



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO DE LA TESIS

Resistencia a antibióticos de bacterias patógenas ESKAPE
(*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter
baumannii*) aisladas de agua y sedimento del río Atoyac.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Jazmin Rosas Sacramento

DIRECTOR (A):

Dra. Fabiola Avelino Flores

CODIRECTOR (A)

Dra. María del Carmen Guadalupe Avelino Flores



Septiembre, 2025



AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Fabiola Avelino Flores por confiar en mí y guiarme para poder desarrollar este trabajo de investigación, por siempre estar a disposición de enseñarme nuevas cosas, aclararme dudas, por su tiempo y esfuerzo, por aceptar las ideas que enriquecieron este trabajo; además de buscar siempre los recursos y obtenerlos.

Así también por ayudarme a desarrollar y a obtener habilidades para obtener una formación integral como profesional.

Y a la vicerrectoría de investigación en estudios de posgrados (VIEP) por el apoyo al proyecto 100319944-VIEP2024.

DEDICATORIA

A mis padres, que día a día se esfuerzan y trabajan muy duro para que mis hermanos y yo podamos cumplir nuestros sueños, metas y obtener una mejor calidad de vida.

A mis hermanos, Miguel, Luis y Ángeles, que son mis compañeros de risas, bromas, enojos, y aliados que han estado en todo momento ahí para mí en todo momento.

ÍNDICE

1.RESUMEN.....	5
2.INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. Mecanismos de acción de los antibióticos sobre las bacterias	9
2.2. Grupos de antibióticos usados en el tratamiento del grupo ESKAPE	10
3. Antecedentes generales.....	12
3.1. <i>Enterococcus faecium</i>	12
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.3. <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
3.4. Técnicas de identificación o caracterización de <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> y <i>A. baumannii</i>	14
4. Antecedentes específicos	15
4.1. Bacterias del grupo ESKAPE en el ambiente.....	15
4.2. Grupo ESKAPE en diferentes cuerpos de agua panorama nivel internacional.....	16
4.3. Grupo ESKAPE en diferentes cuerpos de agua panorama en México.....	16
4.4. Río Atoyac.....	17
4.5. Calidad del agua del río Atoyac.....	18
5. Propuesta de control de <i>S. aureus</i> multirresistentes.....	18
6. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	19
7.METODOLOGÍA.....	21
7.1. Estructura de la investigación	21
7.2. Puntos de muestreo.....	21
7.3. Aislamientos e identificación bioquímica y/o molecular de <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> y <i>A. baumannii</i>	22
7.4. Identificación molecular de <i>E. faecium</i> y <i>S. aureus</i>	23
7.4.1. PCR.....	24

7.5. Perfil de resistencia.....	25
7.6. Propuesta de control de <i>S. aureus</i> multirresistentes.....	28
8.RESULTADOS.....	28
8.1. Aislamiento e identificación bioquímica.....	28
8.2. Identificación molecular de <i>E. faecium</i> y <i>S. aureus</i>	32
8.2.1. Extracción de ADN.....	33
8.2.2. PCR.....	35
8.3. Perfil de resistencia de los aislados de <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> y <i>A. baumannii</i>	36
8.4 Propuesta de control de <i>S. aureus</i> multirresistentes.....	46
9. DISCUSIÓN.....	48
10. CONCLUSIÓN.....	52
11. ANEXO.....	54
12. BIBLIOGRAFÍA.....	56

1. RESUMEN

La multirresistencia a los antibióticos se ha convertido en una crisis de salud pública a nivel mundial. En donde un grupo de bacterias llamado ESKAPE resalta por su multirresistencia y están reportadas de vigilancia a nivel mundial siendo parte de la lista de bacterias patógenas de alta prioridad y prioridad crítica según la OMS. Este grupo está conformado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*

En este estudio se realizó el aislamiento, caracterización bioquímica y molecular y perfil de resistencia de *E. faecium*, *S. aureus*, y para *A. baumannii* solo se realizó la caracterización bioquímica provenientes de muestras de agua y sedimento del río Atoyac en los Estados de Puebla y Tlaxcala- México.

Se aislaron 7 cepas de *E. faecium* las cuales presentaron 100% de resistencia a vancomicina y fueron positivos al gen *vanA*.

Para *S. aureus* se recuperaron 14 en el estado de Puebla y uno en el estado de Tlaxcala presentando resistencia de espectro extendido (XDR), estos aislados también presentaron un 95 % de resistencia al grupo de las penicilinas y un 73% de resistencia al antibiótico de vancomicina, otro punto de las cepas de *S. aureus* fue que dieron negativos al gen *Nuc* y positivos a coagulasa.

En los aislados de *A. baumannii* recuperados fueron solo dos uno en el estado de Puebla y otro en el estado de Tlaxcala donde cumplieron con diferente resistencia al grupo de antibióticos de carbapenémicos.

En general los microorganismos aislados recuperados cumplieron con el requisito de ser considerados patógenos de alta prioridad y de prioridad crítica según la OMS.

2. INTRODUCCIÓN

Los patógenos bacterianos de la actualidad se han presentado en aumento y esto implica una crisis de la salud pública a nivel mundial. (Bertrand et al., 2023). La resistencia a los diferentes grupos de antibióticos va en aumento por el uso inadecuado de ellos y que las bacterias han encontrado la forma de evadir el efecto del antibiótico. Este es el caso del grupo llamado ESKAPE conformado por seis bacterias patógenas *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp*, considerado altamente virulento y resistente. (Bertrand et al., 2023).

- ***Enterococcus faecium*** es una bacteria Gram (GP), anaerobia facultativa que tiene una amplia presencia en suelos, agua y plantas, además de formar parte de microbiota intestinal de humanos y animales. Este patógeno está asociado con múltiples infecciones en heridas, urinarias, dentales, abdominales, bacteriemia, endocarditis, especialmente en pacientes inmunodeprimidos complicando su recuperación (De Oliveira, 2020).
- ***Staphylococcus aureus*** es una bacteria Gram (GP) con un característico crecimiento en forma de racimos de uva, se puede encontrar en zonas húmedas, en el humano la podemos encontrar en boca, axilas y fosas nasales. Las infecciones causadas por este patógeno eran tratadas con penicilina, sin embargo, el aumento de la resistencia a antibióticos ha provocado que actualmente el 90% de los aislamientos clínicos de *S. aureus* son resistentes a la penicilina y aproximadamente el 60% de éstos son resistentes a la meticilina, que era empleado como última opción (Chávez-Jacobo, 2020).

- ***Klebsiella pneumoniae*** es un bacilo Gram (GN) perteneciente a la familia Enterobacteriaceae se encuentra presente en la microbiota de los mamíferos. En humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. La importancia de esta bacteria se debe a que es una de las principales causas de neumonía e infecciones tracto-urinarias en hospitales.
- ***Acinetobacter baumannii*** es una bacteria Gram negativos, es un patógeno oportunista y altamente resistente al ambiente, se asocia con infecciones en la piel, bacteriemia, meningitis, neumonía e infección de heridas. *A. baumannii* su ingreso al cuerpo puede ser a través de heridas abiertas, vías intravenosas y respiradores, debido a su capacidad para crecer en un amplio rango de temperaturas, pH y contenido de nutrientes, puede sobrevivir dentro del cuerpo humano.
- ***Pseudomonas aeruginosa*** es una bacteria Gram negativos, anaerobia facultativa, que puede encontrarse en animales, plantas y suelo, presenta una alta tasa de muertes en pacientes inmuno-comprometidos. Esta bacteria presenta una resistencia intrínseca a múltiples antibióticos: especialmente puede desarrollar resistencia durante el tratamiento con carbapenémicos, principalmente imipenem.
- ***Enterobacter spp.*** un bacilo Gram negativos, anaerobio facultativo que se puede encontrar encapsulado y se asocia comúnmente con infecciones en vías urinarias y del tracto respiratorio, aunque también se encuentra en septicemias en pacientes inmuno-debilitados. *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* son las bacterias de carácter representativo de esta familia y las más frecuentes asociadas con multirresistencia a diferentes antibióticos. (Chávez-Jacobo, 2020).

Este grupo se ha caracterizado por ser responsable de la mayoría de las

infecciones nosocomiales que han presentado una alta resistencia a antibióticos (Denissen *et al.*, 2022). Actualmente las bacterias ESKAPE representan una importante amenaza para la salud, con una estimación de 1.500 millones de infecciones microbianas reportadas a nivel mundial, causando más de 4 millones de muertes (Mohtar *et al.*, 2023). El uso persistente de antibióticos ha provocado la aparición de bacterias multirresistentes, que provocan que los fármacos más eficaces no tengan efecto. (Mulani *et al.*, 2019)

En consecuencia, las infecciones causadas por los patógenos ESKAPE son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año actualiza una lista de patógenos bacterianos prioritarios, que las clasifica en tres categorías (crítica, alta y media) el objetivo de esto es obtener nuevos y mejores tratamientos para tratar de disminuir o eliminar la resistencia a los antibióticos. (OMS/OPS, 2024).

Los patógenos de alta prioridad como *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus* farmacorresistentes y *Acinetobacter baumannii* de prioridad crítica causan problemas específicos para la salud pública, como infecciones persistentes y resistencia a varios antibióticos, por lo que requieren intervenciones de salud pública y estudios específicos.

2.1. Mecanismos de acción de los antibióticos sobre las bacterias

Existen diferentes mecanismos de acción de resistencia bacteriana, entre ellos destaca el uso por parte de las bacterias de enzimas hidrolíticas, que participan en el mecanismo de acción contra los betalactámicos inhiben o interrumpen la síntesis de la pared celular, en donde también activan auto-lisinas o enzimas líticas que llevan a la muerte a la bacteria.

Otro mecanismo es la modificación del sitio activo en donde sucede que un

aminoácido sufre una modificación y por lo tanto genera un blanco diferente y en consecuencia disminuye la afinidad de unión con el antibiótico. (Moreno *et al.*, 2009).

El mecanismo de eflujo es a través de proteínas de transporte de metabolitos en la membrana y otros funcionan hasta que estén en contacto con el antimicrobiano, esto contribuye a disminuir la concentración del antibiótico y su efecto.

Estos mecanismos pueden ser utilizado tanto por grupos de bacterias gram negativas como positivas. (Treviño *et al.*, 2022).

En el caso de las bacterias gram negativas el mecanismo específico es la disminución de la permeabilidad, estos pueden ser cambios o disminución de las porinas que puede bloquear la entrada del antimicrobiano. (Moreno *et al.*, 2009).

2.2. Grupos de antibióticos usados en el tratamiento del grupo ESKAPE.

Para el tratamiento de estos patógenos se usan diferentes grupos de antibióticos como lo son:

-Aminoglucósidos: su mecanismo de acción es que se unen a una fracción del ribosoma de la bacteria, por lo que se producen proteínas defectuosas o inhibición de la síntesis proteica, este grupo de antibióticos es utilizado para *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, los antibióticos utilizados son amikacina, kanamicina y gentamicina. (Obando *et al.*, 2020).

-Penicilinas: éstas actúan afectando la síntesis de la pared celular y se activan enzimas autolíticas que dan origen a la destrucción de la bacteria (Obando *et al.*, 2020), este grupo de antibióticos es mayormente utilizado para diferentes patógenos, para el caso del tratamiento del grupo ESKAPE se utilizan ampicilina, penicilina y dicloxacilina.

-Tetraciclinas: su modo de acción es bloquear la síntesis de proteínas por lo tanto

impide la unión con el ARNt, este grupo es utilizado para ambos grupos de bacterias Gram positivas y negativas, para el tratamiento solo se usa el antibiótico de tetraciclina. (Canale-Guerrero *et al.*, 2011).

-Anfenicoles: actúan inhibiendo la síntesis proteica en la unidad 50s de los ribosomas de manera irreversible, es por eso que es utilizado como bacteriostático, y para diferentes infecciones bacterianas.

-Cefalosporinas: su modo de acción parecido que el grupo de las penicilinas, este grupo de antibióticos en sus diferentes generaciones han sido más efectiva para *P. aureginosa*, aunque con excepción de cefalotina que es más activa frente cocos gram-positivos. (Esparza Olcina MJ, 2008).

-Macrólidos: su modo de acción es inhibiendo la síntesis proteica bacteriana, como es el antibiótico de eritromicina.

-Glucopéptidos: el modo de acción de la vancomicina su modo de acción es la inhibición en la síntesis de la pared celular, perteneciente a este grupo de antibióticos es importante por la OMS para *S. aureus* y *E. faecium*.

-Quinolonas: el antibiótico de ciprofloxacino es específico para *S. aureus* y su modo de acción es específicamente la ADN-girasa. (Esparza Olcina MJ, 2008).

-Lincosamidas: su modo de acción de este grupo de antibióticos es la metilación de la (A)adenina a nivel del ácido ribonucleico ribosomal 23S, en la subunidad 50S del ribosoma. (Stahl, J. 2009b). La Clindamicina es representante de este grupo siendo preferible en su uso y es activamente frente a gram positivos. (Esparza Olcina MJ, 2008).

-Trimetoprima y sulfametoxazol ambos antibióticos bloquean pasos de los metabolismos de folato de las bacterias. (Werth, B. J. 2024).

-Carbapenémicos: actúan inhibiendo enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas, por lo tanto, se detiene la síntesis de la pared celular y se debilita la estructura protectora de la bacteria causando la lisis y muerte de la bacteria. (Obando *et al.*, 2020). Este grupo de antibióticos es ampliamente

utilizado para el tratamiento de *A. baumannii* por ejemplo meropenem e imipinem que son considerados como antibióticos de primera elección y de uso hospitalario. (Kanafani *et al.*, 2023).

3. ANTECEDENTES GENERALES

3.1. *Enterococcus faecium*.

Los enterococos se descubrieron por primera vez en heces humanas en 1899. Sin embargo, hasta 1984, todavía se consideraban parte del género *Streptococcus*. *El Streptococcus faecalis* se describió por primera vez en 1906 cuando se aisló el microorganismo de un paciente con endocarditis. *El Streptococcus faecium* se detectó por primera vez en 1919. Posteriormente, los estreptococos pertenecientes al grupo D se dividieron en dos grupos. Esta división se realizó en base a estudios que demostraron diferencias bioquímicas y diferencias con los ácidos nucleicos (estudios de homología ADN-ARNr y 16SrRNA). *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* se colocaron en el grupo de los enterococos, al que pertenecen más de 50 especies. (Murray BE, 1990).

Es una bacteria Gram (Gp), anaerobia facultativa que tiene una amplia presencia en suelos, agua y plantas, además de formar parte de microbiota intestinal de humanos y animales. Este patógeno está asociado con múltiples infecciones en heridas, vías urinarias, dentales, abdominales, bacteriemia, endocarditis, especialmente en pacientes inmunodeprimidos complicando su recuperación.

Los *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV) ocupa entre el segundo y tercer lugar dentro de los patógenos causantes de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud, por lo que es considerado un problema de salud mundial.

Por lo tanto, la OMS considera a *E. faecium* como un patógeno de alta prioridad. La resistencia a vancomicina en los enterococos está mediada por grupos de genes *van*. (O'Driscoll, T., y Crank, C. W. 2015).

3.2. *Staphylococcus aureus*.

Es una bacteria descubierta en 1880 por el cirujano escocés Alexander Ogston (1844-1929), quien encontró que el pus producido en las heridas quirúrgicas era generado por esta bacteria. Posteriormente, en 1882, Ogston le dió el nombre de "*Staphylococcus*", del griego "Staphylo" que significa "racimo de uvas". En 1884, el cirujano alemán Anton J. Rosenbach (1842-1923) identificó *S. aureus* y la nombró de acuerdo con su pigmentación que producía: *S. aureus*, del latín "aurum" por el pigmento color oro. (Pasachova *et al.*, 2019).

Esta bacteria está clasificada como un coco Gram positivo que se agrupa en racimos, es β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo. Se describe que este microorganismo es parte de la flora normal de los seres humanos encontrándose principalmente en la piel, en la porción nasal faríngea, y axilas.

Se ha descrito a *S. aureus* como la principal causa de bacteriemia nosocomial en Latinoamérica, como la segunda causa de bacteriemia en hospitales. Aunque cualquier persona puede llegar a adquirir una infección por este microorganismo, hay algunos factores de riesgo que son importantes; por ejemplo, los niños menores de dos años, diabéticos, pacientes inmunodeprimidos, o que hayan sido sometidos a una cirugía reciente, entre otras, incrementan la posibilidad de sufrir una infección por *S. aureus*. (Pasachova *et al.*, 2019).

Desde el descubrimiento de este microorganismo se han utilizado diferentes tratamientos. En 1940 la penicilina G era el antibiótico de elección para tratar estas infecciones; sin embargo, algunas cepas adquirieron resistencia no solo a este antibiótico, sino a la oxacilina. (Castellano *et al.*, 2010).

3.3. *Acinetobacter baumannii*.

Acinetobacter baumannii es un patógeno oportunista gram negativo que se considera un patógeno de prioridad crítica según la OMS, es un coccobacilo no fermentativo, con amplio espectro de resistencia a los antibióticos, debido a la baja permeabilidad de la membrana externa y bombas de flujo (Baquero *et al.*, 2018)., se ha convertido en un patógeno nosocomial debido a su multiresistencia y en la coinfección con SARS-CoV-2. La presencia de otras infecciones por *A. baumannii* pueden ser bacteriemias nosocomiales. El tracto respiratorio es el principal sitio de origen y las neumonías son las infecciones más frecuentes.

Aun cuando el género *Acinetobacter* se determinó en 1971, las modificaciones a la nomenclatura se establecieron en 1986, cuando se estandarizaron las especies por medio de la hibridación ADN-ADN, con la cual se identificaron 17 especies. (Aguirre *et al.*, 2010).

3.4. Técnicas de identificación o caracterización de *E. faecium*, *S.aureus* y *A. baumannii*.

La identificación de *Enterococcus spp.* se realiza con diferentes pruebas bioquímicas para diferenciar si se trata de *E. faecalis* o *E. faecium*, siendo las siguientes: catalasa (negativa), hemólisis (positivo), NaCl 6,5% (positiva), bilis esculina (positivo) y PYR (pirrolinodil- β -naftilamidasa) positiva. (Hervé *et al.*, 2007). En las pruebas bioquímicas complementarias se debe determinar movilidad en medio MÍO (movilidad-indol-ornitina) y la presencia de pigmento amarillo. (Hervé *et al.*, 2007).

La identificación de *S. aureus* se realiza mediante cultivo en medios selectivos y por pruebas de identificación bioquímica más empleadas, que siguen siendo el estándar de oro para su identificación, y a continuación se detallan:

-Baird Parker: Es un medio de recuento para *S. aureus* es la presencia de colonias negras, debido a la reducción de telurito de potasio, con un halo transparente que revela actividad lipolítica provocado por la yema de huevo, aunque las colonias pueden confirmarse con una tinción de Gram.

-Agar Sal de manitol: Se emplea para el aislamiento selectivo de *S. aureus* en donde los *S. aureus* coagulasa (positiva) son colonias amarillas y las colonias negativas a coagulasa son colonias rojas.

-Catalasa: Se utiliza para saber si la bacteria produce la enzima catalasa. (Zendejas *et al.*, 2014).

-Coagulasa: se utiliza como un marcador de virulencia y sirve para diferenciar las coagulasa (positiva) de otras especies. (Galli *et al.*, 2019).

A. baumannii es un patógeno que no fermentan la glucosa y son aerobios estrictos, inmóviles, catalasa positivos y oxidasa negativos. (Salazar *et al.*, 2005).

La confirmación de patógenos mediante técnicas moleculares se puede llevar a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizada en la detección de *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii* a partir de muestras clínicas y de alimentos.

4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

4.1. Bacterias del grupo ESKAPE en el ambiente.

La presencia de los patógenos ESKAPE en el medio ambiente se debe a la contaminación a través de derrames de aguas residuales, desechos hospitalarios que no se han manejado correctamente y que están presentes en los cuerpos de agua. (Denissen *et al.*, 2022). A estos se les considera como ambientes no

controlados por que no es un área libre donde no se pueden controlar ciertos parámetros como lo son: luz, pH, temperatura y la presión.

4.2. Grupo ESKAPE en diferentes cuerpos de agua panorama nivel internacional.

En la actualidad en diferentes países se han aislado bacterias del grupo ESKAPE en el ambiente como es el caso de distintos reservorios de agua, estos patógenos oportunistas causan millones de infecciones en la salud humana por la exposición al realizar actividades cotidianas o recreativas en los cuerpos de agua. Debido a lo anterior, se han desarrollado diferentes estudios alrededor del mundo para aislar, evaluar y determinar su multirresistencia. *Enterococcus spp* que sirve como indicador de contaminación fecal en aguas residuales, también ha sido recuperado de diferentes fuentes de agua examinadas, como son muestras obtenidas de algunas playas de EUA (Byappanahalli *et al.*, 2012). Por otra parte, el patógeno *S. aureus* ha sido aislado con alta frecuencia de agua marina y de playas, cercanas a las descargas de aguas residuales de áreas industriales. (Thapaliya *et al.*, 2017). *Acinetobacter baumannii* se ha aislado en el río Sena en el centro de París Francia. (Girlich *et al.*, 2009). Estos estudios indica que los patógenos del grupo ESKAPE no están restringidos al ámbito hospitalario.

4.3. Grupo ESKAPE aislado en cuerpos de agua su panorama en México.

En algunos estudios que se han realizado en México, se han obtenido aislados de patógenos del grupo ESKAPE, en Estados como Chihuahua, Nayarit y Estados fronterizos que colindan con el río Grande. En chihuahua su objetivo del estudio fue identificar patógenos causantes de patologías gastrointestinales y causantes de brotes diarreicos en diferentes cuerpos de agua del estado y a lo largo de la

cascada de Basaseachi, usando como técnica el número más probable(NMP) conforme a norma, para la identificación de coliformes totales y fecales, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca* y posteriormente realizaron la identificación de enteropatógenos y su perfil de resistencia por auto scan, obteniendo como resultado algunos aislados multirresistentes.(Delgado *et al.*, 2016).

En el Estado de Nayarit el estudio realizado tuvo como objetivo obtener aislados de *Enterococcus faecalis* y *faecium* de muestras de agua del río Mololoa en el que los caracterizaron microbiológica y molecularmente. (Héctor *et al.*, 2017).

En el estudio llevado a cabo en los Estados fronterizos del río Grande, se logró aislar diferentes bacterias patógenas que mostraron multirresistencia a diferentes grupos de antibióticos, de muestras provenientes de agua y sedimentos del río (Fuentes *et al.*, 2019). Estos estudios sientan las bases para seguir analizando los distintos cuerpos de agua en México, para realizar un plan de estrategias y lograr una disminución en la multirresistencia de estos patógenos ya que se encuentran en un ambiente no controlado y deja en claro que es una alerta para la salud pública y de contaminación evidente para las comunidades aledañas a los cuerpos de agua. Esto conlleva a la importancia de realizar un estudio en otros ríos contaminados, como el río Atoyac que es considerado uno de los ríos más contaminados en México y en su trayectoria atraviesa el Estado de Puebla y Tlaxcala.

4.4. Río Atoyac.

Uno de los ríos más importantes de México es el río Atoyac que tiene una longitud aproximada de 200 kilómetros cuadrados, el Río Atoyac nace en la sierra Nevada del Estado de Puebla, desciende y se interna al suroeste de Tlaxcala, hasta descargar sus aguas en la presa Valsequillo. (SEMARNAT. 2022).

Aproximadamente recorre 19 municipios de los Estados de Puebla y Tlaxcala, en la mayoría de la comunidad aledaña a este cuerpo de agua lo usan como sustento para la producción agrícola, en la trayectoria del río se han asentado distintas industrias tales como automotrices, textiles, hospitalarias, entre otras, cuyas descargas de aguas residuales no son tratadas ni controladas que van directo al río aumentando la contaminación. Por lo tanto, presenta un nivel alto de contaminación y es identificado como uno de los ríos más contaminados en México, representa un problema evidente su contaminación ambiental y de salud para las comunidades cercanas. (SEMARNAT. 2022).

4.5. Calidad del agua del río Atoyac

Referente a la norma NOM-001-SEMARNAT-1996 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales. Se han reportados parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que forman parte de los contaminantes del cauce del río Atoyac por CONAGUA. Los coliformes fecales están asociados a contaminación por diferentes patógenos, como podría ser *Escherichia coli* con esto se indica la deficiencia del manejo de aguas residuales y evidencia la contaminación de agua superficial y sedimento del río Atoyac. (Hernández-Castillo., 2021).

5. Propuesta de control para aislados de *S. aureus* multirresistentes

El aumento de bacterias multirresistentes en la actualidad es una problemática existente y se han buscado estrategias para disminuir su carga bacteriana en ambientes no controlados. (Aloke *et al.*, 2022). Un panorama similar se observó durante el desarrollo del presente estudio en donde los aislados recuperados de muestras de agua y sedimento del río Atoyac presentaron multirresistencia a diferentes grupos de antibióticos y es por eso que surge la necesidad de

estrategias que no dañen o aumente la contaminación, y es por eso que una estrategia de química verde nos sirve como control para disminuir su presencia de *S. aureus* en ambientes no controlados.

Una alternativa está siendo la nanotecnología con nanopartículas de oro y plata sintetizadas con diferentes métodos físicos, químicos y biológicos. (Mulani *et al.*, 2019). Las nanopartículas se definen como partículas que deben cumplir con una de sus dimensiones mida de 1 a 100 nanómetros y su caracterización se basa en su forma, y tamaño con técnicas como espectroscopia de uv-vis. (Louise Saul., 2019). Aunque su importancia sería dirigirlos a los aislados obtenidos en este estudio de *S. aureus* y disminuir su carga bacteriana en el río Atoyac.

Nanopartículas con síntesis verde las fuentes utilizadas para su síntesis pueden ser extractos de plantas u otros microorganismos, sus propiedades de las nanopartículas destaca su capacidad antibacteriana por su tamaño nanométrico por esto presentan una mayor relación de volumen/superficie por la creciente resistencia a múltiples antibióticos de las bacterias en la actualidad es una buena alternativa de la química verde. (Álvarez *et al.*, 2025).

El ajo (*Allium sativum*) es un bulbo perteneciente a la familia *Liliaceae*, ha sido utilizado con fines curativos desde hace bastante tiempo. (Ramírez *et al.*, 2016). En los últimos tiempos se ha incrementado el número de estudios sobre la efectividad del ajo. En diversas preparaciones, el ajo ha demostrado que la alicina exhibe un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias gram-negativas y gram-positivas. (Ahmad *et al.*, 2013).

La propuesta de control para disminuir la carga bacteriana es con nanopartículas de metal con síntesis verde (Ajo), aplicado en un ambiente no controlado como lo es el río Atoyac.

6. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

- Justificación

Actualmente el grupo ESKAPE es conocido por su resistencia a múltiples antibióticos y se considera con alto impacto por lo que la OMS los clasifica como patógenos de vigilancia de alta prioridad y de prioridad crítica, representando una crisis de salud pública a nivel mundial. Diferentes investigadores alrededor del mundo y en México han realizado estudios en los cuales se han enfocado a lograr recuperarlas de cuerpos de agua y evaluar su multirresistencia. (Aguilar *et al.*, 2023).

Es de suma importancia conocer si existen bacterias del grupo ESKAPE en un vehículo de diseminación como lo es el río Atoyac que es un ambiente no controlado en México.

Sería importante recuperar *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii* pertenecientes al grupo ESKAPE y realizar una caracterización bioquímica y/o molecular y un monitoreo constante de su resistencia a diferentes antibióticos en muestras de agua y sedimento del río Atoyac ya que en la actualidad se carece de esta información.

Otro de los aspectos importantes en los ambientes no controlados con respecto a las bacterias del grupo ESKAPE es que al ser multirresistentes pueden transferir este material genético por conjugación a otras bacterias incluso ambientales o bien cuando mueren y se lisan pueden liberar material genético que puede ser transferido a otros grupos bacterianos, tal es el caso de los genes *vanA* de *Enterococcus faecium* a *S. aureus* confiriendo resistencia a vancomicina.

- Objetivos

Objetivo general.

Determinar el perfil de resistencia para aislados del grupo ESKAPE: *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii* provenientes del río Atoyac.

Objetivos específicos.

- Estandarización de la metodología para el aislamiento y caracterización de *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii*.
- Aislar y caracterizar *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii* de muestras de agua y sedimentos provenientes del río Atoyac.
- Obtención del perfil de resistencia de los aislados de *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii* de muestras de agua y sedimentos provenientes del río Atoyac.

7. METODOLOGÍA.

7.1. Estructura de la investigación.

Se realizó en 4 fases, en la primera fase fue una estandarización de los medios a utilizar para la recolección y el aislamiento de estos patógenos, la segunda fase fue la selección de los puntos a muestrear, la tercera fase aislar y caracterizar bioquímicamente y/o molecularmente a los microorganismos en estudio, por último, se realizó el perfil de resistencia de los aislados de *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii*.

7.2. Puntos de muestreo.

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron muestras de agua y sedimento del río Atoyac por lo que se eligieron 2 puntos en el estado de Puebla y otros 2 puntos en el estado de Tlaxcala.

La localización de los cuatro puntos de muestreo es: El primer punto se encuentra en las coordenadas 19°20'37.9"N 98°10'48.8"W, el segundo punto se encuentra en las coordenadas 19°20'25.9"N 98°12'04.9"W, el tercer punto se localiza en las coordenadas 19°01'30.9"N 98°12'53.9"W y el cuarto punto se localiza en las coordenadas 19°01'19.1"N 98°13'42.4"W. observados en la Figura 1.

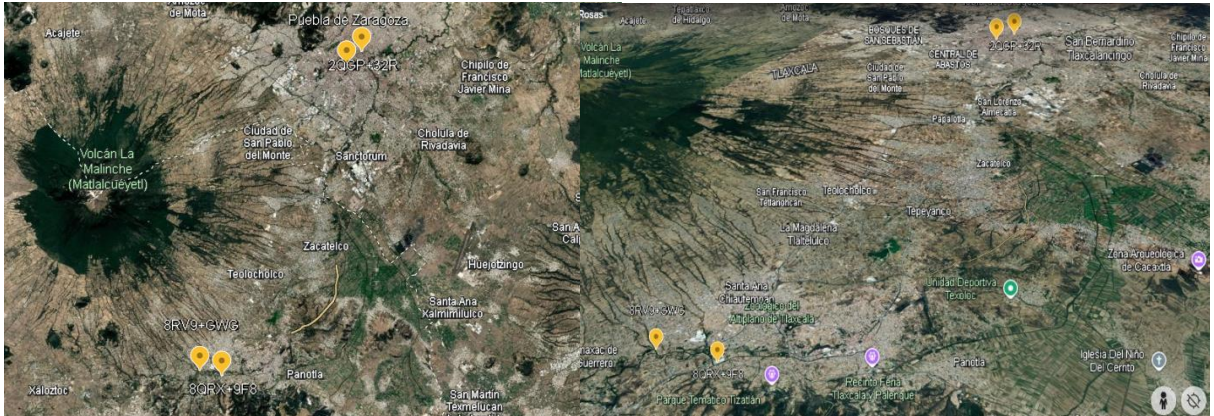


Figura 1. Puntos de ubicación geográfica de donde se recolectaron las muestras de agua y sedimento del río Atoyac obtenidos de Google Earth en donde se observan en ambas imágenes la distancia y el acercamiento de los 4 puntos, dos puntos localizados en la ciudad de Puebla y dos puntos en la colindancia con Tlaxcala.

7.3 Aislamiento e identificación bioquímica y/o molecular de *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii*

La estandarización de los medios de cultivo para la recuperación y el aislamiento de *E. faecium* se realizó tomando como referencia a la norma NMX042-SCFI-2015-AA y a la metodología propuesta en el artículo “*Enterococcus sp* parte II” (Hervé *et al.*, 2007). De los diferentes medios que inicialmente fueron propuestos para el aislamiento de *Enterococcus*, el medio EVA (etil- cristal violeta-azida de sodio) fue el seleccionado, ya que es un medio selectivo para la confirmación y detección de *Enterococos* y como detector de contaminación fecal en el agua formulado por Condalab, esa selectividad hace que no exista interferencia con otros grupos de microorganismos.

Enterococcus faecium

Para el aislamiento de *E. faecium* se inicia agregando una alícuota de 10 mL de las muestras en un tubo con 10 mL de caldo EVA 2X se incubó 24 h a 37°C

después se siembra en placa de agar con BHI con NaCl al 6% se deja en incubación 24 h a 37°C, a los cultivos positivos se les realizan pruebas específicas y se busca crecimiento en telurito de potasio y L-arabinosa para determinar si son aislados de *Enterococcus faecium*.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus se aisló sembrando las muestras de agua del río Atoyac y de sedimentos en placas de agar Baird Parker y en agar Sal y Manitol, se incubaron durante por 72 h a 37°C, luego de esto se realizó la prueba de oxidasa y catalasa, siendo la prueba de oxidasa negativa y la prueba de catalasa positiva, después se procedió a realizar la prueba de coagulasa que consistió en hacer siembra en un tubo con 200 microlitros de caldo BHI y se incubó por 24 h a 37°C pasando este tiempo se agregaron a la muestra 200 microlitros de plasma de conejo y se incubó por 24 h a 37°C en baño María y se leyeron como positivas si se observaba la formación de un coágulo.

Acinetobacter baumannii

Para aislar a *A. baumannii* se hicieron siembras con 100 microlitros de las muestras de agua y sedimento del río Atoyac en medios de Mc Conkey y Soya Tritipcasa TSA con antimicrobiano por extensión en superficie, las placas se incubaron por 24 h a 37°C, posteriormente a las colonias elegidas por morfología, se les realizó pruebas bioquímicas MIO, TSI, LIA, oxidasa y catalasa, para determinar si se trataban de aislados de *A. baumannii*. Una vez que se obtuvieron los resultados esperados se procedió a sembrar los aislados en CHROMagar para *Acinetobacter* como prueba confirmatoria, ya que las colonias son característicamente de color rojo y las otras de color azul.

7.4 Identificación molecular de *S. aureus* y *E. faecium*.

La elección de los oligonucleótidos de *E. faecium* y *S. aureus* fue con ayuda de bases bioinformáticas como NCBI (National Center for Biotechnology Information). Una vez elegidos fueron analizados por las herramientas OligoAnalyzer y Blastn para saber si los oligonucleótidos serán óptimos en la PCR.

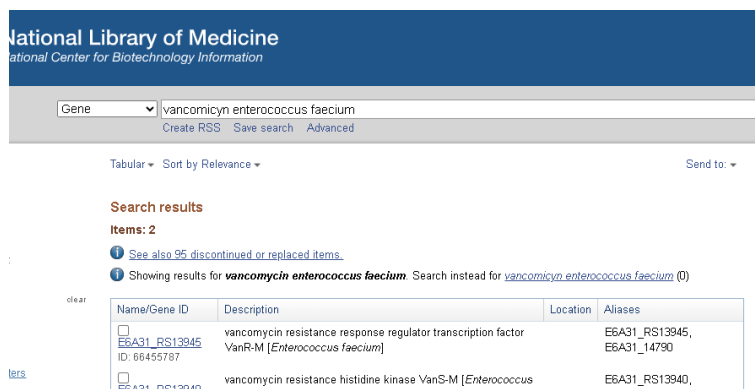


Figura 2. Búsqueda del gen *vanA* en la base de datos en NCBI

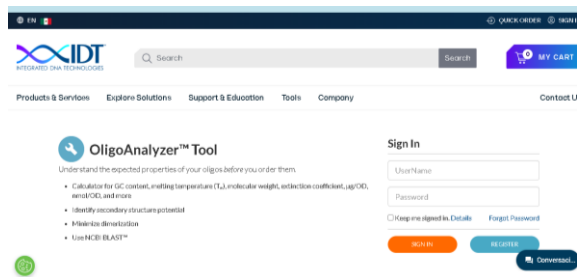


Figura 3. Programa OligoAnalyzer usado para el análisis de los oligonucleótidos de *vanA*.

Se empezó con la extracción de ADN de las cepas de *E. faecium* fue por choque térmico y para *S. aureus* fue por kit siguiendo instrucciones del fabricante. Para la confirmación de ADN se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% y como marcador molecular el GenRuler 100bp plus ADN Ladder, el gel fue teñido en bromuro de etidio y se visualizó por luz UV.

7.4.1 PCR.

Una vez que se obtuvo el ADN de las cepas, se realizó una PCR para los 2 patógenos, para las cepas de *E. faecium* de esta bacteria se usaron los oligonucleótidos realizados anteriormente y dirigidos al *gen* blanco de resistencia de vancomicina.

Para las cepas de *S. aureus* se utilizaron los oligonucleótidos para el *gen nuc* F(5`GCGATGGTGATACTGTTA 3`) y R (5`AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3`), proporcionados por el laboratorio de patogenicidad microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Para la reacción de PCR se ocupó GoTaq GreenMaster Mix 2X (12.5µl), agua libre de nucleasas (5 µl), Oligonucleótidos R(1µl) y F(1µl) y ADN (5µl) para obtener una concentración final de 25µl. Esto fue para ambos de las cepas de *E. faecium* y *S. aureus*. La amplificación se llevó en un termociclador donde se colocaron muestras diferentes de ADN obtenidas anteriormente para empezar con los diferentes ciclos involucrados en una PCR, para esto se hizo un programa de 30 ciclos, la desnaturalización por 1min a 95°C, alineamiento 1min a 55°C, extensión final 10min a 72°C.

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa de 2%, con el mismo marcador de peso que se usó anteriormente en la extracción de ADN, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz UV.

7.5 Perfil de resistencia a antibióticos

La prueba de sensibilidad o resistencia a antibióticos se realizó posterior a la confirmación de los microorganismos.

Por medio de la técnica de Difusión en disco de Kirby Bauer, se seleccionaron de 3 a 5 colonias de cada aislado y se sembraron en medio de Mueller Hinton estéril en tubos de ensayo con 3 ml del medio se dejaron incubando a 37 °C con una agitación de 170 rpm después de 24 h se hizo una resiembra en un tubo de Mueller Hinton estéril y se dejó incubando de 2.5 h a 3 h hasta que alcanzó el grado de turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland, posteriormente se sumergió un hisopo estéril de algodón y se roto por la paredes para quitar excesos, se utilizó para sembrar uniformemente una placa de medio Mueller Hinton en 4 direcciones distintas (a 45°) y se colocaron los sensidiscos de diferentes antibióticos para bacterias Grampositivas con ayuda de una pinza estéril, finalmente se dejó incubando 24h a 37 ° C, al término del periodo de incubación se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición. Para los aislados de *A. baumannii* se realizó la misma metodología solo que se utilizaron sensidiscos de antibióticos de los grupos de carbapenémicos y penicilinas.

Tabla 1. Lista de antibióticos utilizados para las cepas positivos a *S. aureus* y *E. faecium*.

Marca de sensidiscos de antibióticos -MULTIBAC I.D	
Antibiótico	Concentración-µg
Ampicilina	10 µg
Cefalotina	30 µg
cefotaxima	30 µg
Ciprofloxacino	5 µg
Clindamicina	30 µg
Dicloxacilina	1 µg
Eritromicina	15 µg
Gentamicina	10 µg
Penicilina	10 µg

Tetraciclina	3 µg
Sulfametoxazol/Trimetoprim	25 µg
Vancomicina	30 µg

Tabla 2. Lista de antibióticos utilizados para las cepas positivas a *E. faecium* y los aislados de *A. baumannii*.

Marca de sensidiscos de antibióticos -BD BBL	
Antibiótico	Concentración-µg
Cloranfenicol	30 µg
Meropenem	10 µg
Imipenem	10 µg
Amikacina	30 µg
Kanamicina	30 µg

7.6. Propuesta de control de *S. aureus* multirresistentes

- Extracción de solución acuosa de bulbo de ajo (*Allium sativum*).
- Síntesis de nanopartículas de oro y plata por el método de Turkevich
- Síntesis verde de las nanopartículas de oro y plata aplicando como agente reductor el ajo
- Caracterización de las nanopartículas con espectroscopia UV-VIS.

La metodología fue dada bajo la tutela de la Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán.

- Activación de 3 cepas de *S. aureus* recuperados en el estudio y una cepa tipo de *S. aureus* para la prueba.
- Determinación de inhibición por dilución en microplaca

- Medición de la OD antes y después de la acción de las nanopartículas
- Cálculo del porcentaje de inhibición

8. RESULTADOS

8.1. Aislamiento e identificación bioquímica.

Una vez recolectadas las muestras se procedió a la identificación microbiana y al aislamiento de los microorganismos en estudio, tomando como referencia la norma NMX042-SCFI-2015-AA para *E. faecium*, para *S. aureus* y *A. baumannii*, se emplearon las metodologías previamente estandarizadas en este proyecto.

Para la identificación bioquímica de *E. faecium* se seleccionaron colonias que cumplieron con las características de ser blanquecinas, convexas, circulares en medio de BHI con NaCl al 6% y acordes con los resultados esperados para las pruebas específicas de telurito de potasio y L-arabinosa como se observa en la figura 4.

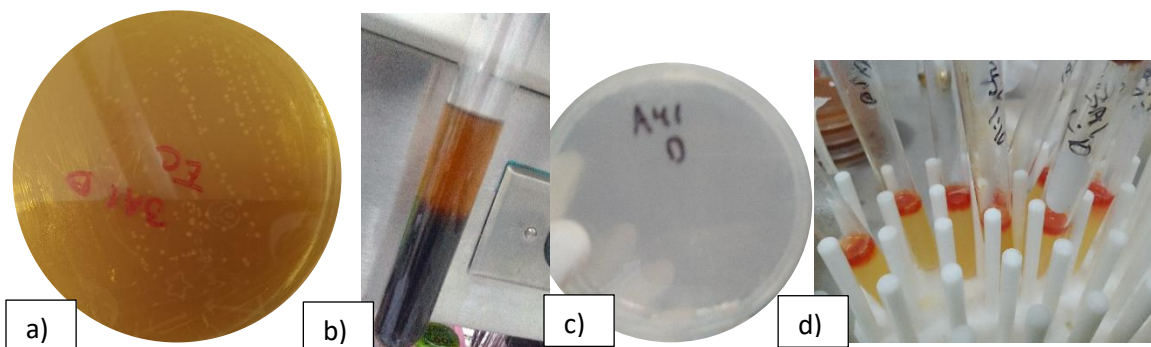


Figura 4. a)placa de agar BHI con NaCl al 6% con crecimiento de la muestra de agua en aislados de *E. faecium*, en el inciso b) prueba confirmatoria medio de EVA 2x de *Enterococcus spp*, c) Prueba de telurito de K, d) prueba de L-arabinosa.

Para *S. aureus* del medio Baird Parker se seleccionaron colonias que cumplieran con las siguientes características de ser negras, circulares, convexas, con un halo metálico alrededor de la colonia, brillantes y lisas, y en el caso del medio Sal y Manitol se seleccionaron colonias amarillas con un halo alrededor amarillo, circulares y convexas. A las colonias presuntivas por morfología colonial, de

alguno de los dos medios de cultivo, se les realizó la prueba de coagulasa y se seleccionaron las que fueran positivas, la positividad de la prueba se puede observar en la figura 5.

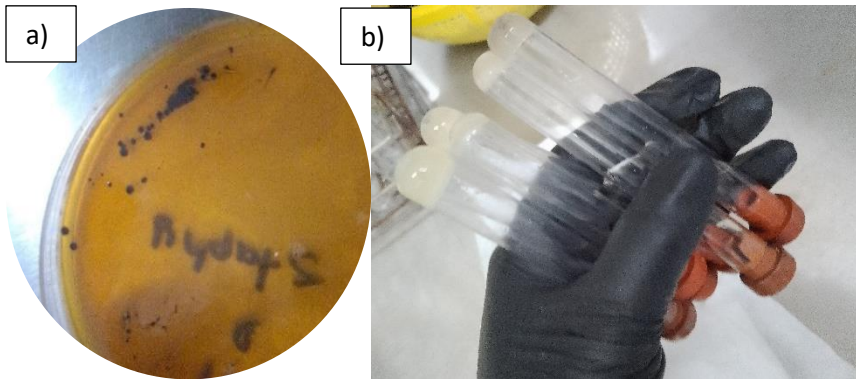


Figura 5. a) placa de agar Baird Parker con crecimiento de las muestras, b) prueba confirmatoria de coagulasa de las colonias aisladas de las muestras de agua y sedimento para las cepas de *S. aureus*.

Para el caso de *A. baumannii* se seleccionaron colonias del medio de Mc Conkey con antimicrobiano, que cumplen con las siguientes características de ser circulares rosadas y lilas, convexas, con un halo alrededor de la colonia que representan su cápsula de polisacáridos de la misma bacteria como se observa en la Figura 6, posterior a esto las pruebas bioquímicas cumplieron con las siguientes características movilidad negativa, catalasa positiva, ornitina negativa, lisina negativo y oxidasa negativa. Por último, se realizó la prueba confirmatoria CHROMagar en donde se seleccionaron colonias de coloración roja como se observa en el inciso b) de la figura 6.



Figura 6. a) placa con crecimiento de *A. baumannii* en agar Mc Conkey con antimicrobiano, b) prueba confirmatoria CHROMagar de las colonias aisladas de las muestras.

En las siguientes tablas están descritos los resultados de los microorganismos aislados obtenidos de las muestras de agua y sedimento del río Atoyac, ordenadas por número de muestreo y estado, donde se muestra la incidencia de los aislados en cada una de las muestras y de donde se había obtenido.

Tabla 3. Cepas de *E. faecium* y *S. aureus* obtenidos de muestras de sedimento del río Atoyac. (S) corresponde a muestra de sedimento, (1, 2) corresponde al número de muestreo y 1:10 a la dilución del crecimiento.

Tlaxcala (Muestreo 1 y 2).	
S1	<i>S. aureus</i>
2S1 1:10	<i>E. faecium</i>
2S2 1:10	<i>E. faecium</i>

Tabla 4. Cepas de *S. aureus* de muestras de agua del río Atoyac. (A) corresponde a muestra de agua, y (3, 4) corresponde al número de muestreo.

Puebla (Muestreo 3 y 4).

3 A2	<i>S. aureus</i>
3 A1	<i>S. aureus</i>
A41	<i>S. aureus</i>
A42	<i>S. aureus</i>
A51	<i>S. aureus</i>
A51	<i>S. aureus</i>

Tabla 5. Cepas de *E. faecium* y *S. aureus* obtenidos de muestras de sedimento del río Atoyac. (S) corresponde a muestra de sedimento, y (3,4) corresponde al número de muestreo.

Puebla (Muestreo 3 y 4).	
3S1	<i>S. aureus</i>
3 S1	<i>S. aureus</i>
3S2	<i>S. aureus</i>
3S2	<i>S. aureus</i>
S42	<i>S. aureus</i>
S51	<i>S. aureus</i>
S51	<i>S. aureus</i>
S52	<i>S. aureus</i>
3S2	<i>E. faecium</i>

Tabla 6. Cepas de *E. faecium* obtenidos de muestras de agua del río Atoyac. (A) corresponde a muestra de agua, y (3,4) corresponde al número de muestreo.

Puebla (Muestreo 3 y 4).	
3 A1	<i>E. faecium</i>
3 A2	<i>E. faecium</i>
A41	<i>E. faecium</i>

A42	<i>E. faecium</i>
-----	-------------------

Tabla 7. Aislados de *A. baumannii* obtenidos de muestras de agua y sedimento del río Atoyac. (S) corresponde a muestra de sedimento, (A) corresponde a muestra de agua, (2,4) corresponde al número de muestreo y 1:10 corresponde a la dilución de la muestra.

Puebla	Tlaxcala
A41 <i>A. baumannii</i>	2S2 1:10 <i>A. baumannii</i>

En los resultados obtenidos y descritos en cada una de las tablas, se muestra un mayor número de cepas de *S. aureus* en muestras de sedimento en el Estado de Puebla.

8.2. Identificación molecular de *E. faecium* y *S. aureus*.

Se descargó de la base de datos NCBI la secuencia en formato FASTA para el gen *van* de *E. faecium* para FASTA.

Después se seleccionaron los oligonucleótidos que cumpliera con las características de unos óptimos oligonucleótidos, posteriormente a esto analizaran con otras herramientas bioinformáticas OligoAnalyzer.

Secuencia en formato FASTA del gen *van*.

ID NZ_CP038997.1

```
5'TGTTTCGTGTTAAGTTTCTTTACATTCTACGCACCTCGAGTGTAATAATTC
TTTATTCTCCACGCTCCATGTTATTTTATATTTCTTTTTTCATGTTATTTTTA
TCCAGAAACCGATCAAGTTTTTACCTATTCCCAAATCCATTTATTCGTTATTT
TTTTCACTGATTAAGAATAATTATTTGATGCTTAAATTAGCTAAAAAAG...AT
GAATAGATTGAAAATAGCCATCCTTGTTTGGGGTTGCTCAGAAGAGCATAA
TGTATCGGTAAAATCAGCGGCAGAGATTGCCAACAACATTGATATAGGAAAA
TATGAACCAATATACATCGGAATAACCCAAAAAACCATGTATAGATTGGGA
TAATGAACACTGTTCGCTCGGCAGTACTTTCATACAGCGTATAGATGTAGTCT
```

TTTCAGTGTTGCACGGAAAATCGGGTGAAGACGGCGCCATACAAGGATTAT
TTGAATTGTCTGGTATACCTTATGTAGGCTGTGATATTCAAAGTTCGGCGGT
TTGTATGGACAAATCACTGGCATATATTATTGCGAAAAAGCTGGCATAGCTA
CTCCTGAATTTTCAGGTCATTTATAAAGACGATAAGCCAGCGGCAGATTTCGTT
TACCTATCCCGTTTTTTGTTAAGCCAGCACGTTCCCGCAGAACTATCGGCAGG
AGCGAGAACGGATAAAAGAAGCGGCAAAAAATATATATAAGGCGCTCGGGT
GTAGAGGTCTTTCTCGTGTTGATATGTTTTTACAAGATAACGGCCGCATTGT
ACTAAATGAAGTCAATACCATGCCTGGTTTCACGTCATACAGCCGTTATCCA
CGTATGATGGTCTCAGCAGGTATAACAATTCCCGAACTGATTGACCACTGAT
TGTATTAGCTGTAAAGGAGTGAATTTGAA **TTGTCCATACAAACCGCCGA**AGG
CTGTGATATTCAAAGTTCGGCGGTTTTGTATGGACAAATCACTGGCATATATT
ATTGCGAAAAACGCTGGCATAGCTACTCCTGAATTTTCAGGTCATTTATAAAG
ACGATAAGCCAGCGGCAGATTCGTTTACCTATCCCGTTTTTTGTTAAGCCAGC
ACGTTTCAGGTTCCCTCCTATGGGTGTGAATAAAGTTAATAGTGCGGATGAATT
GGACTCCGCAATTGACTTGGCAAGACAATATGACAGCAAAATC... 3'

8.2.1 Extracción de ADN.

En los aislados de *E. faecium* se usó el método de choque térmico para la extracción de ADN y posteriormente se realizó una electroforesis por 40 min a 70 volts en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio con el fin de visualizar el ADN.

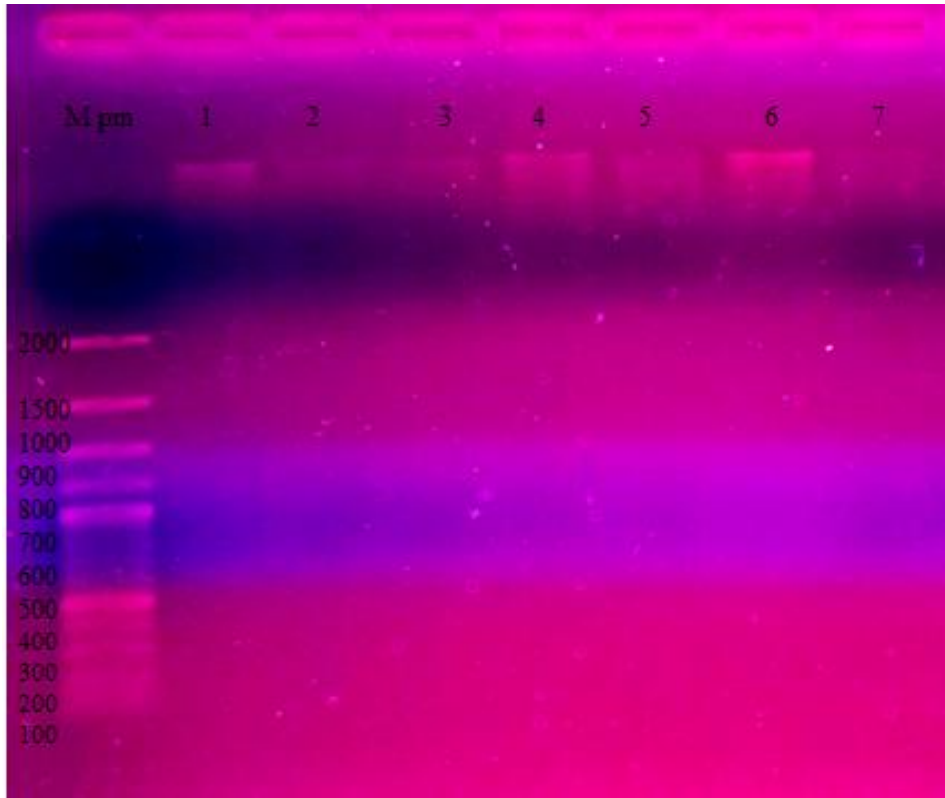


Figura 7. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En donde se observar el ADN de las cepas donde corresponden 1-A41,2-3 A1, 3-A42,4-3 A2,5-2S1, 6-3S2, 7-2S2 de *E. faecium* obtenidos de las muestras de agua y sedimento del río Atoyac.

Para las cepas de *S. aureus* se usó el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep y posteriormente se realizó una electroforesis por 60 min a 70 volts en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio con el fin de visualizar el ADN de *S. aureus* como se muestra en figura 8.

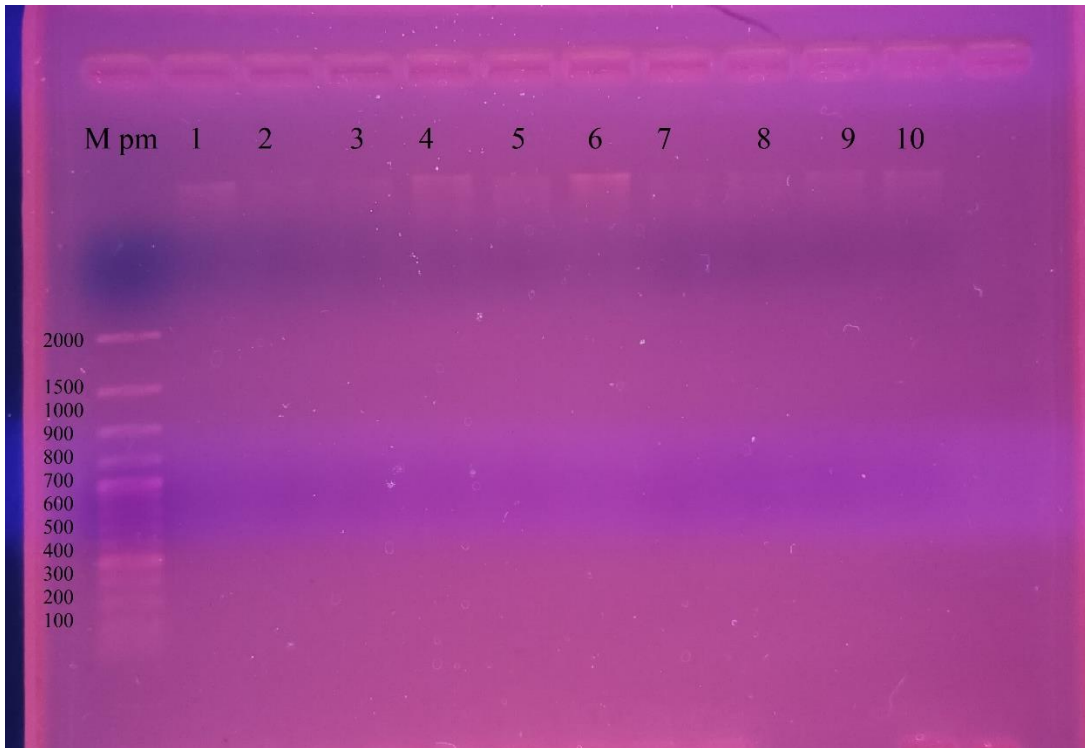


Figura 8. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En donde se observar el ADN de las cepas donde corresponden 1- S51,2-A51, 3-3S2, 4-S52,5-S42, 6-A42, 7-A42, 8-A41,9-S1,10-3S1 de *S. aureus* obtenidos de las muestras de agua y sedimento del río Atoyac.

8.2.2. PCR.

Esta prueba molecular se usó para la caracterización de las cepas de *E. faecium* y *S. aureus*

En el caso de las cepas de *E. faecium* la PCR confirmatoria para el gen *vanA* se usaron los oligonucleótidos antes ya diseñados en este estudio F' **CGGCAGAGATTGCCAACAAAC** y R' **TTGTCCATACAAACCGCCGA.**

Los productos son de 650pb PCR para el *vanA* se visualizaron en un gel agarosa al 2% bajo luz UV y fue teñido con bromuro de etidio.

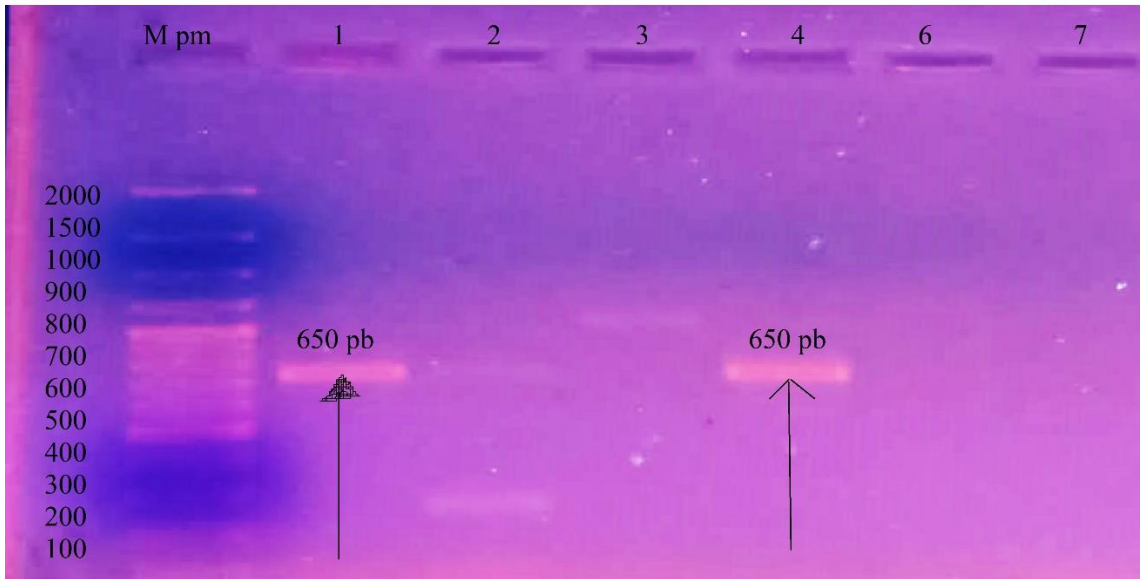


Figura 9. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En donde se observar los amplicones de 650 pb de *van* de los aislados de *E. faecium* obtenidos de las muestras de agua y sedimento del río Atoyac.

La PCR confirmatoria para el gen *Nuc* se usaron los siguientes oligonucleótidos F(5`GCGATGGTGATACTGTTA 3`) y R(5`AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3`), dando como resultado negativo en el gen *Nuc* en los aislados obtenidos de *S. aureus*.

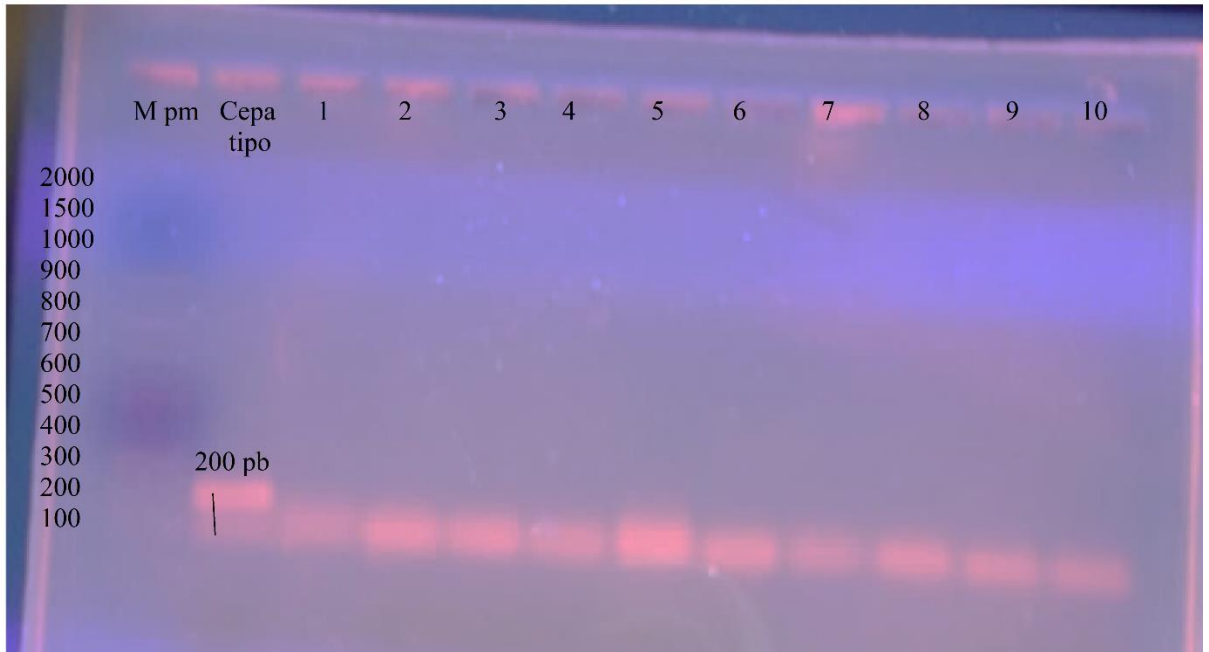


Figura 10. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En donde se observar los amplicones de 200 pb del gen *Nuc* las cepas de *S. aureus* obtenidos de las muestras de agua y sedimento del río Atoyac que corresponden 1-S51, 2-A51, 3-3S2,4-S52, 5-S42,6-A42,7-A 41,8-S1,9-3S1, 10-3 A1.

8.3. Perfil de resistencia de los aislados de *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii*.

Se procedió a hacer las pruebas de resistencia a antibióticos, mediante la técnica de difusión en disco de Kirby Bauer a los microorganismos aislados tomando en cuenta los tratamientos de elección primaria y las recomendaciones de la OMS para ser considerados como patógenos de vigilancia de alta prioridad o prioridad crítica.



Figura 11. Resultados de antibiogramas realizados para las colonias aisladas de las muestras de agua y sedimento.

Para las cepas de *E. faecium* se realizó el perfil de resistencia con 4 grupos de antibióticos y en específico con el grupo de los glucopéptidos que corresponde el antibiótico de vancomicina para cumplir con el requisito según la OMS y ser clasificado como patógeno de alta prioridad.

Tabla 8. Resultados obtenidos del perfil de resistencia de las colonias de las cepas de *E. faecium* en los Estados de Puebla y Tlaxcala.

<i>E. faecium</i>	Vancomicina	Penicilina	Ampicilina	Gentamicina	Cloranfenicol
A41	R	S	R	R	R
3 A1	R	R	S	S	S
A42	R	R	R	R	I
3 A2	R	R	R	S	R
2S1 1:10	R	R	R	R	S
3S2	R	R	R	R	S
2S2 1:10	R	R	R	R	I

*(R)-resistente, (I) resistencia intermedia y (S) sensible.

Se recolectaron un total de 7 cepas de *E. faecium* donde el 100% de los aislados fueron resistentes a vancomicina, 6 fueron multirresistentes y 1 no resulto ser

multirresistentes y por lo tanto cumplen para ser patógenos de alta prioridad según la OMS.

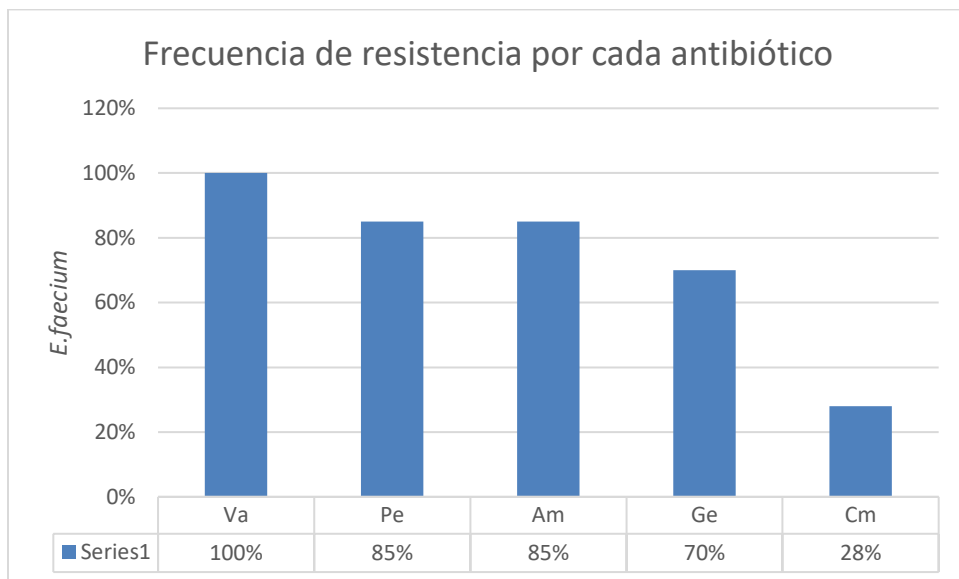


Figura 12. Gráfico de barras donde se muestra el porcentaje de resistencia a cada uno de los antibióticos probados para las cepas de *E. faecium* en este estudio antibióticos.

Para las cepas de *S. aureus* recuperados de las muestras de agua y sedimento del río se corrió el perfil de resistencia con 9 grupos de antibióticos en donde presentan un 95% de resistencia al grupo de las penicilinas y un 73% tienen resistencia a vancomicina, y casi el total de las cepas tienen una resistencia intermedia al antibiótico de eritromicina. Donde se tomó en cuenta la resistencia franca total y no se sumó la resistencia intermedia obtenida.

Tabla 9. Resultados de la prueba de perfil de resistencia de las colonias de las cepas de *S. aureus* en los Estados de Puebla y Tlaxcala.

<i>S. aureus</i>	CFX	VA	AM	TE	PE	E	GE	CPF	DC	CF	SXT	CLM
S51	I	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R
S51	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I
A51	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	S	R

A51	I	S	R	S	S	I	S	S	I	S	R	S
3S2	I	S	R	I	R	I	S	R	R	I	S	S
S52	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
S42	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
A42	S	R	R	I	R	S	S	I	R	S	R	I
A41	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R
S1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3S2	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
3 A2	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
3 A1	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
3S1	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3S1	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R

*CFX=Cefotaxima,VA=Vancomicina, AM=Ampicilina, TE=Tetraciclina, PE=Penicilina, E=eritromicina, GE=Gentamicina, CPF=Ciprofloxacino, DC=Dicloxacilina, CF=Cefalotina, SXT=Sulfametaxazol/Trimetoprim, CLM=Clindamicina. *(R)-resistente, (I) resistencia intermedia y (S) sensible.



Figura 13. Se muestra un gráfico de pastel en donde se demuestra una mayor resistencia al grupo de las penicilinas y en segundo lugar con el grupo de cefalosporinas en las cepas de *S. aureus*.

Para los aislados de *A. baumannii* la prueba de perfil de resistencia se usaron el grupo de carbapenémicos que es de importancia clínica y los demás antibióticos que son usados para bacterias gram negativas. Asimismo, tienen resistencia al grupo de los carbapenémicos los dos aislados con diferencia a la resistencia total que cumple el aislado de *A. baumannii* de Tlaxcala y resistencia intermedia el

aislado de Puebla, por lo tanto, ambos aislados cumplen para ser considerados por la OMS patógenos de prioridad crítica.

Tabla 10. Resultados obtenidos del perfil de resistencia de las colonias aisladas de *A. baumannii* en los Estados de Puebla y Tlaxcala.

<i>A.baumannii</i>	Tetraciclina	Meropenem	Imipinem	amikacina	kanamicina	Gentamicina
A41	S	S	I	S	S	R
2S2 1:10	R	R	S	S	S	S

. * (R)-resistente, (I) resistencia intermedia y (S) sensible.

- Clasificación de los aislados recuperados de las muestras de agua y sedimento del río Atoyac.

Después de los resultados obtenidos de la resistencia se determinó clasificar a los patógenos por la cantidad de grupos de antibióticos que a más de 3 grupos de antibióticos se consideró el microorganismo aislado como multirresistente-(MDR) y a más de 9 grupos de antibióticos se consideró que los microorganismos aislados con resistencia extendida-(XDR). (Silvas, *et al.* 2023).

En todas las cepas de *E. faecium* cumplen con la resistencia al antibiótico de vancomicina que es el requisito según la OMS para ser considerados patógenos de alta prioridad.

En el caso de las cepas totales de *S. aureus* la gran mayoría son multirresistentes (MDR) como se observa en la figura 15.

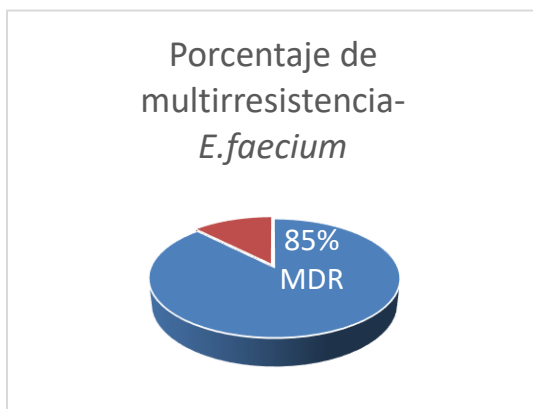


Figura 14. Gráfico donde se muestra el porcentaje de multirresistencia de las cepas recuperados de *E. faecium*.

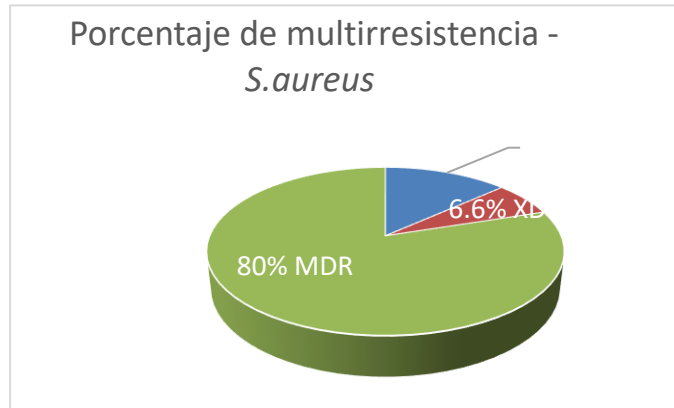


Figura 15. Gráfico en donde se presentan los porcentajes de multirresistencia (MDR), resistencia de espectro extendido (XDR) y el porcentaje de las cepas que no presentan multirresistencia de *S. aureus*.

En el análisis de los resultados obtenidos de la prueba del perfil de resistencia a antibióticos resalta una cepa de *S. aureus* S1 proveniente de la muestra de sedimento del Río Atoyac en el área del estado de Tlaxcala, que presenta resistencia a todos los grupos de antibióticos probados en este estudio, por lo tanto, es un patógeno con resistencia de amplio espectro-XDR.

El cálculo del índice de resistencia a múltiples antibióticos (IRMA) se calculó con la siguiente fórmula donde NA es el número de antibióticos resistente para cada microorganismo aislado y NT es igual a número de total de antibióticos probados para dicho microorganismo.

$$IRMA = \frac{NA}{NT}$$

Tabla 11. Resultados del cálculo IRMA para cada microorganismo aislado.

<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. baumannii</i>

A41-0.8	S51-0.75	A41-0.33
3 A1-0.8	S51-0.83	2S2 1:10-0.33
A42-0.8	A51 -0.75	
3 A2-0.8	A51-0.16	
2S1 1:10-0.8	3S2-0.33	
3S2 -0.8	S52-0.75	
2S2 1:10-0.8	S42-0.91	
	A42-0.41	
	A41-0.66	
	S1-1	
	3S2-0.91	
	3 A2-0.91	
	3 A1 -0.91	
	3S1 -0.91	
	3S1 -0.83	

La interpretación del índice de resistencia a múltiples antibióticos nos dice que los valores mayores a 0.2 el aislado bacteriano proviene de una fuente de alto riesgo de contaminación. Por lo tanto, una fuente de uso frecuente o extensivo de antibióticos son los hospitales.

Todos los microorganismos aislados recuperados de *E. faecium* y *A. baumannii*

proviene de una fuente de alto riesgo de contaminación. Para las cepas de *S. aureus* también mostro que provienen de una fuente de alto riesgo de contaminación excepto por una sola cepa A51 del estado de Puebla y de muestra de agua que no cumple para ser considerado ser proveniente de una fuente de alto riesgo de contaminación.

8.3. Propuesta de control de *S. aureus* multirresistentes

La técnica se hizo por duplicado en tres tiempos diferentes, la primera fue en la estandarización de la metodología, para comparar la acción de las nanopartículas de oro y plata con síntesis verde.

Los resultados obtenidos son los siguientes descritos en la tabla, en donde están descritos los porcentajes de inhibición de crecimiento que tuvieron las bacterias con la presencia de las nanopartículas de oro y plata.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de crecimiento de las cepas de *S. aureus* en presencia de las nanopartículas acopladas y no acopladas con extracto de ajo de oro y plata.

AuNPS	AuNPS/Ajo	AgNPS	AgNPS/Ajo
-16.25%	60%	36.7%	45.45%
-3.75%	77%	26.7%	35.45%
-17.5%	64%	34.2%	40.45%
-12.5%	62%	24.2%	32.95%

Nota. AuNPS nanopartículas de oro, AuNPS nanopartículas de oro acopladas a ajo, AgNPS nanopartículas de plata, AgNPS nanopartículas de plata acopladas a ajo.

Posterior a esto se realizó la prueba estadística T-student para validar si existe diferencia significativa en la efectividad de nanopartículas acopladas con extracto de ajo contra *S. aureus* a un nivel de significancia del 95% $p \leq 0.05$, la prueba T student fue de 2 colas, tipo Homoscedastica ya que las 2 muestras presentaron varianzas iguales, observándose una diferencia de las nanopartículas de oro acopladas a ajo, en cuanto las nanopartículas de plata no se observa una

diferencia significativa respecto al uso de al agente reductor (citrato de sodio), es decir existe un efecto inhibitor en ambos casos.

Se observó que no existe una diferencia significativa respecto a la síntesis estándar. También se observó que las nanopartículas de plata con la síntesis con el agente reductor (citrato de sodio) eran menos estables 2 h mientras que las nanopartículas de síntesis verde fueron más estables por 3 meses en este estudio. Para el caso de las nanopartículas de oro con síntesis verde presentaron un mayor porcentaje de inhibición. Por lo tanto, son más efectivas para la disminución de cepas multirresistentes de *S. aureus* recuperados de muestras del río Atoyac. Por último, la síntesis verde como ha sido citado es más económico y rentable para aplicaciones ambientales.

9. DISCUSIÓN.

La problemática emergente en el ambiente y para la salud pública es la transmisión de las bacterias del grupo ESKAPE, recuperados de muestras de cuerpos de agua considerados ambientes no controlados y vehículos de diseminación. El mal manejo de las aguas residuales de las industrias y hospitales, juegan un papel importante que permite una alta presencia de estos patógenos y contribuyen a su multirresistencia. Por lo anterior en el estudio se determinó que los aislados del grupo ESKAPE presentan multirresistencia y que cumplen para ser considerados por la OMS patógenos de alta prioridad y de prioridad crítica, esto aumenta las posibilidades de que no se puedan encontrar un tratamiento de control adecuado para estos patógenos y es por lo que se determina que no son restringidos al ámbito hospitalario como eran considerados años atrás. Esto convierte el río Atoyac en un vehículo de diseminación de estas bacterias entre los Estados que recorre.

En países como Polonia y Suiza han logrado recuperar a *Enterococcus faecium* utilizando el medio de BHI con NaCl al 6% de muestras provenientes de agua residuales, canales interiores, ríos y cuencas, esto contribuye a validar una parte de la metodología usada en el presente estudio. En el presente estudio las cepas recuperadas de *E. faecium* presentan un 100% de resistencia a vancomicina cumpliendo para ser considerados patógenos de alta prioridad según la OMS, en estudios similares realizados en Polonia sus aislamientos de *Enterococcus* recuperados de muestras de aguas residuales y de ríos fueron clasificados como vancomicina resistentes (VRE) y lo validaron con una PCR simple y multiplex enfocados a la familia de genes *van* siendo los siguientes *vanA*, *vanB*, *vanC1,2* y *3*, como resultado presentaron un 40% de sus aislados de *E. faecium* vancomicina resistente (VRE) (Gotkowska-Płachta, A. 2021). Los hallazgos del presente estudio difieren de lo reportado en Suiza por Biggel et al, 2021 quienes recuperaron a *E. faecium* de muestras de aguas de canales interiores y de aguas

residuales, sólo en un 3%, es importante destacar que ellos usaron un medio específico para conocer si los aislados eran vancomicina resistentes diferente al empleado en este proyecto, pudiendo ser el motivo de la baja incidencia de *E. faecium* VRE, reportada por ellos, en los cuerpos de agua muestreados. (Biggel *et al.*, 2021). En los 2 países concluyen y sugieren que se hagan monitoreos de forma constante en periodos cercanos. Para el caso de México hay un solo estudio donde han logrado recuperar *E. faecium* de muestras provenientes del río Mololoa donde su caracterización microbiológica fue mediante pruebas bioquímicas y lo validaron con una PCR buscando genes de virulencia, en el cual no consideraron que fuesen vancomicina resistente, que es importante y de prioridad para la vigilancia de la salud pública según la OMS. (Héctor *et al.*, 2017).

Para *S. aureus* hay estudios en los cuales lo han recuperado de ríos y de playas en diferentes países como Brasil y EUA. En Brasil se realizó el primer registro de *S. aureus* multirresistente y resistente a metilicina (SARM), donde los aislados recuperados provenían de muestras de agua del río Meia Ponte y fueron confirmados mediante una PCR dirigida a los genes *mecA*, obteniendo que un 80% de los aislados presentaron multirresistencia. (Santos *et al.*, 2025). Por otra parte, en Estados Unidos analizaron la resistencia a metilicina en aislados de *S. aureus* recuperados de muestras de agua de ríos y playas de Hawái presentando una resistencia al antibiótico con un 98%. (Gerken *et al.*, 2021). Estos estudios han concluido que estos cuerpos de agua pueden ser considerados como reservorios de bacterias patógenas. Por otro lado, en México existe una carencia de monitoreos y de estudios enfocados en aislar y recuperar *S. aureus* de cuerpos de agua como ríos, arroyos y playas. Aunque hay un estudio reciente donde realizaron aislamientos e identificación de *S. aureus* donde fue recuperado en cuerpos de agua cercanos a hospitales del estado de Puebla, en donde concluye que las descargas de aguas residuales hospitalarias pueden ser fuentes de alta contaminación (Ahuatzin Flores, O. 2025). Esto incide en el presente estudio en

el cual se logró recuperar 15 cepas de *S. aureus* donde un 80% son multirresistentes y una sola cepa presento resistencia a 9 grupos de antibióticos y por lo tanto se clasifico con resistencia de espectro extendido (XDR) provenientes de muestras agua y sedimento del río Atoyac en una zona de producción agrícola en el estado de Tlaxcala donde su uso es para el riego agrícola en las comunidades aledañas a este cuerpo de agua.

A. baumannii es considerado como un patógeno exclusivo del ámbito hospitalario, pero existe un registro del primer aislado del río Sena en París- Francia que fue recuperado en medio de Mc Conkey con Imipenem que es del grupo de los carbapenémicos, mediante PCR Girlich y colaboradores ellos confirmaron el gen *bla_{OXA-23}* con ello validaron que los cuerpos de agua pueden contaminarse de residuos del ámbito hospitalario y convertirse en vehículos de diseminación (Girlich *et al.*, 2009). En Polonia también han logrado aislar *Acinetobacter* provenientes de muestras de agua de río y de aguas residuales, caracterizando con CHROMagar. (Hubeny *et al.*, 2022). No existen estudios reportados en México de *A. baumannii* en ambientes no controlados, actualmente no se realiza una vigilancia directa en cuerpos de agua y por lo tanto se desconoce su incidencia y su resistencia, por lo que se desconoce un tratamiento de *A. baumannii* presente en cuerpos de agua contaminados. Es por consiguiente, que el presente estudio se guió con pruebas de identificación que se han usado para aislados clínicos logrando recuperar e identificando dos aislados de *A. baumannii*, que podrían ser los primeros aislados del río Atoyac reportados hasta el momento y asimismo estos aislados cumplen con la resistencia a el grupo de antibióticos carbapenémicos para que sean parte de la lista de vigilancia por la OMS para que puedan ser considerados patógenos de prioridad critica. Debido a lo anterior es recomendable llevar la caracterización bioquímica y molecularmente a la par para obtener una certeza de confiabilidad en los estudios.

El estudio deja en evidencia la existencia de bacterias del grupo ESKAPE en un

vehículo de diseminación como lo es el río Atoyac, que afecta a la población del estado de Puebla y Tlaxcala, convirtiéndose en una problemática de salud pública silenciosa y de difícil tratamiento.

10. CONCLUSIÓN

Se estandarizaron las diferentes técnicas para el aislamiento y caracterización de *E. faecium*, *S. aureus* y *A. baumannii* a partir de muestras de agua y sedimento provenientes del río Atoyac.

Se determinó la multirresistencia (MDR) con las cepas estudiadas dando como resultado un 85% de multirresistencia para *E. faecium*, un 80% de multirresistencia para *S. aureus*, resaltando una cepa de *S. aureus* que se determinó la resistencia de espectro extendida (XDR).

Las 7 cepas de *E. faecium* resultaron resistentes un 100% al antibiótico de vancomicina y es por lo que son considerados patógenos de vigilancia de alta prioridad según la OMS.

Las cepas de *S. aureus* presentaron resistencia un 73% a vancomicina con esto cumplen para ser considerados en vigilancia por la OMS y ser clasificados como patógenos de alta prioridad.

Para los aislados de *A. baumannii* resultaron los dos aislados recuperados del río Atoyac, aunque no presentaron multirresistencia si presentaron resistencia al grupo de carbapenémicos que es vigilado por la OMS y los clasifica como patógenos de prioridad crítica.

Todos los microorganismos aislados recuperados fueron clasificados conforme al índice de resistencia a múltiples antibióticos (IRMA), provenientes de fuentes de alto riesgo contaminación y probablemente sean de fuente hospitalaria.

Por último, una cepa S1-*S. aureus* del estado de Tlaxcala puede ser de ayuda para futuras investigaciones debido a su resistencia de amplio espectro-XDR, se determinó con su resistencia a 15 antibióticos y a 9 grupos de antibióticos probados en este estudio.

Como se sabe existe una insuficiencia de antibióticos efectivos contra *S. aureus* y contra los patógenos del grupo ESKAPE, donde destacan por su multirresistencia contra los antibióticos. Es por ello que es necesario plantear

alternativas y estrategias para mitigar la multirresistencia bacteriana a los antibióticos, en diferentes estudios han reportado cualitativamente la inhibición contra bacterias (Bouqellah *et al.*, 2018), aunque no dirigidos para aislados ambientales. Es por eso que es posible con nanopartículas de oro y plata obtenidas por síntesis verde(ajo) que son los resultados de la presente propuesta de este estudio nos damos cuenta que inhiban cepas de *S. aureus* presente en muestras de agua y sedimento del río Atoyac. Por lo tanto, podría contribuir a disminuir la carga bacteriana en un ambiente no controlado y puede incidir para salud pública mundial.

11. ANEXO

Tabla 1. Datos de la OD antes de incubar de las nanopartículas de plata y oro para la inhibición de *S. aureus*

AgNPS/inactivas			
c-/C.bacteriano	AgNPS	AgNPS/Ajo	
0.1	0.4	0.3	Cepa tipo
0.1	0.4	0.3	Cepa tipo
0.1	0.4	0.2	S1
0.1	0.4	0.2	S1
0.1	0.4	0.3	3A2
0.1	0.4	0.3	3A2
0.1	0.3	0.3	S42
0.1	0.3	0.3	S42
AuNPS/inactivas			
c-/C.bacteriano	AuNPS	AuNPS/Ajo	
0.1	0.2	0.2	Cepa tipo
0.1	0.2	0.2	Cepa tipo
0.1	0.2	0.2	S1
0.1	0.2	0.2	S1
0.2	0.2	0.2	3A2
0.2	0.2	0.2	3A2
0.1	0.1	0.2	S42
0.1	0.1	0.2	S42

Tabla 2. Datos de la OD después de incubación por 24 h de las nanopartículas de plata y oro.

AgNPS/activadas			
c-/C.bacteriano	AgNPS	AgNPS/Ajo	
0.8	0.3	0.3	Cepa tipo
0.8	0.3	0.3	Cepa tipo
0.5	0.2	0.2	S1
0.5	0.2	0.2	S1
0.5	0.3	0.3	3A2
0.5	0.3	0.3	3A2
0.6	0.2	0.3	S42
0.6	0.2	0.3	S42
AuNPS/activadas			

c-/C.bacteriano	AuNPS	AuNPS/Ajo	
0.8	0.9	0.5	Cepa tipo
0.8	0.9	0.5	Cepa tipo
0.6	0.8	0.6	S1
0.6	0.8	0.6	S1
0.7	0.8	0.5	3A2
0.7	0.8	0.5	3A2
0.8	0.8	0.5	S42
0.8	0.8	0.5	S42

12. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Chimal, Rafael, Arenas-Alatorre, Jesús Ángel, Marichi-Rodríguez, Francisco, Correa-Prado, Rodrigo, & Álvarez-Pérez, Marco Antonio. (2025). La química verde en la síntesis de nanopartículas y sus propiedades antibacterianas. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 18(34), e69826. Epub 25 de febrero de 2025. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2025.34.69826>

Aguirre-Avalos, G., Mijangos-Méndez, J. C., & Amaya-Tapia, G. (2010). *Bacteriemia por Acinetobacter baumannii*. Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457745511008>

Aguilar-Salazar, A., Martínez-Vázquez, A. V., Aguilera-Arreola, G., De Jesus De Luna-Santillana, E., Cruz-Hernández, M. A., Escobedo-Bonilla, C. M., Lara-Ramírez, E., Sánchez-Sánchez, M., Guerrero, A., Rivera, G., & Bocanegra-García, V. (2023). Prevalence of ESKAPE bacteria in surface water and wastewater sources: Multidrug resistance and molecular characterization, an updated review. *Water*, 15(18), 3200. <https://doi.org/10.3390/w15183200>

Ahmad, T., Wani, I. A., Manzoor, N., Ahmed, J., & Asiri, A. M. (2013). Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 107, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.004>

Ahuatzin Flores, O. (2025). Dispersión de patógenos ESKAPE en el aire y su detección en efluentes cercanos a hospitales de la ciudad de Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/28389>

Aloke, C., & Achilonu, I. (2022). Coping with the ESKAPE pathogens: Evolving strategies, challenges and future prospects. *Microbial Pathogenesis*, 175, 105963. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105963>

Baquero-Marín PJ, Cabarcas-López WF, Carrillo-Betancourt PX, Gaviria-Maya JE, Giraldo-Ospina B, Barrios-Arroyave FA. Infección urinaria por *Acinetobacter baumannii* adquirida en la comunidad: caso clínico de una paciente embarazada. *Ginecol Obstet Mex*. 2018 octubre;86(10):682-686. DOI: <https://doi.org/10.24245/gom.v86i10.2213>

Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012 Dec;76(4):685-706. doi: 10.1128/MMBR.00023-12. PMID: 23204362; PMCID: PMC3510518.

Bertrand, B., Morales-Martínez, A., Hernández-Adame, P. L., & Muñoz-Garay, C. (2023). Multirresistencia a antibióticos y alternativas para resolver esta crisis. *Revista Digital Universitaria*, 23(3). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2023.24.3.1>

Biggel, M., Nüesch-Inderbinnen, M., Raschle, S., Stevens, M. J., & Stephan, R. (2021). Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST133 in the aquatic environment in Switzerland. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.002>

Bouqellah, N. A., Mohamed, M. M., & Ibrahim, Y. (2018). Synthesis of eco-friendly silver nanoparticles using *Allium* sp. and their antimicrobial potential on selected

vaginal bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1789–1794. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.001>

Canale-Guerrero, A., Chombo-Morales, P., Ramírez-Cerda, E., & Feria-Velasco, AI (2011). EL RESURGIMIENTO DE LAS TETRACICLINAS. *e-Gnosis*, 9 (), 1-6.

Castellano González, Maribel J, & Perozo-Mena, Armindo J. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38(1), 18-35. Recuperado en 04 de junio de 2025, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003&lng=es&tlng=es.

Denissen, J., Reyneke, B., Waso-Reyneke, M., Havenga, B., Barnard, T., Khan, S., & Khan, W. (2022). Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *International journal of hygiene and environmental health*, 244, 114006.

Delgado-Gardea, M. C. E., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., Zavala-Díaz de la Serna, F. J., Eroza-de la Vega, G., Nevárez-Moorillón, G. V., Pérez-Recoder, M. C., Sánchez-Ramírez, B., González-Horta, M. D. C., & Infante-Ramírez, R. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Surface Water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6), 597. <https://doi.org/10.3390/ijerph13060597>

Efectos terapéuticos del ajo (*Allium sativum*). (Ramirez et al.). *Salud Y Administración*, 3, 39–47. https://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4_Efectos_Terapeuticos_Ajo.p

df

E, B. H., & T, L. P. (2007). Enterococcus sp Parte II. *Revista Chilena De Infectología*, 24(4). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182007000400009>

Esparza Olcina MJ. Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. (v.2/2008). Guía_ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico [en línea] [actualizado el 22/11/2008; consultado el 29/06/2025]

Fuentes, M. D., Gutierrez, S., Sahagun, D., Gomez, J., Mendoza, J., Ellis, C. C., Bauer, S., Blattner, J., Lee, W., Alvarez, M., & Domínguez, D. C. (2019). Assessment of antibiotic levels, Multi-Drug Resistant bacteria and genetic biomarkers in the waters of the Rio Grande River between the United States-Mexico border. *Journal of Health and Pollution*, 9(23). <https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.23.190912>

Girlich, D., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009). First Isolation of the bla OXA-23 Carbapenemase Gene from an Environmental Acinetobacter baumannii Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 578–579. <https://doi.org/10.1128/aac.00861-09>

Galli, Lucía; Brusa, Victoria; Pellicer, Karina; Staphylococcus aureus; Inter-Médica; 2019; 1178-1185

Gerken, T. J., Roberts, M. C., Dykema, P., Melly, G., Lucas, D., De Los Santos, V., Gonzalez, J., Butaye, P., & Wiegner, T. N. (2021). Environmental Surveillance and Characterization of Antibiotic Resistant Staphylococcus aureus at Coastal

Beaches and Rivers on the Island of Hawai'i. *Antibiotics*, 10(8), 980.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10080980>

Gotkowska-Plachta, A. (2021). The prevalence of virulent and Multidrug-Resistant enterococci in river water and in treated and untreated municipal and hospital wastewater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2), 563. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020563>

Hidalgo, S. A., Torres, R. M. G., Guillén, J. C., Fernandez, M. L., Alcocer, A. T., & García-G, M. C. (2021). Medidas de prevención de infecciones y colonizaciones nosocomiales por enterococcus faecium resistente a vancomicina. *European Scientific Journal ESJ*, 17(25). <https://doi.org/10.19044/esj.2021.v17n25p193>

Héctor, Manuel & Lendo-Hernández, & Gutiérrez-Meza, Jaime & Bueno-Durán, Adela & Márquez González, Antonio & Velázquez-Meza, Ma & Maya, Idalia & Franco, Bernardo & Mondragon, Veronica. (2017). POLLUTION AND HEALTH HAZARDS: ENVIRONMENTAL ISOLATES OF *Enterococcus faecalis* AND *Enterococcus faecium* CHARACTERIZED FOR VIRULENCE GENES, ANTIBIOTIC AND HEAVY METAL RESISTANCE. 6. 182-189.

Hervé E, Beatrice, & Porte T, Lorena. (2007). *Enterococcus* sp Parte II. *Revista chilena de infectología*, 24(4), 311-312. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182007000400009>

Hernández-Castillo, D. H. C. (2021). *Parametros fisicoquimicos y microbiologicos de calidad de las aguas del rio Atoyac y Presa de Valsequillo*. CDH Puebla. Recuperado 9 de junio de 2025, de https://www.cdhpuebla.org.mx/micrositios/Derecho_Humano_al_Agua_y_Sanea

[miento/parametros.pdf](#)

Hubeny, J., Korzeniewska, E., Buta-Hubeny, M., Zieliński, W., Rolbiecki, D., & Harnisz, M. (2022). Characterization of carbapenem resistance in environmental samples and *Acinetobacter* spp. isolates from wastewater and river water in Poland. *The Science of the Total Environment*, 822, 153437. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153437>

J, P. G., S, R. M., L, M. M., J, P. G., S, R. M., & L, M. M. (n.d.). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025

Jorge Alberto, Manuel, Daniel Eduardo, Ricardo, Iván. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 41. <https://www.amimc.org.mx/wp-content/uploads/2021/08/EIM3-2021.pdf#page=21>

kanafani, Kanj, Z. S. S. K. (2023). *Acinetobacter infection: Treatment and prevention*. UpToDate. Retrieved July 4, 2025, from <https://www.uptodate.com/contents/acinetobacter-infection-treatment-and-prevention/print>

Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023, March 6). *Polymerase chain Reaction (PCR)*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK589663/>

Lingyan Sun, Yan Chen, Xiaoting Hua, Yiyi Chen, Jinjing Hong, Xueqing Wu, Yan Jiang, Willem van Schaik, Tingting Qu, Yunsong Yu, Tandem amplification of the *vanM* gene cluster drives vancomycin resistance in vancomycin-variable enterococci, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 75, Issue 2, February 2020, Pages 283–291, <https://doi.org/10.1093/jac/dkz461>

Louise Saul. AZoNano. (2019, March 21). *Gold vs. Silver Nanoparticles*. <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=4971>

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1292-305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292

Mohtar, W. H. M. W., Razali, M. A. M., Mazlan, M. A., Rozaini, A. Z. A., Mooraltharan, S. A., Hamid, A. A., & Buyong, MR (2023). Detección rápida de ESKAPE y bacterias entéricas mediante dielectroforesis cónica y su presencia en el ciclo del agua urbano. *Seguridad de procesos y protección ambiental*, 177, 427-435.

Moreno M, Claudia, González E, Rubén, & Beltrán, Constanza. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>

Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539.

Murray BE. La vida y la época de los Enterococcus. Clin Microbiol Rev. 1990; 3(1):46–65. DOI: 10.1128/cmr.3.1.46. [[DOI](#)] [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]

Obando Pacheco P, Suárez-Arrabal MC, Esparza Olcina MJ. Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. (v.3/2020). Guía_ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico [en línea] [actualizado el 20/10/2020; consultado el 1/07/2025]. Disponible en: <https://www.guia-abe.es>

O’Driscoll, T., & Crank, C. W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. Infection and Drug Resistance, 8, 217–230. <https://doi.org/10.2147/IDR.S54125>

OMS actualiza lista de patógenos resistentes. (2024, July 10). OPS/OMS | Organización Panamericana De La Salud. <https://www.paho.org/es/noticias/10-7-2024-oms-actualiza-lista-patogenos-resistentes>

Pasachova Garzón, J, Ramírez Martínez, S, & Muñoz Molina, L. (2019). Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38. Retrieved June 04, 2025, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025&lng=en&tlng=es.

Salazar de Vegasa¹, Elsa Zuleima , & Nieves², Beatriz . (2005). Acinetobacter spp: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(2), 64-71. Recuperado en 19 de junio de 2025, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-

[25562005000200003&lng=es&tlng=es.](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2025.101603)

Santos, I. R. D., De Lima, L. F., De Souza, M. B., Da Silva, I. N. M., De Sousa, A.R. V., Bailão, A. M., Amaral, C. L. D., & Bailão, E. F. L. C. (2025). First record of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from the Meia Ponte river and effluent in Brazil: an analysis of 1198 isolates. *New Microbes and New Infections*, 66, 101603. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2025.101603>

Stahl, J. (2009b). Lincosamidas. *EMC - Tratado De Medicina*, 13(4), 1–4. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(09\)70527-6](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(09)70527-6)

SEMARNAT (2022). *Saneamiento del Río Atoyac*. gob.mx. <https://www.gob.mx/semarnat%7Crioatoyac/articulos/saneamiento-del-rio-atoyac>

Silvas, L. a. C. (2023, February 20). *Resistencia bacteriana, una crisis actual*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10541255/>

Solaiman, S., Patterson, R., Davey, K., Katz, Y., Payne-Sturges, D., Sapkota, A. R., & Micallef, S. A. (2022). Effects of season and water type on the distribution and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* and *Ent. faecium* from surface and reclaimed water. *Journal of Applied Microbiology*, 133(2), 477–487. <https://doi.org/10.1111/jam.15570>

Thapaliya, D., Hellwig, E. J., Kadariya, J., Grenier, D., Jefferson, A. J., Dalman, M., Kennedy, K., DiPerna, M., Orihill, A., Taha, M., & Smith, T. C. (2017). Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-

Resistant *Staphylococcus aureus* on Public Recreational Beaches in Northeast Ohio. *GeoHealth*, 1(10), 320–332. <https://doi.org/10.1002/2017gh000106>

Treviño, Molina, N., Nora. (2022). *Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana*. Retrieved June 26, 2025, from https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=2%2D%20Impermeabilidad,propio%20de%20bacterias%20Gram%20negativas

Werth, B. J. (2024, May 10). *Trimetoprima y sulfametoxazol*. Manual MSD Versión Para Profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/trimetoprima-y-sulfametoxazol>

Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathoorn E. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020 Aug 10;9(1):130. [10.1186/s13756-020-00770-1](https://doi.org/10.1186/s13756-020-00770-1)

Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.

