

UNIVERSIDAD DE HUANUCO
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERIA AMBIENTAL



TESIS

“Resistencia antimicrobiana en aguas residuales urbanas y de hospitales de Huánuco determinadas mediante análisis metagenómico, 2021”

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA
AMBIENTAL**

AUTORA: Pablo Ramírez, Nelis Rosalvina

ASESORA: Campos Ríos, Bertha Lucila

HUÁNUCO – PERÚ

2023



UDH
UNIVERSIDAD DE HUANUCO
<http://www.udh.edu.pe>

U

TIPO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN:

- Tesis (X)
- Trabajo de Suficiencia Profesional ()
- Trabajo de Investigación ()
- Trabajo Académico ()

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: Biotecnología y Nanotecnología

AÑO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN (2020)

CAMPO DE CONOCIMIENTO OCDE:

Área: Ciencias Naturales

Sub área: Biología

Disciplina: Biología celular, Microbiología

DATOS DEL PROGRAMA:

Nombre del Grado/Título a recibir: Título Profesional de Ingeniera ambiental

Código del Programa: P09

Tipo de Financiamiento:

- Propio (X)
- UDH ()
- Fondos Concursables ()

DATOS DEL AUTOR:

Documento Nacional de Identidad (DNI): 47880823

DATOS DEL ASESOR:

Documento Nacional de Identidad (DNI): 19939411

Grado/Título: Magister en educación gestión y planeamiento educativo

Código ORCID: 0000-0002-5662-554X

DATOS DE LOS JURADOS:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES	GRADO	DNI	Código ORCID
1	Cámara Llanos, Frank Erick	Maestro en ciencias de la salud con mención en: salud pública y docencia universitaria	44287920	0000 -0001 - 9180 -7405
2	Valdivia Martel, Perfecta Sofia	Maestro en ingeniería con mención en: gestión ambiental y desarrollo sostenible	43616954	0000 -0002 - 7194 -3714
3	Duran Nieva, Alejandro Rolando	Biólogo Microbiología	21257549	000 -0001 - 5596 -0445

D

H



UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

Facultad de Ingeniería

PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO(A) AMBIENTAL

En la ciudad de Huánuco, siendo las 17:00 horas del día 18 del mes de setiembre del año 2023, en cumplimiento de lo señalado en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad de Huánuco, se reunieron el sustentante y el **Jurado Calificador** integrado por los docentes:

- Mg. Frank Erick Cámara Llanos (Presidente)
- Mg. Perfecta Sofía Valdivia Martel (Secretario)
- Blgo. Alejandro Rolando Duran Nieva (Vocal)

Nombrados mediante la **Resolución N° 2014-2023-D-FI-UDH**, para evaluar la Tesis intitulada: **"RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES URBANAS Y DE HOSPITALES DE HUÁNUCO DETERMINADAS MEDIANTE ANÁLISIS METAGENÓMICO, 2021"**, presentado por el (la) Bach. **PABLO RAMIREZ, NELIS ROSALVINA**, para optar el Título Profesional de Ingeniero(a) Ambiental.

Dicho acto de sustentación se desarrolló en dos etapas: exposición y absolución de preguntas: procediéndose luego a la evaluación por parte de los miembros del Jurado.

Habiendo absuelto las objeciones que le fueron formuladas por los miembros del Jurado y de conformidad con las respectivas disposiciones reglamentarias, procedieron a deliberar y calificar, declarándolo(a) **APROBADA**..... por **UNANIMIDAD** con el calificativo cuantitativo de **19**..... y cualitativo de **EXCELENTE**..... (Art. 47)

Siendo las **18:10** horas del día **18** del mes de **SEPTIEMBRE** del año **2023**, los miembros del Jurado Calificador firman la presente Acta en señal de conformidad.

Mg. Frank Erick Cámara Llanos
ORCID: 0000-0001-9180-7405
Presidente

Mg. Perfecta Sofía Valdivia Martel
ORCID: 0000-0002-7194-3714
Secretario

Blgo. Alejandro Rolando Duran Nieva
ORCID: 0000-0001-5596-0445
Vocal



UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

Yo, **Bertha Lucila CAMPOS RÍOS**, asesora del PA. **INGENIERÍA AMBIENTAL** y designada mediante **RESOLUCIÓN N° 2487-2022-D-FI-UDH**, de fecha 05 de diciembre de 2022, de la Bach. **PABLO RAMÍREZ, Nelis Rosalvina**, de la investigación titulada **“RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES URBANAS Y DE HOSPITALES DE HUÁNUCO DETERMINADAS MEDIANTE ANÁLISIS METAGENÓMICO, 2021”**

Puedo constar que la misma tiene un índice de similitud del 23% verificable en el reporte final del análisis de originalidad mediante el Software Turnitin.

Cabe informar que se tuvieron las siguientes consideraciones para llegar a dicho porcentaje: se excluyó: caratula; índice, las tablas y los gráficos, la referencia bibliográfica previa revisión, las fuentes menores a 15 palabras.

Por lo que concluyo que, cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio y cumple con todas las normas de la Universidad de Huánuco.

Se expide la presente, a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Huánuco, 30 de setiembre de 2023

CAMPOS RIOS Bertha Lucila
DNI N° 19939411
Cód. ORCID N° 0000-0002-5662-554X

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%

INDICE DE SIMILITUD

23%

FUENTES DE INTERNET

13%

PUBLICACIONES

16%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	1library.co Fuente de Internet	1 %
2	www.researchgate.net Fuente de Internet	1 %
3	www.coursehero.com Fuente de Internet	1 %
4	Submitted to University of Texas Health Science Center Trabajo del estudiante	1 %
5	hemeroteca.unad.edu.co Fuente de Internet	1 %
6	repositorioslatinoamericanos.uchile.cl Fuente de Internet	1 %
7	mro.massey.ac.nz Fuente de Internet	<1 %
8	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1 %
9	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	

Beampol

CAMPOS RIOS Bertha Lucila
DNI N° 19939411
Cód. ORCID N° 0000-0002-5662-554X

DEDICATORIA

A mis padres quienes son la base fundamental de mi formación y ser, a Dios por la guía constante.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a mis padres Eugenio y Lucia por brindarme el apoyo constante durante mis años de estudio y por las enseñanzas del día a día que me intuyeron,

También agradecer a mi hermana Nelsia, mi abuela Rufina, familiares de mi entorno quienes me enseñaron a no rendirme y seguir siempre para adelante.

Al equipo multidisciplinario quienes hicieron posible la realización del trabajo de investigación contando con la colaboración de Luis Jaramillo, Catalina Martínez, Vicky Roa, Heinner Guio y otros.

A los jurados y a mi asesor de la presente tesis, por el apoyo, paciencia y las recomendaciones respectivas de la realización del trabajo de investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	X
CAPÍTULO I	12
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	12
1.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA	12
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	14
1.2.1 PROBLEMA GENERAL	14
1.2.2 PROBLEMA ESPECÍFICO	14
1.3. OBJETIVOS	14
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	14
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
1.4. JUSTIFICACIÓN	15
1.4.1. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA	15
1.4.2. JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA	15
1.4.3. JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA	15
1.5. LIMITACIONES	15
CAPÍTULO II	16
MARCO TEÓRICO	16
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	16
2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES	16
2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES	20
2.2. BASES TEÓRICAS	21
2.2.1. METAGENÓMICA	21
2.2.2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA	25
2.3. DEFINICIONES CONCEPTUALES	29
2.4. HIPÓTESIS	30

2.5. VARIABLES	30
2.5.1. VARIABLE DEPENDIENTE.....	30
2.5.2. VARIABLE INDEPENDIENTE	30
2.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	31
CAPÍTULO III.....	32
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	32
3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	32
3.2. ENFOQUE	32
3.3. DISEÑO METODOLÓGICO	32
3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA	32
3.4.1. POBLACIÓN.....	32
3.4.2. MUESTRA.....	33
3.5. RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	34
3.5.1. TÉCNICAS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.....	34
3.5.2. TÉCNICA PARA EL ANÁLISIS INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS	34
CAPÍTULO IV.....	40
RESULTADOS.....	40
4.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS	40
CAPÍTULO V.....	48
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES.....	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Operacionalización de las variables	31
Tabla 2 Ubicación de los puntos de toma de muestra. Sistema de proyección: UTM/Datum horizontal WGS84	33
Tabla 3 Número y volumen de muestras de aguas residuales urbanas y de hospitales	34
Tabla 4 Puntos de monitoreo durante dos días	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de secuenciación de shotgun	23
Figura 2 Análisis metagenómico	24
Figura 3 Resistencia a antibióticos.	27
Figura 4 Mapa de la ubicación de los puntos de toma de muestra	33
Figura 5 Vista fotográfica de la toma de muestra a nivel Rural	35
Figura 6 Vista fotográfica de la toma de parámetros in situ	36
Figura 7 Clasificación de especies y abundancia en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021.....	40
Figura 8 Riqueza de Rarefied en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021	41
Figura 9 Índice de Shannon en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021	42
Figura 10 Análisis de componentes principales (ACoP) en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021	43
Figura 11 Abundancia de familias de genes de resistencia en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021	44
Figura 12 Diversidad de Shannon de genes de resistencia en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco,2021.....	45
Figura 13 Genes de biosíntesis en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanasdeHuánuco,2021.....	46
Figura 14 Clases de fármacos encontrados en aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021.....	47
Figura 15 Tipos de medicamentos con multirresistencia antimicrobiana en las muestras de aguas urbanas y de hospitales de Huánuco, 2021	47

RESUMEN

Objetivo: La presente indagación tuvo como propósito principal describir la diversidad y abundancia de especies bacterianas y genes de resistencia a antibióticos presentes en aguas residuales urbanas y hospitalarias mediante el uso de la metagenómica. **Metodología:** La indagación adoptó un enfoque cuantitativo, de alcance descriptivo y diseño no experimental. Las muestras de ADN fueron extraídas, cuantificadas y amplificadas, las mismas que fueron tomadas de tres centros: Hospital MINSA, Hospital EsSalud y aguas residuales urbanas de Huánuco, durante dos días. **Resultados:** Entre los principales hallazgos se encontraron las especies *Prevotella copri*, *Escherichia coli*, *Aeromonas caviae*, *Acinotobacter johnsonii*, *Enterococcus hirae*, *Anaerostipes hadrus*, *Faecalibacterium prausnitzii*. Además, la riqueza de Rarefid y el índice de Shannon obtuvieron los valores más altos en aguas residuales de origen urbano, presumiblemente por la variedad de personas y actividades en esta zona. Por otro lado, se observó que las muestras de EsSalud fueron parecidas entre sí durante los dos días de muestreo a diferencia de las muestras del hospital Hermilio Valdizán (MINSA) y zona urbana. Así también, entre los medicamentos hallados estuvieron las cefalosporinas, penémicos, carbapenémicos, monobactámicos y fluoroquinolona. De la resistencia a los antibióticos, se detectaron los genes de las familias Oxa-beta-lactamasa, Tem-beta-lactamasa, major facilitator superfamily (MFS) y gen de la proteína de protección ribosomal resistente a tetraciclina. **Conclusión:** A nivel general no se observaron diferencias marcadas entre los genes de resistencia antimicrobiana de origen hospitalario y de origen urbano.

Palabras clave: aguas residuales, ADN, antimicrobianos, resistencia, metagenómica.

ABSTRACT

Objective: The main purpose of this research was to describe the diversity and abundance of bacterial species and antibiotic resistance genes present in urban and hospital wastewater by metagenomics. **Methodology:** The inquiry became a quantitative approach, with a descriptive scope and a non-experimental design. The DNA samples were extracted, quantified and amplified, the same ones that were taken from three points: MINSA Hospital, EsSalud Hospital and urban wastewater of Huánuco, for two days. **Results:** The main findings had the species *Prevotella copri*, *Escherichia coli*, *Aeromonas caviae*, *Acinotobacter johnsonii*, *Enterococcus hirae*, *Anaerostipes hadrus*, *Faecalibacterium prausnitzii*. In addition, the Rarefid richness and the Shannon index obtained the highest values in urban wastewater, presumably due to the variety of people and activities in this area. On the other hand, it was shown that the EsSalud samples were similar to each other during the two days of the sampling, to differences with the samples from the Hermilio Valdizán Hospital (MINSA) and the urban area. Furthermore, the drugs found were cephalosporins, penems, carbapenems, monobactams and fluoroquinolones. For antibiotic resistance, genes from the Oxa-beta-lactamase, Tem-beta-lactamase, major facilitator superfamily (MFS) and tetracycline-resistant ribosomal protection protein genes were detected. **Conclusion:** Generally, no marked differences were observed between Hospital and urban antimicrobial resistance genes.

Keywords: sewage, DNA, antimicrobials, resistance, metagenomics.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día las bacterias con genes de resistencia antimicrobiana han ido en aumento, ante ello se estima que es el responsable de diversas muertes al año; por lo tanto, el uso de fármacos se torna ineficaz y los patógenos se vuelven aún más resistentes. De tal manera, que bacterias más resistentes denominadas multirresistentes están estrechamente relacionadas con los hospitales, habiéndose propagado ya a las comunidades; siendo así que diversos países estudian los numerosos sustratos o ambientes donde se encuentra la bacteria, las mismas que se pueden situar en hospitales y aguas urbanas.

Sin embargo, en Perú solo existen 5 centros de tratamientos de residuos sólidos, más no líquidos (Soriano-Moreno et al., 2021). Sumado a ello, no existen antecedentes del uso de metagenómica para la detección de especies y genes con resistencia antimicrobiana en aguas residuales hospitalarias y urbanas o también llamadas aguas negras. Ante ellos, se plantea la siguiente interrogante ¿Cuál es la diversidad y la abundancia de genes y especies de resistencia antimicrobiana basado en análisis metagenómicos en aguas residuales urbanas y de hospitales de Huánuco, 2021?.

Asimismo, la indagación se justifica a nivel teórico por el hecho de que se realizó la búsqueda de estudios previos concerniente a las variables indagadas. Por el lado práctico porque se direccionó en brindar conocimiento acerca del metagenómico por medio del análisis de los genes de resistencia antimicrobiana. Además, se justificó metodológicamente por la elaboración de diferentes instrumentos que fueron empleados al momento de la recopilación de datos, siendo así que ayudará como modelo para próximos estudios.

El estudio tiene por objetivo principal Describir la diversidad y la abundancia de las especies y los genes de resistencia antimicrobianos basados en análisis metagenómicos en aguas residuales urbanas y de hospitales en Huánuco, 2021.

La metagenómica se refiere a la recolección de genomas microbianas que existen en los distintos ambientes, las mismas a que hace énfasis a los genomas de animales o plantas. Por otro lado, está la resistencia antimicrobiana que precisamente es un problema de la salud mundial, que se

origina cuando los patógenos adquieren o se desarrollan genes de resistencia a los antimicrobianos esencialmente por recombinación genética entre patógenos y microbios comensales. En el caso de los antibióticos se producen por diversos tipos de microorganismos, que entre ellos se encuentran los hongos, bacterias o actinomicetos, inclusive algunas especies como plantas e insectos, las que causan dicha intervención en el desarrollo de algunos microorganismos.

Dicha indagación tuvo un enfoque cuantitativo, de diseño no experimental y con un alcance descriptivo. La técnica que se aplicó fue la observación y las fuentes de información empleadas fueron tomadas de tres centros: Hospital MINSA, Hospital EsSalud y aguas residuales urbanas de Huánuco, durante dos días.

Dentro de las limitaciones encontradas en la indagación estuvieron el tiempo, lugar y objeto de estudio. Las cuales se pudieron solucionar apropiadamente. Se contó con el laboratorio de la misma Universidad Privada de Huánuco INBIOMEDIC en la ciudad de Lima y Gómez Lab de la Universidad de Minnesota (EEUU). Para la recolección de la muestra se llevó a cabo de acuerdo a lo indicado en la metodología sin ningún inconveniente.

Se llegó a la conclusión que la diversidad y abundancia de bacterias, así, *Prevotella copri* fue la que destacó en abundancia en el hospital EsSalud durante los dos días de muestreos. Respecto a las aguas residuales del hospital MINSA y las zonas urbanas destacaron en abundancia y presencia las bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus hirae*.

CAPÍTULO I

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

1.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA

La resistencia antimicrobiana (RAM), causada por la contaminación proveniente de las descargas de medicamentos y sustancias químicas al medio ambiente constituye una de las principales amenazas emergentes en el área de salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un total de 700 000 mil personas anualmente mueren por infecciones, y éstos no pueden ser eliminados mediante fármacos, los cuales son menos eficaces frente a patógenos cada vez más resistentes. La OMS sostiene que la resistencia antimicrobiana es uno de los 10 principales riesgos para la salud pública (ONU, 2017; WHO, 27 de septiembre de 2022).

Según el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la liberación al medio ambiente de sustancias antimicrobianas procede de hogares, hospitales, instalaciones farmacéuticas y sector agrícola, además, estos microorganismos están evolucionando y originando cepas más resistentes (ONU, 2017).

Actualmente, la RAM se relaciona fuertemente con seis de los diecisiete objetivos de desarrollo sostenible, los cuales son: fin a la pobreza, hambre cero, salud y bienestar, agua limpia y saneamiento, trabajo decente y el crecimiento económico, consumo y producción sostenible. Siendo así que la RAM y el cambio climático constituyen un gran reto para la humanidad.

Fletcher (2015) da a conocer la existencia de numerosas posibilidades respecto a los factores ambientales contribuyendo a la creciente carga de la RAM. Las bacterias que son resistentes a los antibióticos se encuentran en las personas, los animales, los alimentos y el medio ambiente, y pueden propagarse entre humanos, animales, y de persona a persona. Estas variaciones que confieren resistencia son llamadas resistoma y éste se define como la colección de todos los genes que pueden contribuir a la resistencia antibiótica.

Por otro lado, Van Duin y Paterson (2016) mencionan que las bacterias multirresistentes (MDR), están muy extendidas en los hospitales; sin embargo, éstas se han ido propagando en la comunidad causando mayor morbilidad,

mortalidad y mayores costos de atención médica. Así también, Soriano-Moreno et al. (2021) mencionan que, la multirresistencia bacteriana está muy relacionada a los efluentes hospitalarios, aun así, en Perú tan solo hay cinco centros de salud con tratamiento de residuos sólidos, pero no de residuos líquidos. La contaminación a los humanos se produce cuando los efluentes desembocan en ríos y ésta es utilizada para uso doméstico.

Según Baum et al. (2013) citado en Wolf et al. (2022) reevaluaron considerando desde el aspecto de la vigilancia, las aguas residuales urbanas y llegaron a calificar de “saneamiento mejorado” siempre que las aguas residuales son tratadas previa descarga al medio ambiente. Además, encontraron que, a nivel mundial, una porción cada vez mayor de la población humana vive en áreas urbanas y una proporción creciente está conectada a un sistema de alcantarillado.

La vigilancia actual de la RAM en el Perú a menudo se centra solo en unos pocos patógenos y se basa principalmente en informes de resultados fenotípicos (de cultivos) de laboratorio para patógenos, tomadas principalmente en centros de atención como las clínicas y hospitales (Soriano-Moreno et al., 2021), haciendo necesario un estudio genotípico que permita conocer los genes de resistencia antimicrobianos de acuerdo a tecnologías nuevas y emergentes.

En relación a los genes de resistencia a antimicrobianos, éstos son muchos y dependen del ambiente o muestra de donde hayan sido tomados. En residuos urbanos y hospitalarios, Sgobbi et al. (2020) encontraron en Brasil diferencias significativas ($p < 0.05$) en la resistencia a la amoxicilina clavulánico, el aztreonam, la cefepima y la cefotaxima entre las bacterias presentes en aguas residuales hospitalarias y las aguas residuales urbanas.

Respecto a los genes de resistencia antimicrobiana, algunos investigadores como Bajpai et al. (2017); Hooper y Jacoby (2015) y Nogrado et al. (2021) han estudiado a genes como TEM, SHV, CTX-M Beta-lactamasa; genes de resistencia a las quinolonas y genes de proteína de protección ribosomal frente a tetraciclinas, respectivamente.

Considerando que muchos patógenos no son cultivables o no se cuenta con los medios de cultivo bacterianos apropiados para aislarlos, la relevancia del presente estudio radica en identificar con una nueva metodología que

permita identificar el tipo de patógeno y la resistencia antibiótica usando Secuenciamiento masivo.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 PROBLEMA GENERAL

PG: ¿Cuál es la diversidad y la abundancia de genes y especies de resistencia antimicrobiana basado en análisis metagenómicos en aguas residuales urbanas y de hospitales de Huánuco, 2021?

1.2.2 PROBLEMA ESPECÍFICO

PE1. ¿Cuáles son los genes de resistencia antimicrobiana basado en análisis metagenómicos en aguas residuales del hospital MINSA en Huánuco, 2021?

PE2. ¿Cuáles son los genes de resistencia antimicrobiana basado en análisis metagenómicos en aguas residuales del hospital EsSalud en Huánuco, 2021?

PR3. ¿Cuáles son los genes de resistencia antimicrobiana basados en análisis metagenómicos en aguas residuales urbanas en Huánuco, 2021?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

OG. Describir la diversidad y la abundancia de las especies y los genes de resistencia antimicrobianos basados en análisis metagenómicos en aguas residuales urbanas y de hospitales en Huánuco, 2021.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OE1. Describir los genes de resistencia antimicrobiana basados en análisis metagenómicos en aguas residuales del hospital MINSA en Huánuco, 2021.

OE2. Describir los genes de resistencia antimicrobiana basados en análisis metagenómicos en aguas residuales del hospital EsSalud en Huánuco, 2021.

OE3. Describir los genes de resistencia antimicrobiana basados en análisis metagenómicos en aguas residuales urbanas en Huánuco, 2021.

1.4. JUSTIFICACIÓN

1.4.1. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA

Debido a que se recurrirá a la exploración de estudios referentes a las variables estipuladas, la misma que ayudará a generar mayor conocimiento en cuanto a la resistencia antimicrobiana en aguas residuales urbanas y hospitalarias mediante un análisis metagenómico en Perú.

1.4.2. JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA

Esencialmente se centra en dar a conocer el metagenómico a través del análisis de los genes de resistencia antibacterianas en aguas residuales urbanas y hospitales de Huánuco, siendo así que cabe precisar que la tecnología de metagenómica contribuye en conocer las bacterias del RAM y se señala que actualmente es muy empleada a nivel mundial.

1.4.3. JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA

Esta investigación se justifica metodológicamente porque busca establecerá distintas fichas de observación con el fin de analizar el metagenómico, siendo así que todo ello contribuirá de guía para futuros estudios que se encuentren enfocados a los microorganismos y genes de resistencia antimicrobiana en la aguas residuales urbanas y hospitales.

1.5. LIMITACIONES

Dentro del trabajo de investigación las limitaciones lo constituyeron el lugar, tiempo y objeto de estudio. No obstante, ésta no presentó mayores problemas. La indagación se realizó en el laboratorio de la Universidad Privada de Huánuco, INBIOMEDIC en la ciudad de Lima y Gómez Lab de la Universidad de Minnesota (EEUU). Las muestras fueron colectadas de acuerdo a lo mencionado en la metodología sin mayores inconvenientes.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

A nivel internacional, Sgobbi (2020) en su artículo de investigación “Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil”, evaluaron el perfil de resistencia a los antibióticos y la producción de β -lactamasas en bacilos Gram-negativos aislados de aguas residuales hospitalarias y de plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (PTAR) en Brasil. Los resultados tuvieron diferencias significativas en la resistencia a la amoxicilina clavulánico, el aztreonam, la cefepima y la cefotaxima en las aguas residuales hospitalarias en comparación con las urbanas ($p < 0.05$). El fenotipo multirresistentes se observó en el 33.3% de los aislados del alcantarillado hospitalario ($p = 0.0025$). Se encontraron genes de β -lactamasas en el 35.6% de los aislados, siendo los más frecuentes bla_{KPC} y bla_{TEM} (17.8%), bla_{SHV} y bla_{CTX-M} en 13.3% y 8.9% respectivamente.

En 7 regiones geográficas de 74 ciudades de 60 países, Hendriksen et al. (2019) realizaron el estudio que lleva por título “Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage”, llegando a la conclusión de que existen diferencias sistemáticas en la abundancia y la diversidad de genes de resistencias antimicrobiana (RAM) entre Europa/América del Norte/Oceanía y África/Asia/América del Sur. También se determinó que la abundancia de genes RAM está fuertemente correlacionado con factores socioeconómicos, sanitarios y ambientales. De acuerdo a su hallazgo sugirieron que la diversidad y la abundancia de Genes RAM varían según la región y que la mejora del saneamiento y la salud podría limitar la carga global de genes RAM. Respecto a los géneros reportados, encontraron 1546 géneros, pero un número limitado de géneros dominantes, entre estos están *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*. Además, otras bacterias

dominantes y que están presentes por lo general en el medio ambiente fueron encontradas: *Acidovorax* y *Acinetobacter*.

En Colombia, Rodríguez et al. (2021) hicieron uso de la metagenómica para determinar la composición de comunidades bacterianas, en plantas de tratamiento de aguas residuales. Los genes más abundantes fueron los que codifican resistencia a macrólidos, lincosamida, estreptogramina (MLS), β lactámicos y los que codifican la multirresistencia a fármacos (acrB, adeG, mexD). También, se detectaron algunos genes de resistencia antimicrobiana importantes, entre ellos, blaKPC-2 y blaCTX-M, blaTEM-196, blaGES-23, blaOXA-10, mcr-3 y mcr-5.

En Dinamarca; Strange et al. (2021) realizaron un análisis de las bases de datos del NCBI en las cuales se obtuvieron un total de 719 números de acceso, 638 eran bacteriófagos, mientras que el 81 eran otros virus. De estos 81 otros virus, 7 eran bacteriófagos. De la base de datos IMG/VR, un total de 54.893 secuencias eran bacteriófagos, de las cuales 3.693 estaban completas, de este se obtuvo un total de 114 bacteriófagos. De acuerdo al estudio se llegó a la conclusión que, los genes que confieren resistencia a compuestos de las clases de tetraciclinas, aminoglucósidos, sulfonamidas y fenicoles son muy pronunciados en las regiones de África, Asia y América del Sur y en menor medida en Europa, América del Norte, Oceanía y Oriente Medio.

De Abreu et al. (2021), también estudiaron la metagenómica para la identificación de la resistencia a los antimicrobianos. Desde este enfoque, se tiene acceso a los datos genómicos en una muestra ambiental sin la necesidad de aislar o cultivar microorganismos previos al análisis. Analizaron los desafíos de estudiar la resistencia a los antimicrobianos haciendo uso de la metagenómica: análisis de diversidad microbiana, análisis de genes funcionales y búsqueda en la base de datos de resistomas (Colección de genes de resistencia a los antimicrobianos) completas y pertinentes.

Waskito et al. (2022) en su estudio titulado “Antimicrobial Resistance Profile by Metagenomic and Metatranscriptomic Approach in Clinical Practice: Opportunity and Challenge” hacen una reseña

donde dan una descripción general de las metodologías moleculares actuales que suponen una ventaja para mejorar diagnósticos clínicos y manejo de enfermedades infecciosas resistentes. Entre ellas, tecnologías de próxima generación, metagenómica y metatranscriptómica. Además, citan que la determinación mediante metagenómica y metatranscriptómica permite identificar géneros y especies según el método de secuenciación; no obstante, la resistencia a los antimicrobianos sólo se puede detectar a nivel genómico. Dada esta particular dificultad, los secuenciadores y las herramientas bioinformáticas actualmente disponibles requieren de un personal altamente calificado para operar y generar resultados.

Sepúlveda (2021), se encontró los genes asociados a la resistencia y biosíntesis de compuestos antimicrobianos en suelos de manglares sometidos a salinidades contrastantes y contaminados con aguas residuales. Se encontraron vías de biosíntesis comunes para estreptomicina y monobactámicos. Además, el aumento de la concentración de sal también fue determinante para las vías metabólicas y en abundancia diferencial de genes asociados con la síntesis de compuestos antimicrobianos (como: *rfbB* / *rffG*, *INO1* / *ISYNA1*, *rfbA* / *rffH*, *sat* / *met3*, *asd*, *lysC*, *proA*, *aspB*, *fabG*). En conclusión, los mecanismos de tolerancia y adaptabilidad al estrés salino favorecen la síntesis de compuestos antimicrobianos en manglares contaminados por aguas residuales.

Precisamente, entre los genes de resistencia antimicrobiana conocidos se tiene al gen de proteína transportadora mayor facilitator superfamily (MFS Family), el cual al estar presente en proteínas transportadoras confiere una capacidad multirresistente en muchas bacterias. Las proteínas transportadoras multirresistentes pertenecientes a la MFS Family están ampliamente distribuidas en genomas microbianos y poseen un amplio espectro de sustratos específicos (Nogradio et al., 2021).

Otros genes de resistencia antimicrobiana fueron estudiados por Bajpai et al. (2017) quienes encontraron en muestras de aislados urinarios de un hospital de tercer nivel a los genes pertenecientes al

grupo beta-lactamasas de amplio espectro (ESBLs) y son la principal causa de resistencia a los antibióticos betalactámicos, entre ellos, penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos. Sus resultados evidenciaron la presencia de los genes TEM, SHV y CTX-M Beta-lactamasas. Todos ellos son betalactamasas de espectro reducido, que surgen por mutaciones donde se altera la configuración de aminoácidos alrededor del espacio receptivo de la enzima.

Genes que codifican proteínas de protección ribosomal (RPPs) frente a tetraciclina fueron estudiadas en tres fincas ganaderas y un río, haciendo uso de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE). En este estudio encontraron 11 *tet*-ARGs, mientras que la mayor abundancia fue *tet*(O), además la diversidad bacteriana del suelo fue más alta que la del agua. Los genes de resistencia que codifican RPPs están ampliamente distribuidos, aunque su fenómeno no es del todo conocido, estos genes son: *tet*(M), *tet*(O), *tet*(B), *tet*(S), *tet*(W), *otr*(A), *tet* (32), *tet* (36), *tet* (44) y el mosaico *tet* genes (Li et al., 2018; Zhang et al., 2009).

Finalmente, los mecanismos de resistencia a las quinolonas (*qnr*) se adquieren a través de dos categorías de mutaciones y adquisición de genes que confieren resistencia. Las mutaciones de resistencia en una o ambas de las dos enzimas que tienen por objetivo el fármaco, ADN girasa y ADN topoisomerasa IV, están comúnmente en un dominio localizado de GyrA y ParE subunidades de las respectivas enzimas y reducen la unión del fármaco al complejo enzima – ADN. Otras mutaciones de resistencia ocurren en genes reguladores que controlan la expresión de proteínas nativas transportadoras localizadas en la membrana bacteriana. Es decir, la resistencia codificada por plásmidos se debe a proteínas quinolone resistance protein (*qnr*) que protegen a enzimas diana de la acción de las quinolonas (Hooper & Jacoby, 2015).

Checucci et al. (2020) hicieron una revisión bibliográfica donde describen y analizan estudios recientes sobre antibióticos y diseminación en el medio ambiente transmitida por estiércol de genes de resistencia antimicrobiana, llegando a la conclusión que la

transferencia horizontal de elementos genéticos móviles es la principal causa para esta diseminación, también mencionaron que tratamientos químicos y biosanitarios reducen la carga bacteriana.

2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES

Investigaciones nacionales, Sánchez (2018), evaluó la resistencia antimicrobiana de *E. coli* mediante determinación molecular y fenotípica aislada de agua de mar empleado en la venta de productos hidrobiológicos. Los muestreos se llevaron a cabo en Ancón y Chorrillos y el método de conteo consistió en el número más probable (NMP) con el fin de cuantificar coliformes fecales y coliformes termotolerantes. Después, se analizó el perfil fenotípico de resistencia a 5 antibióticos (ampicilina, tetraciclina, sulfatrimetropin, ácido nalidíxico y cloranfenicol) haciendo uso de la técnica de difusión en agar, y por PCR se determinó los genes de resistencia (*bla*TEM, *Sul2*, *catA1*, *tet (A)* *dfrA1* y *qnrA*). Los resultados mostraron que las muestras obtenidas del terminal pesquero de Ancón tuvieron un 40.6% de resistencia a ampicilina, 31.3% a ácido nalidíxico y tetraciclina, 15.6% a sulfatrimetropin y el 3.1% a cloranfenicol. Por otro lado, los aislados del terminal de Chorrillos evidenciaron una resistencia de 46.9% a ampicilina y tetraciclina, 40.6% a ácido nalidíxico y oxitetraciclina y todos los aislados tuvieron resistencia a cloranfenicol.

Arista (2018), en su trabajo de investigación “Factores de riesgo asociados a resistencia bacteriana en infecciones urinarias con urocultivo positivo en pacientes del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (abril – junio del 2017)” determinó lo siguiente: los adultos mayores o iguales a 65 años no alcanzaron significancia estadística en resistencia bacteriana para los urocultivos (OR= 0.89, IC 95% 0.45 – 1.75). Además, no se relaciona la gestación con la resistencia antibacteriana (OR =0.55, IC95 %: 0.2 – 1.46). Sin embargo, la resistencia bacteriana está relacionada con el tratamiento de antibióticos brindado en urocultivos (OR=3.41, IC95% 1.53 – 7.57). Tampoco se ha determinado que la anemia y la resistencia bacteriana tengan alguna relación, mediada por urocultivos (ORR=1.18, IC95%:

0.38 – 3.68). Finalmente, se encontró que la diabetes y la resistencia sí está asociada en urocultivos (3.34, IC95%: 0.91 – 4.18).

Ugarte et. al. (2018) aislaron microorganismos de urocultivos de pacientes ambulatorias de una institución de salud privada en Lima, utilizando 10 aislamientos entre cepas de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Luego, se realizaron los métodos de colistin agar spot, pre difusión con tabletas de colistin, microdilución en caldo colistin y PCR para identificar el gen *mcr-1*. Se obtuvo que siete aislamientos tuvieron el gen *mcr-1*, encargado de la resistencia a polipéptidos. Las otras tres cepas mostraron una resistencia a colistin a nivel fenotípico, más no genotípico, lo cual sugiere que este tipo de resistencia podría no estar asociado con el gen *mcr-1*.

Mancilla (2019) en su tesis de pregrado denominado: “Análisis del metagenoma bacteriano de la rizósfera de quinua (*Chenopodium quinoa* willd) en suelos de alta fertilidad y degradado en huando, Huancavelica” realizado en el distrito de Huando, provincia y departamento de Huancavelica, analizó dos tipos de muestras de suelo: cultivado con quinua en uno degradado y otro de alta fertilidad; llegando a concluir que la diversidad bacteriana en los suelos rizosféricos y no rizosféricos son parecidos en el total de géneros del cultivo de quinua. Además, realizó la comparación de librerías del Suelo no rizosférico fértil (SNRF) y suelo no rizosférico degradado (SNRD), encontrando que *Lactobacillus*, *Cystobacter*, *Blastococcus*, *Gaiella*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*, superan significativamente en número de secuencias al NRF.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. METAGENÓMICA

La definición de esta terminología se refiere al estudio de las bases nitrogenadas en una secuencia que determine los organismos presentes en una muestra. En términos estrictos, la “metagenómica” significa “más allá del genoma”. Se refiere a la colección de genomas microbianos presentes en diferentes ambientes y se refiere a genomas de plantas o animales (incluido el hombre). Otra definición consiste en

decir que, la metagenómica es un área nueva que busca hallar secuencias del genoma de diversos microorganismos, bacterias en este caso, que conforman una comunidad, extrayendo su ADN e identificándolo (Gilbert & Dupont, 2011).

Como da a conocer el National Research Council (US) Committee on Metagenomics: La metagenómica es una ciencia que consiste en descubrir, modelar, comprender y gestionar a nivel molecular las relaciones dinámicas entre las moléculas y se presentan en las microcomunidades y la biosfera.

Actualmente con la metagenómica se ha permitido estudiar a microorganismos cultivables y no cultivables, los cuales interactúan con factores bióticos y abióticos en diversos ambientes (Handelsman, (2004) citado en Rabapane et al., (2022)).

En tanto, la metagenómica nace de la intención de explorar y examinar las comunidades microbianas en diferentes ambientes, lo que da pie a recuperar una nueva diversidad genética, llevando a cabo el estudio de rutas metabólicas, comportamiento ecológico de esta comunidad y accediendo a la secuencia de sus genes (Fierer et al., (2012) citado en Li et al. (2022)).

Finalmente, la microbiología en la actualidad ha explorado conocer un gran número de microorganismos tanto cultivables como no cultivables mediante el uso de la metagenómica y otras técnicas moleculares (Gilbert & Dupont, 2011).

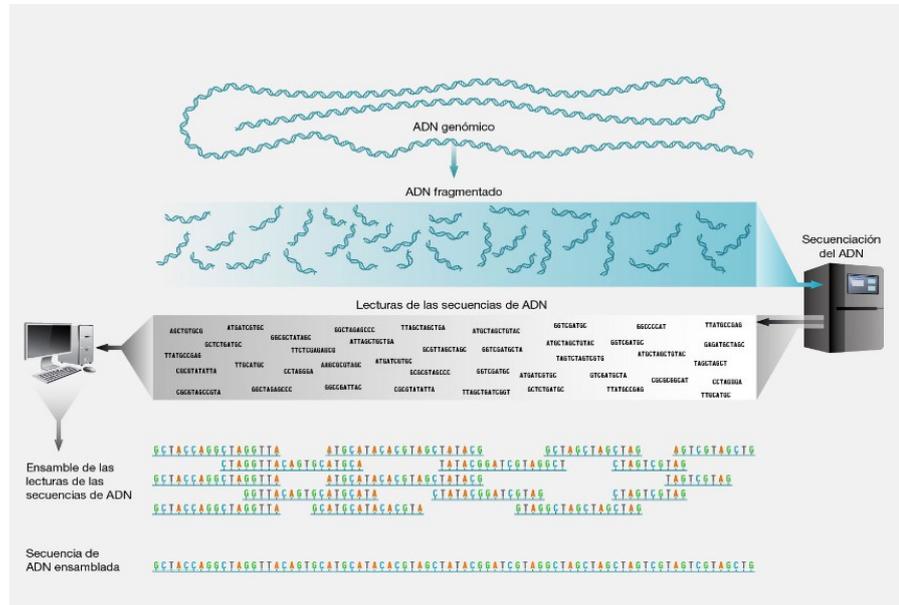
2.2.1.1. METAGENÓMICA SHOTGUN O FUNCIONAL

Es una técnica de laboratorio para determinar la secuencia del ADN del genoma de un organismo, su principal fin es buscar genes con una función determinada. Su método implica descomponer el genoma en un conjunto de pequeños fragmentos de ADN secuenciados individualmente. Un programa de computadora busca coincidencias en la secuencia de ADN y las usa para ubicar los fragmentos individuales en el orden correcto para reconstruir el genoma. Se puede usar para: Determinar qué organismos están presentes, determinar qué genes están presentes y/u obtener genomas a partir de

metagenomas (National Human Genome Research Institute, 2022).

Figura 1

Diagrama de secuenciación de shotgun



Nota. National Human Genome Research Institute, (2022).

2.2.1.2. METAGENÓMICA ESTRUCTURAL

A partir de la secuenciación de ADN metagenómico se llevan a cabo análisis bioinformáticos que buscan resolver principalmente la identidad de los organismos presentes y cuál es su función (Rivera-Urbalejo et al., 2021).

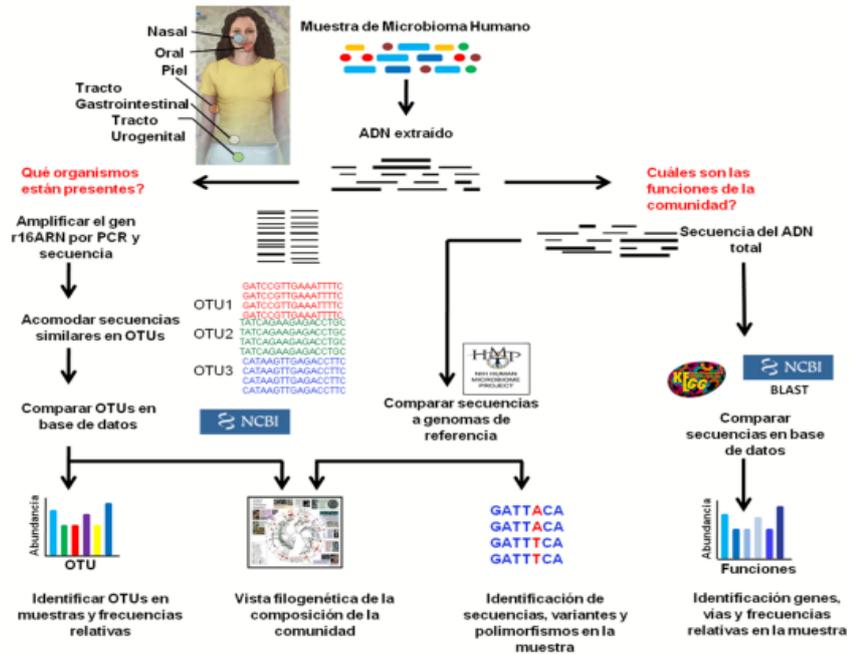
2.2.1.3. ANÁLISIS METAGENÓMICO

El análisis metagenómico se basa en aislar el ADN de una muestra, luego se extrae el ADN total, y el tercer paso se pueden realizar mediante tres diferentes pasos: El ADN se somete a un proceso de digestión y se realiza la clonación en vectores de expresión (cromosomas artificiales de bacterias), cromosomas artificiales de levadura, cósmidos o fásmidos (Buckley & Etensohn, 2019; Tocchetti et al., 2018); en segundo lugar, se puede amplificar mediante PCR a genes que codifican ARN's ribosomales 16S o 18S, permitiendo conocer la diversidad de microorganismos en la muestra (bacterias, arqueas o eucariotas) y, en tercer lugar, mediante una secuenciación

directa de la muestra, usando la plataforma de Biosistemas SOLID System o las de nueva generación (NGS) como las de Illuminia sequencing technology o Roche Genome Secuencer (Kanchi et al., 2018; Roeh et al., 2017). En la Fig. 2 se observa el esquema elaborado por Raimondi (2022).

Figura 2

Análisis metagenómico



Nota. Raimondi (2022).

2.2.1.4. MÉTODOS DEPENDIENTES DE CULTIVOS

El aislamiento de cultivos puros de microorganismos ha ido avanzando con los años debido a su gran interés. Tal es así, que existen diferentes medios de cultivo diseñados, que toman en cuenta factores físico químicos que podrían intervenir en el crecimiento, como temperatura, pH, oxígeno, salinidad y otros; además, su composición se basa en fuentes de carbono, vitaminas y energía. Entre sus ventajas están la caracterización fenotípica y genotípica que se puede desprender de ellas, su bajo costo económico y la disponibilidad del material en físico para posteriores estudios. No obstante, sólo entre el 0.1 y 1% de bacterias del suelo son cultivables en condiciones estándar de laboratorio (Calderoli, 2016).

2.2.1.5. MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVOS

La evolución de métodos para la extracción del ADN o ARN de toda una comunidad microbiana a partir de una muestra hace posible un mayor conocimiento de la diversidad microbiana. Es decir, no todos los microorganismos pueden ser cultivados y de allí nace la necesidad, a través de técnicas moleculares de conocer a los microorganismos no cultivables. Existen dos métodos para extraer metagenomas bacterianos: lisis directa de las células contenidas en una suspensión amortiguadora de la muestra, seguido por una separación del ADN del sustrato y los residuos celulares; o la lisis indirecta, consistiendo en la separación de las células del sustrato y luego son lisadas. En la lisis directa se han probado métodos enzimáticos, altas temperaturas y detergentes. También se ha hecho uso de métodos *bead-beating*, congelamiento-descongelamiento, etc. En el tipo indirecto, se obtiene por procedimientos mecánicos leves, pueden ser químicos o mediante la adición de resinas de intercambio catiónico, seguido por una centrifugación de gradiente de densidad o diferencial (Calderoli, 2016).

2.2.2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

En la actualidad, la resistencia antimicrobiana es un problema de salud mundial, que surge cuando los patógenos desarrollan o adquieren genes de resistencia a los antimicrobianos, generalmente, por recombinación genética entre microbios comensales y patógenos y se asocia con el mecanismo de conjugación de la transferencia horizontal de genes (De Abreu et al., 2021).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la RAM es originada si los microorganismos (Bacterias, hongos, virus y parásitos) están expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos) y por tanto se realizan algunos cambios en ellos.

Como resultado, los medicamentos se tornan ineficientes y las enfermedades que podrían haberse tratado con antibióticos no hacen efecto y se pueden diseminar a otras personas (WHO, 2022).

La resistencia antimicrobiana es una de las mayores amenazas actuales para la salud pública. Se ha estimado que las muertes anuales debido a la resistencia a antimicrobianos alcanzarán los 10 millones al año para el año 2050 (Murray et al., 2022).

FACTORES QUE ACELERA SU PROPAGACIÓN

Son dos factores los que aceleran la propagación de resistencia antimicrobiana: El principal se refiere al mal uso de antimicrobianos en el campo de la medicina humana y veterinaria; el segundo factor se refiere a los factores de estrés en el medio ambiente, entre ellos, pH, altas concentraciones de cloruro de sodio, alta osmolaridad y falta de nutrientes (Pantozzi, 2013).

2.2.2.1. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICO DESDE UNA PERSPECTIVA METAGENÓMICA

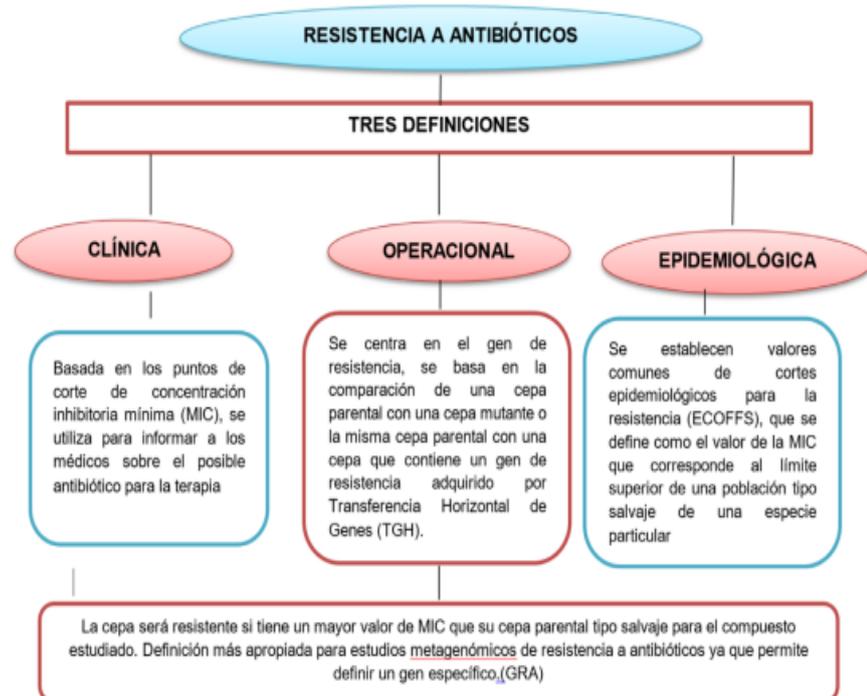
Debido al mal uso y abuso de los antibióticos ha aparecido e incrementado los microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos naturales, sintéticos y semisintéticos. Todo ello dificulta el tratamiento de enfermedades en humanos, plantas y animales, además de buscar el origen y genes de esta resistencia, nuevos antibióticos y su metabolismo (Martínez et al., 2015; Ospino et al., 2018).

Desde el punto de vista metagenómico, existen tres definiciones, las cuales se observan en la figura 1 y se describen a continuación: La primera definición es clínica y se basa en puntos de corte de concentración mínima inhibitoria (MIC) y se emplea para sugerir el antibiótico en terapia. La segunda es una definición operacional, la cual se centra en el gen de resistencia y tiene como base evaluar la similitud de una cepa mutante con una cepa parental o una cepa parental con una cepa con un gen de resistencia adquirido por Transferencia Horizontal de Genes (TGH). Este tipo de definición es la que se usa más por los investigadores, debido a que permite definir un gen específico.

En la definición epidemiológica, se establecen valores comunes de cortes epidemiológicos en resistencia (ECOFFS), la cual vendría a ser el valor de la MIC y corresponde al límite superior de una población tipo salvaje en una especie en particular (Ospino et al., 2018).

Figura 3

Resistencia a antibióticos



Nota. Martínez et al. (2015).

2.2.2.2. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN PLANTAS O CULTIVOS

La resistencia a antibióticos en bacterias patógenas de plantas es hoy en día un problema en los patosistemas, por haberse utilizado dichos antibióticos durante muchos años. Al realizarse el estudio de resistencia, se ha encontrado que éste ha evolucionado a través de la adquisición de un determinante de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes. Así, los genes de resistencia a la estreptomycin *strAB* presentes en *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris*, se cree que se adquirieron de bacterias epífitas no patogénicas bajo plantas hospedantes con selección a antibióticos (Sundin & Wang, 2018).

2.2.2.3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SUELO

El suelo constituye el mayor reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs). Sundin y Wang (2018) proponen en su estudio distinguir los ARG relevantes en el suelo de los que no transmiten resistencia, desarrollar un marco para evaluar los riesgos asociados en la coexistencia de ARG y desarrollar tecnologías verdes para disminuir la introducción de ARG en el suelo y su transmisión a los humanos a través de los alimentos.

2.2.2.4. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EL AGUA

El ingreso a los ambientes acuáticos de los organismos resistentes a antimicrobianos se da por fuentes humanas y animales. Los métodos para reducir la carga bacteriana resistente a antibióticos en aguas residuales y la cantidad de agentes microbianos incluyen la optimización en procesos de desinfección, así como el manejo de aguas residuales y el estiércol. Además, se podría decir, a través de la prevención de la mezcla de bacterias de origen humano y animal con organismos ambientales Baquero et al. (2008) citado en Light et al. (2022).

2.2.3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AGUAS RESIDUALES URBANAS

Las aguas residuales contienen millones de microorganismos, así como un gran número de compuestos orgánicos. Su tratamiento adecuado ante residuos tóxicos y peligrosos es una tarea principal en muchos países, debido al impacto que ocasionan al medioambiente Primelles et. al. (2005).

Gogry et al. (2019) estudiaron la resistencia a colistina entre bacterias de la familia Enterobacteriaceae. Para el estudio, se obtuvieron 253 aislados bacterianos no duplicados de aguas residuales en Delhi y se hizo un cribado fenotípico para resistencia a colistina. Basados en la identificación ARNS 16S ribosomal, los aislados bacterianos fueron *Escherichia coli*, *Aeromonas veronii* y *Aeromonas*

dhakensis. Además, de 47 aislados positivos, el gen de resistencia a colistina *mcr-1* fue detectado en 5 aislados.

En otro estudio, Su et. al. (2017) detectaron 381 genes de resistencia en muestras de aguas residuales urbanas en China, sin agrupamientos geográficos en particular. Además, se observó una variación estacional en abundancia de genes de resistencia, con concentraciones en promedio de 3.27×10^{11} y 1.79×10^{12} copias/L en verano e invierno, respectivamente.

2.2.4. ANTIBIÓTICOS

Se originan a partir de diferentes tipos de microorganismos, entre ellos, bacterias, hongos o actinomicetos, incluso ciertas especies de insectos y plantas, las cuales llegan a intervenir en el desarrollo de ciertos microorganismos. Su mecanismo de degradación en el medio ambiente es igual a otros compuestos orgánicos, con la diferencia que todas las reacciones se llevan a cabo aún en concentraciones muy bajas (Ramírez-Cando et al., 2019).

2.3. DEFINICIONES CONCEPTUALES

- **Antibióticos:** Los antibióticos son medicamentos relevantes para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales de origen microbiano, estas sustancias son frecuentemente encontradas en el ambiente, sobre el cual ejercen un impacto negativo (Serna et al., 2022).
- **Resistencia antimicrobiana:** La resistencia antimicrobiana se define como la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de los antibióticos; es una característica inherente de la bacteria o puede ser una capacidad adquirida durante el proceso infeccioso (Giono et al., 2020).
- **Metagenómica:** La metagenómica es el análisis genómico de secuencias de una población de microorganismos, que hace posible conocer el perfil de las comunidades microbianas en el medio ambiente y su interacción con el cuerpo humano (Flygare et al., 2016).
- **Aguas residuales:** Aguas correspondientes a residuos de efluentes agrícolas, industriales, drenaje de minas, lixiviados de vertederos, aguas contaminadas de ríos y lagos, de zonas urbanas y escorrentías de carreteras (Stefanakis, 2018).

2.4. HIPÓTESIS

Por ser una investigación de nivel descriptivo no posee hipótesis, ya que el objetivo principal se orienta generar información y conocimiento sobre la diversidad y abundancia de genes de resistencia antimicrobiana, basados en el análisis metagenómico en aguas residuales urbanas y de hospital en Huánuco, 2021.

2.5. VARIABLES

2.5.1. VARIABLE DEPENDIENTE

Diversidad y abundancia de genes.

2.5.2. VARIABLE INDEPENDIENTE

Análisis metagenómicos en aguas residuales urbanas.

2.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 1

Operacionalización de las variables

VARIABLES	DIMENSIONES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO
V.I. Análisis metagenómico en aguas residuales urbanas y de hospitales en Huánuco	Extracción de ADN	Cuantitativa	De razón	kit mini QIAamp Stool de ADN
	Amplificación			HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, EE. UU.).
	Secuenciamiento de NGS			MiSeq de Illumina en la empresa Macrogen Inc (Korea).
	Genes de resistencia a antibióticos			Uso de blastx, CARDs y contigs
V.D. Diversidad y abundancia de genes de resistencia antimicrobiana	Secuenciamiento de NGS	Cuantitativa	De razón	MiSeq de Illumina en la empresa Macrogen Inc (Korea).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. TIPO

El estudio es de tipo básica o conocida también como pura, lo cual quiere decir que este tipo de indagación se emplea como base teórica para diversos tipos de exploración (Hadi et al., 2023).

3.1.2. ALCANCE O NIVEL

La presente investigación fue de enfoque descriptivo. Según Gallardo (2017) una investigación descriptiva es aquella que busca describir y explicar lo que se investiga, pero no dar las razones por las cuales tiene lugar. En el presente estudio se buscó conocer a los microorganismos y sus genes de resistencia antimicrobiana presentes en aguas residuales urbanas y de hospitales mediante un análisis metagenómico.

3.2. ENFOQUE

El presente trabajo de investigación fue de enfoque cuantitativo; ya que en todo el proceso de investigación se realizó la recopilación de datos siguiendo un orden determinado (Ñaupas et al., 2018).

3.3. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente estudio de investigación fue no experimental, debido a que organiza, resume y presenta los datos de una manera informativa. Los datos se presentan en tablas y figuras (Ñaupas et al., 2018).

3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.4.1. POBLACIÓN

El ámbito de aplicación para la realización de la investigación fue el distrito de Huánuco, provincia de Huánuco. La población estuvo determinada por las aguas residuales del desagüe del hospital Minsa, Essalud y vivienda urbana, en Amarilis (Tabla 1), que son descargadas al río Huallaga.

CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD:

- Criterios de inclusión: Aguas residuales representativas sin procesar a partir de las tuberías principales de los distintos establecimientos (hospitales MINSA, EsSalud y casas urbanas).
- Criterios de exclusión: No se utilizaron aguas residuales de los distintos establecimientos (hospitales MINSA y EsSalud y casas urbanas) con lluvias recientes para excluir el efecto del clima.

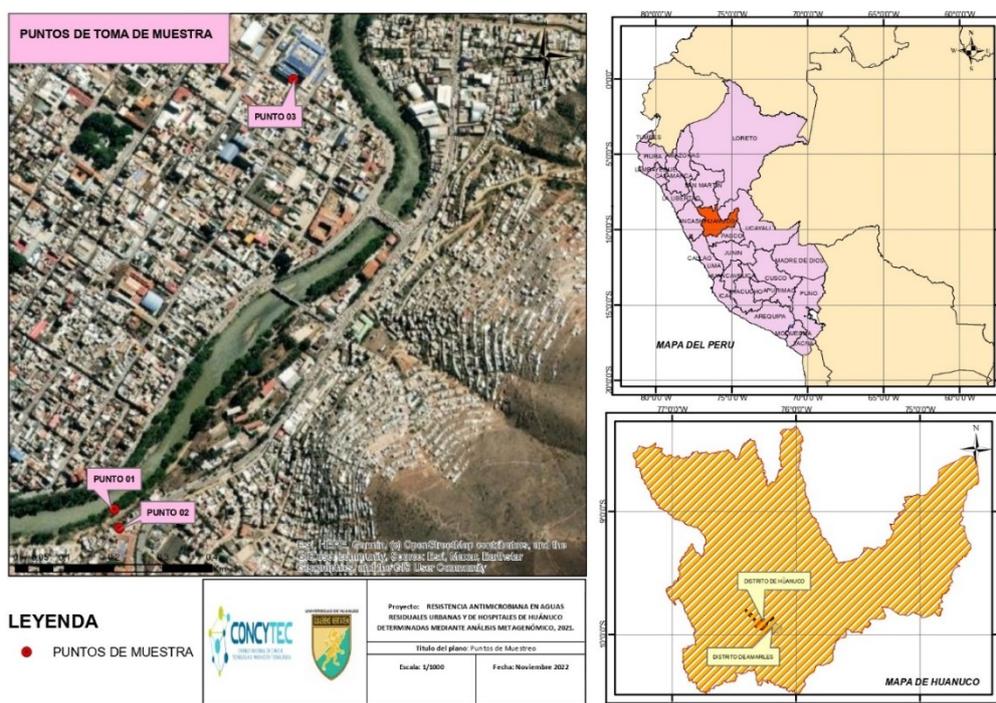
Tabla 2

Ubicación de los puntos de toma de muestra. Sistema de proyección: UTM/Datum horizontal WGS84

Puntos	Coordenadas Este	Coordenadas Norte
P1	364107.258	8901375.047
P2	364125.000	8901337.000
P3	364479.11	8902248.022

Figura 4

Mapa de la ubicación de los puntos de toma de muestra



3.4.2. MUESTRA

Para la realización del análisis se recopiló un total de 06 muestras de agua residual del hospital y vivienda de la zona urbana: 2 L de los

desagües del hospital MINSA, 2L de los desagües del hospital de EsSalud y 2L desagües de manzanas de casas urbanas (Tabla 3).

Tabla 3
Número y volumen de muestras de aguas residuales urbanas y de hospitales

Lugar	Número de muestras	Volumen
Zona Urbana	02	1L
Hospital EsSalud	02	1L
Hospital Hermilio Valdizán	02	1L

3.5. RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

3.5.1. TÉCNICAS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Para la recolección de datos se utilizó la Técnica de la Observación y los instrumentos fueron: fichas de observación, como la ficha de campo donde se recolectaron datos de la zona definidas previamente; asimismo, la ficha de laboratorio posterior a la ejecución de las pruebas de resistencia, estos instrumentos nos permitieron tener registro de todo lo observado en el estudio.

3.5.2. TÉCNICA PARA EL ANÁLISIS INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Los datos son presentados a nivel descriptivo, mediante gráficos de sectores pastel y dispersión.

Los datos fueron ordenados en el software R, y mediante el software Phyloseq se realizó el análisis de componentes principales (PCoA) basados en las distancias de Bray-Curtis y las abundancias relativas de las especies y genes de resistencia antimicrobiana. Los genes clúster se determinaron en base a variables categóricas, por tipo de aguas.

3.5.1.1. PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL

La recolección de muestras de agua residual se realizó en las coordenadas ya descritas (Tabla 3), procedentes de los hospitales MINSA, EsSalud y la parte urbana del distrito de Amarilis, Huánuco. Las muestras se recolectaron durante dos

días. Previo a la recolección de las muestras de agua se realizó la rotulación de cada tubo de 50 ml.

Las muestras tomadas se recolectaron de la siguiente manera:

- Se recogieron las muestras de las descargas del alcantarillado de la zona urbana previo a la caída del río Huallaga.
- Las muestras del Hospital EsSalud se recopilaron en el buzón de salida, previo al conector final de tubería de desagüe.
- Para las muestras del Hospital MINSA (Hermilio Valdizan) se evaluó toda la infraestructura de su sistema de saneamiento y se determinó un punto de salida antes de unirse al alcantarillado principal.

Figura 5

Vista fotográfica de la toma de muestra a nivel Rural



Así también, se tomaron datos de los parámetros de campo *in situ*, entre ellos, medición de oxígeno disuelto (OD), potencial de hidrógeno (pH) temperatura y conductividad eléctrica en cada punto de muestreo (Tabla 3).

Figura 6

Vista fotográfica de la toma de parámetros in situ



Tabla 4

Puntos de monitoreo durante dos días

Punto de Muestra	Puntos de Monitoreo 01	Parámetros		
		T°	PH	Conductividad
01 Zona Urbana	DIA 01	22.6 °C	7.87	903 us/cm
	DIA 02	23 °C	7.88	886 us/cm
02 Hospital EsSalud	DIA 01	22 °C	6.97	241 us/cm
	DIA 02	23.7 °C	7.98	1767 us/cm
03 Hospital H. Valdizán	DIA 01	26 °C	7.88	3999 us/cm
	DIA 02	24.3 °C	7.70	2133 us/cm

Nota: Mediante la siguiente tabla se puede verificar los puntos de las zonas de muestra que se realizó.

3.5.1.2. MANEJO DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN

Los 2 litros de muestras de aguas residuales en envases esterilizados se mezclaron con etanol al 100% a una relación de volumen de 1: 1 para la fijación de biomasa. Las muestras se descongelaron durante 12 horas a aproximadamente 20 °C antes de ser procesadas. Después de descongelar, se sedimentaron 250 ml de cada muestra en una centrifuga a

10,000 x g durante 10 min. El sedimento se almacenó a -20 °C o -80 °C antes de la extracción de ADN; así como, el sobrenadante se almacenó en -80 °C para el posterior análisis de residuos y virus antimicrobianos, estos análisis se examinaron en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Huánuco.

En el laboratorio de la Universidad de Huánuco, se extrajo el ADN a partir de los sedimentos de aguas residuales de acuerdo con un protocolo optimizado utilizando el kit mini QIAamp Stool de ADN incluyendo el doble del volumen de la muestra a utilizar y el mezclado previo. El ADN total se diluyó en 100 µl de agua estéril y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Para cada lote de extracciones de ADN, se procedió a un control en blanco de extracción de ADN en paralelo con las muestras de aguas residuales para monitorear el ADN de ruido.

3.5.1.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN Y EVALUACIÓN DE CALIDAD

Se evaluó la concentración y calidad de ADN del microbiota analizada, a partir de cada muestra de ADN para ser examinada en el laboratorio INBIOMEDIC, usando el cuantificador de ADN (QIAExpert) y por gel electroforesis.

3.5.1.4. AMPLIFICACIÓN DE ADN

Las amplificaciones por PCR se realizaron usando una PCR de ciclo único de 30 ciclos usando el HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, EE. UU.). Se amplifica el gen 16s rRNA y 18S rRNA, mientras que los amplicones resultantes se purificaron, cuantificaron, agruparon y secuenciaron en un MiSeq de Illumina en la empresa Macrogen Inc (Korea).

3.5.1.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO OTU'S Y FUNCIONALIDAD

Las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) se seleccionaron, seguido de la clasificación taxonómica. Se mostraron un conjunto único de genes de Grupos Ortólogos (COG), que proporcionan información de genes potencialmente

asociados con el metabolismo, la estructura o la diversidad funcional de la flora microbiana intestinal.

3.5.1.6. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA

Se utilizaron blastx contra la base de datos de resistencia antibiótica CARDs usando los contigs para encontrar mayores secuencias homólogas. Se construyeron gráficos de barras de los recuentos de genes normalizados. El único factor de análisis de la varianza (ANOVA) se realizó en Excel con un valor de 0,05 para categorías comparadas. Los valores de p se ajustaron para comparaciones múltiples utilizando la corrección de Bonferroni.

3.5.3. PROTOCOLO DE ANÁLISIS

a. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El filtrado y el procesamiento de los datos de la secuencia metagenómica se realizaron mediante la canalización de la herramienta Kneaddata para eliminar las lecturas de baja calidad, los cebadores y la contaminación del hospedero (<https://github.com/biobakery/kneaddata>). El índice Bowtie2 del genoma de referencia humano GRch37 se utilizó como referencia humana. Los parámetros de Trimmomatic dentro de los datos de Kneaddata se establecieron en 4 tamaños de ventana deslizante básicos y sólo mantuvieron las lecturas con una puntuación de Phred superior a 20. La longitud mínima de las muestras guardadas también se fijó en al menos el 90 por ciento de la longitud total de lectura de entrada. Kraken2 se utilizó para anotaciones taxonómicas, utilizando la base de datos integrada de kraken2 (Wood et al., 2019). La confianza taxonómica se fijó en 0,1. Luego, los informes de Kraken2 se procesaron a través de Braken para el análisis de abundancia con una longitud mínima de 100 y al menos 10 lecturas para realizar una nueva estimación (Lu et al., 2017). El análisis de la abundancia de rutas de genes y las familias de genes se realizó con Humann3 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/humann>). Chocophlan y uniref se

utilizaron como bases de datos de nucleótidos y proteínas, respectivamente.

b. ANÁLISIS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Primero se realizó un análisis utilizando la herramienta RGI para una familia de genes, clase de fármaco y abundancia de mecanismo de resistencia utilizando secuencias limpias de alta calidad (Alcock et al., 2020). Se utilizó DIAMOND como herramienta de alineación para el análisis. El análisis secundario de la resistencia a los antibióticos se realizó con AMRPlus-Plus para las anotaciones de los mecanismos de resistencia a los medicamentos, el tipo de resistencia y las funciones (Doster et al., 2020) y también se aprovecharon las bases de datos integradas de MEGAs.

3.6. ASPECTOS ÉTICOS

Conforme a los aspectos éticos están regidos a los siguientes principios; los procedimientos la transparencia, hace referencia en que la documentación recogida de las instituciones sea auténtica y que no contengan alguna alteración (Ruiz et al., 2022).

Además, tiene el principio de precaución intelectual y auditoria, que específicamente constan en que la indagación esté adecuadamente citada y referencia de acuerdo a las normas internacionales APA en la indagación. Llegando a concluir que el indagador realizará dicho estudio con responsabilidad y ética, con la intención de prevenir algún trance que implique el correcto desarrollo del estudio (Moreno & Carrillo, 2019)..

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

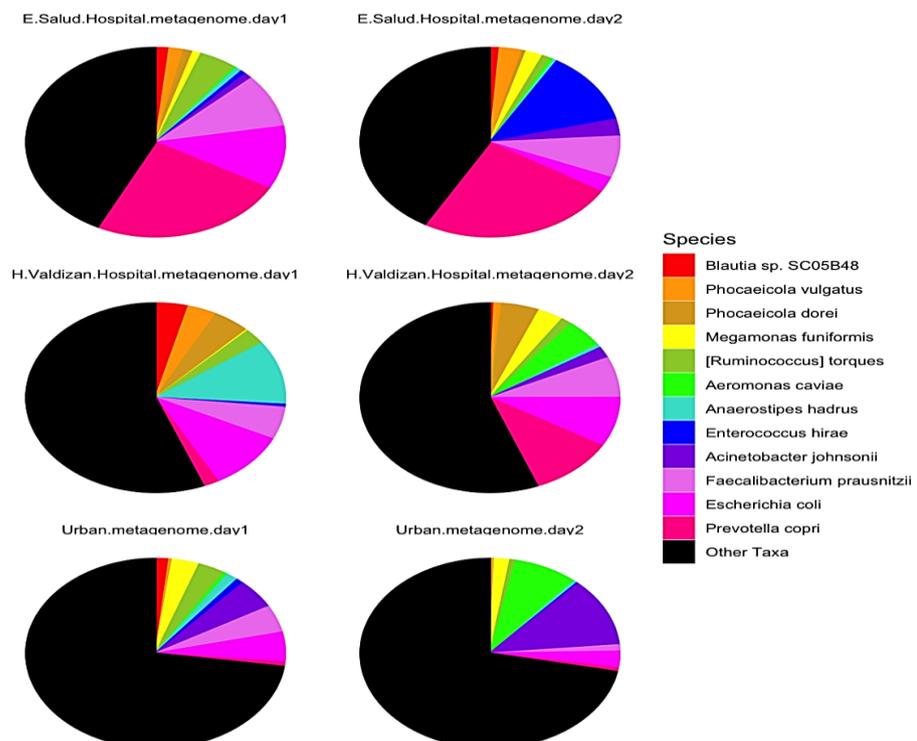
4.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS

4.1.1. ABUNDANCIA DE ESPECIES

En la figura 6 se observa las especies y su abundancia en los tres puntos de muestreo y durante los dos días. Se encontró a la especie *Prevotella copri*, la cual está altamente presente en el Hospital EsSalud, mientras que en las otras muestras tiene valores muy bajos. Además, la presencia de la especie *Blautia sp.* fue pequeña en términos de abundancia en todas las muestras. En el hospital Hermilio Valdizán las bacterias más prevalentes fueron las bacterias *Escherichia coli* y en la muestra urbanística *Acinetobacter johnsonii* y la bacteria *Aeromonas caviae*. Así también, otras taxas (other taxa) pueden llegar a ocupar casi la mitad de toda la muestra en cuanto a abundancia. Otros géneros y especies reportados fueron: *Enterococcus hirae*, *Anaerostipes hadrus*, *Faecalibacterium prausnitzii*.

Figura 7

Clasificación de especies y abundancia en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021

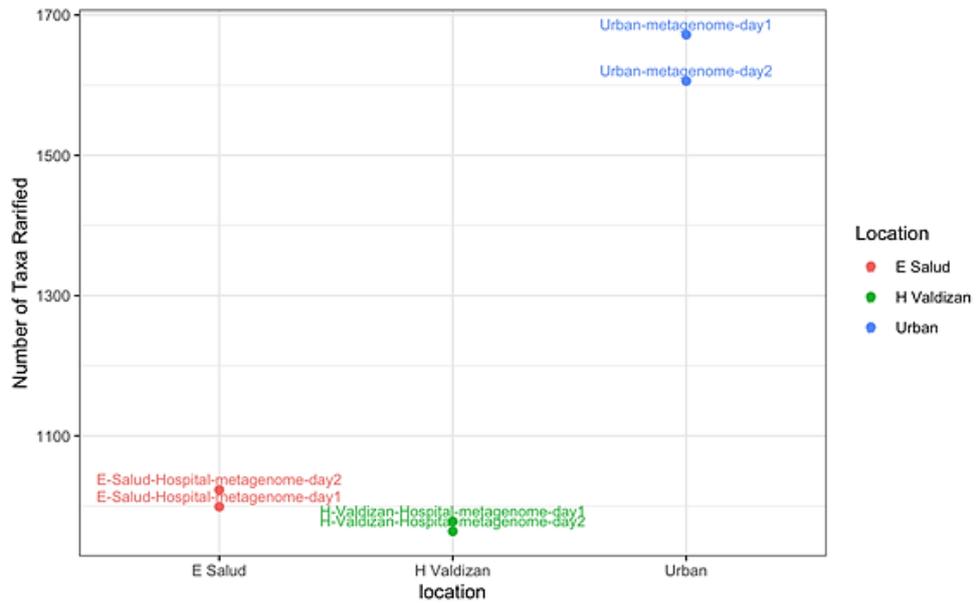


4.1.2. ALFA DIVERSIDAD

De acuerdo a la riqueza de Rarefied (número de taxa) se puede decir que en la Figura 7 se muestran los diferentes puntos de muestreo y el número de taxas, por tanto, la mayor diversidad se observó en la zona urbana en ambos días, mientras que las muestras provenientes de hospitales tuvieron un bajo número de taxas.

Figura 8

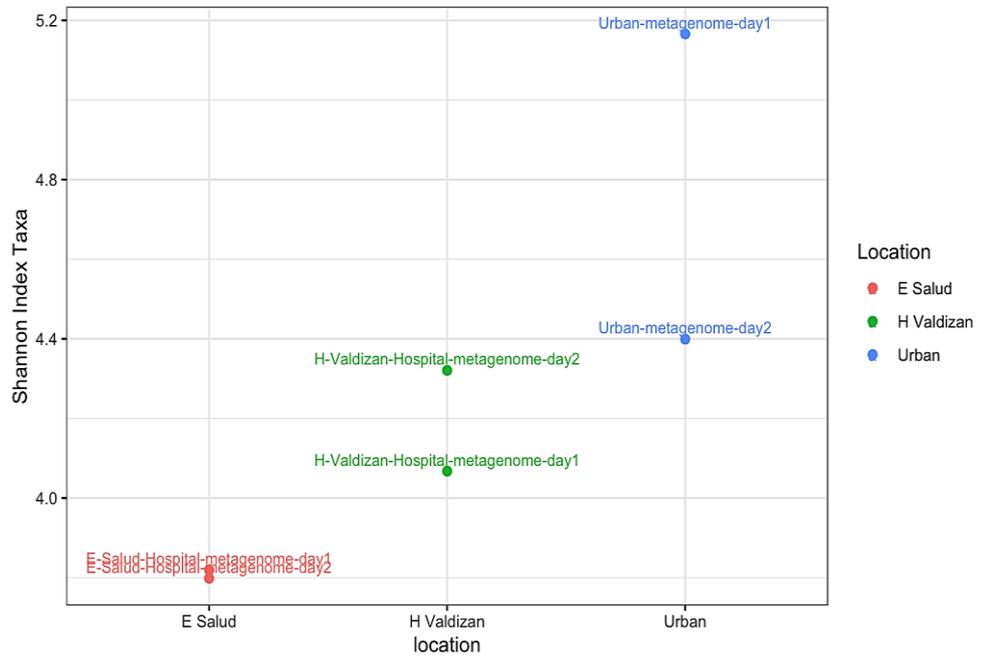
Riqueza de Rarefied en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021



Respecto al índice de Shannon, éste nos permite ver la diversidad de microorganismos que se tiene dentro de las muestras, obteniéndose los mayores valores en las aguas residuales urbanas y la menor riqueza en las aguas residuales hospitalarias de EsSalud (Figura 8).

Figura 9

Índice de Shannon en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021



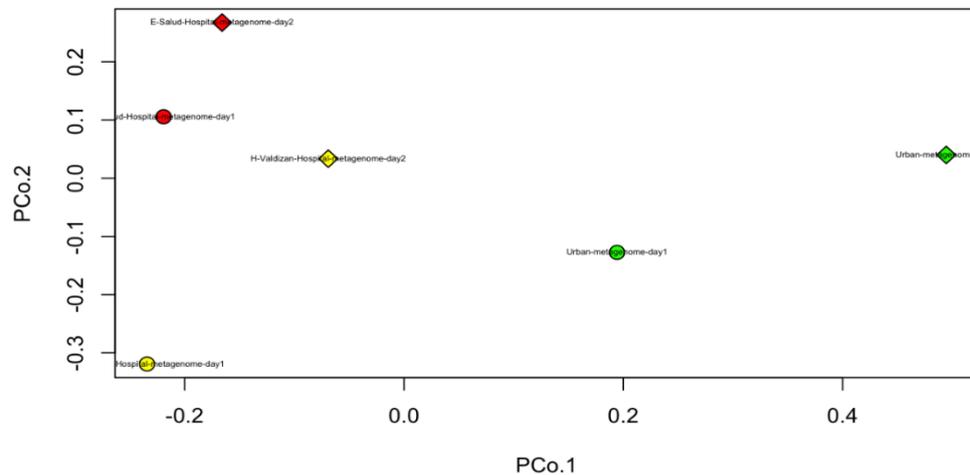
4.1.3. DIVERSIDAD BETA

En el gráfico de componentes principales (Figura 9) observamos que las muestras de EsSalud entre el día 1 y el día 2 son semejantes entre sí a diferencia de las muestras de aguas urbanas y las del Hospital Valdizán, las cuales son muy distintas entre sí.

Figura 10

Análisis de componentes principales (ACoP) en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021

Bray Weighted

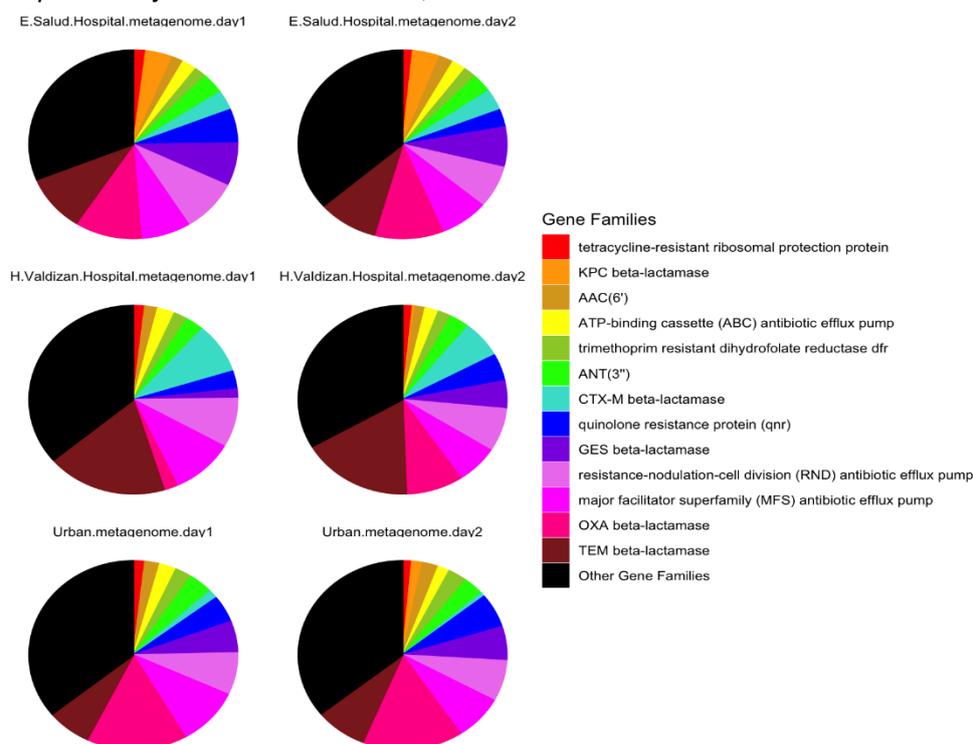


4.1.4. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

De acuerdo a la Figura 10, se tiene los siguientes genes de resistencia agrupados en familias:

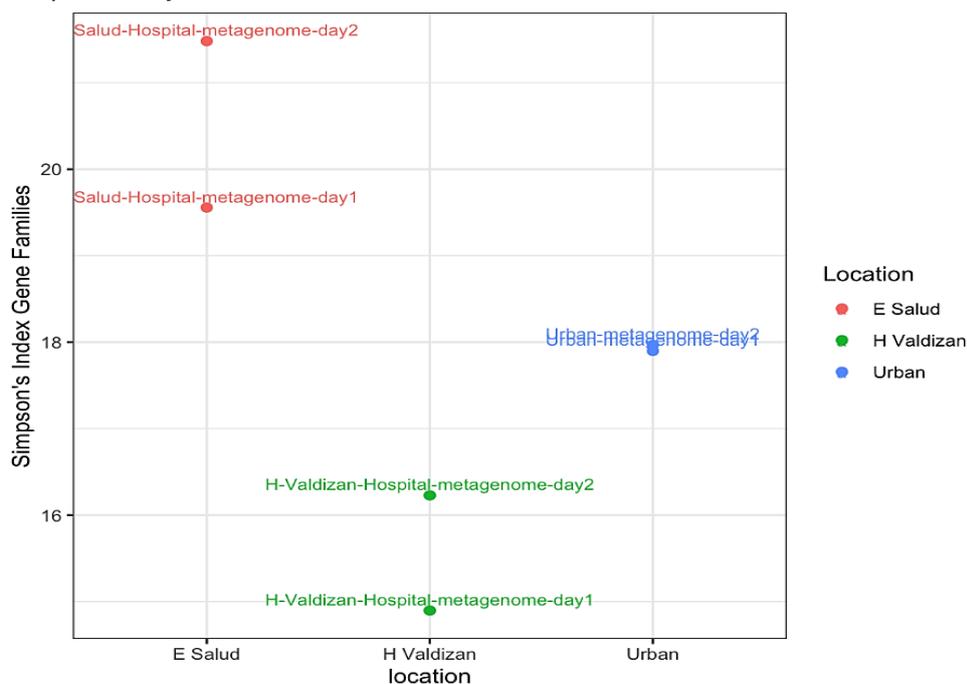
- En la muestra de EsSalud se puede observar que en abundancia la familia de genes resistentes como oxa-beta-lactamasa, tem beta lactamase, GES beta lactamasa y proteína transportadora mayor facilitator superfamily (MFS).
- En el Hospital de H. Valdizán, se tiene principalmente a los genes de resistencia de las familias Tem Beta – lactamasa, oxa-beta lactamasa, proteína transportadora del antibiótico RND, seguida por proteína transportadora mayor facilitator superfamily (MFS), CTX-M beta-lactamasa.
- En la muestra urbanística, se puede observar que sobresale el gen de la familia oxa-beta-lactamase, seguido de proteína transportadora mayor facilitator superfamily (MFS), Tem Beta lactamasa y proteína de resistencia a las quinolonas (qnr).

Figura 11
Abundancia de familias de genes de resistencia en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021



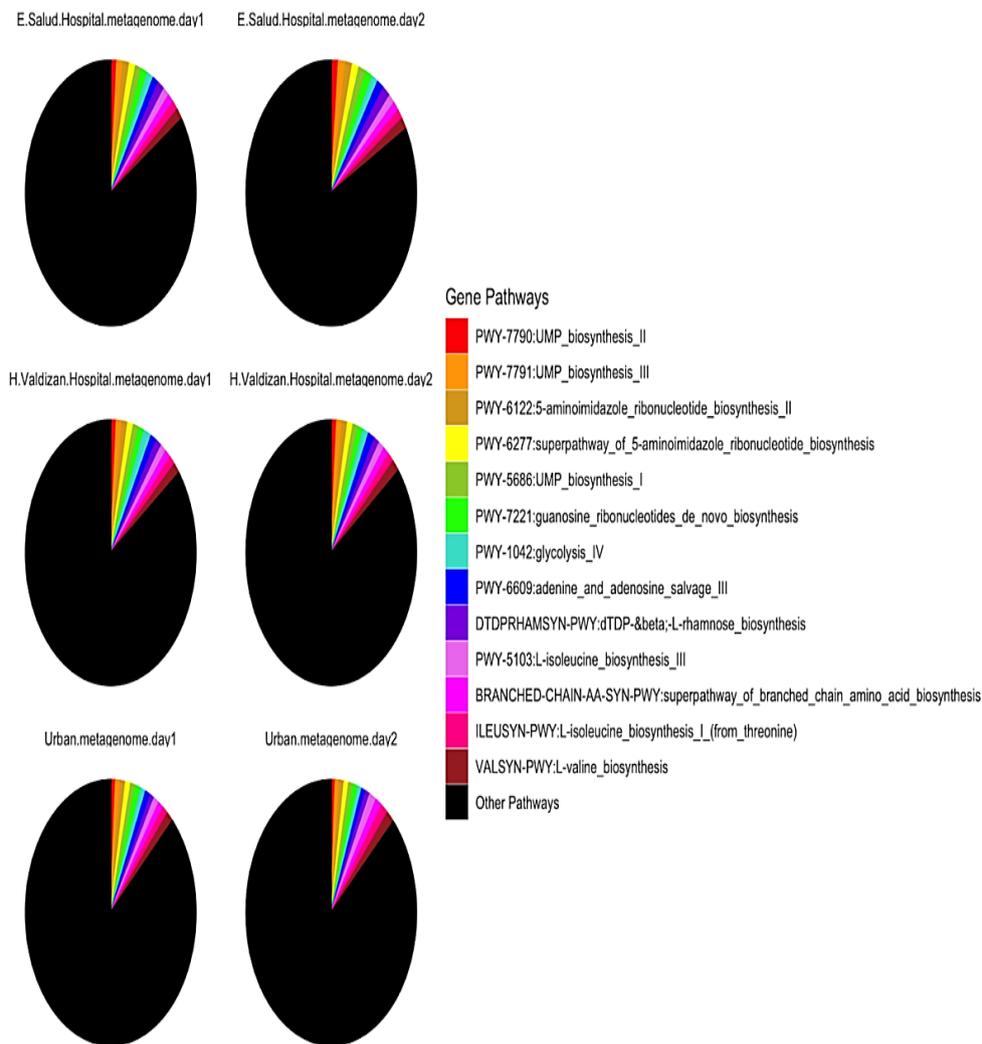
En la Figura 11, se observa mediante el índice de Simpson, que la mayor variedad y cantidad de genes de resistencia se encontraron en el Hospital de EsSalud, mientras que valores menores están presentes en la zona urbana y Hospital H. Valdizán.

Figura 12
Diversidad de Shannon de genes de resistencia en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021



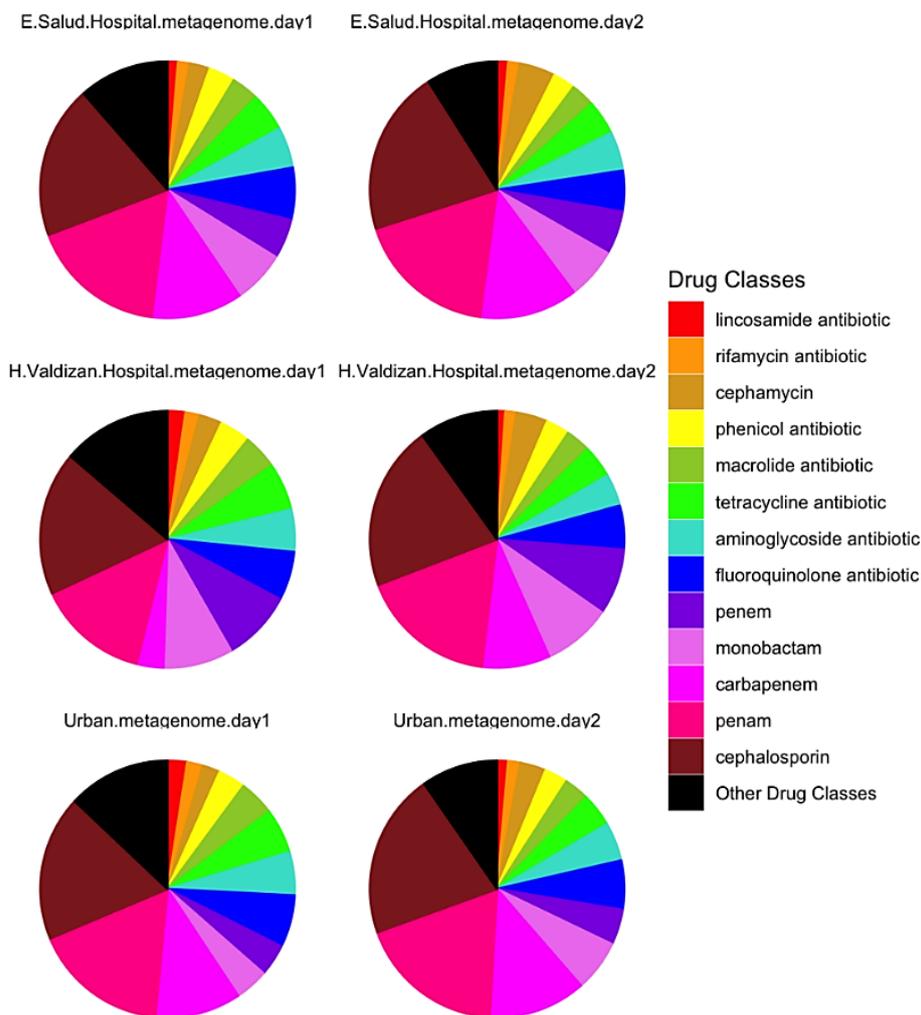
En la Figura 12 se observa los genes de las vías de biosíntesis de uridina-5-monofosfato II, uridina-5-monofosfato III, aminoimidazole ribonucleótido biosíntesis II, biosíntesis ribonucleótido 5-aminoimidazole de supervía, biosíntesis I, entre otros. Sin embargo, más del 50% corresponde a otras vías de biosíntesis.

Figura 13
Genes de biosíntesis en tres muestras de aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021



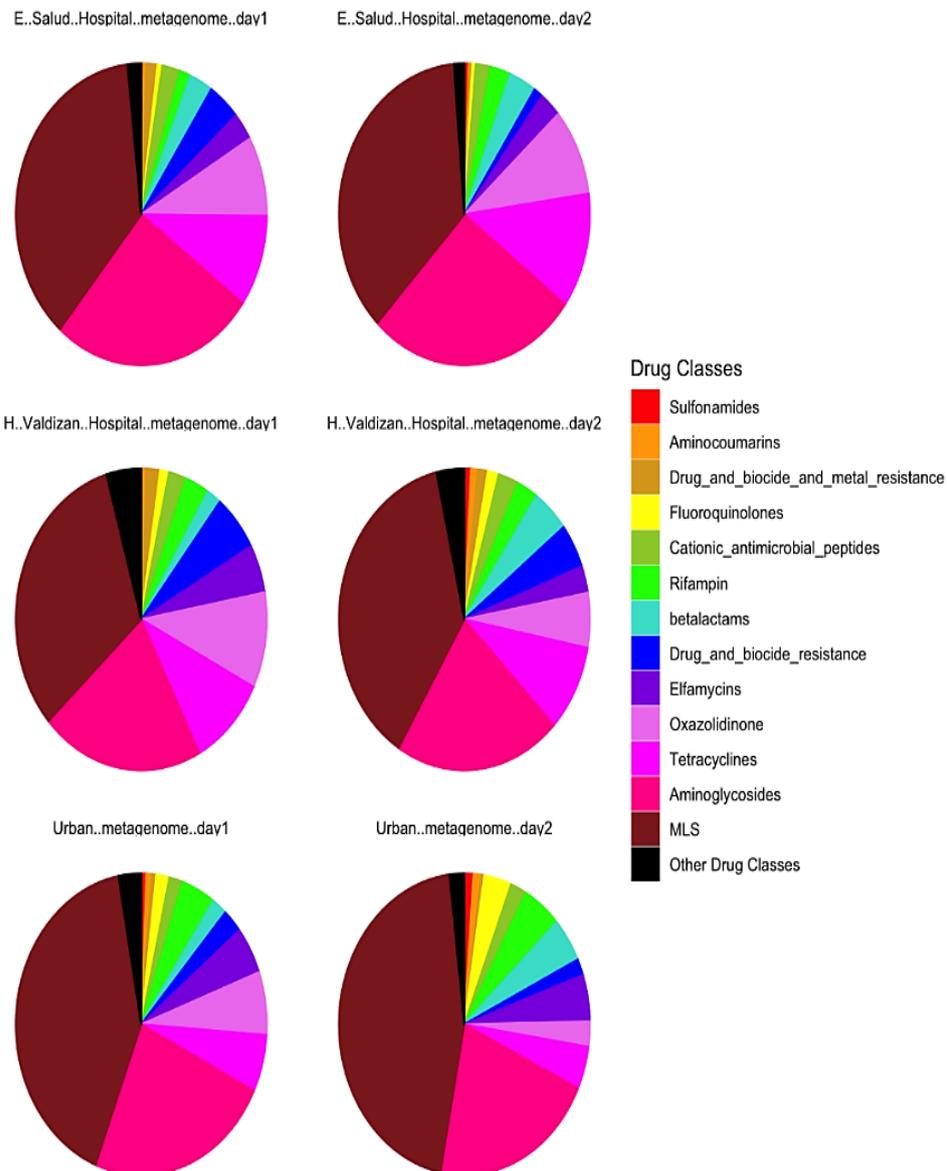
Entre los fármacos hallados que destacan en abundancia se tienen a los antibióticos cefalosporinas, penémicos, carbapenémicos, monobactámicos y fluoroquinolona (Figura 13).

Figura 14
Clases de fármacos encontrados en aguas hospitalarias y urbanas de Huánuco, 2021



Así también, en la Figura 14 se observa los tipos de medicamentos para los cuales hubo multirresistencia antimicrobiana en las muestras de aguas urbanas y de hospitales. En abundancia destacan los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS), aminoglucósidos, tetraciclinas y oxazolidinonas.

Figura 15
Tipos de medicamentos con multiresistencia antimicrobiana en las muestras de aguas urbanas y de hospitales de Huánuco, 2021



CAPÍTULO V

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La metagenómica se refiere al conjunto de genomas, generalmente microbianos presentes en hombres, plantas y animales, todas ellas en muestras de comunidades y nichos (Gilbert & Dupont, 2011). Otra definición consiste en decir que, la metagenómica es todo el material genómico presente en una muestra pudiendo ser ambiental y que permitiría conocer las comunidades microbianas y genomas de microorganismos (Techtmann & Hazen, 2016). La importancia de esta técnica molecular radica en poder conocer una diversidad de bacterias y genes presentes en una muestra que no pueden ser cultivadas o procesadas en condiciones estándar de laboratorio (De Abreu et al., 2021).

Así también, Waskito et al. (2022) describe las ventajas de aplicar métodos moleculares para mejorar diagnósticos clínicos y enfermedades infecciosas resistentes. De Abreu et al. (2021) empleó la metagenómica para identificar la resistencia a antimicrobianos a través de detección de genes, diversidad microbiana, detección de genes funcionales, además de la búsqueda en la base de datos de resistomas (Colección de genes de resistencia a los antimicrobianos) completas y pertinentes. De igual manera, el presente estudio servirá de base para las predicciones de la propagación de los antimicrobianos en ambientes acuáticos, ya que muchas de estas bacterias no pueden ser cultivadas en el laboratorio.

Las bacterias que son resistentes a los antibióticos se encuentran en las personas, los animales, los alimentos y el medio ambiente, y pueden propagarse entre humanos, animales, y de persona a persona (Fletcher, 2015). La presente indagación tuvo por fin último describir la diversidad y abundancia de las bacterias presentes en el análisis metagenómico, encontrando entre las especies al género *Blautia* y las especies *Escherichia coli*, *Acinotobacter jhonsonii*, *Faecalibacterium*, *Aeromonas caviae*, entre otros. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Hendriksen et al. (2019), quienes detectaron en muestras de aguas residuales las bacterias fecales dominantes de los géneros *Faecalibacterium* y *Escherichia*. Mientras que

Acidovorax y *Acinetobacter* también fueron bacterias dominantes normalmente presentes en el medio ambiente. No obstante, la especie *Prevotella copri* estuvo altamente presente en el hospital EsSalud, lo cual podría deberse a su presencia en el conducto intestinal de las personas con dietas ricas en fibra, ya que posee enzimas que le permiten metabolizar polisacáridos complejos, de acuerdo a los análisis metagenómicos llevados a cabo por Yeoh et al. (2022) y, por tanto, podría haber sido desechado a través del tracto gastrointestinal a los efluentes.

Por otro lado, la resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema de salud mundial, que surge cuando los patógenos desarrollan o adquieren genes de resistencia a los antimicrobianos, generalmente, por recombinación genética entre microbios comensales y patógenos y se asocia con el mecanismo de conjugación de la transferencia horizontal de genes (Bertomeu, 2017; Checcucci et al, 2020; De Abreu et al., 2021). Checcucci et al. (2020) también menciona qué tratamientos químicos y biosanitarios reducen la carga bacteriana. Bertomeu (2017) en cambio, describe a los genes de resistencia como enzimas que codifican e inhiben al antibiótico. Por tanto, en su investigación identificó genes de resistencia en muestras de salida del tratamiento de aguas residuales mediante PCR y obtuvo que estos genes se mantenían a pesar de las técnicas de tratamiento de aguas en plantas residuales.

En el presente estudio se describieron los genes de resistencia hallados en las muestras de aguas hospitalarias y urbanas, pero antes se debe decir que, éstos genes dependen del ambiente o muestra, así Sgobbi (2020) encontraron en su mayoría genes β -lactamasas (35.6%), específicamente a los genes bla_{KPC} y bla_{TEM} presentes en las muestras en un 17.8% y Bajpai et al. (2017) también encontró en muestras urinarias de un hospital de tercer nivel la presencia de este tipo de genes, betalactámicos. También, Sepúlveda (2021) identificó genes asociados a resistencia en suelos de manglares contaminados con aguas residuales, encontrando vías de biosíntesis de estreptomicina y monobactámicos. Esto coincide con lo hallado en el presente estudio, en el cual se identificaron genes de las familias OXA, KPC y TEM beta lactamasas. A continuación, se describirán algunas familias.

En relación al gen de proteína transportadora mayor facilitator superfamily (MFS) que fue identificado, es reportado como familia de gen de resistencia antimicrobiana y se menciona que se encuentra, precisamente, distribuido en amplios sustratos y presente en diversos genomas microbianos. Además, se menciona que podría conferir multirresistencia a muchas bacterias (Nogrado et al., 2021). Las muestras de aguas residuales de los hospitales EsSalud, MINSA y de aguas urbanas presentaban al gen en mención, en todas las muestras.

El gen que codifica proteínas de protección ribosomal (RPPs) frente a tetraciclina estuvieron presentes en las muestras de aguas negras, coincidiendo con lo reportado por Li et al. (2018), quienes también detectaron este gen en ríos.

Respecto de la resistencia a las quinolonas se le atribuye a un locus al que le designó como qnr (quinolone resistance), cuya función es proteger el ADN-girasa y topoisomerasa IV de la intervención de las quinolonas (Hooper y Jacoby, 2015). El gen que codifica la proteína de resistencia a las quinolonas (qnr) está presente en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y se le atribuye resistencia a estreptomicina y quinolonas, aun así, el entorno genético de querub está aún por investigar (Rodríguez-Martínez, 2005), sin embargo, en las muestras de aguas urbanísticas y de hospitales se encontró este gen.

Precisamente, los estudios de última generación muestran que existe una alta resistencia antimicrobiana en muestras de plantas de tratamiento de aguas residuales, llegando a constituir puntos o zonas calientes (hotspots); además, estos estudios permitirían predecir el impacto de la resistencia antimicrobiana en una población (Rodríguez et al., 2021). Bertomeu (2017) también menciona que gran parte de los antibióticos terminan en las estaciones depuradoras de aguas negras por tener un sistema ineficiente de eliminación y pueden mantener a los antibióticos por largos periodos de tiempo. Sin embargo, el presente estudio muestra que tanto en aguas residuales de hospitales como en urbanas existió una alta presencia de genes de resistencia. Esto podría deberse a lo mencionado por Van Duin y Paterson (2016), quienes estudiaron la carga bacteriana multirresistente y llegaron a la conclusión que las bacterias se habían propagado de zonas hospitalarias a urbanas.

Otro autor menciona que, los antibióticos residuales están presentes en aguas de ríos por la interacción del ser humano-animal y de allí que aumenta la resistencia antimicrobiana por parte de las bacterias. Además, éstos se metabolizan de diferente forma. Por ejemplo, los antibióticos β -lactámicos destruyen la pared celular bacteriana y actúan solo cuando las bacterias están en fase de multiplicación. En este grupo están las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (Romero, 2020). Sin embargo, el tratamiento ineficiente de las aguas residuales produce una descarga de residuos de fármacos también ineficiente a los ríos (Ortega-Paredes et al., 2020). Precisamente, en esta investigación se encontró, en las muestras de aguas residuales y urbanísticas la presencia de cefalosporinas, penémicos, carbapenémicos, monobactámicos y fluoroquinolona.

Una vez más, Katagiri et al. (2021) describieron la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos de aguas residuales mediante las plantas de tratamiento que desembocan en los ríos. Los resultados mostraron composiciones bacterianas similares entre tanques viejos y nuevos, betalactámicos de amplio espectro y genes *bla*_{CTX-M} y carbapenasas. En Perú solo existen 5 centros de tratamientos de residuos sólidos, mas no líquidos (Soriano-Moreno et al., 2021), lo que podría significar muchos y variados puntos calientes (hotspots) con presencia de una comunidad bacteriana bastante diversa con resistencia a antibióticos.

Así también, Guo et al. (2021) estudiaron muestras de aguas residuales sin tratar de tres hospitales a través de la metagenómica, identificándose 130 filos y 2554 géneros, con composiciones de la comunidad bacteriana significativamente diferentes entre hospitales y encontrando genes de resistencia antimicrobiana, sugiriendo que se deben aplicar medidas de protección para evitar infecciones humanas difíciles de tratar.

Respecto a los genes pathways, éstos representan a vías moleculares para el metabolismo, procesamiento de información genética, otros procesos celulares, enfermedades humanas y desarrollo de medicamentos. En el presente estudio se encontraron entre las principales vías, al gen de biosíntesis de uridina-5-monofosfato II, uridina-5-monofosfato III, aminoimidazole ribonucleótido biosíntesis II, biosíntesis ribonucleótido 5-aminoimidazole de supervía y biosíntesis I. Cada gen pathway supone taxas

que poseen determinado pathway, por ejemplo, la vía de biosíntesis III incluye a bacterias como *Bacillus subtilis* y *Lactococcus lactis*, además el rango taxonómico va desde Actinobacteria, Archaea y Firmicutes. Esta vía es usada para la biosíntesis de polisacáridos, glicoproteínas y fosfolípidos (Zrenner et al., 2006). De igual manera también la biosíntesis de ribonucleótido 5-aminoimidazole de supervía es conocido que ocurre en *Escherichia coli* y el rango taxonómico esperado es en bacterias (MetaCyc, 2022).

Por otro lado, Soriano-Moreno et al. (2021) menciona que la multirresistencia bacteriana está muy relacionado a los efluentes hospitalarios y la contaminación a humanos se produce cuando los efluentes desembocan en ríos, siendo esta agua utilizada para uso doméstico. Entre la clase de fármacos multirresistentes se encontraron los MLS, aminoglucósidos, tetraciclinas y betalactámicos; estos resultados son similares a lo reportado por Rodríguez et al. (2021) quienes hallaron en muestras de plantas de aguas residuales genes que codifican resistencia a MLS, betalactámicos y multirresistencia a otros fármacos. Así también, Strange et al. (2021) encontraron que los genes que confieren resistencia a compuestos de las clases tetraciclinas, aminoglucósidos y fenicoles son dominantes en África, Asia y América del Sur.

El presente estudio identificó genes que confieren la multirresistencia a ciertos tipos de medicamentos, entre ellos, destacan principalmente a los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS), aminoglucósidos, oxazolidinona en abundancias bastante similares entre las muestras de aguas residuales de hospitales y de aguas urbanas. Así, esta información coincide con lo reportado por Rodríguez et al. (2021), quienes encontraron abundantes genes que confieren resistencia a multifármacos, entre ellos, MLS, betalactamasas y aminoglucósidos.

Respecto a las diferencias significativas entre las muestras de aguas residuales de hospitales y de aguas urbanas, Sgobbi et al. (2020) encontraron diferencias significativas en Brasil en la resistencia a la amoxicilina clavulánico, el aztreonam, la cefepima y la cefotaxima en las aguas residuales hospitalarias en comparación con las urbanas ($p < 0.05$), sin embargo, en la presente indagación se realizó un análisis exploratorio para determinar clusters, llegando a la conclusión que existe una alta diversidad de especies

en aguas residuales urbanas en comparación a las aguas residuales de hospitales, mostrando, por tanto, dos grupos marcadamente separados (Figura 7).

Existen más estudios en resistencia antimicrobiana en muestras de aguas provenientes de hospitales que urbanas, por tanto, la investigación representa nuevos hallazgos en Perú comparando ambos tipos de efluentes y permitirá prevenir sobre las especies de bacterias resistentes y genes de resistencia que pueden estar afectando la salud humana.

CONCLUSIONES

- Se describió la diversidad y abundancia de bacterias, así, *Prevotella copri* fue la que destacó en abundancia en el hospital EsSalud durante los dos días de muestreos. Respecto a las aguas residuales del hospital MINSA y las zonas urbanas destacaron en abundancia y presencia las bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus hirae*.
- Se tiene mayor diversidad de especies bacteriológicas en las muestras de agua residual Urbanística a comparación de los hospitales (MINSA y EsSalud). Además, se observó que las muestras de EsSalud son parecidas entre sí para ambos días en comparación a las muestras del hospital MINSA y zona urbana.
- Se describió la diversidad y abundancia de los genes de resistencia en los tres puntos de muestreo: En el hospital EsSalud se encontró a los genes de la familia OXA-beta lactamasa, tem beta lactamasa y GES beta lactamasa. En el hospital H. Valdizán, destacaron las familias Tem Beta Lactamasa, oxa-beta lactamasa y MFS Family. Mientras que, en la muestra urbanística estuvo presente las familias oxa-beta-lactamase, MFS y Tem Beta lactamasa.
- Respecto a los genes pathways, se encontró a los genes de las vías de biosíntesis de uridina-5-monofosfato II, uridina-5-monofosfato III, aminoimidazole ribonucleótido biosíntesis II, biosíntesis ribonucleótido 5-aminoimidazole de supervía y biosíntesis I.
- Finalmente, los tipos de medicamentos hallados fueron las cefalosporinas, penémicos, carbapenémicos, monobactámicos y fluoroquinolona, mientras que los fármacos multirresistentes lo constituyeron los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS), aminoglucósidos, tetraciclinas y oxazolidinona.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con los análisis metagenómicos que permitan conocer la diversidad y abundancia de bacterias cultivables y no cultivables en diferentes ambientes, así como dividir claramente las bacterias que tienen resistencia antimicrobiana.
- Se recomienda realizar otras técnicas moleculares y fenotípicas que permitan conocer más acerca de la presencia y abundancia de las bacterias resistentes, multirresistentes y genes de resistencia.
- Se sugiere realizar estudios de aguas residuales tratadas y sin tratar en países en vías de desarrollo y países desarrollados, para observar diferencias y sugerir alternativas frente al avance cada vez mayor de resistencia antimicrobiana.
- Se recomienda la realización de más estudios detallados respecto a la resistencia de microorganismos y su impacto en la salud pública haciendo uso de técnicas moleculares modernas.
- Se recomienda la divulgación de los datos obtenidos a las entidades correspondientes, debido a la relevancia de los hallazgos y las medidas regulatorias que podrían asumir a partir del presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcock, B., Raphenya, A., Lau, T., Tsang, K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L., Cheng, A., Liu, S., Min, S., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R., Nasir, J., & Oloni, M. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(18), 517-525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Arista, N. (2018). *Factores de riesgo asociados a resistencia bacteriana en infecciones urinarias con urocultivo positivo en pacientes del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión (abril – junio del 2017)*. Repositorio Institucional de la Universidad Ricardo Palma. <https://acortar.link/XGRjAc>
- Bajpai, T., Pandey, M., Varma, M., & Bathambare, G. (2017). Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna Journal of Medicine*, 7(1), 12-16. <https://doi.org/10.4103/2231-0770.197508>
- Bertomeu, A. (2017). *Detección de resistencias a antibióticos en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincia de Valencia. [Tesis de licenciatura en Biotecnología]*. <https://acortar.link/QCRazA>
- Buckley, K., & Etensohn, C. (2019). Techniques for analyzing gene expression using BAC-based reporter constructs. *Methods in Cell Biology*, 151(1), 197-218. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.01.004>
- Calderoli, P. (2016). Análisis de las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo aplicando procedimientos metagenómicos. *Tesis para optar el grado de doctor. Universidad Nacional de La Plata*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/52022>
- Checucci, A., Trevisi, P., Luise, D., Modesto, M., Blasioli, S., Braschi, I., & Mattarelli, P. (2020). Exploring the Animal Waste Resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. *Frontiers in Microbiology*, 11(1). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01416/full>

- De Abreu, V., Perdigao, J., & Almeida, S. (2021). Metagenomic Approaches to Analyze Antimicrobial Resistance: An Overview. *Frontiers*, 11(1). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.575592/full>
- Doster, E., Lakin, S., Dean, C., Wolfe, C., Young, J., Boucher, C. B., Noyes, N., & Morley, P. (2020). MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Research*, 48(4), 561-569. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1010>
- Hadi, M. M., Martel, C. P., Huayta, F. T., Rojas, C. R., & Arias, J. L. (2023). *Metodología de la investigación: Guía para el proyecto de tesis* (1 ed.). Instituto Universitario de Innovación Ciencia y Tecnología Inudi Perú S.A.C.
- Fletcher, S. (2015). Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 20(4). <https://doi.org/10.1007/s12199-015-0468-0>
- Flygare, S., Simmon, K., Miller, C. y col. Taxonómero: un portal de análisis metagenómico interactivo para la detección universal de patógenos y el perfilado de la expresión del ARNm del hospedador. *Genoma Biol* 17, 111 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0969-1>
- Gallardo, E. (2017). *Metodología de la Investigación: Manual autoformativo interactivo*. Universidad Continental.
- Gilbert, J., & Dupont, C. (2011). Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annual Review of Marine Science*, 3(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. D., Torres-López, F. J. y Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*, 156(2), 172-180.
- Gogry, F., Siddiqui, M., & Rizwanul, Q. (2019). Emergence of Mcr-1 Conferred Colistin Resistance among Bacterial Isolates from Urban Sewage Water in India. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(32). <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06561-5>

- Guo, X., Tang, N., Lei, H., Fang, Q., Liu, L., Zhou, Q., & Song, C. (2021). Metagenomic Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Untreated Wastewater from Three Different Hospitals. *Frontiers in Microbiology*, 12(1). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709051>
- Hendriksen, R., Munk, P., Njage, P., Van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S., Kjeldgaard, J., & Kaas, R. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 10(1). <https://www.nature.com/articles/s41467-019-08853-3>
- Hooper, D., & Jacoby, G. (2015). Mechanisms of Drug Resistance: Quinolone Resistance: Mechanisms of Quinolone Resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 12-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4626314/>
- Kanchi, R., Walton, K., & Khosroheidari, M. (2018). MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. *Disease Gene Identification: Methods and Protocols*, 1706(1), 223-232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12
- Katagiri, M., Kuroda, M., Sekizuka, T., Nakada, N., Ito, Y., Otsuka, M., Watanabe, M., & Kusachi, S. (2021). Comprehensive Genomic Survey of Antimicrobial-Resistance Bacteria in the Sewage Tank Replacement with Hospital Relocation. *Infection and Drug Resistance*, 14(1), 5563-5574. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34984011/>
- Li, C., Jiang, C., Wu, Z., Cheng, B., An, X., Wang, H., Sun, Y., Huang, M., Chen, X., & Wang, J. (2018). Diversity of antibiotic resistance genes and encoding ribosomal protection proteins gene in livestock waste polluted environment. *Journal of Environmental Science and Health*, 53(7), 423-433. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29469609/>
- Li, Z., Chen, Y., Ling, A., Li, H., Lin, Z., & Wang, Y. (2022). Effects of Biocontrol Agents Application on Soil Bacterial Community and the Quality of Tobacco. *Current Microbiology*, 79(11), 320. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-022-02937-y>
- Light, E., Baker-Austin, C., Card, R., Ryder, D., Alves, M., Al-Sarawi, H., Adulla, K., Stahl, H., Al-Gabshi, A., Alghoribi, M., Balkhy, H., Joseph,

- A., Hughes, A., Le Quesne, W., Verner-Jeffreys, D., & Lyons, B. (2022). Establishing a marine monitoring programme to assess antibiotic resistance: A case study from the Gulf Cooperation Council (GCC) region. *Environmental Advances*, 9(1). <https://acortar.link/6O67Mu>
- Lu, J., Breitwiese, F., Thielen, P., & Salzberg, S. (2017). Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, 3(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- Mancilla, J. (2019). *Análisis del metagenoma bacteriano de la rizosfera de quinua (Chenopodium quinoa Wild) en suelos de alta fertilidad y degradado en Huando, Huancavelica. [Tesis para obtener el título de ingeniería]*. Repositorio Institucional UNH. <https://acortar.link/n6W5vV>
- Martínez, J., Coque, T., & Baquero, F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology*, 13(2). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399>
- MetaCyc. (09 de noviembre de 2022). *MetaCyc superpathway of 5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis*. <https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-6277>
- Moreno, D., & Carrillo, J. (2019). *Normas APA 7.ª edición Guía de citación y referenciación*. Universidad Central. https://www.revista.unam.mx/wp-content/uploads/3_Normas-APA-7-ed-2019-11-6.pdf
- Murray, C., Shunji, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Jhonson, S., Browne, A., Give, M., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef, B., Kumaran, E., McManigal, B., Agarwal, R., . . . Amuasi, J. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext#%20](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext#%20)
- National Human Genome Research Institute. (26 de setiembre de 2022). *National Human Genome Research Institute*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Secuenciacion->

shotgun#: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Secuenciacion-shotgun#>

- Nogrado, K., Unno, T., Hur, H., & Lee, J. (2021). Tetracycline-resistant bacteria and ribosomal protection protein genes in soils from selected agricultural fields and livestock farms. *Applied Biological Chemistry*, 64(1).
<https://appliedbiolchem.springeropen.com/articles/10.1186/s13765-021-00613-6>
- Ñaupas, H., Valdivia, M., Palacios, J., & Romero, H. (2018). *Metodología de la investigación cuantitativa-cualitativa y redacción de tesis*. (5ta ed.). Bogotá: Ediciones de la U.
- ONU. (2017). *La resistencia antimicrobiana causada por la contaminación es una de las mayores amenazas emergentes para la salud*.
<https://acortar.link/jHxPmi>
- Ortega-Paredes, D., Barba, P., Mena-López, S., Espinel, N., Crespo, V., & Zurita, J. (2020). High quantities of multidrug-resistant *Escherichia coli* are present in the Machángara urban river in Quito, Ecuador. *Journal of Water and Health*, 18(1), 67-76.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32129188/>
- Ospino, K., Castilla, M., & Sánchez, R. (2018). Resistencia microbiana desde una perspectiva metagenómica. *NOVA publ. cient.*, 91-100.
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-976281>
- Pantozzi, F. (2013). Resistencia antimicrobiana en bacterias de origen animal. *Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes (REIE)*, 7(8). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/92795>
- Primelles, E., Velazco, P., Ramírez, S., & Rodríguez, E. (2005). Estudio preliminar para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con empleo hipoclorito de sodio y ultrasonido. *Revista Cubana de Química*, 17(3), 106-107.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543687038>
- Rabapane, K., Ljoma, G., & Matambo, T. (2022). Insufficiency in functional genomics studies, data, and applications: A case study of bio-prospecting research in ruminant microbiome. *Frontiers in Genetics*,

13(1).

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2022.946449/full>

Raimondi, S. (2022). Metagenómica: más allá del genoma de los microorganismos. *Bitácora Digital*, 1(2).

<https://revistas.unc.edu.ar/index.php/Bitacora/article/view/5573>

Ramírez-Cando, L., Chicaiza, S. y Ramos, A. (2019). Detección de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas como contaminantes emergentes en los ríos San Pedro y Pita del cantón Rumiñahui. *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 30(2).
<https://www.redalyc.org/journal/4760/476060341008/>

Rivera-Urbalejo, A., Vasquez-Sandoval, D., Fernández-Vásquez, J., Rosete-Enríquez, M., Cesa-Luna, C., Morales-García, Y., Muñoz-Rojas, J. y Quintero-Hernández, V. (2021). Aportes y dificultades de la metagenómica de suelos y su impacto en la agricultura. *Acta Biológica Colombiana*, 26(3), 449-461.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2021000300449

Rodríguez, E., Ramírez, D., Balcázar, J., & Jiménez, J. (2021). Metagenomic analysis of urban wastewater resistome and mobilome: A support for antimicrobial resistance surveillance in an endemic country. *Environmental Pollution*, 276(116736).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026974912100316X?via%3Dihub>

Rodríguez-Martínez, J. (2005). Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(1). <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-resistencia-quinolonas-mediada-por-13070406>

Roeh, S., Weber, P., Rex-Haffner, M., Deussing, J., Binder, E., & Jakovcevski, M. (2017). Sequencing on the SOLiD 5500xl System – in-depth characterization of the GC bias. *Nucleus*, 8(4).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5597294/>

Romero, E. (2020). Caracterización de la resistencia antimicrobiana en *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido

- (BLEE) aislada de aguas residuales descargadas en el río Chimbo del cantón San Miguel-provincia Bolívar-Ecuador. *Repositorio digital de la Universidad Central del Ecuador*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22406>
- Ruiz, J., Pinedo, L., Barbarán, P., & Pretell, L. (2022). Gestión del Gobierno Abierto y uso del portal de transparencia en una universidad pública peruana. *Enfoque UTE*, 13(1), 73 - 81. <https://doi.org/https://doi.org/10.29019/enfoqueute.799>
- Sánchez, C. (2018). Detección molecular y fenotípica de resistencia antimicrobiana de Escherichia coli aislada de agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos. *Repositorio Institucional de la UPCH*. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/3854>
- Sepúlveda, A. (2021). Caracterización metagenómica de genes asociados a la síntesis y resistencia de compuestos antimicrobianos en suelos de manglar. *Tesis para optar el grado de maestro en Bosques y Conservación. Universidad Nacional de Colombia*.
- Serna-Galvis, E., Martínez-Mena, Y. L., Porras, J., & Torres-Palma, R. A. (2022). Antibióticos de alto consumo en Colombia, excreción en orina y presencia en aguas residuales—una revisión bibliográfica. *Ingeniería y competitividad*, 24(1).
- Sgobbi, G., Neves, L., Columbaro, N., Vilela, T., Pinheiro, G., Da Costa, A., & Segura-Muñoz, S. (2020). Gram-negative bacteria carrying β -lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(6). <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-020-08319-w>
- Soriano-Moreno, D., Yareta, J., Rojas-Cosi, A., Fajardo-Loyola, A., León-Luna, D., Castillo-Quezada, I., Laura-Bejarano, M., Hilario-Sánchez, M., Galarza-Pérez, M., & Marcos-Carbajal, P. (2021). Hospital effluents as a reservoir of beta-lactamase and carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(2). <https://acortar.link/D1AzoD>

- Stefanakis, A.I. 2018. *Constructed Wetlands for Industrial Wastewater Treatment*. (A. I. Stefanakis Ed.). John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, Reino Unido.
- Strange, J., Leekitcharoenphon, P., Duus, F., & Aarestrup, F. (2021). Metagenomics Analysis of Bacteriophages and Antimicrobial Resistance from Global Urban Sewage. *Scientific Reports*, 11(1). <https://www.nature.com/articles/s41598-021-80990-6>
- Su, J.-Q., An, X.-L., Li, B., Chen, Q.-L., Gillings, M., Chen, H., Zhang, T., & Zhu, Y.-G. (2017). Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistome in China. *Microbiome*, 5(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5517792/>
- Sundin, G., & Wang, N. (2018). Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 161-180. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-080417-045946>
- Techtmann, S., & Hazen, T. (2016). Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(10). <https://academic.oup.com/jimb/article/43/10/1345/5995976>
- Tocchetti, A., Donadio, S., & Sosio, M. (2018). Large inserts for big data: artificial cromosomas in the genomic era. *FEMS Microbiology Letters*, 365(9). <https://academic.oup.com/femsle/article/365/9/fny064/4935161>
- Ugarte, R., Olivo, J., Corso, A., Pasteran, F., Albornoz, E. y Sahuanay, Z. (2018). Resistencia a colistín mediado por el gen mcr-1 identificado en cepas de Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae. Primeros reportes en el Perú. *Anales de la Facultad de Medicina*, 79(3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832018000300004
- Van Duin, D., & Paterson, D. (2016). Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5314345/>

- Waskito, L., Rezkitha, Y., Vilaichone, R.-K., Wibawa, I., Mustika, S., Sugihartono, T., & Miftahussurur, M. (2022). Antimicrobial Resistance Profile by Metagenomic and Metatranscriptomic Approach in Clinical Practice: Opportunity and Challenge. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(5). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35625299/>
- WHO. (27 de setiembre del 2022). Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Wood, D., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome biology*, 20(1), 1-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wolf, J., Hubbard, S., Brauer, M., Ambelu, A., Arnold, B., Bain, R., Bauza, V., Brown, J., Caruso, B., Clasen, T., Colford Jr, J., Freeman, M., Gordon, B., Jhonston, R., Mertens, A., Prus-Ustun, A., Ross, I., Stanaway, J., Zhao, J., Cumming, O., & Boisson, S. (2022). Effectiveness of interventions to improve drinking water, sanitation, and handwashing with soap on risk of diarrhoeal disease in children in low-income and middle-income settings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 400(10345). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35780792/>
- Yeoh, Y., Sun, Y., Ip, L., Wang, L., Chan, F., Miao, Y., & Ng, S. (2022). Prevootella species in the human gut is primarily comprised of Prevootella copri, Prevootella stercorea and related lineages. *Scientific Reports*, 12(1). <https://www.nature.com/articles/s41598-022-12721-4>
- Zhang, X.-X., Zhang, T., & Fang, H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Microbiology and Biotechnology*, 82(3). <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-008-1829-z>
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., & Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1).

CÓMO CITAR ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Pablo Ramírez, N. (2023). *Resistencia antimicrobiana en aguas residuales urbanas y de hospitales de Huánuco determinadas mediante análisis metagenómico, 2021*. [Tesis de pregrado, Universidad de Huánuco]. Repositorio institucional UDH. <http://...>

ANEXOS

ANEXO 1

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título: “RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES URBANAS Y DE HOSPITALES DE HUÁNUCO DETERMINADAS MEDIANTE ANÁLISIS METAGENÓMICO, 2021”

PROBLEMA	OBJETIVOS	VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADORES	POBLACIÓN
Problema General	Objetivo General	V.I			
¿Cuál es la resistencia a antimicrobianos debido a la diversidad y la abundancia de genes de resistencia antimicrobiana basado en análisis metagenómicos en aguas residuales urbanas y de hospitales de Huánuco, 2021?	Evaluar la resistencia a antimicrobianos debido a la diversidad y la abundancia del gen de resistencia antimicrobiana basados en análisis metagenómico en aguas residuales urbanas y de hospitales en Huánuco, 2021.	Análisis metagenómico en aguas residuales urbanas y de hospitales en Huánuco. (Temperatura, genes)	<ul style="list-style-type: none"> Extracción de ADN Amplificación 	<p>Protocolo optimizado</p> <p>PCR de ciclo único</p>	Aguas residuales urbanas y de hospital ESSALUD, MINSA.
Problema Específico	Objetivo Específico	V.D			MUESTRA
¿Cuáles son los genes de resistencia antimicrobiana basado en análisis metagenómico en aguas residuales del hospital MINSA en Huánuco, 2021?	Determinar los genes de resistencia antimicrobiana basados en análisis metagenómicos en aguas residuales del hospital MINSA en Huánuco, 2021	Diversidad y abundancia de genes de resistencia antimicrobiana. (Temperatura, secuenciamiento de NGS, microorganismos)	<ul style="list-style-type: none"> Secuenciamiento de NGS Genes de resistencia a antibiotico Secuenciamiento de NGS 	<p>Microorganismos Ttaxonomia</p> <p>Secuencias homologas</p> <p>Microorganismos abundancia.</p>	<p>Aguas residuales de las viviendas urbanas</p> <p>Aguas residuales del hospital del MINSA y EsSalud</p>
¿Cuáles son los genes de resistencia antimicrobiana basado en análisis metagenómico en aguas residuales del hospital	Determinar los genes de resistencia antimicrobiana basados en análisis metagenómicos en aguas residuales del hospital EsSalud en Huánuco, 2021.				

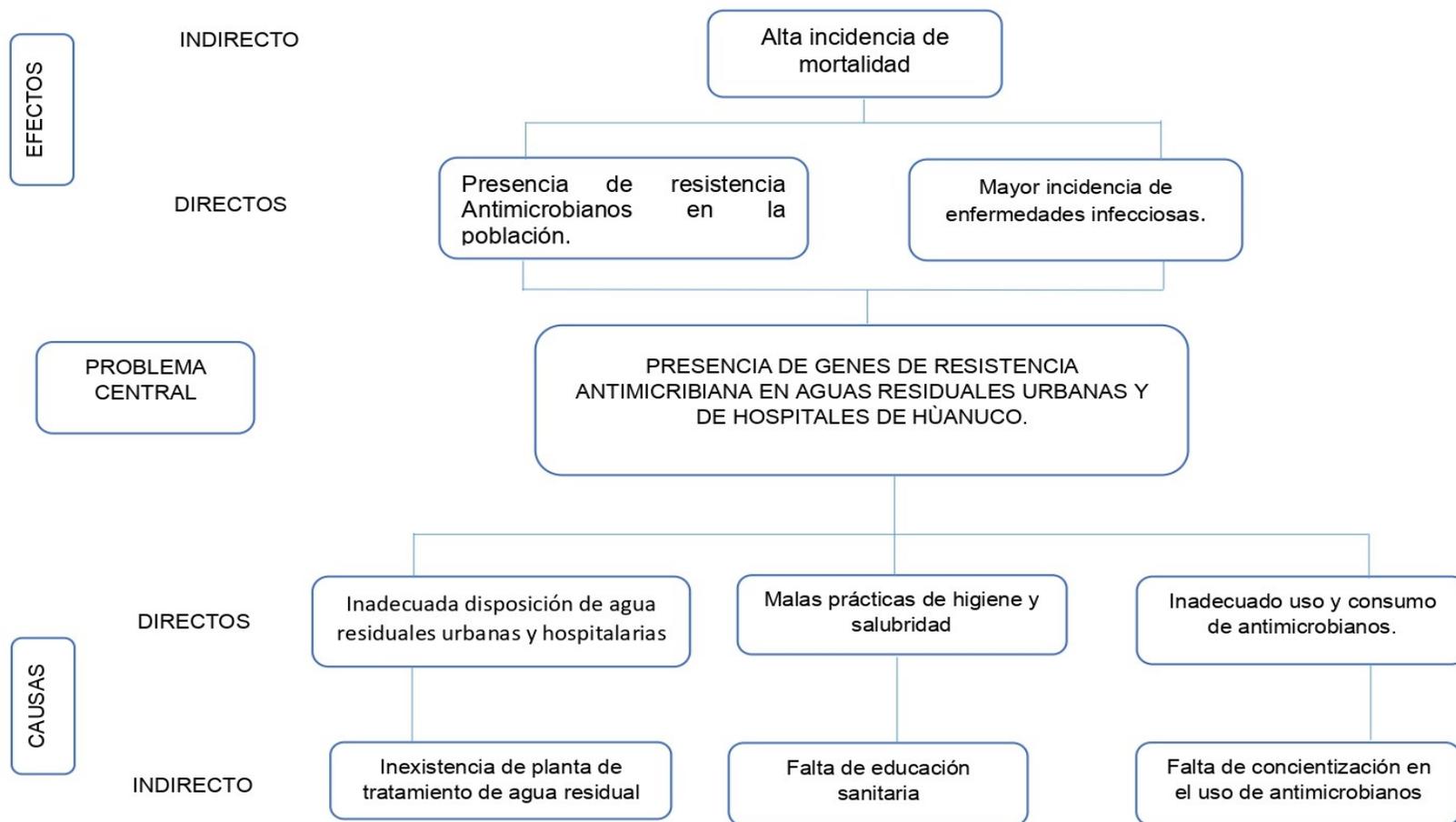
EsSalud en Huánuco,
2021?

¿Cuáles son los genes de
resistencia antimicrobiana
basado en análisis
metagenómicos en aguas
residuales Urbanas en
Huánuco, 2021?

Determinar los genes de
resistencia antimicrobiana
basados en análisis
metagenómicos en aguas
residuales urbanas en
Huánuco, 2021.

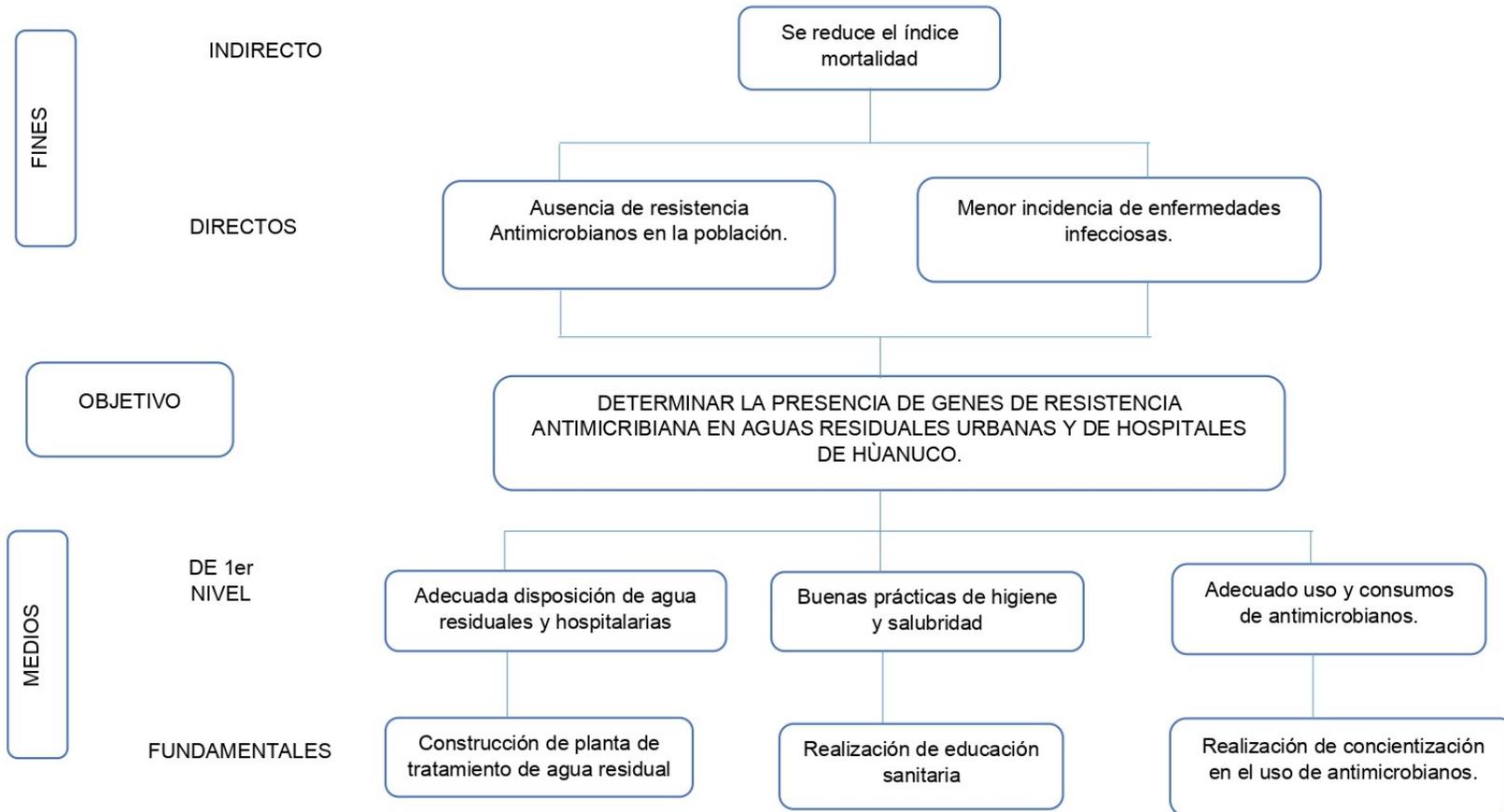
ANEXO 2

ÁRBOL DE CAUSAS Y EFECTOS



ANEXO 3

ÁRBOL DE FINES Y MEDIOS



ANEXO 4

RESOLUCIÓN DE APROBACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

Facultad de Ingeniería

RESOLUCIÓN N° 299-2021-D-FI-UDH

Huánuco, 22 de marzo de 2021

Visto, el Oficio N° 127-2021-C-PAIA-FI-UDH, mediante el cual el Coordinador Académico de Ingeniería Ambiental, remite el dictamen de los jurados revisores, del Trabajo de Investigación (Tesis) titulado "RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES URBANAS Y DE HOSPITALES DE HUÁNUCO DETERMINADAS MEDIANTE ANÁLISIS METAGENÓMICO, 2021", presentado por el (la) Bach. Nelis Rosalvina, PABLO RAMIREZ.

CONSIDERANDO:

Que, según mediante Resolución N° 006-2001-R-AU-UDH, de fecha 24 de julio de 2001, se crea la Facultad de Ingeniería, y;

Que, mediante Resolución de Consejo Directivo n° 076-2019-SUNEDU/CD, de fecha 05 de junio de 2019, otorga la Licencia a la Universidad de Huánuco para ofrecer el servicio educativo superior universitario, y;

Que, mediante Resolución N° 424-2020-D-FI-UDH, de fecha 20 de agosto de 2020, perteneciente a la Bach. Nelis Rosalvina, PABLO RAMIREZ se le designó como ASESOR(A) de Tesis al Dr. Heinner Hilario Guio Chunga, docente adscrito al Programa Académico de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería, y;

Que, según Oficio N° 127-2020-C-PAIA-FI-UDH, del Coordinador Académico quien informa que los JURADOS REVISORES del Trabajo de Investigación (Tesis) titulado: "RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES URBANAS Y DE HOSPITALES DE HUÁNUCO DETERMINADAS MEDIANTE ANÁLISIS METAGENÓMICO, 2021" presentado por el (la) Bach. Nelis Rosalvina, PABLO RAMIREZ, integrado por los siguientes docentes: Mg. Frank Erick Camara Llanos (Presidente), Mg. Elmer Riveros Agüero (Secretario) y Blgo. Alejandro Rolando Duran Nieva (Vocal), quienes declaran APTO para ser ejecutado el Trabajo de Investigación de (Tesis), y;

Estando a las atribuciones conferidas al Decano de la Facultad de Ingeniería y con cargo a dar cuenta en el próximo Consejo de Facultad.

SE RESUELVE:

Artículo Único. - APROBAR, el Trabajo de Investigación y su ejecución titulado: "RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AGUAS RESIDUALES URBANAS Y DE HOSPITALES DE HUÁNUCO DETERMINADAS MEDIANTE ANÁLISIS METAGENÓMICO, 2021" presentado por el (la) Bach. Nelis Rosalvina, PABLO RAMIREZ para optar el Título Profesional de Ingeniero(a) Ambiental del Programa Académico de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Huánuco.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE, ARCHÍVESE



Distribución:

Fac. de Ingeniería - PAIA - Asesor - Exp. Graduando - Interesado - Archivo.
BCR/||R/nto.

ANEXO 5

RESOLUCIÓN DE NOMBRAMIENTO DE ASESOR

UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO *Facultad de Ingeniería*

RESOLUCIÓN N° 2487-2022-D-FI-UDH

Huánuco, 05 de diciembre de 2022

Visto, el Oficio N° 932-2022-C-PAIA-FI-UDH presentado por el Coordinador del Programa Académico de Ingeniería Ambiental y el Expediente N° 382838-0000004352, de la Bach. **Nelis Rosalvina PABLO RAMIREZ**, quien solicita cambio de Asesor de Tesis.

CONSIDERANDO:

Que, de acuerdo a la Nueva Ley Universitaria 30220, Capítulo V, Art. 45º inc. 45.2, es procedente su atención, y;

Que, según el Expediente N° 382838-0000004352, presentado por el (la) Bach. **Nelis Rosalvina PABLO RAMIREZ**, quien solicita cambio de Asesor de Tesis, para desarrollar su trabajo de investigación, y;

Que, con Resolución N° 424-2020-D-FI-UDH, de fecha 20 de agosto de 2020, en la cual se designa como Asesor de Tesis de la Bach. **Nelis Rosalvina PABLO RAMIREZ** al Dr. Heinner Hilario Guio Chunga, quien no tiene vínculo laboral con esta universidad, y;

Que, según lo dispuesto en el Capítulo II, Art. 31 del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad de Huánuco vigente, es procedente atender lo solicitado, y;

Estando a las atribuciones conferidas al Decano de la Facultad de Ingeniería y con cargo a dar cuenta en el próximo Consejo de Facultad.

SE RESUELVE:

Artículo Primero. - **DEJAR SIN EFECTO**, la Resolución N° 424-2020-D-FI-UDH, de fecha 20 de agosto de 2020.

Artículo Segundo. - **DESIGNAR**, como nuevo Asesor de Tesis de la Bach. **Nelis Rosalvina PABLO RAMIREZ** a la Mg. Bertha Lucila Campos Ríos, Docente del Programa Académico de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y ARCHÍVESE



UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO
FACULTAD DE INGENIERÍA
Ing. Ethel Ibarra Manzano Lozano
SECRETARÍA DOCENTE



UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO
DECANATO
Mg. Bertha Campos Ríos
DECANA DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA

Distribución:
Fac. de Ingeniería - PAIA - Asesor - Mat. y Reg.Acad. - Interesado - Archivo.
BCR/EJML/rto

ANEXO 6

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

DATOS DE CAMPO

Punto de Muestra	Localidad/Jr/ Av	Distrito	Provincia	Departamento	Coordenadas UTM		Altura (m.s.n.m)	Fecha	pH	T °C	COND. Us/cm
					Este	Norte					
DIA 1											
P1	Amariles	Amariles	Huánuco	Huánuco	364107.258	890137.5047	1916	Setiembre 2021	7.81	21 °C	1010 Us/cm
P2	Amariles	Amariles	Huánuco	Huánuco	364476.130	890224.032			7.53	20 °C	355 us/cm
P3	Huánuco	Huánuco	Huánuco	Huánuco	364479.110	890224.8022			7.25	22 °C	3117 uc/cm
DIA 2											
P1	Amariles	Amariles	Huánuco	Huánuco	364107.258	890137.5047	1916	Noviembre 2021	7.43	22 °C	1529 Us/cm
P2	Huánuco	Amariles	Huánuco	Huánuco	364476.130	890224.032			7.83	21 °C	933 Us/cm
P3	Huánuco	Huánuco	Huánuco	Huánuco	364479.110	890224.8022			7.00	20 °C	326 Us/cm

ANEXO 8

PANEL FOTOGRÁFICO

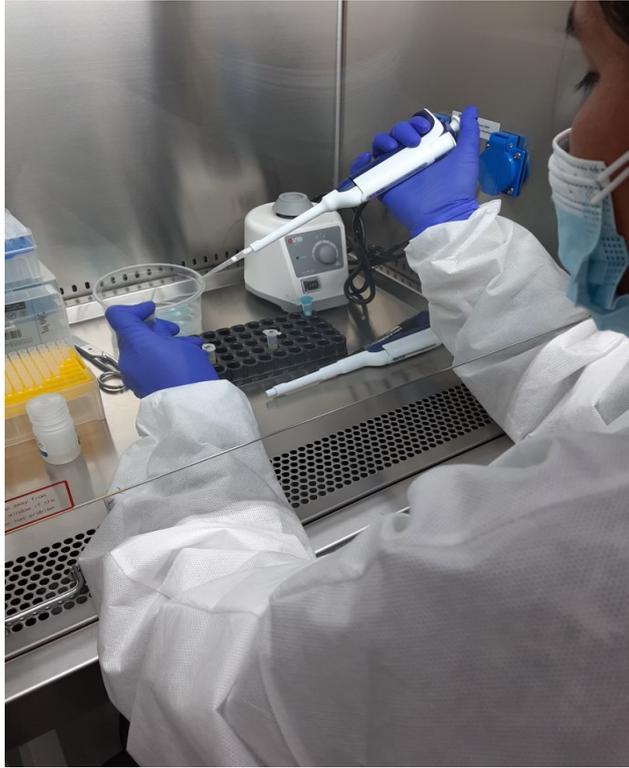
Vista Fotográfica de la toma medición de parámetros In situ, en aguas Residuales Urbanas.



Vista fotográfica del rotulado de muestras



Vista fotográfica del Procesamiento de Muestras en Laboratorio de genética y Biología Molecular de la Universidad de Huánuco.



Vista fotográfica de la obtención del ADN de las muestras realizadas.

