cuenta los criterios del manual CLSI M-100 (154). Las concentraciones inhibitorias mínimas interpretadas como intermedio, se consideraron como resistentes, y el perfil de multidrogorresistencia se hizo de acuerdo a lo planteado por Magiorakos, en donde se clasificaron los perfiles de resistencia por categorías de antibióticos (156). De esta forma, los antibióticos piperacilina/tazobactam (TZP) y ampicilina/sulbactam (SAM), se clasificaron dentro del grupo penicilina/inhibidor, cefoxitin (FOX) dentro de las cefamicinas, ceftazidima (CAZ) y ceftriaxona (CRO) como cefalosporinas de tercera generación, cefepime (FEP) como cefalosporina de cuarta generación; ertapenem, imipenem, meropenem e imipenem dentro de la familia de los carbapenémicos; amikacina (AMK) y gentamicina (GN) dentro de la familia de los aminoglucósidos, ciprofloxacina (CIP) dentro de las fluoroquinolonas, tigeciclina (TGC) dentro de las tetraciclinas y colistina (COL) en la categoría de las polimixinas. La multidrogoresistencia (MDR) fue definida como resistencia a al menos tres categorías de antibióticos.

6.14 Prueba piloto:

Para el entrenamiento del personal y estandarización para el desarrollo de las pruebas microbiológicas y registro de los parámetros fisicoquímicos, se realizó una prueba piloto con dos muestreos en la PTAR durante el mes de septiembre del año 2016.

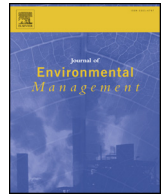
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Artículo original: Alta frecuencia y diversidad de *E. coli* resistente a betalactámicos, en una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de Antioquia, Colombia (High clonal diversity of Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant).

Publicado en la revista Journal of Environmental Management

Este da respuesta a los objetivos:

1. Evaluar el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos de control, en la planta de tratamiento de aguas residuales, durante el tiempo de muestreo.
2. Evaluar la presencia de enterobacterias de importancia clínica resistentes a betalactámicos empleando métodos fenotípicos y moleculares.
3. Evaluar la relación entre los perfiles de susceptibilidad y los genes de resistencia a betalactámicos presentes en las enterobacterias detectadas



Research article

High clonal diversity of multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant

A.M. Aristizábal-Hoyos^{a,b,1}, E.A. Rodríguez^{a,1}, L. Arias^b, J.N. Jiménez^{a,*}

^a Línea de Epidemiología Molecular Bacteriana. Grupo de Investigación en Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^b Grupo de Bioprocesos Microbianos, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

Wastewater treatment plants
Antimicrobial resistance
Enterobacteria
Beta-lactamases
Extended-spectrum β-lactamases
AmpC-type beta-lactamases

ABSTRACT

Increasing beta-lactam resistance has led to the exploration of different places, such as wastewater treatment plants (WWTPs) which have been considered to be reservoirs and sources of bacterial resistance. This work aims to determine the presence of beta-lactamase-producing-Enterobacteriaceae in different points of a WWTP in Colombia. Six samplings were carried out in 2017 in the raw influent, aeration tanks, recycled sludge and final effluent of a WWTP. The beta-lactamase-producing-Enterobacteriaceae were detected and identified using phenotypic and molecular methods. Of the 353 isolates included, 28.3% corresponded to enterobacteria. The most frequent microorganisms were *Escherichia coli* (83%), *Citrobacter freundii* (11%) and *Enterobacter cloacae* complex (4%). The 97% of enterobacteriaceae had at least one beta-lactamase, and the most prevalent were the *bla*_{TEM} (43.8%) and *bla*_{CTX-M-1group} (35.8%) which were detected specially in recycled sludge and final effluent sample points. High percentage of multidrug resistance (to beta-lactams and non-beta-lactam antibiotics) was detected in *E. coli* (63.2%). Additionally, the typing by PFGE and MLST showed high genotypic diversity and the presence of the successful ST131 clone, globally spread. This work highlights the strong role of *E. coli* as a vector for the dissemination of resistance and the beta-lactamases in aquatic environments.

1. Introduction

Antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli to beta-lactam antibiotics, the family of antibiotics most commonly used in clinical practice, is currently considered a serious public health problem and has been classified by the World Health Organization as a critical priority (Tacconelli et al., 2017). The main mechanism of resistance to beta-lactam resistant enterobacteria is mediated by the production of enzymes that hydrolyze the antibiotic, called beta-lactamases. Among these, the extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) produced mainly by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* highlighted due to their great impact, because they can hydrolyze penicillins, penicillin inhibitors and broad-spectrum beta-lactam antibiotics such as third and fourth generation cephalosporins and monobactams. At present, hundreds of ESBLs have been identified, with the most prevalent genotypes belonging to 3 groups called *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} (Dallenne et al., 2010). Moreover, AmpC-type beta-lactamases, which are found constitutively in some Enterobacteriaceae such as *Citrobacter freundii*

and *Enterobacter* spp, also play an important role. Some enzymes can be found in plasmid form, such as CMY, LAT, BIL, ACT, MIR, MOX, FOX among others (Munita and Arias, 2016), and also have the capacity to hydrolyze from penicillins to third-generation cephalosporins (Jacoby, 2009).

The presence of beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae has been described mainly in hospital environments. However, in the last decade, they have been reported in other scenarios such as farm agricultural crops, food and in different water bodies and others (Nascimento et al., 2017; Zekar et al., 2017), demonstrating the ability of these enzymes to disseminate beyond the hospital settings. In particular, aquatic systems seem to play an essential role in this dissemination, not only for Gram-negative bacilli resistant to beta-lactams, but also for bacterial resistance in general, because they are the main receptors of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistant genes from anthropogenic activities (Berglund, 2015; Wellington et al., 2013). In this regard, different studies conducted worldwide have described the presence of beta-lactam resistant bacteria in wastewater

* Corresponding author. Grupo de Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Calle 67, 53-108, Bloque 5, oficina 135, Medellín, Colombia.

E-mail address: jnatalia.jimenez@udea.edu.co (J.N. Jiménez).

¹ Contributed equally to the work.

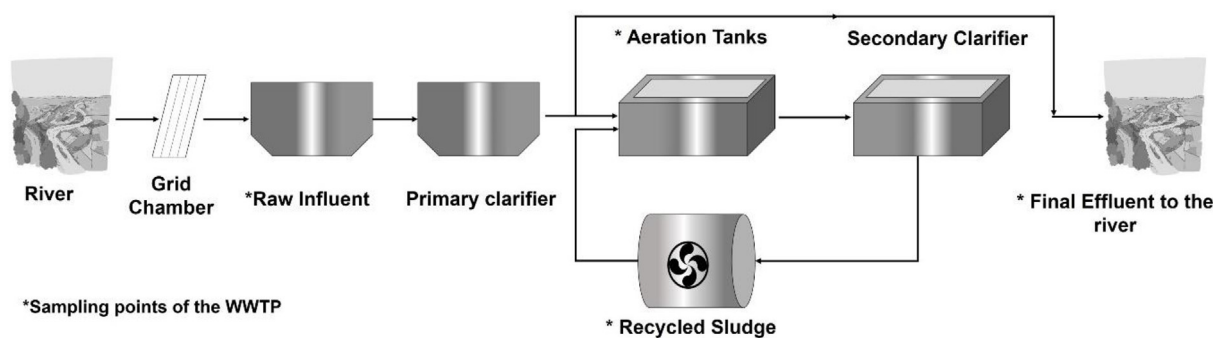


Fig. 1. The figure shows the sampling points of the wastewater treatment plant.

and wastewater treatment plants (WWTPs). This is why these are considered to be one of the main anthropogenic sources of antibiotic-resistant bacteria, as the most hospital, domestic and industrial wastes converge there (Guo et al., 2017; Wellington et al., 2013). Additionally, it has been observed that although the biological treatments in the WWTPs significantly reduce the number of bacteria, they do not completely eliminate the antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistant genes, since their main objective is the removal of nutrients and microorganisms (including some pathogens) from the organic load, that's why is expected that resistant bacteria are still present in the effluent (Wellington et al., 2013; Yu et al., 2018).

While there have been practically no studies carried out on antimicrobial resistance in WWTPs in Latin America, some approaches to this issue have been made regarding effluents from rivers and wastewater discharges where some microorganisms have been found to be carrying different resistance genes, such as Gram-positive cocci and Gram-negative bacilli (Florez and Sanchez, 2017; Oliveira et al., 2018; Silva et al., 2005). In Colombia, studies conducted in two WWTPs (including one in the department of Antioquia) have detected the presence of antibiotics that can influence the selection pressure and promote the exchange of genetic material between bacteria (Botero-Coy et al., 2018).

Taking the aforementioned into account, and with the purpose of determining the contribution of the WWTP to the problem of antimicrobial resistance in an endemic region such as Colombia, in this study was proposed to determine the presence of beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different points of a WWTP in the department of Antioquia, the second most important state in Colombia, where the use of antibiotics is not regulated, and studies carried out report a high frequency of resistant to beta-lactams.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Culture media (MacConkey agar and nutrient agar), NaCl (for the preparation of Luria Bertani agar) and peptone (to prepare peptone water) were purchased from Merck Millipore; tryptone, yeast extract and agar bacteriological -Agar No. 1- (for preparation of Luria Bertani agar) were purchased from Oxoid, Thermo Scientific; Purified distilled water was obtained in the Direct-Q® 3 UV Water Purification System (Millipore) for the preparation of the above reagents. ChromoID™ ESBL chromogenic medium, oxidase test, Vitek® 2 AST antibiogram cards and sterile saline were purchased from BioMérieux.

The primers for the identification of beta-lactamases and for 16S rRNA and were synthesized in Integrated DNA Technologies (IDT), the primers for the realization of MLST were synthesized in Macrogen, Inc; ultrapure water obtained from the Direct-Q® 3 UV Water Purification System (Millipore) was used for the preparation of the same, and the other reagents for carrying out the PCR (Buffer, MgCl₂, dNTPs) were purchased from Bioline. Reagents Tris/Boric Acid/EDTA (TBE),

Certified™ Low Melt Agarose and Pulsed Field Certified Agarose for PFGE were purchased from Bio-Rad.

2.2. Study site and sampling

The study was carried out at a WWTP in the department of Antioquia, Colombia, which collects domestic, industrial and hospital wastewater from four of the region's municipalities. It has an average capacity of 155.000 m³·d⁻¹, with conventional biological treatment of activated sludge with hydraulic retention time around 6h, solids retention time of 3 days, mixed liquor suspended solids of 2300 mg·L⁻¹ on average, and its resulting effluent is discharged into the nearest natural water source.

A total of six samplings were carried out during the months of February to July of 2017, one each month. Four points of the WWTP were evaluated: raw influent, aeration tanks (the depth of the tanks is 7 meters), recycled sludge and final effluent, and 250 mL of residual water was taken at each point. The samples were stored at 4 °C and processed within 4 h of collection (Fig. 1).

2.3. Measurement of physicochemical parameters

The physicochemical parameters including room temperature, pH, dissolved oxygen, sample temperature, percentage of oxygen saturation and conductivity were determined *in situ* and by triplicate with a HACH® HQ40D multi-digital multimeter, were measured in the raw influent, aeration tanks, and final effluent. For the measurement of total organic carbon, chemical oxygen demand, total solids, suspended solids and volatile suspended solids, the samples were collected and evaluated following the suggested procedures of the standard methods of the American Public Health Association (APHA-AWWA) (APHA et al., 2012).

2.4. Quantification of heterotrophic microorganisms and gram-negative bacilli harboring beta-lactamases

For the quantification of heterotrophic bacteria and Gram-negative bacilli harboring beta-lactamases, 1 mL of each sample collected was taken and serial dilutions were made in sterile peptonated water until a dilution 10⁻⁷ was reached. Aliquots of 100 µL were seeded on Luria Bertani agar for the quantification of heterotrophic bacteria; and ChromoID™ ESBL chromogenic culture medium (BioMérieux, France) for the quantification and detection of β-lactam-resistant Gram negative bacilli. Each sample was seeded in triplicate and incubated at 37 °C (± 2) for 18–24 h. Subsequently, the counting of colony forming units (CFUs) obtained on the Luria Bertani agar and chromogenic medium ChromID™ ESBL was carried out according to the color reaction of the chromogenic agar.

2.5. Screening of beta-lactam resistant bacteria

From ChromID™ ESBL chromogenic medium, an average of 5 colonies of each bacterial morphotype detected in the medium were randomly selected: green colonies corresponding to *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* or *Citrobacter* (KESC); rose-pink colonies corresponding to *E. coli*, and light brown to dark brown colonies corresponding to Proteaeae (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*). The colonies were seeded on the MacConkey agar (Merck Millipore) and on the nutritive agar (Merck Millipore). The oxidase test (BioMérieux) was also carried out for the selection of enterobacteria (Ojer-Usoz et al., 2014).

2.6. Identification of enterobacteria

All the isolates classified as enterobacteria, according to the oxidase test, were selected for bacterial identification by detection of the 16S rRNA gene (Korzeniewska and Harnisz, 2013). DNA extraction was performed using the commercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). The detection of the 16S rRNA gene was carried out using simple PCR, using the universal primers 27FAGAGTTTGATCCTGGCT CAG and 1492R-GGTTACCTGTACGACTT, according to the protocol described by Dunbar et al. (1999). The amplification products were sequenced, and the sequences analysed in the Geneious® software version R8 (<https://www.geneious.com>) were subsequently compared with sequences available in GenBank, using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool) from the National Center for Biotechnology Information of the United States (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.7. Molecular detection of genes coding for beta-lactamases (ESBL and AmpC-type beta-lactamases)

Using different multiplex PCR protocols, all the isolates identified by 16S rRNA were subjected to molecular characterization of the beta-lactamases of greater importance in the Enterobacteriaceae family under the conditions described by Dalenne (Dalenne et al., 2010). The genes coding for beta-lactamases variants bla_{TEM} (TEM-1 and TEM-2), bla_{SHV} (SHV-1) and $bla_{CTX-M-8/25}$ group (which includes the CTX-M-8 variants, CTX-M-25, CTX-M-26 and CTX-M-39 up to CTX-M-41), $bla_{CTX-M-1}$ group (CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-15), $bla_{CTX-M-2}$ group (CTX-M-2) and $bla_{CTX-M-9}$ group (CTX-M-9, and CTX-M-14) were evaluated. Likewise, AmpC-type beta-lactamase variants mediated by plasmids called LAT, BIL, CMY, DHA, ACT and MIR were detected; which were organized in three groups: LAT/BIL/CMY (including variants LAT-1 to LAT-3, BIL-1, CMY-2 to CMY-7, CMY-12 to CMY-18 and CMY-21 to CMY-23), DHA (DHA-1 and DHA-2) and ACT/MIR (ACT-1 and MIR-1).

2.8. Susceptibility profile in *Escherichia coli*

The antimicrobial susceptibility was carried out in approximately 50% of the *E. coli* isolates (enterobacteria detected the most frequently) using the automated system Vitek2® (bioMérieux Clinical Diagnostics). The *E. coli* isolates were selected according to the proportion of the distribution obtained in each sampling point of the WWTP with the total of isolates (n = 83).

The following antibiotics were evaluated: Ampicillin/Sulbactam (SAM), Piperacillin/Tazobactam (PTZ), Cefoxitin (FOX), Ceftazidime (CAZ), Ceftriaxone (CRO), Cefepime (FEP), Doripenem (DOR), Ertapenem (ETP), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Amikacin (AMK), Gentamicin (GN), Ciprofloxacin (CIP), Tigecycline (TGC) and Colistin (COL). The quality controls and the interpretation of the sensitivity profiles were performed according to the guidelines of CLSI 2018, and EUCAST for the interpretation of tigecycline (CLSI, 2018; EUCAST, 2018).

2.9. Molecular typing of *Escherichia coli* using pulsed-field electrophoresis (PFGE)

A PFGE was performed on a representative number of *E. coli* isolates (83%, n = 69), according to their detection frequency in the study. For the selection of the isolates, the sampling point of the WWTP and the enzymatic profile of the beta-lactamase genes were taken into account. For the realization of PFGE, a standardized protocol was used by the Bacterial Molecular Epidemiology Line of the Microba group. For the restriction, 50 IU of the Xba I enzyme (Thermo Scientific, United States) was used and the bacteriophage lambda ladder (New England Biolabs, UK) was used to normalize the DNA fragment patterns. For the electrophoretic run, the Chef-DR III system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) was employed with the following conditions: a temperature of 11 °C, an angle of 120° and a gradient voltage of 6 V/cm. The degree of relationship of the isolates was determined using the Dice similarity coefficient in the software BioNumerics version 6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). To define the genetically related isolates, a cutoff of > 80% was used. The dendrograms were generated using the unweighted-pair group method using average linkages method (UPGMA), with a 1% tolerance and a 0.5% optimization.

2.10. Molecular typing of *Escherichia coli* using multilocus sequence typing (MLST)

This technique was performed in a representative number of *E. coli* (21%, n = 17), for which eight conserved genes were sequenced in all the isolates, using the primers suggested on the Pasteur Institute website (http://bigsdbs.pasteur.fr/ecoli/primers_used.html). The types of alleles and Pasteur sequence type (PST) determination were made through the MLST page of the Pasteur Institute (https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_ecoli_seqdef_public&page=profiles).

2.11. Statistical analysis

For the qualitative variables, a description was made calculating the absolute and relative frequencies. The median and interquartile ranges were calculated for all the variables, and the ANOVA and Kruskal Wallis tests were used to detect the statistically significant differences of the variables between the sampling points (p < 0.005). Statistical analysis was carried out using the statistical package SPSS® v20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

The susceptibility profiles were constructed taking into account the criteria of the CLSI M-100 manual (CLSI, 2018). The minimum inhibitory concentrations interpreted as intermediate were considered as resistant, and the multidrug resistance profile was made according to what was stated by Magiorakos, where the resistance profiles were classified by antibiotic categories (Magiorakos et al., 2012). Thus, the antibiotics piperacillin-tazobactam (TZP) and ampicillin/sulbactam (SAM) were classified within the penicillin/inhibitor group; cefoxitin (FOX) within cephamycins, ceftazidime (CAZ) and ceftriaxone (CRO) as third-generation cephalosporins, cefepime (FEP) as fourth-generation cephalosporin; ertapenem, imipenem, meropenem and imipenem within the family of carbapenems; amikacin (AMK) and gentamicin (GN) within the family of aminoglycosides, ciprofloxacin (CIP) within the fluoroquinolones, tigecycline (TGC) within the tetracyclines, and colistin (COL) in the category of polymyxins. Multidrug resistance was defined as resistance to at least three categories of antibiotics.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical parameters and total quantification of heterotrophic bacteria and cephalosporin-resistant bacteria in the WWTP

The results of the physicochemical parameters evaluated are

Table 1

The values of the physicochemical parameters in raw influent, aeration tanks and final effluent.

Parameter	Raw influent	Aeration tanks	Final effluent
	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)
Room temperature (°C)	28,0 (24,0-34,0)	32,5 (21,0-34,0)	30,0 (23,0-34,0)
Sample temperature (°C)	25,0 (24,7-25,7)	25,9 (24,5-26,8)	25,4 (24,6-26,0)
pH	7,7 (7,6-8,0)	7,3 (7,2-7,4)	7,6 (7,4-7,9)
Dissolved oxygen (mg*L ⁻¹) *	2,5 (1,4-2,8)	0,2 (0,2-0,4)	4,3 (4,2-4,7)
Oxygen saturation (%) **	36,3 (21,6-39,2)	3,6 (3,0-5,9)	63,1 (62,4-68,4)
Conductivity (µS/cm)	855,0 (831,0-1044,0)	928,0 (840,0-1118,0)	965,0 (775,0-1031,0)
COD (mg O ₂ /L) **	690,7 (638,1-731,8)	†	257,7 (206,2-284,0)
TOC (mg*L ⁻¹)	94,1 (27,1-185,4)	†	46,0 (15,3-82,1)
Total solids (mg*L ⁻¹) **	851,0 (794,5-1046,0)	†	546,8 (479,0-631,0)
Suspended solids (mg*L ⁻¹)	260,0 (184,0-360,0)	848,0 (760,0-1020,0)	936,0 (148,0-3032,0)
Volatile suspended solids (mg*L ⁻¹)	3784,0 (3416,0-4512,0)	4248,0 (3760,0-4256,0)	5148,0 (3540,0-6612,0)

IQR - Interquartile range.

COD: Chemical oxygen demand, TOC: Total organic carbon.

*Statistically significant differences between all sampling points of the WWTP (p < 0.05).

**Statistically significant differences between all sampling points of the WWTP (p = 0,000).

† Not analysed.

detailed in Table 1. At a general level, no statistically significant differences were observed at the three sampling points for the parameters like sample temperature (23.4 °C and 27.1 °C), pH (7.1 and 9.8), conductivity (775 µS/cm - 1557 µS/cm), total organic carbon (11.5 mg*L⁻¹ - 220.25 mg*L⁻¹), suspended solids (108.0 mg*L⁻¹ - 4376 mg*L⁻¹) and volatile suspended solids (3116 mg*L⁻¹ - 7980 mg*L⁻¹). The ambient temperature observed showed a high variability (lower value 21 °C and higher value 37 °C) which could be explained by the sampling period coincided with the “child phenomena”. Nevertheless, as mentioned above the sample temperature showed lower variability without no effect over the microbial composition. By contrast, parameters such as dissolved oxygen (0.1 mg*L⁻¹ - 5.2 mg*L⁻¹), oxygen saturation (1.6%–73.7%), chemical oxygen demand (164.9 mg O₂/L- 902.0 mg O₂/L) and total solids (435.5 mg*L⁻¹ - 1058 mg*L⁻¹) showed statistically significant differences between all the sampling points (p < 0.05). The finding of these differences in parameters such as chemical oxygen demand and total solids indicates an adequate reduction of the organic load after treatment of wastewater in the WWTP under study. In this regard, previous studies suggest that despite the significant differences that can be observed in parameters such as 5-day biochemical oxygen demand, chemical oxygen demand, suspended solids, total solids and fats, between influents and effluents, notice that these indicators are important for determining the quality of the effluent in the control of wastewater treatment (Howard et al., 2004).

On the other hand, the total heterotrophic bacteria count ranged between 6.1 and 7.6 Log CFU mL⁻¹/g⁻¹, while the total beta-lactam resistant bacteria count was between 4.5 and 5.6 Log CFU mL⁻¹/g⁻¹. As expected, the maximum and minimum values were observed in the recycled sludge (with statistically significant differences in the bacterial count of recycled sludge with respect to the other sampling points

Table 2

Microbiological parameters values at the sampling points.

Parameter	Raw influent	Aeration tanks	Recycled sludge	Final effluent
	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)
THBC (Log CFU/mL) ^a	6,8 (6,5-6,9)	6,6 (6,3-6,8)	7,6 (7,3-8,0)	6,1 (5,9-6,2)
BRBC (Log CFU/mL) ^a	4,8 (4,8-5,0)	4,7 (4,7-4,8)	5,61 (5,5-5,7)	4,5 (4,5-4,6)

CFU - Colony Forming Unit.

THBC -Total heterotrophic bacteria count.

BRBC - Beta-lactam resistant bacteria count.

IQR - Interquartile range.

^a Statistically significant differences of the recirculated activated sludge with respect to the other sampling points (p < 0.05).

(p < 0.05) and in the final effluent respectively (Table 2), which demonstrates the ability of the WWTP to reduce the amount of microorganisms (Guyomard-Rabenirina et al., 2017). However, the microorganisms were not completely eliminated, and this was reflected in the resistant bacteria count. Similar aspects have been previously observed and constitute the reason why WWTPs have been consolidating as a reservoir of microorganisms, carrying not only beta-lactamases but also other mechanisms of antibiotic resistance (Ben et al., 2017). Additionally, when antibiotic-resistant bacteria in the final effluent come into contact with different water basins, they can promote the genetic exchange of resistance genes between resistant and susceptible microorganisms in the environment, posing a danger to public health (Adefisoye and Okoh, 2016).

3.2. Microorganisms identified in the wastewater treatment plant (WWTP)

A total of 353 Gram-negative bacilli suspected of harboring beta-lactamases were selected from the ChromID ESBL™ medium, of which 28.3% (n = 100) corresponded to enterobacteria. The genera detected were *E. coli* (83%, n = 83), followed by *C. freundii* (11%, n = 11), *Enterobacter cloacae* complex (4%, n = 4), *K. pneumoniae* (1%, n = 1) and *Kluyvera georgiana* (1%, n = 1). Regarding the distribution by sampling point, it was observed that *E. coli* and *C. freundii* were detected at all points of the WWTP, whereas *E. cloacae* complex was absent in the aeration tanks; and *K. pneumoniae* and *K. georgiana* were only detected in the final effluent (3.4%) and aeration tanks (4.2%) respectively (Fig. 2).

Enterobacteriaceae belong to the phyla of Proteobacteria which are characterized by their ability to transfer DNA to other bacterial groups and to facilitate the propagation of antibiotic resistant genes between environmental bacteria and commensals in water or other types of

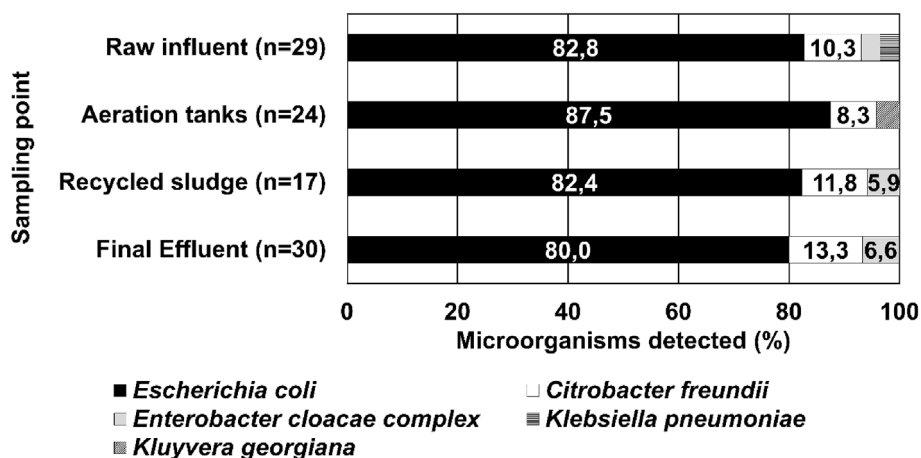


Fig. 2. The distribution of beta-lactamase-harboring Enterobacteriaceae in the different sampling points of the WWTP. The figure shows the frequencies of enterobacteria, identified by 16S rRNA, at the different sampling points of the WWTP.

environments (Jiang et al., 2017). In this work, different genera and species of enterobacteria harboring beta-lactamases were detected, distributed in several points of the WWTP in a similar way to those reported in studies carried out in countries such as Portugal, Austria and Spain (Figueira et al., 2012; Ojer-Usoz et al., 2014; Reinthaler et al., 2010). These studies found that Enterobacteriaceae such as *E. coli* and *K. pneumoniae*, which are producers of ESBLs, have the ability to survive to the biological treatment process, thus managing to survive most points of wastewater treatment (Prado et al., 2008; Yu et al., 2018).

3.3. Beta-lactamases detected in the treatment plant

In general, it was found that 97% (n = 97) of the enterobacteria analyzed had some of the evaluated resistance genes. Likewise, a total of 160 beta-lactamases were detected, of which 85.6% (n = 137) corresponded to penicillinase and ESBL; and the remaining 14.4% (n = 23) to AmpC-type beta-lactamases.

The cephalosporinases of the CTX-M group were the most frequently detected at 52.6%, distributed as follows: *bla*_{CTX-M-1 group} 35.8% (n = 49); *bla*_{CTX-M-9 group} 8.8% (n = 12); *bla*_{CTX-M-8/25 group} 4.4% (n = 6) and *bla*_{CTX-M-2 group} 3.6% (n = 5). On the other hand, the beta-lactamase variant *bla*_{TEM} was the second most frequent with 43.8% (n = 60), and at a lower percentage the variant *bla*_{SHV} (3.6%, n = 5) (Fig. 3A). Interestingly, it was observed that the beta-lactamase variant *bla*_{TEM} and the cefotaximase *bla*_{CTX-M-1 group} were the most frequently detected at all sampling points; occurring in a percentage higher than 30%, mainly in recycled sludge and in the final effluent, with a higher percentage even in the sludge with respect to the influent. Among the enzymes detected with lower frequency were the *bla*_{CTX-M-9 group} cefotaximase (> 3.5%), the beta-lactamase variant *bla*_{SHV}, (> 2.5%) (present at all points), and finally *bla*_{CTX-M-8/25 group}, which was present in the raw influent (7.9%) and aeration tanks (9.1%) (Fig. 3A).

Regarding the distribution of beta-lactamases in the WWTP, in the aeration tanks was found all beta-lactamases evaluated, compared to what happened in the other points where the beta-lactamases distribution was variable. Concerning to the distribution of these beta-lactamases by microorganism, the predominance of *bla*_{TEM} can be observed in all bacterial genera, except for *K. pneumoniae*, which only had *bla*_{SHV}. The presence of *bla*_{CTX-M-1 group} was noted, which was present in most of the *E. coli* isolates obtained from all sampling points, in addition to an isolate of *E. cloacae complex*, obtained in the final effluent (Fig. 3A).

The discovery of *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} in all the sampling points in the present study, mainly in the final effluent where the highest frequency of these genes was obtained, is significant. This suggests that

although the treatment used in the WWTP significantly decreases organic matter and microorganisms, the conventional biological treatment carried out there apparently also favors the development of antimicrobial resistance as a result of the contact between susceptible and antibiotic-resistant bacteria, added to the constant selection pressure exerted by subinhibitory concentrations of antibiotics (Keen and Fugère, 2017; Luczkiewicz et al., 2010). The frequency of these beta-lactamases has been shown to vary over time and site, not only at a clinical level but also at an environmental level, since previously beta-lactamases *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} were the most common among enterobacteria (Blanco et al., 2016; Shi et al., 2015). However, over the last almost 20 years, after the environmental finding of the *bla*_{CTX-M} gene in *K. georgiana*, the ability of this gene to spread in a plasmid form in other enterobacteria such as *E. coli* and *Klebsiella* sp (Poirel et al., 2002) has been established, so its frequency has been found to be even higher than *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}. In our study, the detection of the *bla*_{CTX-M-1 group} cefotaximase as the most frequent of the CTX-M type is consistent with the findings in the work carried out by Bréchet et al., where 75% of the CTX-M beta-lactamases detected were *bla*_{CTX-M} from group 1, subgroups CTX-M-1 (50%) and CTX-M-15 (25%) (Bréchet et al., 2014). Interestingly, we have found isolates from different genera such as *E. coli*, *K. georgiana* and *C. freundii* harboring beta-lactamases, such as *bla*_{CTX-M-2 group}; *bla*_{CTX-M-9 group} and *bla*_{CTX-M-8/25 group}, which supports the importance of the study regarding the presence of cephalosporinases in a WWTP (Amos et al., 2014). The high frequency of *bla*_{CTX-M} genes in *E. coli* reaffirms what has been found in other studies, as does the frequent detection of ESBLs in this genus, since such enzymes confer resistance to cephalosporins, one of the most widely used groups of antibiotics at the clinical level (Borgogna et al., 2016; Shi et al., 2015). Also, *bla*_{TEM} has been shown to be the most commonly reported gene conferring resistance to beta-lactam antibiotics, in addition to its ability to persist not only in the wastewater treatment stages but also in waters downstream of the WWTP effluent (Yu et al., 2018).

Of the AmpC-type resistance genes detected, 78.3% (n = 18) belonged to the LAT/BIL/CMY group, 17.4% (n = 4) to the ACT/MIR group and 4.3% (n = 1) to DHA. The same frequency pattern was observed for the first two mentioned enzymes at each sampling point, since AmpC DHA was detected only in an isolate identified as *K. georgiana*, present in the aeration tanks (16.7%, n = 1), making it into the only sampling point where the three enzymes evaluated were detected (Fig. 3B). Regarding the distribution of AmpCs by microorganism, it was observed that of the total samples analyzed from all the sampling points, 11% of the isolates (identified as *E. coli*) carried at least one of the two genes found. Likewise, of the 11 isolates of *C. freundii* found in all the sampling points, only 9 harbored the gene of the LAT/BIL/CMY group; and of the isolates identified as *E. cloacae*

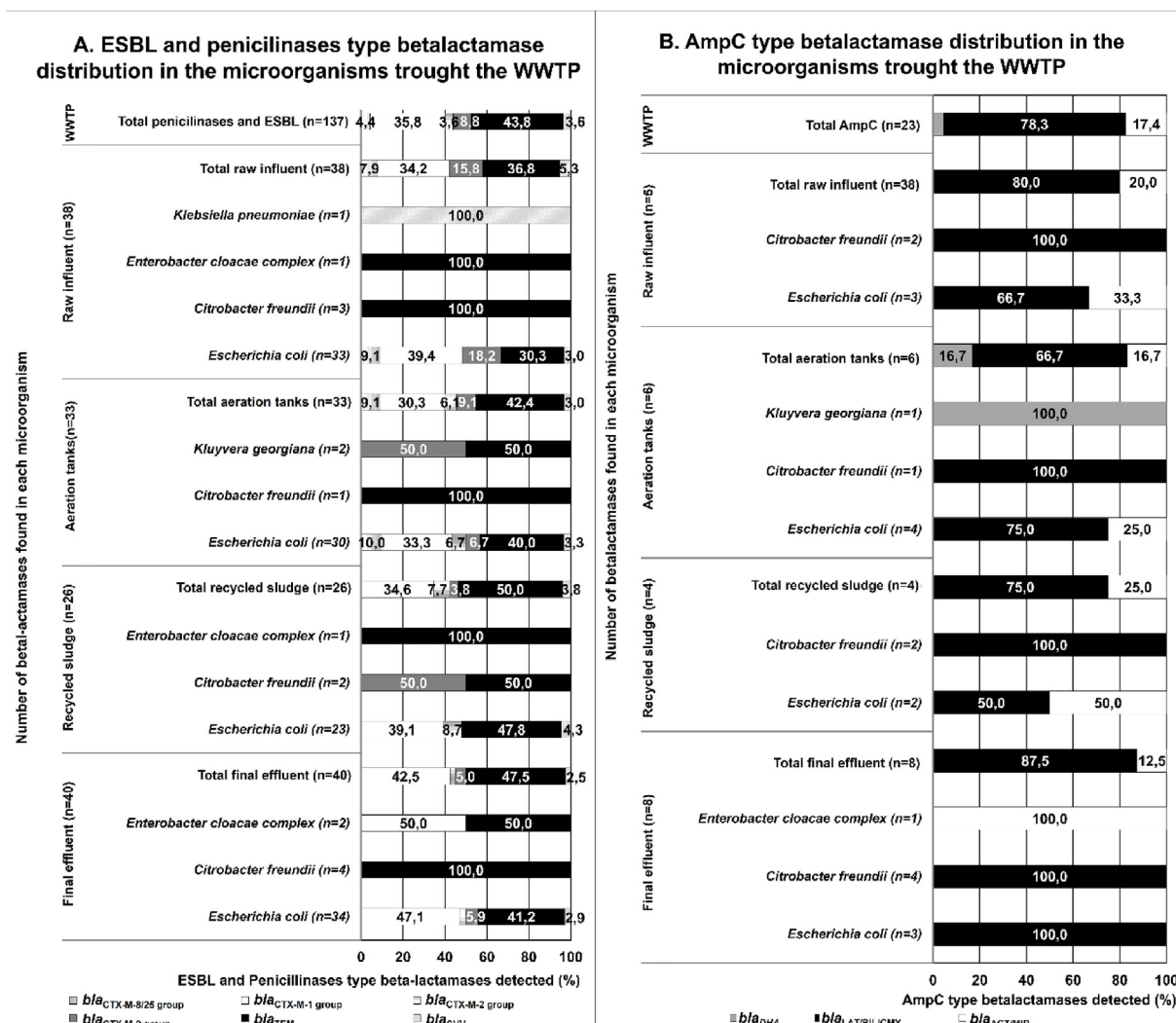


Fig. 3. The distribution of penicillinase-type beta-lactamases, ESBLs and AmpCs in the microorganisms through the WWTP. A. Distribution of beta-lactamases type ESBLs present in the microorganisms found in the different sampling points. B. Distribution of beta-lactamase type AmpCs present in the microorganisms found in the different sampling points.

complex, only one isolate from the final effluent harbored the ACT/MIR gene (Fig. 3B).

Although AmpCs type beta-lactamase have been reported worldwide, their frequency is much lower compared to ESBLs. The finding of these plasmid genes in our study, especially those of the LAT/BIL/CMY group, shows that CMY is one of the most common AmpCs at a clinical, environmental and even animal level (Campana et al., 2013; Castellanos et al., 2017; Thomson, 2010). Most of these studies involving the detection of beta-lactamase enzymes in areas other than the clinical one have mainly taken place in countries on the European and Asian continents (Cheddie et al., 2017; Reinthaler et al., 2010). However, given the endemic conditions in Latin America and the Caribbean to hosting *bla*_{CTX-M} at the hospital level, the results of this study show the potential scale that the antimicrobial resistance problem, especially in our country, if we keep in mind that since 2002, the presence of enterobacteria harboring this gene has been reported in hospital isolates (Rada et al., 2019).

Different authors have affirmed that WWTPs contribute to the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and the contamination of effluents, as wastewater arrives there from anthropogenic activities at the community and hospital level, accommodating antibiotic resistant genes such as ESBLs and AmpCs (Ben Said et al., 2016; Bréchet et al., 2014; Korzeniewska et al., 2013). In this same sense, it has been

pointed out that some microorganisms from different anthropogenic activities can influence the resistance patterns of bacteria present in the aquatic environment, indicating the prevalence of microorganisms, especially enterobacteria harboring ESBLs, in the different bodies of water, which is another worrying aspect (Igrejas et al., 2016).

The presence of beta-lactamases producing-*E. coli* in all the sampling points (> 80%) is relevant, and has also been found in other studies carried out on hospital effluents, rivers, and different stages of a WWTP (raw influent, aeration tanks and final effluent), which similarly report a high frequency of this microorganism in the sampled sites (Korzeniewska et al., 2013; Yu et al., 2018). Although there is a hostile environment to the permanence of microorganisms not used to the conditions in these places, it has been found that environmental strains of *E. coli* have great genomic plasticity, allowing them to survive in low-nutrient conditions, likewise increasing the level of gene transcription as a defense mechanism to the stress generated in this microorganism (Jang et al., 2017). It should also be noted that the capacity of *E. coli* is not limited to nutritional aspects, as it is well known that this microorganism also evolves through horizontal gene transfer, mutations and the acquisition of mobile genetic elements such as transposons; thus facilitating the obtaining of different resistance mechanisms such as beta-lactamases, which are considered to be the most common enzymes in this microorganism (Bajaj et al., 2016). In view of this situation, the

importance of *E. coli* as a vector for the dissemination of resistance has been corroborated, given that it plays a fundamental role in the diffusion of ESBLs as a causative agent of urinary tract infections (UTI). This also indicates the strong role of wastewater in the dissemination of this type of beta-lactamases (Adefisoye and Okoh, 2016)

3.4. Beta-lactamases profiles

A total of 21 beta-lactamases profiles were detected in the identified microorganisms. 29% of these carried a single enzyme, 52% two enzymes, and 19% carried three enzymes concomitantly. The sampling points that showed the greatest diversity in beta-lactamases profiles were the influent and the aeration tanks, with 12 profiles, followed by the final effluent with 11 and the recycled sludge with 7 profiles. At a general level, the five most frequent profiles were TEM+CTX-M-1 group (24%) and CTX-M-1 group (15%) which was present only in *E. coli*; TEM (11%) present in three bacterial genera (*E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae* complex), CTX-M 9 group (8%) present only in *E. coli*, and TEM+LAT/BIL/CMY (8%) present in *E. coli* and *C. freundii*. Among the lower frequency profiles found (1%) were: TEM+CTX-M-1 group+ACT/MIR, TEM+SHV+CTX-M-1 group (present only in *E. coli*) and TEM+CTX-M-9 group+DHA (present in *K. georgiana*) (Fig. 4, Supporting information Table S1). The presence of different beta-lactamases simultaneously, especially in *E. coli*, evidences the role of this microorganism in their clonal dissemination to other environments. Of the 21 beta-lactamases profiles found, *E. coli* was the only carrier of 14 of them, especially of the most frequent profile TEM+CTX-M-1 group. At the hospital level, isolates have been found harboring more than one resistance gene, especially *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} concomitantly (Blanco et al., 2016). However, this same situation has been found at an environmental level, where the situation of antimicrobial resistance is mainly evident to beta-lactam antibiotics (Amos et al., 2014; Reinthaler et al., 2010).

3.5. Antimicrobial resistance in *E. coli*

On a general level, *E. coli* isolates were resistant to most antibiotics. In all isolated sampling points, resistance to the ampicillin/sulbactam inhibitors (with percentages between 66.7% and 90%) and piperacillin/tazobactam (with percentages between 10% and 18.2%) was found. On the other hand, resistance to second-generation cephalosporins also varied, showing resistant isolates for cefoxitin between 8.3% and 60% in influent, recirculation sludge and final effluent. For third-generation

cephalosporins, the percentages of Ceftazidime resistance were between 20% and 63.6%, while for ceftriaxone they ranged from 80% to 100%. Finally, for fourth-generation cephalosporins such as cefepime, resistant isolates were found in between 16.7% and 54.5% of the samples. The evaluation of resistance to non-beta-lactam antibiotics showed percentages of resistance between 20% and 40% for Gentamicin, while for Ciprofloxacin it was between 20% and 70% (Fig. 5). No evaluated isolate showed resistance to colistin (Fig. 5).

A total of 15 resistance profiles by antibiotic categories were found to be present in the influent (8 profiles), aeration tanks (7 profiles), final effluent (6 profiles) and recycled sludge (4 profiles). In general, among the most frequent profiles found were Pen/inhib+3 GC (15.8%), followed by Pen/inhib+3 GC+4 GC+Fq (13.2%), Pen/inhib+3 GC+Fq (13, 2%), 3 GC (10.5%), and 3 GC+Fq (7.9%) (Fig. 6). Taking into account the classification made by Magiorakos et al., we identified multidrug resistance in 63.2% of the isolates evaluated, 41.7% in the influent, 80% in the aeration tanks and recycled sludge, and 63.6% in the final effluent.

It is important to note that isolates with beta-lactamases such as the *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M-1 group} showed a resistance percentage greater than 40% for beta-lactams such as ampicillin/sulbactam and ceftriaxone; between 15% and 34% for antibiotics such as ceftazidime, cefepime, and ciprofloxacin, especially in the case of *bla*_{TEM} carriers. At least 3% of them showed resistance to the other antibiotics evaluated, with the exception of colistin. The distribution of all the profiles is shown in Fig. 6.

The results found in the present study are evidence of a high percentage of multidrug resistance (63.2%) detected in *E. coli* isolates, compared to studies conducted in different countries: 34.29% in Austria, 38% in Poland and 32.7% in South Africa (Jang et al., 2017; Reinthaler et al., 2010; Yu et al., 2018). Additionally, recent studies suggest that the presence of beta-lactamases, especially *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} of the type CTX-M-1 and CTX-M-15, could suggest the presence of other non-beta-lactam resistance mechanisms such as fluoroquinolone resistance genes (Adefisoye and Okoh, 2016; Amos et al., 2014; Bajaj et al., 2016; Ben Said et al., 2016). It is important to highlight that in the present study some isolates with the most frequent profile were found. As well as being resistant to beta-lactams, they showed resistance to the fluoroquinolone's family between 20% and 70%, highlighting the role of the WWTPs as reservoirs of multidrug-resistant enterobacteria (Mahfouz et al., 2018).

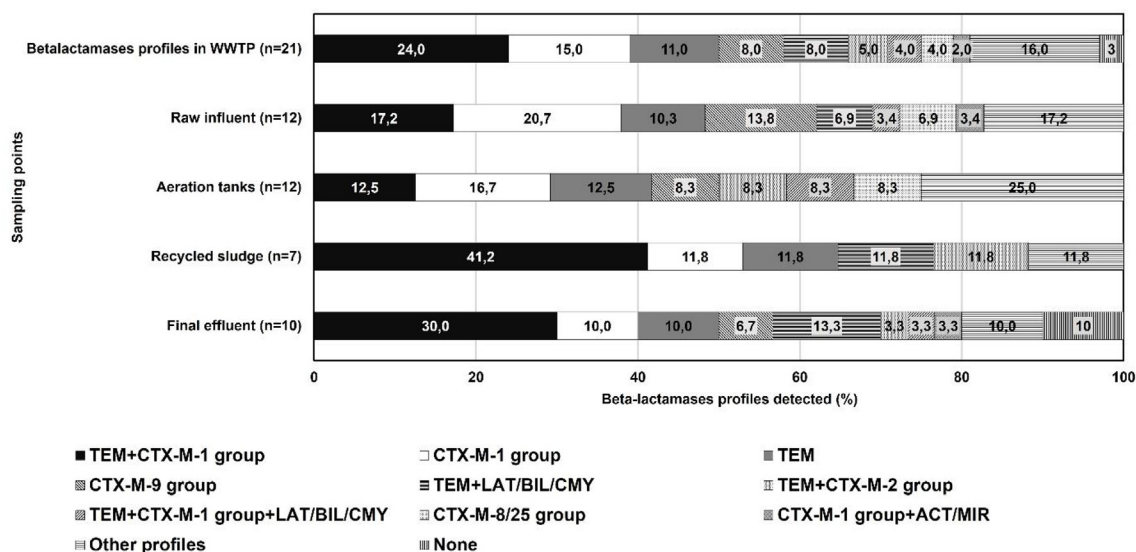


Fig. 4. The distribution of beta-lactamase profiles found in the WWTP. The figure illustrates the distribution of beta-lactamase profiles through the WWTP.

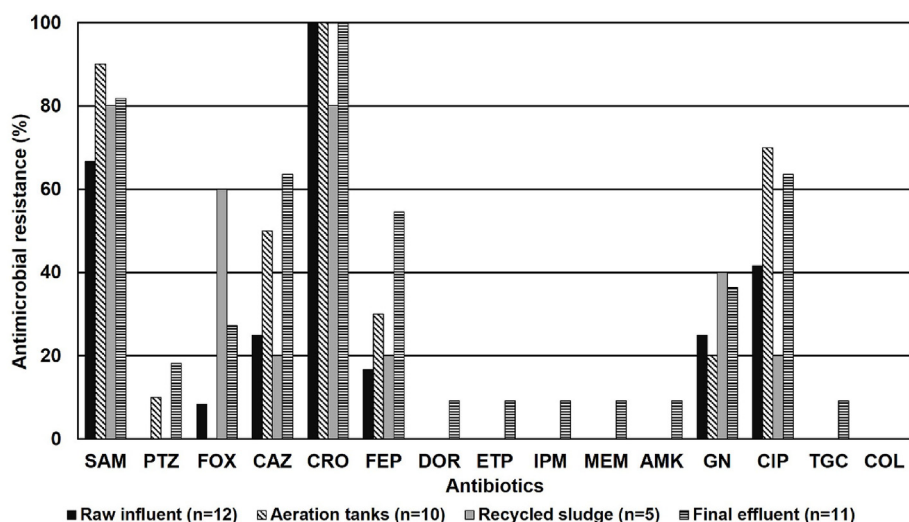


Fig. 5. The Distribution of antimicrobial resistance of *E. coli* by sampling point. The figure illustrates the percentage of resistance by antibiotic for *E. coli*, through the PTAR. Ampicillin/Sulbactam (SAM), Piperacillin/Tazobactam (PTZ), Cefoxitin (FOX), Cefazidime (CAZ), Ceftriaxone (CRO), Cefepime (FEP), Doripenem (DOR), Ertapenem (ETP), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Amikacin (AMK), Gentamicin (GN), Ciprofloxacin (CIP), Tigecycline (TGC) and Colistin (COL).

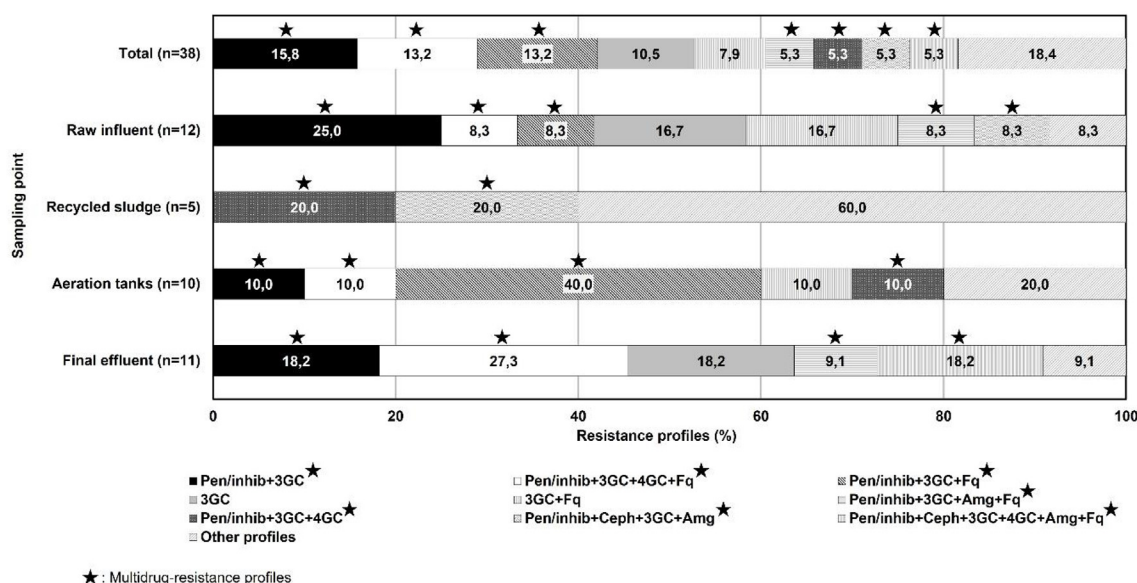


Fig. 6. The distribution of resistance profiles by antibiotic category. The figure illustrates the resistance profiles by antibiotic category found in the 38 isolates of *E. coli* evaluated. Pen/Inhib (Penicillins + beta-lactamase inhibitors), 3 GC (Third-generation cephalosporins), 4 GC (fourth-generation cephalosporins), Fq (Fluoroquinolones), Amg (Aminoglycosides), Ceph (Cephamycin).

3.6. Pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing

The results of the PFGE showed that the *E. coli* isolates recovered from the WWTP exhibit a high diversity, with a Dice coefficient similarity of around 50%. In general, these differences were observed in isolates from the different sampling points of the WWTP, as well as in *E. coli* isolates recovered in the different months of the study (Fig. 7). An exception was found in two clusters formed by three and four isolates respectively, with a similarity percentage equal to or greater than 80%, which shared the same cefotaximase (*bla*_{CTX-M-9} group) or beta-lactamase profile, and were obtained at different points of sampling. Other clusters were made up of two isolates, which mostly had different beta-lactamases profiles, but shared an enzyme in common.

On the other hand, a high diversity was found in the isolates evaluated by MLST. PST2, PST53, PST86, PST88, PST308, PST398, PST471, PST506, PST521, PST532, PST597, PST636, PST638, PST722, PST726 and PST893 were among the detected PSTs (Fig. 7). The genetic diversity evidenced in PFGE and MLST in samples of effluents from municipal, hospital and natural wastewater coincides with the work

carried out by Galvin et al. and by Ibekwe et al. (Galvin et al., 2010; Ibekwe et al., 2011). This diversity may reflect the selection pressure present in the WWTP, since in addition to receiving the hospital and community waters (Oliveira et al., 2016), there is a high concentration of emerging contaminants such as antibiotics, and a significant amount of organic matter constituted largely of bacteria, which favors close contact between cell and cell, helping to exchange genetic material inside the WWTP (Amos et al., 2014). This exchange is evidenced by the high frequency of beta-lactamases detected in 97% of the isolates, this being a much higher percentage compared to other studies such as Ojer-Usoz et al., which found 71.3% of microorganisms harboring these resistance genes (Ojer-Usoz et al., 2014). Among the PST found in the study PST506, which is known as ST131 by the Warwick method, and which has had an important impact on the dissemination of antimicrobial resistance since this clone has been characterized by its high virulence, multiresistance and for being an excellent reservoir of *bla*_{CTX-M-15} cefotaximase (Röderova et al., 2016).

It was in Colombia in 2011 that the first molecular characterization of Latin America of *bla*_{CTX-M-15} was carried out on isolates of *E. coli*

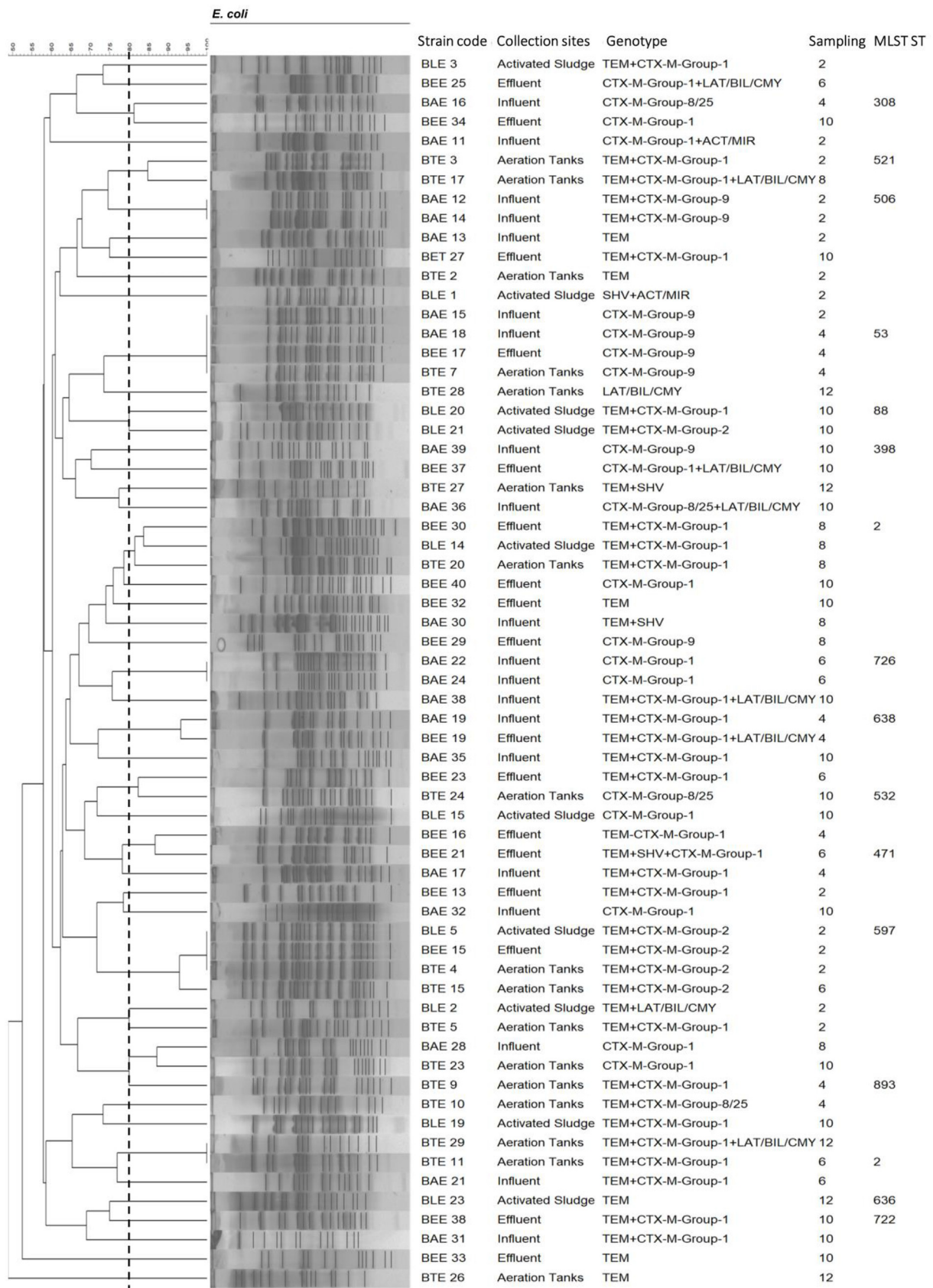


Fig. 7. The diversity of *E. coli* isolates. The figure illustrates the diversity of some *E. coli* isolates obtained during the sampling time.

obtained in infections acquired in the community where the presence of some isolates to clone ST131 was demonstrated (Ruiz et al., 2011), and since then their presence has been found with high frequency in the hospital environment (Blanco et al., 2016). Other types of PSTs, such as PST2 and PST53, were also detected. These have been reported to cause bacteremia (Kim et al., 2017). PST471 has also been reported in four carbapenemase-producing isolates from patients in Spain (Ortega et al., 2016).

Finally, the finding of the different types of *E. coli* in the WWTP is evidence of the uniqueness that this microorganism has in its genome, because although it has approximately 1400–1500 genes that make up its central genome, a study of 92 isolates carried out in a WWTP in Germany detected around 4700 genes belonging to their pangenome (including antibiotic resistance genes), of which 50% of these could occur in one or two of the detected strains. This evidences the individuality of each isolate studied. Additionally, the high genomic diversity present in this microorganism is mediated by domestic wastewater and the waste generated by the animals and humans present in the WWTP (Mahfouz et al., 2018).

4. Conclusions

According to the literature reviewed, this is the first study conducted in Colombia that characterizes beta-lactam resistant-Enterobacteria at different points in a wastewater treatment plant. The results of this work showed high genotypic diversity and a high percentage of multidrug resistance of *E. coli* (63.2%) compared with other countries. This diversity confirms the selection pressure present in the WWTP suggesting that places like this favors the development of antimicrobial resistance due to the dissemination of plasmids enzymes in aquatic environments especially beta-lactamases like *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} which were the most frequent in this study demonstrating its capacity to remain through the time. Additionally, the results by MLST showed the presence of the successful and globally spread ST131 clone, which is known for carrying beta-lactamases like *bla*_{CTX-M} conferring resistance to beta-lactams like cephalosporins, one of the most antibiotics employed in clinical practice. This finding evidence the problem of antimicrobial resistance in Colombia considered an endemic country for this issue and highlights another factor of great relevance that must be taken into account for the control of the emergence of bacterial resistance, such as has been reported in other countries.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Administrative Department of Science, Technology and Innovation -Colciencias-, Project 111571149740 and Contract 124-2017.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.073>.

References

Adefisoye, M.A., Okoh, A.I., 2016. Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. *Microbiology* 5, 143–151. <https://doi.org/10.1002/mbo3.319>.

Amos, G.C.A., Hawkey, P.M., Gaze, W.H., Wellington, E.M., 2014. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1785–1791. <https://doi.org/10.1093/jac/dku079>.

APHA, AWWA, WEF, 2012. *SMWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd. ed. American Public Health Association, Washington.

Bajaj, P., Singh, N.S., Viridi, J.S., 2016. *Escherichia coli* B-lactamases: what really matters. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00417>.

Ben, W., Wang, J., Cao, R., Yang, M., Zhang, Y., Qiang, Z., 2017. Distribution of antibiotic resistance in the effluents of ten municipal wastewater treatment plants in China and the effect of treatment processes. *Chemosphere* 172, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.041>.

Ben Said, L., Jouini, A., Alonso, C.A., Klibi, N., Dziri, R., Boudabous, A., Ben Slama, K., Torres, C., 2016. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia. *Sci. Total Environ.* 550, 1103–1109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.042>.

Berglund, B., 2015. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 5, 28564. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.28564>.

Blanco, V.M., Maya, J.J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J.S., Motoa, G., Pallares, C.J., Rosso, F., Matta, L., Celis, Y., Garzon, M., Villegas, M.V., 2016. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 34, 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.011>.

Borgogna, T.R., Borgogna, J.-L., Mielke, J.A., Brown, C.J., Top, E.M., Botts, R.T., Cummings, D.E., 2016. High diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in municipal wastewater and urban Wetlands. *Microb. Drug Resist.* 642, 842–853. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0197>.

Botero-Coy, A.M., Martínez-Pachón, D., Boix, C., Rincón, R.J., Castillo, N., Arias-Marín, L.P., Manrique-Losada, L., Torres-Palma, R., Moncayo-Lasso, A., Hernández, F., 2018. An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. *Sci. Total Environ.* 642, 842–853. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.06.088>.

Bréchet, C., Plantin, J., Sauguet, M., Thouverez, M., Talon, D., Cholley, P., Guyeux, C., Hocquet, D., Bertrand, X., 2014. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1658–1665. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu190>.

Campana, E.H., Barbosa, P.P., Fehlberg, L.C.C., Gales, A.C., 2013. Frequency of plasmid-mediated AmpC in enterobacteriaceae isolated in a Brazilian teaching hospital. *Braz. J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200023>.

Castellanos, L.R., Donado-Godoy, P., León, M., Clavijo, V., Arevalo, A., Bernal, J.F., Timmerman, A.J., Mevius, D.J., Wagenaar, J.A., Hordijk, J., 2017. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on Inc11 plasmids in the Colombian poultry chain. *PLoS One* 12, e0170777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170777>.

Cheddie, P., Dziva, F., Akpaka, P.E., 2017. Detection of a CTX-M group 2 beta-lactamase gene in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from a tertiary care hospital, Trinidad and Tobago. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 16, 33. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0209-x>.

CLSI, 2018. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA.

Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., Arlet, G., 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 490–495. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A., Kuske, C.R., 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1662–1669.

EUCAST, 2018. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. [WWW Document]. URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

Figueira, V., Serra, E.A., Vaz-Moreira, I., Brandão, T.R.S., Manaia, C.M., 2012. Comparison of ubiquitous antibiotic-resistant Enterobacteriaceae populations isolated from wastewaters, surface waters and drinking waters. *J. Water Health* 10, 1–10. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.002>.

Florez, N.L., Sanchez, T., 2017. Evaluación de la presencia de resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y Oxacilina en tres microorganismos en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá. Universidad Santao Tomás.

Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D., Cormican, M., 2010. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4772–4779. <https://doi.org/10.1128/AEM.02898-09>.

Guo, J., Li, J., Chen, H., Bond, P., Yuan, Z., 2017. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res.* 123, 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.002>.

Guyomard-Rabenirina, S.S., Dartron, C., Falord, M.M., Sadikalay, S., Ducat, C.C., Richard, V., Breurec, S.S., Gros, O., Talarmin, A., 2017. Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. *PLoS One* 12, e0173155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173155>.

Howard, I., Espigares, E., Lardelli, P., Martín, J.L., Espigares, M., 2004. Evaluation of microbiological and physicochemical indicators for wastewater treatment. *Environ. Toxicol.* 19, 241–249. <https://doi.org/10.1002/tox.20016>.

Ibekwe, A.M., Murinda, S.E., Graves, A.K., 2011. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources. *PLoS One* 6, e20819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020819>.

Igrejas, G., Novais, C., Arul Jose, P., R Haq, Q.M., Azam, M., Jan, A.T., 2016. *bla*_{CTX-M-152}, a novel variant of CTX-M-group-25, identified in a study performed on the prevalence of multidrug resistance among natural inhabitants of river Yamuna, India. *Front. Microbiol.* 7, 176. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00176>.

Jacoby, G.A., 2009. AmpC B-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>.

Jang, J., Hur, H.G., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., Ishii, S., 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J. Appl. Microbiol.* 123, 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>.

Jiang, X., Ellabaan, M.M.H., Charusanti, P., Munck, C., Blin, K., Tong, Y., Weber, T., Sommer, M.O.A., Lee, S.Y., 2017. Dissemination of antibiotic resistance genes from

- antibiotic producers to pathogens. *Nat. Comm.* 8, 15784. <https://doi.org/10.1038/ncomms15784>.
- Keen, P.L., Fugère, R., 2017. Antimicrobial Resistance in Wastewater Treatment Processes, Antimicrobial Resistance in Wastewater Treatment Processes. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781119192428>.
- Kim, H., Kim, Y.A., Park, Y.S., Choi, M.H., Lee, G.I., Lee, K., 2017. Risk factors and molecular features of sequence type (ST) 131 extended-spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* in community-onset bacteremia. *Sci. Rep.* 7, 14640. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14621-4>.
- Korzeniewska, E., Harnisz, M., 2013. Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. *J. Environ. Manag.* 123, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.03.024>.
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., Harnisz, M., 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.014>.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- Mahfouz, N., Caucci, S., Achatz, E., Semmler, T., Guenther, S., Berendonk, T.U., Schroeder, M., 2018. High genomic diversity of multi-drug resistant wastewater *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 8, 8928. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27292-6>.
- Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- Nascimento, T., Cantamessa, R., Melo, L., Lincopan, N., Fernandes, M.R., Cerdeira, L., Lincopan, N., Fraga, E., Dropa, M., Sato, M.I.Z., 2017. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. *Sci. Total Environ.* 598, 910–915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.207>.
- Ojer-Usoz, E., González, D., García-Jalón, I., Vitas, A.I., 2014. High dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res.* 56, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.041>.
- Oliveira, M., Serrano, I., Van Harten, S., Bessa, L.J., Bernardo, F., da Costa, P.M., 2016. Fecal contamination of wastewater treatment plants in Portugal. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 14671–14675. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6962-0>.
- Oliveira, L.G., Ferreira, L.G.R., Nascimento, A.M.A., Reis, M.D.P., Dias, M.F., Lima, W.G., Paiva, M.C., 2018. Antibiotic resistance profile and occurrence of AmpC between *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a domestic full-scale WWTP in southeast Brazil. *Water Sci. Technol.* 2017, 108–114. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.091>.
- Ortega, A., Sáez, D., Bautista, V., Fernández-Romero, S., Lara, N., Aracil, B., Pérez-Vázquez, M., Campos, J., Oteo, J., Aznar, J.E., Campelo, C., Sánchez-Romero, I., Martínez, R., Orden, B., González, A., Solís, S., García-Picazo, L., Cercenado, E., Alhambra, A., Salso, S., Gómez, C., Alós, J.I., Miguel-Martínez, M.D., Alarcón, T., Llorca, L., Ledo, M.T., El Knaichi, F., Trujillo, G., Morta, M., Hernández, B., Hernández, J.M., Saz, J.V., Fontanals, D., Ruiz-Velasco, L.M., de Miguel, S., López-Urrutia, L., Baladón, C., Carranza, R., Somodevilla, Á., Castón, J., Romero, M.D., Cuesta, I., Cabezas, T., Gómez, F., Antolín, M.I., Carpintero, Y., Buñuel, F., 2016. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2131–2138. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw148>.
- Poirel, L., Kämpfer, P., Nordmann, P., 2002. Chromosome-encoded ambler class a β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 4038–4040. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.4038-4040.2002>.
- Prado, T., Pereira, W.C., Silva, D.M., Seki, L.M., Carvalho, A.P.D.A., Asensi, M.D., 2008. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 136–141. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x>.
- Rada, A., Rada, A.M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., Villegas, M.V., 2019. Distribución y caracterización molecular de beta-lactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia (2001-2016). *Biomédica* 39, 45. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>.
- Reinthal, F.F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G., Marth, E., 2010. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res.* 44, 1981–1985. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.052>.
- Röderova, M., Halova, D., Papousek, I., Dolejska, M., Masarikova, M., Hanulik, V., Pudova, V., Broz, P., Htoutou-Sedlakova, M., Sauer, P., Bardou, J., Cizek, A., Kolar, M., Literak, I., 2016. Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Front. Microbiol.* 7, 2147. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02147>.
- Ruiz, S.J., Montealegre, M.C., Ruiz-Garbajosa, P., Correa, A., Briceño, D.F., Martínez, E., Rosso, F., Muñoz, M., Quinn, J.P., Cantón, R., Villegas, M.V., 2011. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1993–1996. <https://doi.org/10.1128/JCM.00045-11>.
- Shi, H., Sun, F., Chen, J., Ou, Q., Feng, W., Yong, X., Xia, P., 2015. Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial *Escherichia coli* infection in China. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 4. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0063-7>.
- Silva, J.A., Loyola, P.S., Galleguillos, J.O., Rodríguez, Y.G., Colque-Navarro, P., Möllby, R., Kühn, I., 2005. Prevalencia de Enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev. Med. Chile* 133, 1201–1210. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872005001000009>.
- Tacconelli, E., Magrini, N., Kahlmeter, G., Singh, N., 2017. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. World Health Organization. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70222-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70222-1).
- Thomson, K.S., 2010. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1019–1025. <https://doi.org/10.1128/JCM.00219-10>.
- Wellington, E.M.H., Boxall, A.B.A., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., Thomas, C.M., Williams, A.P., 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 13, 155–165. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1).
- Yu, X., Zhang, M., Zuo, J., Shi, X., Tang, X., Chen, L., Li, Z., 2018. Evaluation of antibiotic resistant lactose fermentative opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae bacteria and blaTEM-2gene in cephalosporin wastewater and its discharge receiving river. *J. Environ. Manag.* 228, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.043>.
- Zekar, F.M., Granier, S.A., Marault, M., Yaici, L., Gassilloud, B., Manceau, C., Touati, A., Millemann, Y., 2017. From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa. *Front. Microbiol.* 8, 1569. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01569>.
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S., Olańczuk-Neyman, K., Fudala-Książek, S., Olańczuk-Neyman, K., 2010. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 44, 5089–5097. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.007>.

8. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se ha logrado caracterizar la resistencia a betalactámicos, especialmente de betalactamasas, en bacilos Gram negativos presentes en una planta de tratamiento de aguas residuales de Antioquia. Este trabajo constituye el primer estudio realizado en Colombia que caracteriza enterobacterias portadoras de betalactamasas, en diferentes puntos de una planta de tratamiento de aguas residuales.

Adicionalmente, se determinaron los parámetros fisicoquímicos de la PTAR durante el período de estudio, en donde se encontró de forma general, que la mayoría de los parámetros están dentro de los rangos adecuados, evidenciando el funcionamiento óptimo del sistema de tratamiento y la capacidad de la PTAR para disminuir la carga orgánica de forma significativa.

De otra parte, se emplearon diferentes métodos fenotípicos, moleculares convencionales y herramientas de tipificación molecular como PFGE y MLST que contribuyeron a identificación de la presencia de bacilos Gram negativos portadores de betalactamasas, siendo más frecuentes *E. coli* y *C. freundii*, los cuales durante los últimos años han demostrado su capacidad para permanecer en el ambiente y a nivel hospitalario, causando enfermedades nosocomiales, oportunistas y problemas de salud en la comunidad. Adicionalmente, el uso de los métodos empleados en epidemiología molecular, permitieron señalar a *E. coli* como el microorganismo más diverso con capacidad para portar la mayoría de los genes de resistencia a betalactámicos, en especial de *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} de forma concomitante. La presencia de ambos genes, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M}, se ha reportado con frecuencia en este microorganismo en donde adicionalmente se halló multidrogorresistencia en el más del 60% de los aislados de *E. coli* evaluados, siendo resistentes no sólo a betalactámicos sino a otras familias de antibióticos como fluoroquinolonas, cuya relación con el gen *bla*_{CTX-M} se ha determinado en diversos estudios reportados en la literatura.

Finalmente, estos hallazgos son un reflejo de la problemática de la resistencia antimicrobiana en Colombia, considerado un país endémico para este tema, y evidencian otro factor de gran relevancia desde el punto de vista epidemiológico y es el hecho de que las plantas de tratamiento debe igualmente ser tenidas en cuenta en la implementación de mecanismos y planes de control de la emergencia de la resistencia bacteriana, tal como ha sido reportado en otros países.

9. PERSPECTIVAS

Este estudio se convierte en una base muy importante para investigaciones futuras relacionadas con:

1. Realización de experimentos de conjugación con el objetivo de evidenciar la capacidad de transferencia de estos mecanismos de resistencia (determinando elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones).
2. Teniendo en cuenta la importancia de *E. coli* en otros ambientes es necesaria la implementación de herramientas de secuenciación de nueva generación (secuenciación de genoma completo) para dilucidar el origen del microorganismo.
3. La determinación de la presencia genes de resistencia diferentes a los betalactámicos, presentes en las enterobacterias detectadas, pues estudios previos han demostrado la co-ocurrencia de genes que codifican para la resistencia de antibióticos no betalactámicos en aislados portadores de betalactamasas.
4. El estudio de la resistencia antimicrobiana en otras PTAR importantes del país, con el fin de correlacionar los resultados obtenidos, con la problemática de la resistencia a nivel local y nacional.
5. Estudios de epidemiología molecular para el análisis simultáneo de efluentes hospitalarios y las aguas residuales de la PTAR, para la comparación de genomas bacterianos hallados a nivel ambiental y a nivel hospitalario.
6. La metodología empleada para estandarizar el recuento bacteriano en los diferentes puntos de la PTAR, se puede aplicar a otros ambientes acuáticos contaminados con antibióticos como efluentes agrícolas, ganaderos, ríos y lagos.
7. Correlación de los parámetros fisicoquímicos con la presencia de bacterias resistentes y genes de resistencia presentes en la planta de tratamiento de aguas residuales.

8. Es realmente importante buscar otras estrategias para la contención de la resistencia antimicrobiana, especialmente en la remoción de bacterias resistentes a antibióticos.

10. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo se ha presentado en tres eventos académicos, de los cuales dos se realizaron a nivel nacional y tres a nivel internacional.

Eventos nacionales:

- Simposio Medellín Microbial Meeting-MeMM. 26 de octubre de 2017, Medellín-Colombia. *“Detección de bacilos Gram negativos resistentes a betalactámicos en una planta de tratamiento de aguas residuales de Antioquia”*. Aristizábal AM, Rodríguez EA, Arcos Y, Arias L, Jiménez JN. Modalidad: Póster.
- XI Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, I Encuentro Andino de Investigación en Enfermedades Infecciosas (ACIN). Del 2 al 4 de agosto de 2018, Pereira. Risaralda. *“Detección de enterobacterias de importancia clínica portadoras de betalactamasas en una planta de tratamiento de aguas residuales de Antioquia”*. Aristizábal AM, Rodríguez EA, Arias L, Jiménez JN. Modalidad: Oral.



Eventos internacionales:

- 4th International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance (EDAR 2017). Del 13 al 17 de agosto de 2017, Lansing, MI (USA). *“Betalactamase-producing Gram-negative bacteria isolated from wastewater treatment plant (WWTP) in Medellin, Colombia”*. Erika Rodríguez, Ana Aristizábal, Lida Arias, Yamilet Arcos, Judy Natalia Jimenez. Modalidad: Póster
- 6th Central European Symposium on Antimicrobials and Antimicrobial Resistance (CESAR). Del 19 al 22 de Septiembre de 2018, Sveti Marti Na Muri, Croacia. *“Isolation and Characterization of Beta-Lactam Resistance Gram-Negative Bacteria in Different Stages of a Wastewater Treatment Plant in Colombia”*. Erika Rodríguez, Ana Aristizábal, Lida Arias, Judy Natalia Jiménez. Modalidad: Póster

- XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM). Del 13 al 16 de noviembre de 2018, Santiago de Chile, Chile. *“Descripción de enterobacterias portadoras de betalactamasas tipo BLEES y AmpC, en una planta de tratamiento de aguas residuales del departamento de Antioquia, Colombia”*. Aristizábal AM, Rodríguez EA, Arias L, Jiménez JN. Modalidad: Póster (Comunicación libre panel).

11. ANEXOS

Anexo 1.

	<p align="center">Presencia de antibióticos y bacterias resistentes en afluentes y efluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales del área metropolitana de Medellín</p>	
<p>Versión 01</p>	<p align="center">Formato información general y recolección de datos variables <i>in situ</i></p>	<p>Elaborado por:</p> <p>Revisado por:</p>

I. INFORMACIÓN GENERAL	
1. SALIDA DE CAMPO N° _____	
2. Fecha de toma de muestra: DD ____/MM____/AAAA_____	
Altitud en msnm : 1.460 m.s.n.m	
Responsables: Responsable principal: _____ _____	
Personal de EPM que acompañó en la recolección: _____	
Registro fotográfico de los tanques Aireación : Sí <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	

II. CARACTERISTICAS DE LA ESTACION DE MUESTREO	
3. Estado del tiempo <u>predominante del día anterior</u> a la toma de muestra:	
Mañana: Lluvia <input type="checkbox"/> Soleado <input type="checkbox"/> Vientos <input type="checkbox"/> Nublado <input type="checkbox"/>	
Otras observaciones _____	
Tarde: Lluvia <input type="checkbox"/> soleado <input type="checkbox"/> vientos <input type="checkbox"/>	
4. <u>Estado del tiempo actual</u> : Lluvia <input type="checkbox"/> soleado <input type="checkbox"/> vientos <input type="checkbox"/> Nublado <input type="checkbox"/>	
Otras observaciones: _____ _____ _____	

ESTACIÓN DE MUESTREO				
	AFLUENTE	EFLUENTE	TANQUES DE AIREACIÓN	LODO ACTIVADO DE RECIRCULACIÓN
5. Hora de la toma de muestra				
6. Caudal (m ³ /s)				NA
7. Temperatura ambiente (°C)				NA
8. Descripción de la estación de muestreo				NA

III. PARÁMETROS FISICOQUIMICOS DEL AGUA			
PARAMETRO (medida por triplicado)	AFLUENTE	EFLUENTE	TANQUES DE AIREACIÓN
9. Temperatura del agua			
10. pH (Unidades de pH)			
11. Oxígeno disuelto (mg/L)			
12. Porcentaje de saturación de oxígeno			
13. Conductividad (µs/cm)			

Nota: se tomarán los datos de oxígeno disuelto para tanques de aireación en esta salida:

IV. OTRAS OBSERVACIONES

14. Durante los última semana ha ingresado algún contaminante fuerte a la planta que haya interrumpido el funcionamiento normal de ésta: Sí NO

En caso de respuesta afirmativa:

Por cuánto tiempo se interrumpió el funcionamiento de la planta _____

Otra observaciones al respecto:

15. Durante el último día el total del caudal entrante ha pasado por el tratamiento secundario Sí NO

Otras observaciones al respecto:

16. ¿Durante los últimos días se ha presentado fenómenos de “bulking” en los tanques de tratamiento secundario? Sí NO

17. ¿Durante los últimos días se ha presentado fenómenos de “foaming” en los tanques de tratamiento secundario? Sí NO

18. Otros comentarios sobre el funcionamiento de la planta

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *J Investig Surg* [Internet]. 2012;25(2):67–77. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08941939.2012.664099>
2. Depaola LG. Antimicrobial Resistance – The Global Threat: State of the Science. Vol. 88, *The Journal of Dental Hygiene*. 2014.
3. Rosenblatt-Farrell N. The landscape of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2009 Jun [cited 2017 Nov 1];117(6):A244-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590668>
4. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. *World Heal Organ* [Internet]. 2014;1–257. Available from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
5. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. Vol. 6, *New Microbes and New Infections*. 2015. p. 22–9.
6. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharm Ther* [Internet]. 2015;40(4):277–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4378521>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4378521>

7. Bergeron S, Boopathy R, Nathaniel R, Corbin A, LaFleur G. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. 2015 Aug 1 [cited 2017 Oct 2];102:370–4. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830515001456>
8. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microb Spectr* [Internet]. 2016;4(2):1–37. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/pdf/nihms715987.pdf>
9. Meek RW, Vyas H, Piddock LJV. Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use? *PLoS Biol*. 2015;13(10):1–11.
10. Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. Vol. 303, *International Journal of Medical Microbiology*. 2013. p. 293–7.
11. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control* [Internet]. 2017 Apr 10;12:Doc05. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388835/>
12. Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. Vol. 78, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014. p. 3–13.
13. El-Kfoury KA. Multidrug-resistant Gram-negative bacilli in the wastewater of a

- Lebanese hospital: Profiles and mechanisms of resistance. *J Infect Public Health* [Internet]. 2015;1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2015.11.014>
14. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;6:25–64.
 15. OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 17]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
 16. Auer S, Wojna A, Hell M. Oral treatment options for ambulatory patients with urinary tract infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;
 17. Barraud O, Peyre M, Couvé-Deacon E, Chainier D, Bahans C, Guignon V, et al. Antibiotic Resistance Acquisition in the First Week of Life. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Jul 4 [cited 2018 Dec 5];9:1467. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01467/full>
 18. Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* [Internet]. American Society of Microbiology; 2018 [cited 2018 Dec 5]. p. 289–316. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819804.chap13>
 19. Moriel DG, Rosini R, Seib KL, Serino L, Pizza M, Rappuoli R. *Escherichia coli*:

Great diversity around a common core. MBio [Internet]. 2012; Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374390/>

20. Silveyra IM, Pereyra AM, Alvarez MG, Villagran MD, Baroni AB, Deza N, et al. Aislamiento de *Escherichia coli* enteropatógeno O157:H16 de un caso de diarrea infantil y sus contactos familiares en La Pampa, Argentina. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Dec 8];47(4):317–21. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0325754115001236>
21. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;
22. Iranpour D, Hassanpour M, Ansari H, Tajbakhsh S, Khamisipour G, Najafi A. Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. *Biomed Res Int*. 2015;
23. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013.
24. Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*. 2011;7(7):1–9.
25. Cai L, Ju F, Zhang T. Tracking human sewage microbiome in a municipal wastewater treatment plant. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(7):3317–26.

26. Marti E, Variatza E, Balcázar JL. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. Vol. 22, Trends in Microbiology. 2014. p. 36–41.
27. Davin-Regli A, Pagès JM. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Vol. 6, Frontiers in Microbiology. 2015.
28. Biológicas C para investigaciones. Bacilos gramnegativos. In: Díaz C FJ, Estrada M S, Franco R L, Jaramillo A JM, Maestre B AE, Ospina O S, et al., editors. Microbiología de las infecciones humanas. 1 Ed. Medellín; 2007. p. 914.
29. Matar GM. Editorial: Pseudomonas and Acinetobacter: From Drug Resistance to Pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2018 Mar 13 [cited 2018 Dec 6];8:68. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00068/full>
30. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2008.
31. Tomasz A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Annu Rev Microbiol. 1979;33:113–37.
32. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(2):116–29.

33. Martínez MJF, García MIG, Sánchez EG, Sánchez JEG. [Available carbapenems: Properties and differences]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010;28 Suppl 2(Supl 2):53–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130931>

34. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Current* [Internet]. 2013;114. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>

35. Chan-Tompkins NH. Multidrug-resistant gram-negative infections. Bringing back the old. *Crit Care Nurs Q*. 2011;34(2):87–100.

36. Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2005;8(1369–5274 (Print)):518–24. Available from: <c:%5CKARSTEN%5CPDFs%5CAntibiotika-PDFs%5CAnti-2005%5CThomson - Bonomo-The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria-beta-lactams in peril.pdf>

37. Leung E, Weil DE, Raviglione M, Nakatani H. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*. 2011;89(5):390–2.

38. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010;54(3):969–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995920> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2825993>

39. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases [1]. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(6):1050–1.
40. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440–58.
41. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci [Internet].* 2015;22(1):90–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
42. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. Vol. 27, *Korean Journal of Internal Medicine.* 2012. p. 128–42.
43. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. Vol. 13, *The Lancet Infectious Diseases.* 2013. p. 785–96.
44. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet].* 2014 Dec [cited 2017 Nov 1];32:4–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25542046>
45. Ovalle MV, Saavedra SY, González MN, Hidalgo AM, Duarte C, Beltrán M. Resultados de la vigilancia nacional de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud en enterobacterias y Gram negativos no fermentadores, Colombia 2012-2014. *Biomédica.* 2017;37(4):39.

46. Hocquet D, Muller A, Bertrand X. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. Vol. 93, *Journal of Hospital Infection*. 2016. p. 395–402.
47. Carlet J, Rambaud C, Pulcini C. Save Antibiotics: a call for action of the World Alliance Against Antibiotic Resistance (WAAAR). *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014 Nov 28 [cited 2017 Nov 2];14:436. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432402>
48. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med*. 2010;
49. Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2013;14(2):199–210. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14656566.2013.763030>
50. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2015;109(7):309–18. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/2047773215Y.0000000030>
51. Torres AG. Escherichia coli diseases in Latin America-a “One Health” multidisciplinary approach. *Pathog Dis*. 2017;
52. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*. 2015.

53. Wang S, Zhao SY, Xiao SZ, Gu FF, Liu QZ, Tang J, et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing bloodstream infections in three hospitals in Shanghai, China. *PLoS One*. 2016;
54. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JDD. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect*. 2008;
55. Lopez-Cerero L, Navarro MD, Bellido M, Martin-Pena A, Vinas L, Cisneros JM, et al. *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2018 Dec 8];69(3):809–14. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt405>
56. Peirano G, Pitout JDD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010.
57. Han JH, Garrigan C, Johnston B, Nachamkin I, Clabots C, Bilker WB, et al. Epidemiology and characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) from long-term care facility residents colonized intestinally with fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;
58. Li B, Lu Y, Lan F, He Q, Li C, Cao Y. Prevalence and characteristics of ST131 clone among unselected clinical *Escherichia coli* in a Chinese university hospital. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;

59. Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martinez E, et al. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1993–6.
60. Liu LH, Wang NY, Wu AYJ, Lin CC, Lee CM, Liu CP. *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018;
61. Liu L, Chen D, Liu L, Lan R, Hao S, Jin W, et al. Genetic Diversity, Multidrug Resistance, and Virulence of *Citrobacter freundii* From Diarrheal Patients and Healthy Individuals. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2018 Jul 10 [cited 2018 Dec 9];8:233. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00233/full>
62. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: Clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 2012.
63. Kuboyama RH, de Oliveira HB, Moretti-Branchini ML. Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacae* in a high-risk neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;
64. Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 May 18 [cited 2018 Dec 6];6:392. Available from:
http://www.frontiersin.org/Antimicrobials%2C_Resistance_and_Chemotherapy/10.3

65. Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(4):761–78.
66. Jiang X, Ellabaan MMH, Charusanti P, Munck C, Blin K, Tong Y, et al. Dissemination of antibiotic resistance genes from antibiotic producers to pathogens. *Nat Commun.* 2017;8:15784.
67. Wellington EMH, Boxall ABA, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013;13(2):155–65. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)
68. Usma JI, Gutiérrez OD, Gil MJ, Soto AM. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Prod más Limpia* [Internet]. 2013;7(2):52–73. Available from: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/265>
69. Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect Ecol Epidemiol* [Internet]. 2015 Sep 8;5(1):28564. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4565060/>
70. Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. *Environ Sci Technol.*

2006;40(23):7445–50.

71. Marti E, Balcázar JL. Antibiotic resistance in the aquatic environment. Petrovic M, Barceló D, Pérez S, editors. *Anal Removal, Eff Risk Pharm Water Cycle*. 2 Ed. 2013;62:671–84.
72. Zhang T. Antibiotics and resistance genes in wastewater treatment plants. 2016;(8):120–5.
73. Yu X, Zhang M, Zuo J, Shi X, Tang X, Chen L, et al. Evaluation of antibiotic resistant lactose fermentative opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae bacteria and blaTEM-2 gene in cephalosporin wastewater and its discharge receiving river. *J Environ Manage*. 2018;228:458–65.
74. Thomson KS. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010;48(4):1019–25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849556/>
75. Campana EH, Barbosa PP, Fehlberg LCC, Gales AC. Frequency of plasmid-mediated AmpC in enterobacteriaceae isolated in a Brazilian teaching hospital. *Brazilian J Microbiol*. 2013;
76. Castellanos LR, Donado-Godoy P, León M, Clavijo V, Arevalo A, Bernal JF, et al. High Heterogeneity of Escherichia coli Sequence Types Harboring ESBL/AmpC Genes on IncII Plasmids in the Colombian Poultry Chain. Butaye P, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jan 26 [cited 2018 Nov 24];12(1):e0170777. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0170777>

77. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. Vol. 24, *Clinical Microbiology Reviews*. 2011. p. 718–33.
78. *Primer for Municipal Wastewater Treatment Systems*. 2004 [cited 2017 Oct 31]; Available from: <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/primer.pdf>
79. Moura A, Tação M, Henriques I, Dias J, Ferreira P, Correia A. Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR-DGGE analysis. *Microbiol Res*. 2009;164(5):560–9.
80. Gerardi MH. *Wastewater Bacteria*. *Wastewater Bacteria*. 2006. 1-255 p.
81. Gresch M, Armbruster M, Braun D, Gujer W. Effects of aeration patterns on the flow field in wastewater aeration tanks. *Water Res*. 2011;45(2):810–8.
82. Ramalho RS, Jiménez Beltrán D, Lora F de. *Tratamiento de aguas residuales*. Jiménez Beltrán D, de Lora F, Sete Ramalho R, editors. Barcelona: Reverté; 1996. 720 p.
83. Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Vol. 157, *Environmental Pollution*. 2009. p. 2893–902.
84. Benit N, Roslin AS. Physicochemical properties of wastewater collected from different sewage sources. *Int J Innov Sci Eng Technol*. 2015;2(11):6.
85. Le T-H, Ng C, Chen H, Yi XZ, Koh TH, Barkham TMS, et al. Occurrences and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria and Genetic Determinants of Hospital Wastewater in a Tropical Country. *Antimicrob Agents Chemother*

- [Internet]. 2016 Dec 21;60(12):7449–56. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5119029/>
86. Guo J, Li J, Chen H, Bond P, Yuan Z. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res* [Internet]. 2017;123:468–78. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135417305651>
87. Hoque ME, Cloutier F, Arcieri C, McInnes M, Sultana T, Murray C, et al. Removal of selected pharmaceuticals, personal care products and artificial sweetener in an aerated sewage lagoon. *Sci Total Environ*. 2014;487(1):801–12.
88. Cydzik-Kwiatkowska A, Zielińska M. Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2016 Mar 1;32(4):1–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4773473/>
89. Reinthaler FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, et al. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res* [Internet]. 2010;44(6):1981–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.052>
90. Ojer-Usoz E, González D, García-Jalón I, Vitas AI. High dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2018 Sep 30];56(0):37–47. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135414001572?via%3Dihub>

91. Turolla A, Cattaneo M, Marazzi F, Mezzanotte V, Antonelli M. Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading. *Chemosphere*. 2018;
92. Blaak H, Lynch G, Italiaander R, Hamidjaja RA, Schets FM, De Husman AMR. Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in dutch surface water and wastewater. *PLoS One*. 2015;10(6):1–16.
93. Osińska A, Korzeniewska E, Harnisz M, Niestępski S, Niestępski S. The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate. *Sci Total Environ*. 2017;577:367–75.
94. Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2013;91:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>
95. Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho APDA, Asensi MD. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46(1):136–41.
96. Chagas TPG, Seki LM, Cury JC, Oliveira JAL, Dávila AMR, Silva DM, et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2011;111(3):572–81.
97. Acuatécnica. ¿Cuántas plantas de tratamiento de aguas residuales hay en Colombia?

- [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 1]. Available from: <http://acuatecnica.com/cuantas-plantas-tratamiento-aguas-residuales-colombia/>
98. IDEAM. Capítulo II: Fundamentos teóricos de lodos activados y aireación extendida [Internet]. [cited 2018 Dec 9]. p. 36. Available from: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/1Fundamentosdelprocesodelodosactivados.pdf>
99. Robayo Mayorga VL, Castillo Pinilla DM, Tangarife Torres I, Rojas Vargas JF, Puerto Gómez CF, Villalba Hernández N. Estudio Sectorial de los servicios públicos domiciliarios de Acueducto y Alcantarillado-2016 [Internet]. Bogotá D.C; 2017 [cited 2019 May 6]. Available from: https://www.superservicios.gov.co/sites/default/archivos/SSPD/Publicaciones/Publicaciones/2018/Oct/estudio_sectorial-compilado-26-12-2017-vbibiana.pdf
100. APHA, AWWA, WEF. SMWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [Internet]. 22 nd. Washington: American Public Health Association; 2012 [cited 2018 Oct 24]. 1360 p. Available from: <http://www.standardmethods.org/>
101. Gaitán MS. DETERMINACIÓN DE OXIGENO DISUELTO POR EL MÉTODO YODOMÉTRICO MODIFICACIÓN DE AZIDA [Internet]. 2004 [cited 2018 Dec 10]. Available from: <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Oxígeno+Disuelto+Método+Winkler.pdf/e2c95674-b399-4f85-b19e-a3a19b801dbf>

102. Von Sperling M. Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal. *Water Intell Online*. 2015;
103. Blog Hanna Instruments. Química del agua [Internet]. 2018 [cited 2018 May 10]. Available from: <http://www.hannainst.es/blog/category/biblioteca/quimica-del-agua/>
104. Woodard & Curran, Inc., Woodard & Curran, Inc. Waste Characterization. *Ind Waste Treat Handb* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2019 May 6];83–126. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780750679633500072>
105. Londoño Restrepo J, Macias Ospina IC, Ochoa Jaramillo FL. Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014. *Infectio*. 2016;
106. González L, Cortés JA, Cortés JA. Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en enterobacterias en aislamientos intrahospitalarios en Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2013 Dec 3 [cited 2017 Jun 2];34(2):180–97. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1550>
107. Pacheco R, Osorio L, Correa AM, Villegas MV. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen blaKPC en hospitales de Colombia. *Biomédica*. 2014;34:81–90.
108. Vanegas JM, Cienfuegos A V., Ocampo AM, López L, Del Corral H, Roncancio G, 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;
109. Maldonado NA, Múnera MI, López JA, Sierra P, Robledo C, Robledo J. Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: resultados de seis años de vigilancia. *Biomédica* [Internet]. 2014;34:433–46. Available from:
<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i3.1658>
 110. Ovalle MV, Saavedra SY, González MN, Hidalgo AM, Duarte C, Beltrán M. Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae and Gram negative bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014. *Biomédica*. 2018;
 111. Grupo Germen. Análisis del comportamiento de la sensibilidad a los antibióticos en población adulta en el Departamento de Antioquia, Grupo GERMEN, año 2016. In: *Primer Boletín Grupo Germen* [Internet]. Medellín: Grupo Germen; 2017 [cited 2017 May 2]. p. 24. Available from:
http://www.grupogermen.org/pdf/Primer_Boletin_Grupo_Germen_2017.pdf
 112. Grupo Germen. Análisis del comportamiento de la sensibilidad a los antibióticos en población pediátrica, en el Departamento de Antioquia, Grupo GERMEN, años 2015 y 2016. In: *Primer Boletín Grupo Germen* [Internet]. Grupo Germen; 2017 [cited 2017 May 2]. p. 24. Available from:
http://www.grupogermen.org/pdf/Primer_Boletin_Grupo_Germen_2017.pdf
 113. Goering R V., Köck R, Grundmann H, Werner G, Friedrich AW. From theory to

practice: Molecular strain typing for the clinical and public health setting.

Eurosurveillance. 2013;

114. Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: Focus on infection. American Journal of Epidemiology. 2001.
115. Boccia S, Pasquarella C, Colotto M, Barchitta M, Quattrocchi A. Molecular Epidemiology Tools in the Management of Healthcare-Associated Infections: Towards the Definition of Recommendations. Epidemiol Prev. 2015;
116. Peirano G, Richardson D, Nigrin J, McGeer A, Loo V, Tuye B, et al. High prevalence of ST131 isolates producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli isolates from Canada. Antimicrob Agents Chemother. 2010;
117. Park SH, Byun JH, Choi SM, Lee DG, Kim SH, Kwon JC, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli in the community and hospital in Korea: emergence of ST131 producing CTX-M-15. BMC Infect Dis. 2012;
118. Coque TM, Novais Â, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. Emerg Infect Dis. 2008;
119. Giuffrè M, Cipolla D, Bonura C, Geraci DM, Aleo A, Di Noto S, et al. Outbreak of colonizations by extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli sequence type 131 in a neonatal intensive care unit, Italy. Antimicrob Resist Infect

Control. 2013;

120. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008;
121. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, et al. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 2011;
122. Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F, Henderson DK, Palmore TN, et al. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;
123. Rodríguez-Zulueta P, Silva-Sánchez J, Barrios H, Reyes-Mar J, Vélez-Pérez F, Arroyo-Escalante S, et al. First outbreak of kpc-3-producing *klebsiella pneumoniae* (st258) clinical isolates in a mexican medical center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013.
124. Ocampo AM, Vargas CA, Sierra PM, Cienfuegos AV, Jiménez JN. Caracterización molecular de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2015 May 26 [cited 2017 Jun 7];35(4):496–504. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2610>
125. Witney AA, Gould KA, Pope CF, Bolt F, Stoker NG, Cubbon MD, et al. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111

- serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2014;
126. Dropa M, Lincopan N, Balsalobre LC, Oliveira DE, Moura RA, Fernandes MR, et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;
 127. Dolejska M, Frolkova P, Florek M, Jamborova I, Purgertova M, Kutilova I, et al. CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella* spp. isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *J Antimicrob Chemother*. 2011;
 128. Bréchet C, Plantin J, Sauget M, Thouverez M, Talon D, Cholley P, et al. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin Infect Dis*. 2014;58(12):1658–65.
 129. Galvin S, Boyle F, Hickey P, Vellinga A, Morris D, Cormican M. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(14):4772–9.
 130. CDC. Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) | PulseNet Methods | PulseNet | CDC [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>
 131. Parizad EG, Parizad EG, Valizadeh A. The application of pulsed field gel

- electrophoresis in clinical studies. *J Clin Diagnostic Res.* 2016;
132. Kluytmans-Van Den Bergh MFQ, Rossen JWA, Bruijning-Verhagen PCJ, Bonten MJM, Friedrich AW, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Whole-genome multilocus sequence typing of extended-spectrum-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016;
 133. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. Multilocus sequence typing (MLST) [Internet]. [cited 2018 Dec 10]. Available from: <https://pubmlst.org/general.shtml>
 134. Clermont O, Gordon D, Denamur E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiol (United Kingdom).* 2015;
 135. Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G, Singh N. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics. World Health Organization. 2017.
 136. 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* [Internet]. 2010;65(3):490–5. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/long/65/3/490>
 137. Jacoby GA. AmpC B-Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161–82.
 138. Trott D. B-lactam Resistance in Gram-negative Pathogens Isolated from Animals. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2013;19(2):239–49. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894614>

139. Reich F, Atanassova V, Klein G. Extended-spectrum β -lactamase- and ampc-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(8):1253–9.
140. Ben Said L, Jouini A, Klibi N, Dziri R, Alonso CA, Boudabous A, et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2015 Jun 16 [cited 2017 Oct 2];203:86–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515001129?via%3Dihub>
141. Tansawai U, Sanguansermisri D, Na-udom A, Walsh TR, Niumsup PR. Occurrence of extended spectrum β -lactamase and AmpC genes among multidrug-resistant *Escherichia coli* and emergence of ST131 from poultry meat in Thailand. *Food Control.* 2018;84:159–64.
142. Nascimento T, Cantamessa R, Melo L, Lincopan N, Fernandes MR, Cerdeira L, et al. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. *Sci Total Environ.* 2017;598:910–5.
143. Amador PP, Fernandes RM, Prudêncio MC, Barreto MP, Duarte IM. Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of Class A and Class C β -lactamases. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng.* 2015;

144. Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FVB, Assis DM, 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. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.001>
145. Oliveira LG, Ferreira LGR, Nascimento AMA, Reis MDP, Dias MF, Lima WG, et al. Antibiotic resistance profile and occurrence of AmpC between *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a domestic full-scale WWTP in southeast Brazil. *Water Sci Technol*. 2018;2017(1):108–14.
146. Silva JA, Loyola PS, Galleguillos JO, Rodríguez YG, Colque-navarro P, Möllby R, et al. Prevalencia de Enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev Med Chil*. 2005;133(10):1201–10.
147. Florez NL, Sanchez T. Evaluación de la presencia de resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y Oxacilina en tres microorganismos en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá [Internet]. Universidad Santao Tomás; 2017 [cited 2017 Sep 27]. Available from: <http://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/4316/FlorezNayibeth2017.pdf?sequence=1>
148. Botero-Coy AM, Martínez-Pachón D, Boix C, Rincón RJ, Castillo N, Arias-Marín LP, et al. ‘An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater.’ *Sci Total Environ* [Internet]. 2018 Nov 15 [cited 2018 Oct 24];642:842–53. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718321636>

149. bioMérieux. chromID™ ESBL agar (ESBL), Selective chromogenic medium for the screening of Extended Spectrum β -Lactamase-producing enterobacteria (ESBL) [Internet]. 2010 [cited 2017 May 26]. Available from:
http://www.biomerieux.co.kr/upload/package_insert-2.pdf
150. Zhang S, Han B, Gu J, Wang C, Wang P, Ma Y, et al. Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere*. 2015;135.
151. Petti CA, Carroll KC. Procedures for the Storage of Microorganisms. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 10 Ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 124–31.
152. Korzeniewska E, Harnisz M. Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. *J Environ Manage* [Internet]. 2013;123:1–7. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.03.024>
153. Dunbar J, Takala S, Barns SM, Davis JA, Kuske CR. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1999;65(4):1662–9. Available from:
<https://aem.asm.org/content/65/4/1662>
154. CLSI. M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [Internet]. 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, editor. Wayne, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. 296 p. Available from:

<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100-3/>

155. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Internet]. Version 8. Europe: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2018. p. 95. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
156. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, 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.* 2012;18(3):268–81.
157. Zekar FM, Granier SA, Marault M, Yaici L, Gassilloud B, Manceau C, et al. From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of North Africa. *Front Microbiol.* 2017;8:1569.
158. Howard I, Espigares E, Lardelli P, Martín JL, Espigares M. Evaluation of microbiological and physicochemical indicators for wastewater treatment. *Environ Toxicol.* 2004;19(3):241–9.
159. Guyomard-Rabenirina SS, Dartron C, Falord MM, Sadikalay S, Ducat CC, Richard V, et al. Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173155.
160. Ben W, Wang J, Cao R, Yang M, Zhang Y, Qiang Z. Distribution of antibiotic resistance in the effluents of ten municipal wastewater treatment plants in China and

the effect of treatment processes. *Chemosphere*. 2017;172:392–8.

161. Adefisoye MA, Okoh AI. Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. *Microbiologyopen*. 2016;5(1):143–51.
162. Sabri NA, Schmitt H, Van der Zaan B, Gerritsen HW, Zuidema T, Rijnaarts HHM, et al. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2018;
163. Galler H, Feierl G, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, Habib J, et al. Multiresistant bacteria isolated from activated sludge in Austria. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;57(5):704–10.
164. Figueira V, Serra EA, Vaz-Moreira I, Brandão TRS, Manaia CM. Comparison of ubiquitous antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* populations isolated from wastewaters, surface waters and drinking waters. *J Water Health*. 2012;10(1):1–10.
165. Keen PL, Fugère R. Antimicrobial Resistance in Wastewater Treatment Processes. L. Keen P, Raphaël F, editors. *Antimicrobial Resistance in Wastewater Treatment Processes*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2017. 1-366 p.
166. Łuczkiewicz A, Jankowska K, Fudala-Książek S, Olańczuk-Neyman K, Fudala-Książek S, Olańczuk-Neyman K. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res*. 2010;44(17):5089–97.
167. Shi H, Sun F, Chen J, Ou Q, Feng W, Yong X, et al. Epidemiology of CTX-M-type

- extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial *Escherichia coli* infection in China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2015 Jan 16 [cited 2018 Jul 16];14:4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25591816>
168. Bush K. Other β -lactam antibiotics. In: Bush K, editor. *Antibiotic and Chemotherapy* [Internet]. 9 Ed. W.B. Saunders; 2010 [cited 2018 Jul 16]. p. 226–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702040641000154>
169. Poirel L, Kämpfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class a β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(12):4038–40.
170. Amos GCA, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EM. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(7):1785–91.
171. Borgogna TR, Borgogna J-L, Mielke JA, Brown CJ, Top EM, Botts RT, et al. High Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases in Municipal Wastewater and Urban Wetlands. *Microb Drug Resist*. 2016;642:842–53.
172. Tokajian S, Moghnieh R, Salloum T, Arabaghian H, Alousi S, Moussa J, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewaters and refugee camp in Lebanon. *Future Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2018 Apr 12];13(1):81–95. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/fmb-2017-0093>

173. Cheddie P, Dziva F, Akpaka PE. Detection of a CTX-M group 2 beta-lactamase gene in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from a tertiary care hospital, Trinidad and Tobago. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2017 [cited 2018 Aug 30];16(1):33. Available from: <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12941-017-0209-x>
174. Rada A, Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribución y caracterización molecular de beta-lactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia (2001-2016). *Biomédica* [Internet]. 2019 Oct 12 [cited 2018 Nov 24];39:45. Available from: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/4351>
175. Ben Said L, Jouini A, Alonso CA, Klibi N, Dziri R, Boudabous A, et al. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae of water samples in Tunisia. *Sci Total Environ*. 2016;550:1103–9.
176. Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2013;91:96–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.014>
177. Igrejas G, Novais C, Arul Jose P, R Haq QM, Azam M, Jan AT. blaCTX-M-152, a Novel Variant of CTX-M-group-25, Identified in a Study Performed on the Prevalence of Multidrug Resistance among Natural Inhabitants of River Yamuna, India. *India Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2018 Oct 18];7:176. Available

from: www.frontiersin.org

178. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol.* 2017;123(3):570–81.
179. Bajaj P, Singh NS, Viridi JS. Escherichia coli B-lactamases: What really matters. Vol. 7, *Frontiers in Microbiology.* 2016. p. 417.
180. Delgado-Gardea MCE, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores R, de la Serna FJZD, Eroza-de la Vega G, Nevárez-Moorillón GV, et al. Multidrug-resistant bacteria isolated from surface water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(6):e597.
181. Jena J, Sahoo RK, Debata NK, Subudhi E. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections in adults. *3 Biotech* [Internet]. 2017 Aug 14 [cited 2018 Nov 28];7(4):244. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-017-0879-2>
182. Blanco VM, Maya JJ, Correa A, Perenguez M, Muñoz JS, Motoa G, et al. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(9):559–65.
183. Mahfouz N, Caucci S, Achatz E, Semmler T, Guenther S, Berendonk TU, et al. High genomic diversity of multi-drug resistant wastewater Escherichia coli. *Sci Rep.*

2018;8(1):8928.

184. Ibekwe AM, Murinda SE, Graves AK. Genetic diversity and antimicrobial resistance of escherichia coli from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources. *PLoS One*. 2011;6(6):e20819.
185. Oliveira M, Serrano I, Van Harten S, Bessa LJ, Bernardo F, da Costa PM. Fecal contamination of wastewater treatment plants in Portugal. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23(14):14671–5.
186. Röderova M, Halova D, Papousek I, Dolejska M, Masarikova M, Hanulik V, et al. Characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment in the Czech Republic. *Front Microbiol*. 2016;7:2147.
187. Kim H, Kim YA, Park YS, Choi MH, Lee GI, Lee K. Risk Factors and Molecular Features of Sequence Type (ST) 131 Extended-spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* in Community-onset Bacteremia. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Nov 7 [cited 2018 Nov 24];7(1):14640. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29116143>
188. Ortega A, Sáez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Lara N, Aracil B, et al. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(8):2131–8.