UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Genes de resistencia a antibióticos y plásmidos de bacterias aerobias aisladas en la subcuenca del río Virilla de Costa Rica

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en Bacteriología

Bradd Alejandro Mendoza Guido

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

DEDICATORIA

A mis hermanos y a mi madre, porque aunque no siempre he estado de acuerdo, me han utilizado como ejemplo para salir adelante, cuando en realidad ellos me han enseñado más de lo que yo podría haber hecho. Espero que sigan en su camino académico como yo he intentado mantenerme en el mío, con los altibajos que conlleva, desarrollando resistencia al fracaso hasta llegar a donde tiempo atrás solo era un sueño.

AGRADECIMIENTO

A mis tutores, la Dra. Maria Arias, el Dr. Keilor Rojas y la Dra. Kenia Barrantes, por la tutela constante y los ánimos para seguir en este camino académico. Al Dr. Carlos Chacón director del programa de posgrado en Microbiología, por su apoyo y consejos en todo este proceso. Al Instituto de Investigaciones en Salud, Escuela de Biología y al Centro Nacional de Alta tecnología por el uso de su infraestructura para desarrollar mi tesis. A la empresa dónde laboro, Genesys Costa Rica por brindarme oportunidades de crecimiento y permitirme continuar en este proceso mediante la toma de espacios necesarios. A mis amigos, familia y pareja por siempre apoyarme y creer en mí. Y finalmente a Molly, Orión, Coco y Moka, por ser la fuerza que en ocasiones era lo único que me faltaba.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en Bacteriología.

PhD. Carlos Chacón Díaz
Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado

PhD. María Arias Andrés
Directora de Tesis

PhD. Keilor Rojas Jiménez
Asesor

M. Sc. Kenia Barrantes Jiménez
Asesora

PhD. César Rodríguez
Representante
Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología

Bradd Mendoza Guido
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA ii

AGRADECIMIENTO iii

HOJA APROBACIÓN iii

TABLA DE CONTENIDO v

RESUMEN EN ESPAÑOL vi

ABSTRACT vii

LISTA DE CUADROS viii

LISTA DE FIGURAS x

I. INTRODUCCIÓN 1

II. JUSTIFICACIÓN 11

III. OBJETIVOS 12

IV. METODOLOGÍA 13

V. RESULTADOS 19

VI. DISCUSIÓN 42

VII. CONCLUSIONES 58

VIII. FUENTES DE FINANCIAMIENTO 59

IX. REFERENCIAS 60

X. ANEXOS 87

RESUMEN EN ESPAÑOL

La contaminación del agua con sustancias orgánicas, incluidos los antibióticos, representa una creciente preocupación a nivel global. La exposición de las bacterias ambientales a contaminantes no antibióticos, puede aumentar las tasas de transferencia horizontal de genes, así como la expresión de Genes de Resistencia a Antibióticos (GRAs). Debido a esto, se destaca la necesidad de monitorear y comprender las dinámicas de resistencia antimicrobiana en bacterias ambientales locales, para abordar de manera efectiva la problemática de resistencia desde el concepto multidisciplinario de "Una Salud". En este estudio se recolectaron muestras de la columna de agua en tres ubicaciones a lo largo de un gradiente de contaminación del río Virilla y se aislaron bacterias de la familia Enterobacteriaceae. Se secuenció el genoma de 15 aislamientos (cinco por sitio) para identificar sus GRAs, Elementos Genéticos Móviles (EGMs) y evaluar su resistencia a múltiples antimicrobianos mediante el sistema VITEK2. Se obtuvieron aislamientos de los géneros *Shigella* (10 aislamientos), *Klebsiella* (4) y *Citrobacter* (1). En términos generales, se observó que los aislamientos del sitio de muestreo con mayor contaminación (Sitio 3) presentaron mayor número de GRAs, plásmidos y fenotipos de resistencia, destacando el aislamiento A231-12 (*Shigella* sp.) que presentó resistencia a siete antibióticos. La resistencia en este aislamiento parece ser conferida por genes que se encuentran dentro de un único plásmido, que cuenta con un integron de clase 1 que podría facilitar el flujo de estos GRAs. Además, se encontraron los genes *sul* y *dfrA* presentes en conjunto en plásmidos y un integron de clase 1, lo que indica un posible evento de co-resistencia a la combinación de los antibióticos trimetoprima/sulfametoxazol con el potencial de movilizarse a otras bacterias en el ambiente. Los resultados sugieren la necesidad de ampliar los estudios sobre la relación entre contaminación y resistencia a antimicrobianos en ambientes acuáticos, para entender mejor las dinámicas de resistencia en cepas ambientales que posteriormente pueden llegar a desarrollarse en casos clínicos.

ABSTRACT

Water pollution with organic substances, including antibiotics, represents a growing global concern. In Costa Rica, the sub-basin of the Virilla River presents high levels of environmental risk due to the presence of emerging contaminants. The exposure of non-antibiotic contaminants, such as pharmaceuticals and microplastics to environmental bacteria can increase horizontal gene transfer events and the expression of antibiotic resistance genes (ARGs). Therefore, there is a need to monitor and understand antimicrobial resistance dynamics in local environmental bacteria to effectively address the resistance issue from the multidisciplinary concept of "One Health". In this study, we sampled three locations along a contamination gradient of the Virilla River, where surface water samples were collected and used to isolate bacteria of the Enterobacteriaceae family. The genomes of 15 isolates (five per site) were sequenced to identify their ARGs, mobile genetic elements (MGEs), and evaluate their resistance to multiple antimicrobials using the VITEK2 system. We obtained isolates from the genera *Shigella* (10 isolates), Klebsiella (4), and Citrobacter (1). Overall, isolates from the sampling site with higher levels of contamination (site 3) showed a higher number of ARGs, plasmids, and resistance phenotypes, highlighting the isolate A231-12 (*Shigella* sp.), which exhibited resistance to seven antibiotics. All indications suggest that resistance phenotype in this isolate is conferred by genes found within a single plasmid with replicases from the IncFIA and IncQ1 groups, that also contains a class 1 integron that could facilitate the flow of these ARGs. Additionally, the *sul* and *dfrA* genes were found together on plasmids and a class 1 integron, indicating a possible co-resistance event against the combination of trimethoprim/sulfamethoxazole antibiotics with the potential to spread into other bacteria in the environment. Taken together, these results suggest the need to expand studies about the relationship between pollution and antimicrobial resistance in aquatic environments, to better understand resistance dynamics in environmental strains that may subsequently develop into clinical cases.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estadísticas base de los aislamientos obtenidos para los diferentes métodos de ensamblaje. La taxonomía más cercana se obtuvo mediante la herramienta GTDB, además se puede encontrar el valor de ANI para la cepa más cercana en la base de datos……...…...……20

Cuadro 2. Cantidad de GRAs clasificados por su genotipo de resistencia encontrados en el cromosoma y en plásmidos de los genomas ensamblados a partir de los datos de obtenidos por la plataforma Illumina. Todos los GRAs presentaron un porcentaje de cobertura y similitud mayor al 93%...….…..……28

Cuadro 3. Cantidad de GRAs clasificados por su genotipo de resistencia encontrados en los diferentes géneros bacterianos de los genomas ensamblados a partir de los datos de obtenidos por la plataforma Illumina…….……30

Cuadro 4. Número de plásmidos, integrones y Secuencias de Inserción (SI) encontradas en cada aislamiento analizado según los datos obtenidos por la plataforma Illumina……...31

Cuadro 5. Mutaciones y genes asociados con la resistencia a nitrofurantoina para los aislamientos pertenecientes a los géneros *Shigella* y *Klebsiella*. Se utilizó como referencia los genomas de las cepas *E. coli* K12 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, ambas susceptibles a la nitrofurantoína….……40

Cuadro suplementario 1. Información de acceso a los genomas de las diferentes cepas externas utilizadas en el árbol filogenómico. ……87

Cuadro suplementario 2. Resultados de los GRAs presentes en los 15 aislamientos que fueron secuenciados por la plataforma Illumina, obtenidos por el software abricate utilizando la base de datos AMR-FinderPlus del NCBI. Se muestra el código del aislamiento, el código del plásmido o si se encontraba en el cromosma del aislamiento, el nombre del gen, la cobertura

e identidad contra la referencia utilizada por la base de datos, el código de accesión de la referencia utilizada y el fenotipo de resistencia al que se asocia dicho gen…….88

Cuadro suplementario 3. Resultados de los elementos genéticos móviles presentes en los 15 aislamientos que fueron secuenciados por la plataforma Illumina, obtenidos por el software MOB-suite. Se muestra el código del plásmido, el código del aislamiento, el tamaño putativo del plásmido y su contenido GC, el grupo de incompatibilidad de las replicasas presentes, la clase de la relaxasa y el tipo de plásmido (conjugativo, movilizable o no mobilizable)……...91

Cuadro suplementario 4. Resultados de los GRAs presentes en los 2 aislamientos que fueron secuenciados por las plataformas Illumina y PacBio, obtenidos por el software abricate utilizando la base de datos AMR-FinderPlus del NCBI. Se muestra el código del aislamiento, el código del plásmido o si se encontraba en el cromosma del aislamiento, el nombre del gen, la cobertura e identidad contra la referencia utilizada por la base de datos, el código de accesión de la referencia utilizada y el fenotipo de resistencia al que se asocia dicho gen…….93

Cuadro suplementario 5. Resultados de los elementos genéticos móviles presentes en los 2 aislamientos que fueron secuenciados por las plataformas Illumina y PacBio, obtenidos por el software MOB-suite. Se muestra el código del plásmido, el código del aislamiento, el tamaño putativo del plásmido y su contenido GC, el grupo de incompatibilidad de las replicasas presentes, la clase de la relaxasa y el tipo de plásmido (conjugativo, movilizable o no mobilizable)……..95

Cuadro suplementario 6. Información obtenida mediante Sistemas de Información Geográfica para cada uno de los sitios muestreados. Categorías RVI: NT No o escasamente transformado, muy sostenible RVI ≥70%; PT Parcialmente transformado, sostenibilidad media 50%≤RVI<70%; MT Transformación moderada, sostenibilidad media-baja 30%≤RVI<50%; HT Altamente transformado, baja sostenibilidad 10%≤RVI<30%; CT Completamente transformado RVI< 10% (las siglas corresponden al inglés)……..96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dendrograma de los aislamientos basado en el porcentaje de identidad de nucléotidos (ANI por sus siglas en inglés) que comparten entre ellos. Se traza una línea en dos puntos, al 90 y 99.5% de diferencia entre el valor de ANI……....22

Figura 2. Árbol filogenómico representando las relaciones evolutivas basadas en el algoritmo máximum likelihood, de las bacterias aisladas y otros genomas de referencia descargados del NCBI. En los nodos se muestran los valores de boostrap basados en 1000 submuestros; los colores representan los sitios de dónde se aislaron las bacterias y las barras en azul representan el número de ARGs presentes (los números entre paréntesis representan los ARGs encontrados en plásmidos)……..……....24

Figura 3. Fenotipo de resistencia de los aislamientos que fueron resistentes al menos a un antibiótico realizado por VITEK2. En cada cuadro se muestra el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) obtenida..... ……....25

Figura 4. Abundancia absoluta de GRAs encontrados por sitio. Cada punto en el gráfico representa el número de GRAs encontrados en el genoma de un aislamiento……....26

Figura 5. Abundancia absoluta de EGMs encontrados por sitio. Cada punto en el gráfico representa el número de EGMs encontrados en el genoma de un aislamiento……....32

Figura 6. Sección del cromosoma del aislamiento *Shigella* sp. A224-8 que contiene el plásmido potencial incorporado, obtenido por el ensamblaje híbrido (Illumina y PacBio). Se resaltan los GRAs, secuencias *attC* y la replicasa del grupo IncQ1 que asocia la región con un plásmido de dicho grupo.....……....33

Figura 7. Estructura putativa del plásmido AB190 identificado por el software MOB-suite con los datos de ensamblaje híbridos asociado al aislamiento……....34

Figura 8. Estructura putativa del plásmido A998 identificado por el software MOB-suite con los datos del ensamblaje híbrido asociados al aislamiento *Shigella* sp. A231-12. Se resalta los GRAs, secuencias de inserción (SI) y secuencias *attC*…….……....36

Figura 9. Estructura putativa de la región multirresistente del plásmido A998 presente en el aislamiento *Shigella* sp. A231-12 para los datos del ensamblaje híbrido. En ambos casos se resalta los GRAs, secuencias de inserción (SI) y secuencias *attC*. ……....36

Figura 10. Estructura putativa del plásmido AB595 identificado por el software MOB-suite con los datos de Illumina asociado al aislamiento *K. pneumoniae* A238-6. Se resaltan los GRAs y secuencias de inserción (SI)…….37

Figura 11. Estructura putativa del plásmido PAC305 identificado por el software MOB-suite con los datos de Illumina asociado al aislamiento *C. gillenii* A223-5. Se resaltan los GRAs…….38

I. INTRODUCCIÓN

El agua es una molécula indispensable para que la vida celular exista como la conocemos hoy día; y a pesar de que su consumo es estrictamente necesario para que las personas se mantengan en un estado de salud adecuado, un tercio de la población mundial sufre problemas de acceso a agua potable (1). La contaminación de los recursos hídricos como ríos y mares se asocia principalmente con el alto uso e inadecuado desecho de compuestos orgánicos de origen antropogénico, como plaguicidas, tensioactivos, hormonas, antibióticos, colorantes, entre muchos otros más. Y aunque estos compuestos se han vuelto esenciales en actividades cotidianas como la agricultura, la salud y el cuidado personal, su producción y emisión al ambiente han sobrepasado la capacidad de monitoreo y evaluación de sus efectos nocivos en la salud ambiental (2).

Luego de ser utilizadas, las sustancias químicas son transportadas por escorrentía o son vertidas a las cañerías, liberadas en ríos y posteriormente a los mares. Si bien una parte de las aguas residuales son llevadas a plantas de tratamiento, donde disminuyen las cargas de estos contaminantes, por lo general no logran ser removidos en su totalidad y siguen siendo liberados parcialmente (3). Este tipo de contaminación está ligada al crecimiento de la urbanización, resultando particularmente importante en los países de renta media o “en desarrollo”, debido a un incremento en el acceso a sustancias químicas en contraposición con un avance insuficiente de infraestructura de saneamiento (4). La presencia de agentes químicos, incluyendo a los antibióticos, pueden ocasionar una selección de microorganismos con resistencia a los mismos. La resistencia a antimicrobianos (RAM) es otro de los mayores problemas que enfrenta hoy en día la humanidad (5). Recientemente se ha catalogado como un problema ecológico, que requiere abordarse mediante perspectivas multidisciplinarias como la de “Una Salud” (“One Health” en inglés), que relaciona la salud humana, animal y la calidad ambiental (6).

Los antibióticos son compuestos orgánicos producidos por microorganismos o producidos sintéticamente que son utilizados en áreas como la agricultura y salud, tanto humana como animal. Estas drogas pueden funcionar de dos maneras 1) aquellas citotóxicas que provocan la muerte de los microorganismos y, 2) aquellas citostáticas que inhiben su

crecimiento, pero nos las eliminan (7). A pesar del beneficio que han traído estos compuestos en la lucha contra múltiples microorganismos patógenos, su uso y desecho inadecuado a través de los años ha causado que se cree una fuerza selectiva constante, provocando a su vez el desarrollo de resistencia a los mismos. Se ha intentado responder a estos microorganismos multirresistentes mediante la búsqueda y producción de nuevos antibióticos. Sin embargo, todo indica que la humanidad está perdiendo la batalla, ya que los microorganismos cada vez parecen tener mayor resistencia mientras que a su vez nos topamos con un "vacío" en el desarrollo de nuevas moléculas antimicrobianas (7, 8).

Las sustancias farmacéuticas, incluyendo antibióticos, son catalogados como contaminantes emergentes, y mayoritariamente se encuentran en el ambiente como mezclas químicas con otros contaminantes. Los estándares para el tratamiento de estos residuos no han sido totalmente establecidos debido a su complejidad y variabilidad (9, 10). Los residuos de antibióticos han sido detectados globalmente tanto en ambientes terrestres como acuáticos, en concentraciones preocupantes que en ocasiones sobrepasan los límites terapéuticos (11). El daño ecológico que estos pueden causar se ha medido utilizando evaluaciones de riesgo ambientales con la exposición a organismos modelo como *Daphnia* y otros macroinvertebrados, pero se ha planteado la necesidad de utilizar mejores métodos que evalúen la alteración en las comunidades microbianas que son esenciales para los ecosistemas (10, 11).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales están diseñadas para tratar residuos sólidos únicamente, por lo que los residuos de sustancias farmacéuticas activas se almacenan y consecuentemente son liberadas al ambiente. Muchos de estos residuos, como los antibióticos entre otros compuestos químicos, al pasar por las plantas de tratamiento son expuestos a las comunidades microbianas ahí habitantes, ocasionando una presión selectiva en los microorganismos presentes que ocasiona la diseminación de los genes de resistencia y microorganismos resistentes a los antibióticos expuestos. En Costa Rica se ha evidenciado la presencia de múltiples residuos de antibióticos en aguas superficiales y marinas (5, 12, 13).

Los genes encargados de generar la resistencia a los antibióticos no se quedan solo dentro de los microorganismos que los contienen, sino que pueden ser transferidos a otros microorganismos en el ambiente. Los eventos de transferencia horizontal de genes (THG) juegan un papel esencial en la evolución de los organismos, debido a que permiten el flujo

de genes y la adquisición de fenotipos con ventaja adaptativa (14). Se sabe que este evento es una de las fuerzas más importantes que dan forma a los genomas procariotas. De hecho, se ha argumentado que la THG representa una fuerza evolutiva con mayor peso en las bacterias que la evolución dirigida por mutaciones (15, 16); llegándose a denominar como "evolución en saltos cuánticos" debido a la adquisición de múltiples genes en un solo evento, abriendo la puerta a la diversificación de los genomas (17, 18). La THG además ha sido asociada con la formación de organelas como la mitocondria o el cloroplasto; esto debido a que hay evidencia de eventos de THG desde diferentes simbiontes procariotas a sus hospederos eucariontes (14). De hecho se ha encontrado evidencia de posibles eventos de THG desde bacterias que conforman el microbioma humano a células somáticas del hospedero (19).

Uno de los principales mecanismos de THG involucrados en la transferencia de GRAs en bacterias es la conjugación (14). Esta se basa en la transferencia de un plásmido (molécula de ADN extracromosomal) de una bacteria a otra mediante la formación de un pili sexual. Aquí la molécula de ADN se mueve en conjunto con proteínas, formando una partícula de nucleoproteína que secretada por un sistema de secreción en bacterias (generalmente el tipo IV) (20). Este mecanismo requiere contacto físico entre las bacterias y que los genes se encuentren en el plásmido transportado de una bacteria a otra. Los mecanismos biológicos y ecológicos que determinan la persistencia de plásmidos y su genes en comunidades bacterianas del ambiente son objeto de debate en la actualidad, ya que se cree incluso que los plásmidos que no están bajo selección natural pueden permanecer en las poblaciones por procesos de deriva génica y eventualmente contribuir al "fitness" (éxito reproductivo) de las especies (21, 22).

Los GRAs también pueden ser adquiridos por el mecanismo de transformación; el cual se basa en la capacidad que tienen ciertas bacterias competentes de tomar el ADN libre en el ambiente e introducirlo en el interior de la célula dónde puede recombinar con el genoma bacteriano si cumple con cierto grado de homología, o bien ser convertirdo en elementos extra cromosomales (23). Otro mecanismo de THG capaz de movilizar GRAs es conocido como transducción; el cual se basa en el movimiento de ADN de una bacteria a otra mediante un fago (virus que colonizan bacterias). Si bien esta forma de movilización de

GRAs ha sido menos estudiada, se ha reportado en múltiples especies (24–26), llegando a movilizar no sólo GRAs sino también plásmidos completos (26).

Adicionalmente, se ha descrito que los agentes de transferencia de genes (ATG) pueden movilizar genes en tasas significativas (27). Los ATG son partículas producidas por la célula huésped bacteriana que se ensamblan de forma similar a los bacteriófagos, pero introduciendo segmentos aleatorios de ADN en lugar de los genes para su propia reproducción (28). Estos ATG fueron descritos en la especie *Rhodobacter capsulatus*, y se ha demostrado que pueden acarrear GRAs y su producción ser estimulada por la presencia de antibióticos en el ambiente (29). Finalmente, en los últimos años se ha propuesto la vesiducción como un quinto mecanismo de THG, el cual se basa en la formación de vesículas de membrana que empaqueta diferentes compuestos (como ADN) por parte de una célula; que puede ser transferida e internalizada en otra célula receptora (30). Este mecanismo ha sido reportado como capaz de transferir GRAs que expresan resistencia a antibióticos betalactámicos en experimentos de laboratorio (31).

Debido a que los plásmidos conjugativos representan uno de los medios de movilización de genes (como GRAs) más efectivos, se han utilizado diferentes métodos de clasificación para nombrarlos (32). Estos métodos se basan principalmente en las funciones de movilización y replicación de los plásmidos; por ejemplo, los plásmidos se pueden nombrar según su habilidad de coexistir con otros plásmidos en la misma célula debido a la similitud en sus sistemas de replicación, siendo aquellos plásmidos del mismo grupo incompatibles entre sí. Por lo que, los plásmidos con alta similitud en las secuencias de replicación, son asignados dentro de los mismos grupos de incompatibilidad (Inc) (32). Sin embargo, este sistema de clasificación ha mostrado ciertas limitaciones, como por ejemplo que algunos plásmidos del mismo grupo sean parcialmente compatibles y otros de grupos que deberían ser compatibles se excluyan entre sí (32, 33).

Asimismo, los plásmidos pueden ser clasificados según la secuencia y origen filogenético de la relaxasa, la cual es una enzima que cataliza el corte en una de las hebras de ADN del plásmido para facilitar su movimiento a través del sistema de secreción (34). Si bien esto permite agrupar los plásmidos bajo diferentes grupos de relaxasas, Garcillan-Vilan y colaboradores demostraron que al analizar 9894 plásmidos, más de la mitad (58%) no presentaron relaxasa, por lo que los plásmidos “no movilizables” no pueden clasificarse bajo

dicho sistema (32). Estas limitaciones han ocasionado que se propongan nuevos sistemas de clasificación de plásmidos basados en toda la secuencia de su estructura; de hecho algunas de las nuevas herramientas bioinformáticas como MOB-suite (35) y pATLAS (36) usan sistemas de clasificación basados en distancias genéticas, que representan de mejor manera las relaciones de intercambio de genes entre plásmidos. Sin embargo, el flujo continuo de genes entre plásmidos debido a las altas tasas de recombinación y de transferencia horizontal generan complicaciones en la clasificación de plásmidos bajo esta modalidad (32). Además, sigue siendo esencial anotar y clasificar la secuencia de replicación y la relaxasa en caso de ser posible para poder relacionar nuevos plásmidos con otros previamente descritos en la literatura.

La tasa de conjugación y prevalencia de plásmidos puede verse afectada por diferentes factores, principalmente aquellos que alteran alguna de las variables que establecen el nicho en el que se encuentran sus microrganismos hospederos. Esto se da, debido a que los plásmidos tienden a acarrear genes que participan en procesos celulares y metabólicos involucrados en la adaptación al ambiente, como genes de resistencia y factores de virulencia, entre otros. Por lo que, en presencia de una presión selectiva, la transferencia de los plásmidos y la expresión de sus genes puede beneficiar su persistencia en el ambiente (37). La teoría clásica apunta a que entre mayor sea la ventaja adaptativa que esos genes le den a su hospedero, mayor será la tasa de prevalencia de dicho plásmido en esa población. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la selección natural no es la única fuerza evolutiva que puede afectar la fijación de un plásmido en la población, sino que la deriva génica y la estocasticidad ambiental también juegan un papel (21, 22).

Otro de los factores que puede afectar la tasa de conjugación es la relación filogenética entre el organismo donador y el receptor; si bien estudios indican que conforme la relación taxonómica entre el donador y el receptor aumenta la tasa de conjugación tiende a disminuir (38), también es cierto que dicho evento puede darse entre bacterias de clados (grupo de taxones emparentados filogenéticamente) muy distantes (39, 40). Sin embargo, al compartir una relación filogenética cercana, es más común que conserven mecanismos de replicación y expresión del ADN plasmídico compatible (38). Asimismo, como este proceso debe llevarse mediante contacto físico entre las células (41), es necesario que haya una cercanía física, la cuál es mayormente compartida entre aquellas bacterias que habitan en

nichos con características similares. A pesar de esto existen algunas barreras que pueden bloquear o disminuir la conjugación entre bacterias. En enterobacterias es común encontrar a la proteína TraT que ayuda a crear una exclusión de superficie y denegar la conjugación de plásmidos similares a los que ya estén en la célula receptora (42) . Otra barrera que dificulta el proceso de adquisición de plásmidos es la presencia de enzimas de restricción en la célula, ya que la mayoría de estos se mueven en su forma de hebra sencilla y entre mayor sea la presencia de sitios de restricción, mayor es el rechazo que experimentan las bacterias (43).

Anteriormente se han descrito las principales familias de plásmidos que acarrean GRAs en bacterias de la familia Enterobacteriaceae. Plásmidos del grupo de incompatibilidad IncF (o MOB_F por su relaxasa) son restringidos a Enterobacterias, y principalmente encontrados en *E. coli*. En estos plásmidos se asocian principalmente la presencia de genes que codifican BetaLactamasas de Espectro Extendido (BLEE), cabapenemasas, modificadores de aminoglicósidos y genes de resistencia a quinolonas (44). Por otro lado, los plásmidos del grupo IncI son encontrados en un reducido número de bacterias y suelen encontrarse principalmente en aislamientos europeos de aves de corral (45, 46). Los plásmidos del grupo IncX similar a los IncI, se han asociado principalmente con aislamientos de *E. coli* y *Salmonella* de origen animal (44), y presentan GRAs asociados con BLEE y resistencia a quinolonas aunque también se han encontrado genes de resistencia a carbapenemasas (47, 48).

En bacterias de la familia Enterobacteriaceae existen otros grupos de plásmidos que suelen ser detectados en menor medida, como los de los grupos IncR e IncQ. Los primeros suelen no presentar una relaxasa ni elementos conjugativos, pero presentando genes que confieren resistencia a una amplia cantidad de tipos de antibióticos como betalactámicos, sulfonamidas, quinolonas, aminoglicósidos, entre otros (44, 49). Los plásmidos IncQ presentan una relaxasa del grupo MOB_Q y se ha reportado la presencia de GRAs como *blaCMY-4*, *blaGES-1* y el arreglo genético *sul2-strA-strB* en su estructura (50, 51).

La presencia de contaminantes no-antibióticos en el ambiente también puede acelerar la tasa de conjugación de las bacterias y con ello el intercambio de genes de resistencia a antibióticos. Muchos agentes farmacéuticos tienen niveles de citotoxicidad que pueden causar estrés celular, que en bacterias está definido como condiciones extremas y potencialmente dañinas detectadas por las bacterias, que desencadenan respuestas genéticas

y metabólicas como respuesta a sobrevivir (52). Ante el estrés celular causado por fármacos citotóxicos, microorganismos como las bacterias pueden desencadenar diferentes respuestas metabólicas. Una de ellas es la alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (53). Estas moléculas generan un daño oxidativo en las células que puede tener múltiples repercusiones, entre ellas el aumentar la permeabilidad de las membranas celulares (54). El aumento de la permeabilidad y daño de las membranas celulares ocasionado por la presencia de sustancias químicas, ha demostrado jugar un papel importante en el aumento de las tasas de conjugación y la transferencia de genes de resistencia en bacterias de diferentes grupos (55–58).

Aunque los mecanismos no están del todo claros, se sabe que las membranas más permeables por un aumento en la expresión de porinas, pueden permitir un mayor ingreso de sustancias farmacéuticas, potenciando la intensidad de su efecto promotor de la respuesta SOS y de la conjugación (55). La respuesta SOS se define como una respuesta ante el daño al ADN dónde el ciclo celular se detiene para reparar el ADN mediante polimerasas de baja fidelidad, lo que implica la generación de nuevas variantes que podrían tener un efecto directo en el “fitness” de las especies (59) Estudios han demostrado que los fármacos no antibióticos también pueden ocasionar la sobreexpresión de genes relacionados con la regulación de la permeabilidad de la membrana y de canales de la membrana externa (54, 60). Asimismo, la presencia de contaminantes en el ambiente suele ocasionar una mayor producción de bombas de eflujo en las bacterias, ya que utilizan dichos canales activos para sacar múltiples compuestos del interior de la célula. Esto puede ocasionar un fenómeno de co-selección, ya que algunas de las bombas pueden extrudir también múltiples antibióticos que se encuentren en las células bacterianas, provocando resistencia a los mismos (61, 62).

Otros genes que tienden a regularse por la presencia de algunos fármacos como ibuprofeno, naproxeno, gemfibrozil y diclofenaco, son aquellos relacionados con la producción de pilis sexuales y la generación de las fimbrias. Los pilis son el conducto por el cual el plásmido se mueve a través de una bacteria a otra y las fimbrias son apéndices que facilitan la adhesión (presentes en gram negativas), favoreciendo también el contacto célula a célula. Ambos apéndices celulares pueden beneficiar el intercambio de material genético ya que pueden participar en el proceso de conjugación (54). Lo anterior indica que la

presencia de estos químicos puede generar cambios a nivel de membrana y sus apéndices por diferentes vías.

Como se mencionó anteriormente, otro mecanismo por el cual los fármacos no antibióticos pueden afectar la transferencia de genes de resistencia es mediante el sistema SOS de reparación de ADN (54). Las bacterias al recibir daño en el ADN por diferentes agentes mutagénicos como: la radiación UV, metil metano sulfonato u otras sustancias que muten el ADN o perjudiquen la síntesis de ADN; expresan diferentes ADN polimerasas especiales. Estas son capaces de sintetizar una nueva hebra utilizando el ADN dañado como molde, pero rellenando con una secuencia de nucléotidos aleatorios (63). Este mismo sistema al ser activado puede promover o potenciar otros procesos como la transferencia horizontal de genes y la recombinación (64, 65). Muchos antibióticos expuestos por debajo de su dosis letal mínima (cantidad mínima necesaria para provocar la muerte del organismo), desencadenan la respuesta SOS en bacterias, y además se ha demostrado que otros fármacos no antibióticos también pueden hacerlo (54). Además, el sistema SOS ocasiona diferentes mutaciones a lo largo del genoma, propiciando la creación de variantes de genes de resistencia que podrían otorgar una ventaja adaptativa (o no) a las especies (66). Por lo que tendríamos otro sistema indirecto en el que estos fármacos podrían propiciar la diversidad y prevalencia de genes de resistencia a otras bacterias de la población.

Como se mencionó previamente, las bacterias también pueden adquirir genes en el ambiente mediante el proceso de transformación. Aunque los ambientes acuáticos altamente contaminados representan ambientes hostiles donde el ADN tiende a degradarse en mayor medida, un estudio demostró que las concentraciones de ADN extracelular en el sedimento son mayores a las intracelulares en un río de China (67). Esto se relaciona con el hecho de que las moléculas de ADN pueden adherirse a diferentes partículas y estabilizarse; las mismas partículas donde los microorganismos pueden asentarse y facilitar el proceso de transferencia horizontal de genes (transformación por contacto físico) (68).

Debido a los mismos principios mencionados anteriormente en dónde los fármacos no antibióticos pueden producir ROS y afectar la permeabilidad de la membrana, el proceso de transformación genética se verá beneficiado ya que permitirá el paso de los genes al ambiente intracelular (54). También se ha determinado que hay cierta co-selección entre genes de resistencia a antibióticos y genes de resistencia a biocidas, debido a que tienden a

estar en los mismos elementos móviles o los mecanismos comparten genes en común; ocasionando que un aumento indiscriminado de biocidas aumente la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (69). A esto se le suma el hecho de que hoy día hay una gran cantidad de microplásticos que se han liberado y circulan en el ambiente, funcionando probablemente como un reservorio de genes de resistencia (debido a sus comunidades asociadas) en ambientes acuáticos y propiciando el desarrollo de bacterias multirresistentes (70, 71).

Aunque la resistencia a los antibióticos es una problemática que se ha propiciado en diferentes grupos taxonómicos bacterianos, uno de los que más han preocupado es aquel que abarca a bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Estas bacterias han desarrollado una alta capacidad de resistir a diferentes antibióticos, como las betalactamasas, en especial a los carbapenemes, lo que ha causado que se ubiquen en la prioridad 1 (crítica) en la problemática de resistencia a antibióticos, según la Organización Mundial de la Salud (72).

Debido a que la adquisición de genes de resistencia a antibióticos se da principalmente por el flujo de plásmidos entre bacterias (73), el estudiar los efectos de diferentes factores en las tasas de conjugación de estas bacterias puede ayudarnos a entender mejor las dinámicas de resistencia; en especial en aquellas cepas ambientales que son menos estudiadas (74). Ya ha sido probado en estudios previos, que la presencia de fármacos no antibióticos puede generar un aumento en las tasas de conjugación de *E. coli* (54, 75). Al aplicar acetaminofén en bajas concentraciones se promueve la tasa de transferencia de plásmidos mediado por conjugación. Este patrón peculiarmente fue observado en dos plásmidos de interés clínico que acarreaban los genes *mcr-1* o *tet*(X4), que confieren resistencia a la colistina y tigeciclina (75). En otro estudio se reportó además que fármacos no antibióticos como antiinflamatorios no esteroidales, reductores de lípidos y bloqueadores β, aumentan la transferencias de genes de resistencia transmitidos por conjugación (54). Ambos fenómenos se asociaron con los mismos principios mencionados anteriormente basados en la producción de ROS y aumento en la permeabilidad de la membrana.

Tomando la información anterior, se considera de suma importancia el determinar si la presencia de contaminantes producto de la actividad humana (p.e. antibióticos, desinfectantes, otras sustancias de origen farmacéutico, microplásticos, etc) pueden jugar un

papel en la diversidad de genes de resistencia presentes en bacterias en el ambiente. Estas dinámicas deben ser estudiadas a nivel local ya que las diferentes cepas y el reservorio genético puede comportarse de diferentes maneras dependiendo de la ubicación geográfica y tipos de contaminantes con los que cohabiten. Por tanto, hacemos énfasis en la importancia de monitorear los genes de resistencia en cepas ambientales locales (76).

II. JUSTIFICACIÓN

Costa Rica es uno de los países más biodiversos a nivel mundial, por lo que su imagen natural destaca particularmente ante la de muchos otros países. Sin embargo, detrás de dicha imagen se esconden problemas de uso indiscriminado de pesticidas, agroquímicos y otros contaminantes emergentes (5, 77, 78). Estos contaminantes inciden particularmente en la calidad del recurso hídrico, uno de los problemas más importantes en Latinoamérica y el mundo (1). En Costa Rica se han hecho algunos esfuerzos por determinar el grado de contaminantes farmacéuticos en aguas superficiales (12, 13, 79). Uno de estos estudios, que incluye la subcuenca del Virilla, demostró niveles altos de riesgo por toxicidad a organismos del ecosistema acuático (HQ por sus siglas en inglés de Hazard Quotient) asociado a la presencia de sustancias farmacéuticas en las aguas (12), indicando que el Virilla es uno de los ríos con mayor riesgo ambiental y presencia de contaminantes emergentes del país (5).

El surgimiento de bacterias resistentes a los antibióticos se ha vuelto una problemática a nivel de salud mundial; por lo que entender cómo ciertos agentes contaminantes pueden contribuir con la diseminación de la resistencia antimicrobiana, se vuelve un asunto clave. Especialmente, se desvela la necesidad de estudiar cepas locales, ambientales que presenten genes de resistencia, para así poder comprender cómo los contaminantes descartados a nivel local pueden estar afectando las dinámicas epidemiológicas de los genes de resistencia presentes en el ambiente.

Esto concuerda con lo planteado en el “Plan de Acción Nacional de Lucha Contra la Resistencia a los Antimicrobianos” en dónde se menciona la necesidad de un monitoreo de la RAM en el país, bajo el concepto de “Una Salud”. Asimismo, un grupo con alta necesidad de estos estudios es la familia Enterobacteriaceae, grupo bacteriano de gran importancia en la microbiota intestinal, que alberga patógenos de relevancia para la salud pública y en donde se encuentran especies de preocupación por su resistencia a los carbapenems (72). Nuestro trabajo contribuye a la generación de conocimiento sobre los perfiles de resistencia tanto genotípicos como fenotípicos de cepas locales aisladas de un ambiente con alta influencia urbana, que podría utilizarse como materia preliminar para elaborar futuros planes de monitoreo de resistencia a antimicrobianos en el ambiente.

III. OBJETIVOS

Pregunta:

¿Qué genes de resistencia y elementos genéticos móviles están presentes en el genoma de un grupo de Enterobacterias aisladas de un río con alto grado de contaminación urbana, como la subcuenca del río Virilla?

Objetivo general:

Describir la diversidad de genes de resistencia a los antibióticos y los elementos genéticos móviles presentes en el genoma de bacterias de la familia Enterobacteriaceae aisladas de muestras de columna de agua de sitios con diferente influencia urbana en el Río Virilla.

Objetivos específicos:

1) Caracterizar la presencia de genes de resistencia a antibióticos y su fenotipo en Enterobacterias aisladas de río Virilla.

2) Describir la estructura de los elementos genéticos móviles con genes de resistencia a antibióticos en las Enterobacterias aisladas.

IV. METODOLOGÍA

Muestreo y colección de enterobacterias

Se realizaron giras en las fechas 1, 8 y 15 de noviembre de 2021 a tres ubicaciones sobre el curso principal de la subcuenca del río Virilla: Un primer sitio (Sitio 1) cercano a la naciente del río en el cantón de Vásquez de Coronado (X=-83,943056; Y=9,985869; WGS84), presentando menor impacto antropogénico y mayormente rodeado de parcelas utilizadas para ganadería, que se ve reflejado en una densidad de habitantes por km^2 aproximada de 137 y un índice de vegetación remanente (RVI por sus siglas en inglés) de 57,85 (medianamente sostenible). Un segundo sitio (Sitio 2) de muestreo ubicado río abajo en el cantón de Tibás (punto medio: X= -84,097587; Y=9,963274), en contacto con la comunidad de cuatro reinas y con una densidad poblacional de 1349 habitantes por km^2 y un RVI de 8,53 (completamente transformado). El último sitio de muestreo (Sitio 3) estaba localizado en el cantón de Mora, en la represa Brasil en Ciudad Colón, donde converge el río Virilla con uno se sus afluentes, el rio Uruca y se da una acumulación de diferentes residuos antropogénicos (X= -84,222936; Y=9,946220). Este sitio presentaba una densidad poblacional aproximada de 1129 habitantes por km^2 con un RVI de 26,43 (baja sostenibilidad). Para el análisis de información espacial se contó con el apoyo del Laboratorio de Estudios Espaciales Aplicados a la Contaminación del IRET (SIG-IRET), con métodos similares a lo reportado en Villalobos-Vargas et al. (2024) (80) y Blanco-Peña et al. (2024) (81). El detalle de la metodología se incluyen en el anexo A. Si bien presentaba menor densidad poblacional y un mayor valor de RVI que el Sitio 2, era la zona dónde se observaban menores niveles de calidad de agua basado en los índices fisicoquímicos y biológicos utilizados por el Ministerio de Ambiente para la calidad de las aguas superficiales (índice Holandés y BMWP-CR respectivamente). Esto es verificable en el Sistema Nacional de Información para la Gestión Integrada del Recurso Hídrico (SINIGIRH) con datos del Plan Nacional de Monitoreo de Aguas Superficiales (82). Los enlaces a puntos que coinciden con zonas cercanas al monitoreo, y que incluyen los resultados de los índices de calidad reportados por el MINAE se adjuntan en el anexo A.

Se colectaron muestras de agua superficial en los tres sitios y fechas, para aislar bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Para esto, primero se prefiltró 250

ml de cada muestra de agua superficial utilizando un prefiltro estéril de fibra de vidrio de poro 80 µm. Posteriormente se realizó una filtración (con filtro estéril de poro 0,2 µm) de cada prefiltrado. Cada filtro se incubo por 24 horas a temperatura ambiente (TA) en 40 ml de caldo Lauril para favorecer el crecimiento de coliformes fecales. Posteriormente se traspasó del caldo Lauril a placas de cultivo con medio Levine y MacConkey y se dejó crecer las colonias por 24h. Estos medios favorecen la diferenciación de diferentes morfotipos de la familia Enterobacteriaceae, por lo que, al identificar unidades formadoras de colonias en las muestras de los diferentes puntos de muestreo y fechas, se replicaban a medios de cultivo nuevos par así obtener morfotipos en cultivo puro. Estos morfotipos fueron almacenados por duplicado en tubos de 1.5mL con glicerol al 20% en medio CTS después de 24h de crecimiento y preservados a -80°C.

Selección de aislamientos, extracción de ADN y secuenciación

De la colección total de bacterias aisladas (72 aislamientos) se seleccionaron 15 aislamientos (5 por sitio) basados en la presencia de plásmidos que fueron identificados mediante extracciones de ADN plasmídico utilizando el kit comercial NucleoSpin Plasmid (Mercherey-Nagel) y visualización por geles de agarosa al 0.8%. A estos aislamientos se les extrajo el ADN mediante el kit Dneasy PowerSoil (Qiagen), siguiendo las instrucciones de fabricantes y posteriormente se enviaron para su secuenciación mediante la tecnología Illumina NovaSeq platform (Proveedor Novogene), obteniendo 1GB de datos crudos para cada genoma.

Análisis preliminar y control de calidad (datos crudos)

Los datos crudos en formato fasta quality (fastq) fueron visualizados mediante el programa Fastqc (83), aquí se revisaron parámetros como el contenido GC de los genomas, valores calidad de Illumina, las frecuencias de tetranucleótidos y además se verificó la presencia de adaptadores de Illumina en las lecturas. Se procesaron los datos mediante el programa bbduk (84) para remover los adaptadores que aún quedaban en las secuencias. Posteriormente se utilizó Trimmomatic para eliminar los primeros 10 nucleótidos de las secuencias, esto debido a que presentaban frecuencias tetranucleotidídicas no homogéneas (AT:GC), lo cual se debe a errores en los adaptadores e índices de Illumina. También se

eliminaron todas aquellas con valores de calidad de Illumina debajo de 30 al promediar 4 nucleótidos tomados aleatoriamente y finalmente aquellas lecturas con una longitud menor a 100pb.

Ensamblaje y evaluación de parámetros de calidad

El ensamblaje se llevó a cabo utilizando el ensamblador Spades (85), utilizando los valores de k-mers de 21,33,55, 77 y 99. Posteriormente se eliminaron todos los contigs menores a 1000kb con bbduk y se visualizaron las estadísticas del ensamblaje con la herramienta Quast (86). Para estimar la completitud y la redundancia de los genomas se importaron a la plataforma Anvio v6.2 (87), aquí se utilizó la herramienta HMMER (88) para anotar los marcos abiertos de lectura de los genes y mediante Clusters of Orthologous Genes (COGs) se alinearon contra una base de datos de 143 genes de copia única (87). Los porcentajes de completitud y redundancia se basan en la cantidad de genes presentes y si estos se encuentran en más de una copia en los genomas ensamblados.

Asimismo, se utilizó el programa Drep (89) para calcular los porcentajes de identidad de nucleótidos (ANI por sus siglas en inglés) y crear un dendograma basado en las distancias de MASH entre los diferentes genomas de las bacterias aisladas para averiguar si representaban las mismas cepas; el corte en este caso fue mayor a 0.5% de diferencia entre aislamientos.

Identidad taxonómica y análisis filogenómicos

La identidad taxonómica de los aislamientos basado en la información genómica se obtuvo mediante la base de datos GTDB, encontrando los genomas más cercanos basados en el método de neighbor joining (90). Al identificar los genomas más similares, se descargaron genomas de cepas de la misma especie y género relacionadas de la base de datos Genbank (NCBI) para recrear las relaciones evolutivas de los genomas y poder confirmar su taxonomía asignada por el GTDB. Se utilizó una base de datos de 71 genes de copia única seleccionados para bacterias recrear filogenias en bacterias (87), se extrajeron y concatenaron las secuencias de los genomas, se alinearon y se realizó un análisis de máxima verosimilitud utilizando la herramienta fastTree (91) empleando el modelo evolutivo GTR (G+I) con un bootstrap de

1000 réplicas. El árbol fue visualizado en la herramienta en línea Interactive Tree of Life (iTOL) (92).

Fenotipo de resistencia a antibióticos

Para determinar el perfil de resistencia a antibióticos de los diferentes aislamientos se cultivaron en agar LB por 24h. Posteriormente se analizaron mediante la herramienta VITEK2 en el laboratorio de bacteriología médica de la facultad de Microbiología, UCR. La tarjeta de antibiograma utilizada (VITEK® 2 AST-N401) fue la designada para organismos de la familia Enterobacteriaceae, e incluía antibióticos aminoglucósidos (amicacina, Gentamicinaa), betalactámicos (ampicilina/sulbactam), carbapenemes (ertapenem, meropenem), cefalosporinas (cefalotina, cefazolina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima), quinolonas (ciprofloxacino, norfloxacino), sulfonamidas/diaminopirimidinas (trimetoprima/sulfametoxazol), y otros como fosfomicina y nitrofurantoína. La susceptibilidad a los antibióticos se realizó según las guías de uso del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio en su edición 2020 (CLSI por sus siglas en inglés) (93).

Identificación de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) y elementos genéticos móviles (EGMs)

Los plásmidos fueron re-construidos utilizando la herramienta MOB-suite (35) y se separaron los contigs asociados a cada plásmido de los cromosómicos para ciertos análisis posteriores. Los integrones fueron mapeados mediante la herramienta integron Finder (94) y según los contigs en que se encontraban se identificó si estaban dentro del genoma o en un plásmido. La visualización de estos potenciales plásmidos reconstruidos se realizó con la herramienta PlasMapper 3.0 (95).

Los GRAs se identificaron mediante la base de datos del NCBI AMRfinder plus (96) utilizando la herramienta abricate (97), debido a que es la base de datos con mayor constancia de actualización entre las actuales (98). Se estableció un porcentaje de cobertura y de similitud mínimo de 80% para el alineamiento con la base de datos. Se analizaron los GRAs presentes tanto en el cromosoma como en los plásmidos y se calculó la abundancia y riqueza para cada ubicación genómica y por sitio de muestreo. Para determinar si existían diferencias significativas entre el número de EGM y el número de GRA por sitio se realizó una prueba de Kruskall-Wallis con un nivel de confianza de 95% en el software R (99), donde cada genoma de los aislamientos representaba una réplica. Posteriormente se realizó una prueba de Dunn con un nivel de confianza de 95% para diferenciar entre cuales sitios existían las diferencias significativas para cada variable.

Búsqueda de mutaciones que confieren fenotipo de resistencia a antibióticos

Se realizó la anotación de los genomas bacterianos mediante la herramienta Prokka (100). Posteriormente se hizo una búsqueda manual de mutaciones puntuales en ciertos genes asociados al fenotipo de resistencia expresado por ciertas bacterias. En primera instancia se utilizó el genoma de referencia de *Escherichia coli* K12 que es susceptible a ciprofloxacina para extraer el gen *gyrA* que codifica para la topoisomerasa blanco del antibiótico. Se comparó su secuencia de aminoácidos con los genomas anotados relacionados con esta especie, tanto los susceptibles como los resistentes al antibiótico y se identificaron las mutaciones encontradas.

Este mismo análisis se realizó con los genes *nfsA* y *nfsB* que al mutar se relacionan con el desarrollo de resistencia a Nitrofurantoína. Para este análisis se utilizaron los genomas de referencia de *E. coli* K12 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883.

Secuenciación de los genomas de los aislamientos A224-8 y A231-12 por la tecnología de PacBio para confirmación de plásmidos

Debido a resultados obtenidos con los genomas secuenciados por Illumina, se decidió enviar a secuenciar el genoma de dos aislamientos con presencia de plásmidos con GRA mediante la tecnología de secuencias largas PacBio. Esto con el fin de obtener un ensamblaje de mejor calidad, para así confirmar la estructura de los plásmidos y sus GRAs, ya que los plásmidos contienen secuencias repetitivas mayores a 300pb, lo que queda fuera del rango de ensamblaje de secuencias de Illumina. Para esto se enviaron las muestras a la empresa NovoGen y las lecturas largas que se obtuvieron fueron utilizadas para realizar un ensamblaje híbrido con la herramienta Spades (85); dicha herramienta genera el ensamblaje a partir de las lecturas largas de PacBio, generando contigs que luego son completados al llenar los vacíos que quedan con las secuencias cortas de Illumina. Luego se emplearon las mismas herramientas mencionadas previamente para la caracterización de GRAs y EGMs.

V. RESULTADOS

Ensamblaje y evaluación de parámetros de calidad

En el cuadro 1 se muestran las características de los genomas ensamblados con base en los parámetros mayormente reportados para evaluar la calidad de los ensamblajes. En cuanto al número de contigs por genoma, se obtuvo un rango de 45-159 contigs, donde entre menor sea el número de contigs mejor es el proceso de ensamblado. Asimismo, el número de contigs que representan la mitad del genoma total (L50) tuvo un rango de 6-25 y el rango del valor N50 que representa el contig ubicado en la mediana según su largo total entre todos los ensamblados fue de 201941-617749pb, dónde entre mayor sea este valor, mejor calificado es el ensamblaje.

Los resultados de completitud van desde 78,87 hasta 100% dónde 13 de los 15 genomas contemplaban el valor máximo y los genomas de los aislamientos A229-5 y A230-5 tuvieron valores de 87,32 y 78,87% respectivamente. Los valores de redundancia van desde 0 a 2,8%, dónde 10 de los genomas tenían el valor mínimo, otros cuatro presentaron valores de 1,4% y sólo el genoma del aislamiento A229-5 presentó un valor de 2,8%. Es importante mencionar que los genomas asociados a los aislamientos A229-5 y A230-5 en un inicio presentaron altos valores de redundancia (>50%) lo que se relaciona con una contaminación por otro microorganismo. Debido a esto se procedió a realizar una depuración manual de contigs basado en las frecuencias de tetranucleótidos tal y como se refinan los genomas ensamblados a partir de metagenomas (101).

El tamaño de los genomas se relacionó con la taxonomía asignada. Para los aislamientos del género *Shigella* se obtuvo un tamaño promedio de 4,86Mpb (GC: 50,66) y el tamaño reportado para el genoma de referencia en el NCBi *S. flexneri* 2a str. 301 es de 4,8Mpb (GC: 50,5). Para los aislamientos del género *Klebsiella* se obtuvo un tamaño promedio de 5,46 (GC: 57,30) siendo el tamaño de referencia de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286 de 5,7Mpb (GC: 57%). El aislamiento asignado como *Citrobacter gillenii* tuvo un tamaño del genoma fue de 4,97 (GC: 52,48) y la referencia indica un valor de a 5,2Mpb. (52,50).

Cuadro 1. Estadísticas base de los aislamientos obtenidos para los diferentes métodos de ensamblaje. La taxonomía más cercana se obtuvo mediante la herramienta GTDB, además se puede encontrar el valor de ANI para la cepa más cercana en la base de datos.

Aislamiento (No. Sitio de aislamiento)	Ensamblaje	Contigs	Size (Mpb)	N50	L50	%GC	Completitud	Redundancia	Taxonomía según GTDB (ANI)
A222-7 (1)	Illumina	73	4,9	130684	11	50,61	100	0	*Shigella flexneri* (97.81)
A229-5 (1)	Illumina	127	5,05	78655	22	50,89	87,32	2,8	*Shigella flexneri* (97,49)
A229-12 (1)	Illumina	99	4,75	103479	15	50,78	100	1,4	*Shigella flexneri* (97,90)
A236-7 (1)	Illumina	64	4,8	167951	10	50,7	100	0	*Shigella flexneri* (97,75).
A236-12 (1)	Illumina	73	4,7	147946	8	50,59	100	0	*Shigella flexneri* (97,76)
A223-7 (2)	Illumina	45	4,97	413561	6	52,48	100	1,4	*Citrobacter gillenii* (98,96)
A230-5 (2)	Illumina	143	4,96	59516	25	50,56	78,87	1,4	*Shigella flexneri* (97,80)
A230-7 (2)	Illumina	77	4,8	158798	11	50,7	100	1,4	*Shigella flexneri* (97,63)
A230-8 (2)	Illumina	159	4,96	77565	23	50,62	100	0	*Shigella flexneri* (97,66)
A237-6 (2)	Illumina	67	5,22	188161	10	57,56	100	0	*Klebsiella pneumoniae* (99,06)
A224-7 (3)	Illumina	84	5,6	141929	14	57,21	100	0	*Klebsiella variicola* (98,94)

A224-8 (3)	Illumina	101	4,7	109905	16	50,65	100	0	*Shigella flexneri* (97,74)
A231-5 (3)	Illumina	51	5,47	215170	9	57,27	100	0	*Klebsiella pneumoniae* (99,05)
A231-12 (3)	Illumina	60	5	226574	8	50,55	100	0	*Shigella flexneri* (97,96)
A238-6 (3)	Illumina	75	5,54	191124	10	57,19	100	0	*Klebsiella pneumoniae* (98,96)
A224-8 (3)	Híbrido	5	4,7	4712205	1	50,73	100	0	*Shigella flexneri* (97,74)
A231-12 (3)	Híbrido	4	5,08	4757699	1	50,61	100	0	*Shigella flexneri* (97,96)

Según el análisis del porcentaje de identidad de nucleótidos (ANI por sus siglas en inglés) y las distancias de MASH entre los genomas (Fig. 1), se puede ver que únicamente dos de los genomas presentan un porcentaje de similitud del 100%, siendo estos los aislamientos A236-7 y A230-7, además los aislamientos A230-5 y A229-5 comparten un 99,9% de similitud por lo que también podrían ser considerados la misma cepa. El aislamiento A236-7 fue aislado en el Sitio 1 en la tercera fecha de muestreo, mientras que A230-7 se aisló del segundo sitio en la segunda fecha, por lo que podemos considerar que el hecho de sean la misma cepa es resultado de un evento aleatorio y de la naturaleza del lugar y no un artefacto de la metodología de muestreo. De igual manera el aislamiento A229-5 se aisló del Sitio 1 y el A230-5 del Sitio 2, ambos en la misma fecha. Todos los demás aislamientos presentaban una diferencia mayor al 99.5% así que se trataron como aislamientos independientes.

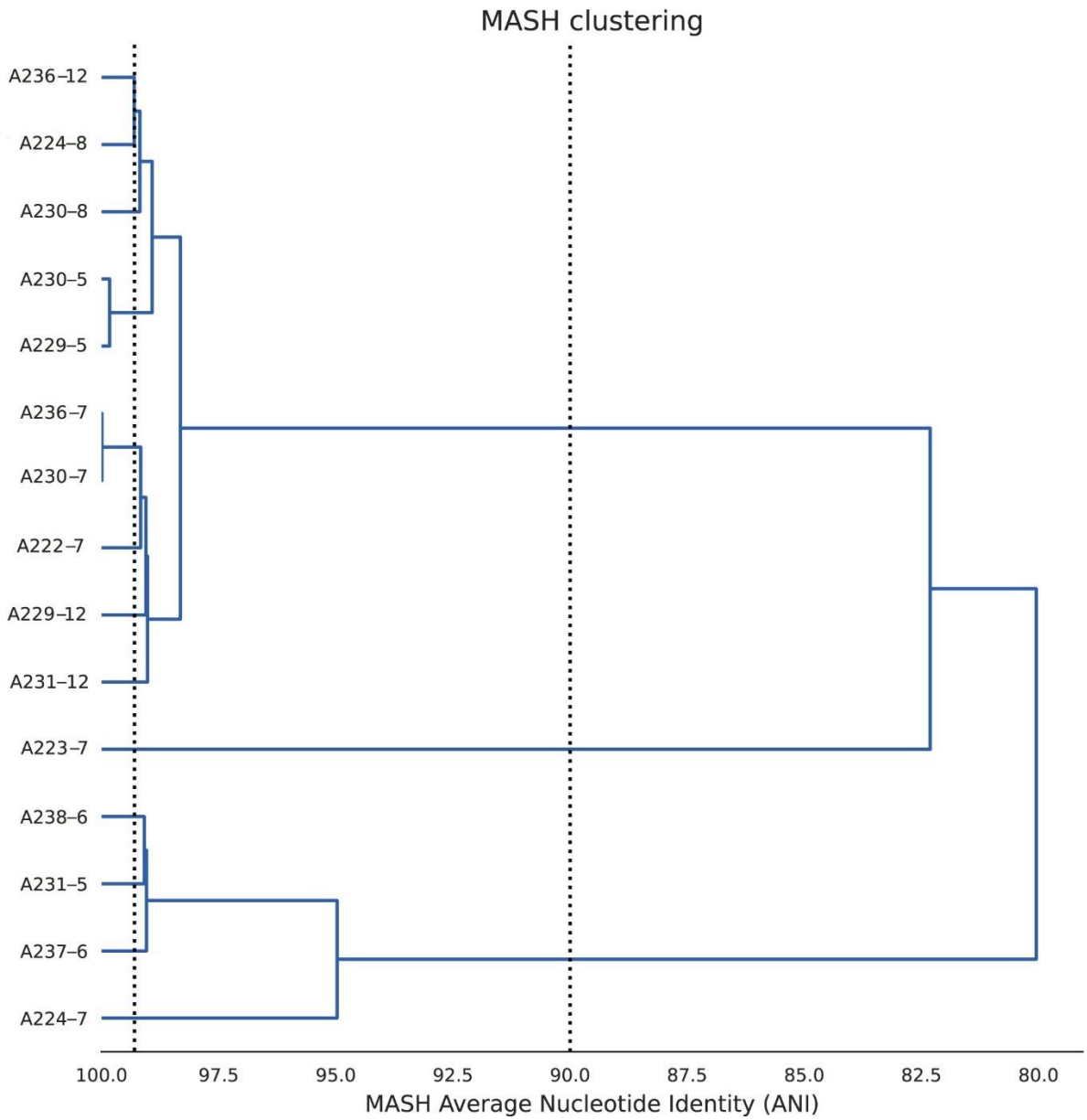


Figura 1. Dendrograma de los aislamientos basado en el porcentaje de identidad de nucléotidos (ANI por sus siglas en inglés) que comparten entre ellos. Se traza una línea en dos puntos, al 90 y 99.5% de diferencia entre el valor de ANI.

Identidad taxonómica y análisis filogenómicos:

En la Figura 2 se muestran las relaciones filogenómicas de los aislamientos y diferentes genomas cercanos que fueron descargados de la base de datos del NCBI, en el Cuadro suplementario 1 se puede encontrar la información de todas las secuencias externas utilizadas para recrear el árbol. Se puede apreciar que cuatro aislamientos pertenecen al género *Klebsiella*, estando el aislamiento A224-7 emparentado con la especie *Klebsiella variicola* y los aislamientos A237-6, A238-6 y A231-5 con *Klebsiella penumoniae*. Asimismo, el aislamiento A223-7 se relaciona con la especie *Citrobacter gillenii*. Los aislamientos asignados como *Shigella flexneri*, en el árbol filogenómico se encuentran relacionados con aislamientos del género *Shigella*, pero la relación entre las especies dentro de este género no es totalmente clara. Nuestros aislamientos se dividen en dos grupos, uno ubicado de forma independiente de cualquiera de las especies y serotipos utilizados, que contiene los aislamientos A224-8, A229-5, A230-5, A230-8 y A236-12, y otro que parece compartir un ancestro en común más reciente con la cepa *S. sonnei* SE6-1, quién tiene un origen ambiental incluyendo los aislamientos A230-7, A236-7, A229-12, A222-7 y A231-12. Estos aislamientos no se agrupan con los genomas de *S. sonnei* de origen clínico y de hecho parecen estar más emparentados con una cepa de *S. boydii*. Esto sugiere que las relaciones evolutivas de este grupo de especies del género *Shigella* no son realmente claras, pero se confirma que todos los aislamientos pertenecen al género.

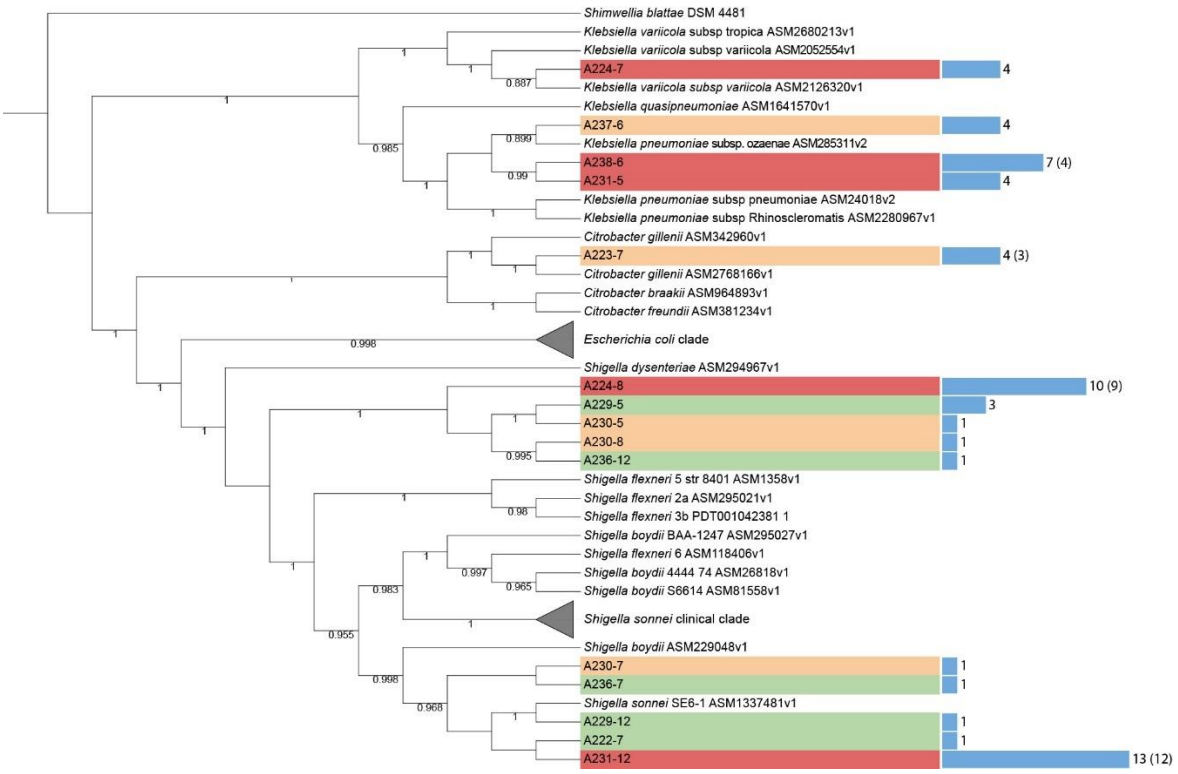


Figura 2. Árbol filogenómico representando las relaciones evolutivas basadas en el algoritmo de máxima verosimilitud, de las bacterias aisladas y otros genomas de referencia descargados del NCBI. En los nodos se muestran los valores de boostrap basados en 1000 submuestros; los colores representan los sitios de dónde se aislaron las bacterias y las barras en azul representan el número de GRAs presentes (los números entre paréntesis representan los GRAs encontrados en plásmidos).

Fenotipo de resistencia a antibióticos

Solamente siete de los 15 aislamientos medidos presentaron fenotipo de resistencia a al menos un antibiótico (Fig. 3). Los aislamientos que presentaron resistencia a más de un antimicrobiano fueron; *K. pneumoniae* A238-6 que presentó resistencia a la nitrofurantoína y la trimetoprima/sulfametoxazol, *Shigella* sp. A230-7 que presentó fenotipo resistente a las mismas dos moléculas y además un fenotipo intermedio de resistencia a la ampicilina/sulfabactam; y finalmente *Shigella* sp. A231-12 que fue resistente a 7 antibióticos: ampicilina/sulbactam, cefazolina, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona, gentamicina y trimetoprim/sulfametoxazol, siendo positivo para Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE). El antibiótico al que hubo mayor resistencia fue la nitrofurantoína, ya que cinco

aislamientos presentaron dicho fenotipo, seguido de la Trimetoprima/Sulfametoxazol a la cuál tres de los aislamientos fueron resistentes. Ningún aislamiento del Sitio 1 presentó fenotipo de resistencia, mientras que tres del Sitio 2 y cuatro del Sitio 3 presentaron resistencia a 1 o más de los antibióticos probados.

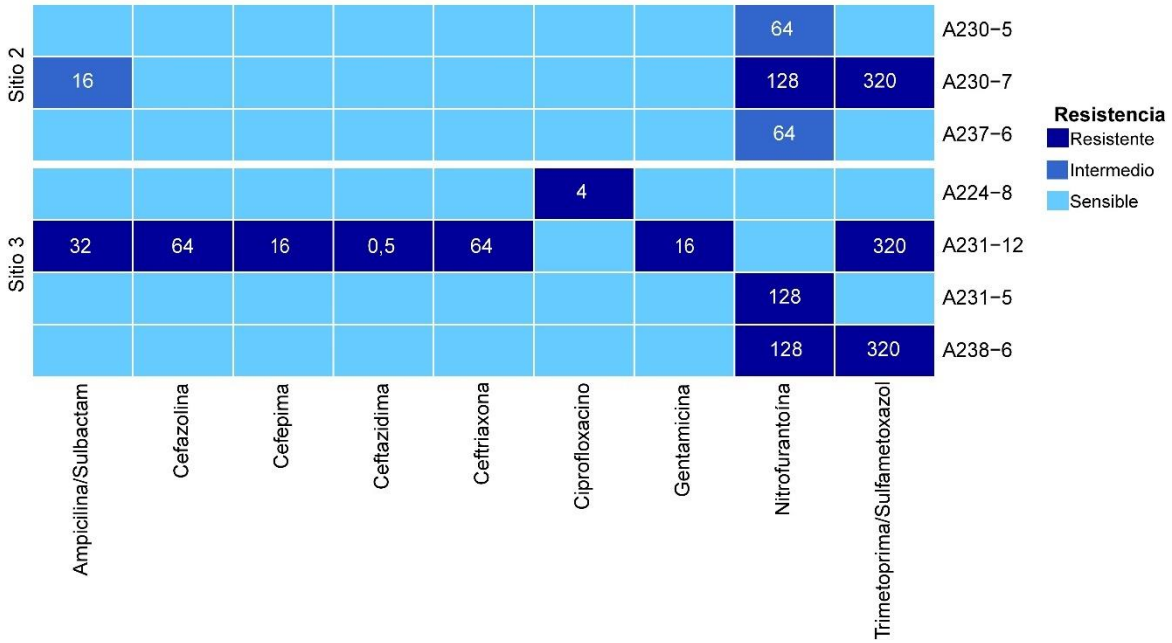
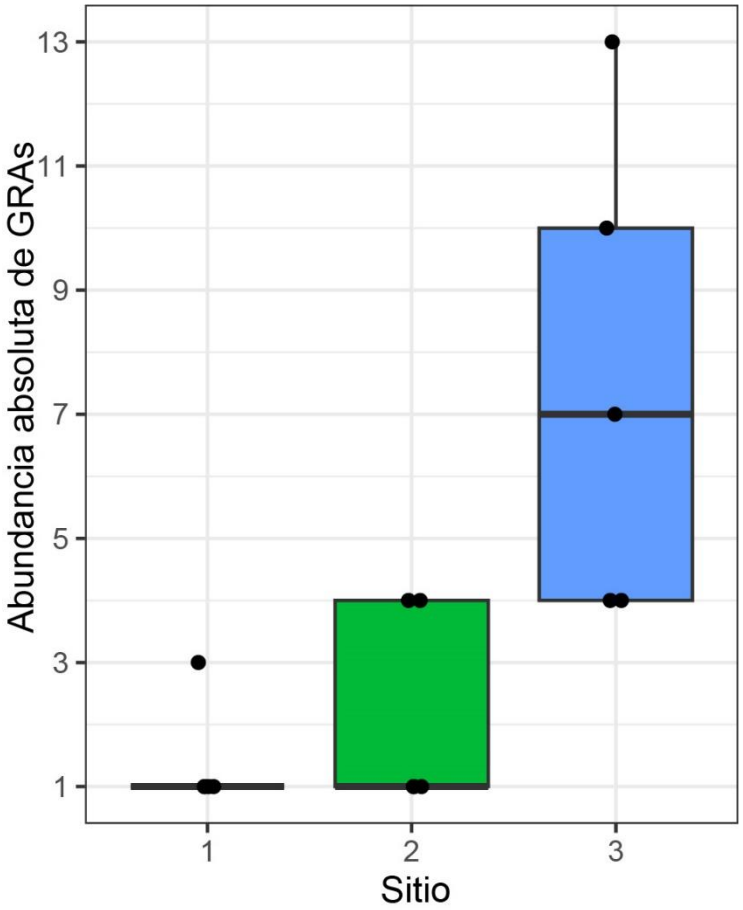


Figura 3. Fenotipo de resistencia de los aislamientos que fueron resistentes al menos a un antibiótico realizado por VITEK2. En cada cuadro se muestra el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) obtenida.

Identificación de genes de resistencia a antibióticos (GRAs)

Toda la información sobre los resultados GRAs encontrados por el sofware abricate en la base de datos AMR FinderPlus pueden ser encontrados en el Cuadro suplementario 2. Una abundancia total de 56 GRAs y una riqueza de 33 GRAs fueron encontrados en los 15 genomas secuenciados. Para los GRAs encontrados en los cromosomas bacterianos, se obtuvo una abundancia de 29 GRAs y una riqueza de 17; mientras que para los plásmidos se obtuvo una abundancia de 27 GRAs y una riqueza de 16. Ningún gen fue encontrado tanto en cromosoma como en plásmido. Para el Sitio 1 se obtuvo una abundancia de 7 GRAs y una riqueza de 5 GRAs, mientras que para el Sitio 2 los valores de abundancia y riqueza fueron

de 11 para ambas medidas. Finalmente, en el Sitio 3 se encontró una abundancia de 38 GRAs y una riqueza de 29. Se puede apreciar que el Sitio 3 presentó mayores medidas de diversidad de GRAs que los demás sitios, seguido por el Sitio 2 y finalmente el Sitio 1 fue el que presentó valores más bajos de abundancia y riqueza. Mediante la prueba estadística de Kruskall Wallis se demostró que las diferencias de abundancia por sitio son significativas (Chi=9,45, p=0,009, Fig. 4) pero la prueba de Dunn únicamente fue significativa entre el Sitio 1 y 3 (Z=-2.936, p=0,01), más no así entre los sitios 1 y 2 (Z=-0,678, p=1) y 2 y 3 (Z= -2,258, p=0,072). Debido a que ningún gen se encontró en más de una ocasión en un mismo genoma, los valores



de riqueza para cada aislamiento son los mismos que de abundancia.

Figura 4. Abundancia absoluta de GRAs encontrados por sitio. Cada punto en el gráfico representa el número de GRAs encontrados en el genoma de un aislamiento.

En el sitio con mayor contaminación (Sitio 3) se encontraron los aislamientos que presentaron el mayor número GRAs en plásmidos. Los 27 genes de resistencia presentes en

plásmidos estuvieron repartidos en cuatro aislamientos: *C. gillenii* A223-7, *Shigella* sp. A224-8, *Shigella* sp. A231-12 y *K. pneumoniae* A238-6. Tres de estas bacterias fueron aisladas del Sitio 3 y únicamente el aislamiento *C. gillenii* A223-7 fue aislado del Sitio 2. En términos generales, los aislamientos con mayor número de GRAs fueron *Shigella* sp. A231-12 con una abundancia de 13 GRAs, seguido por el aislamiento *Shigella* sp. A224-8 con 10 y en tercer lugar el aislamiento *K. pneumoniae* A238-6 con 7, todos aislados del Sitio 3 (Fig. 2).

La mayoría de los potenciales fenotipos de los GRAs están asociados a BetaLactamasas de Espectro Extendido (BLEE), encontrando un total de 18 GRAs de los cuales 15 estaban presentes en el cromosoma. En segundo lugar, tenemos los GRAs asociados a resistencia a fenicoles y quinolonas (10 GRAs), de la familia de genes *Oqx* que codifican para bombas de eflujo de la familia RND y además todos se localizaban en el cromosoma de los aislamientos. En tercer lugar, se encontraron los GRAs asociados a estreptomicina en plásmidos (7 GRAs), que codifican para fosfotransferasas y nucleotidil transferasas que confieren grupos fosfatos y nucleotídicos a los ribosomas para evadir el efecto de los aminoglucósidos. En el cromosoma también se detectaron algunos GR a fosfomicina (4 GRAs) que estuvieron ausentes en plásmidos. En los plásmidos se encontró mayor diversidad de GRAs según su fenotipo de resistencia, como resistencia a sulfonamida (5 GRAs), tetraciclinas (4 GRAs) y otros en menor número que se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Cantidad de GRAs clasificados por su genotipo de resistencia encontrados en el cromosoma y en plásmidos de los genomas ensamblados a partir de los datos de obtenidos por la plataforma Illumina. Todos los GRAs presentaron un porcentaje de cobertura y similitud mayor al 93%.

Gen	Resistencia	Cromosoma	Plásmidos
aac(3)-IId	Gentamicina		1
aadA2	Kanamicina		2
aadA5	Estreptomicina		1
aph(3')-Ia	Estreptomicina		1
aph(3")-Ib	Estreptomicina		2
aph(6)-Id	Estreptomicina		3
blaCTX-M-115	Betalactámicos		1
blaEC	Betalactámicos	3	
blaEC-15	Betalactámicos	2	
blaEC-18	Betalactámicos	5	
blaGIL-1	Betalactámicos	1	
blaLEN-10	Betalactámicos	1	
blaSHV-110	Betalactámicos	1	
blaSHV-187	Betalactámicos	2	
blaTEM-1	Betalactámicos		2
dfrA12	Trimetropim		1
dfrA26	Trimetropim		1
floR	Florfenicoles		1
fosA_gen	Fosfomicina	2	
fosA6	Fosfomicina	2	
mph(A)	Macrólidos		2
oqxA	Fenicoles, quinolonas	1	
oqxA10	Fenicoles, quinolonas	1	
oqxA5	Fenicoles, quinolonas	1	
oqxA6	Fenicoles, quinolonas	2	
oqxB	Fenicoles, quinolonas	1	
oqxB11	Fenicoles, quinolonas	2	
oqxB15	Fenicoles, quinolonas	1	
oqxB25	Fenicoles, quinolonas	1	
sul1	Sulfonamidas		2
sul2	Sulfonamidas		3
tet(B)	Tetraciclinas		3
tet(X)	Tetraciclinas		1

La mayoría de GRAs en los aislamientos de *Shigella* estuvieron asociados a resistencia a betalactámicos (11 GRAs), seguidos por estreptomicina (5 GRAs) y sulfonamidas (4 GRAs). Los organismos del género *Klebsiella* presentaron en su mayoría genes de resistencia a fenicol/quinolona (8 GRAs), betalactámicos (6 GRAs) y fosfomicina (4 GRAs). El aislamiento clasificado como *C. gillenii* presentó 4 GRAs, de los cuales dos estuvieron asociados con resistencia a estreptomicina, uno a tetraciclinas y el otro a betalactámicos. El número de GRAs por grupos taxonómicos se resume en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cantidad de GRAs clasificados por su genotipo de resistencia encontrados en los diferentes géneros bacterianos de los genomas ensamblados a partir de los datos de obtenidos por la plataforma Illumina.

Gen	Resistencia	*Citrobacter*	*Klebsiella*	*Shigella*
aac(3)-IId	Gentamicina			1
aadA2	Kanamicina			1
aadA5	Estreptomicina			1
aph(3')-Ia	Estreptomicina			2
aph(3")-Ib	Estreptomicina	1		1
aph(6)-Id	Estreptomicina	1		2
blaCTX-M-115	Betalactámicos			1
blaEC	Betalactámicos			3
blaEC-15	Betalactámicos			2
blaEC-18	Betalactámicos		1	4
blaGIL-1	Betalactámicos	1		
blaLEN-10	Betalactámicos		1	
blaSHV-110	Betalactámicos		1	
blaSHV-187	Betalactámicos		2	
blaTEM-1	Betalactámicos		1	1
dfrA12	Trimetropim			1
dfrA26	Trimetropim		1	
floR	Florfenicoles			1
fosA_gen	Fosfomicina		2	
fosA6	Fosfomicina		2	
mph(A)	Macrólidos			2
oqxA	Fenicoles, quinolonas		1	
oqxA10	Fenicoles, quinolonas			1
oqxA5	Fenicoles, quinolonas		1	
oqxA6	Fenicoles, quinolonas		2	
oqxB	Fenicoles, quinolonas		1	
oqxB11	Fenicoles, quinolonas		1	1
oqxB15	Fenicoles, quinolonas		1	
oqxB25	Fenicoles, quinolonas		1	
sul1	Sulfonamidas			2
sul2	Sulfonamidas		1	2
tet(B)	Tetraciclinas	1		2
tet(X)	Tetraciclinas			1

Descripción de los elementos genéticos móviles (EGM)

Toda la información sobre los EGM presentes en las bacterias (plásmidos, integrones y secuencias de inserción (SI)) se encuentra en el cuadro suplementario 3. Un total de 52 plásmidos y 138 SI fueron encontrados en los 15 genomas secuenciados, además de dos integrones de clase 1 encontrados en plásmidos presentes de dos aislamientos del Sitio 3 (*Shigella* sp. A231-12 y *Shigella* sp. A224-8) (Cuadro 4). La Figura 5 muestra los valores de plásmidos y de SI por sitio, en dónde se puede apreciar que los aislamientos del Sitio 3 presentan mayor número de plásmidos y de SI por sitio. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los sitios en el número de plásmidos (Chi=2,354, p=0,308) ni de SI (Chi=1,516, p=0,469).

Cuadro 4. Número de plásmidos, integrones y secuencias de inserción encontradas en cada aislamiento analizado según los datos obtenidos por la plataforma Illumina.

Aislamiento (No. Sitio de aislamiento)	Plásmidos (conjugativos)	Integrones	Secuencias de inserción
A222-7 (1)	1 (1)	0	3
A229-5 (1)	4 (2)	0	10
A229-12 (1)	4 (1)	0	12
A236-7 (1)	2 (0)	0	11
A236-12 (1)	2 (1)	0	7
A223-7 (2)	2 (1)	0	5
A230-5 (2)	4 (1)	0	7
A230-7 (2)	3 (1)	0	6
A230-8 (2)	5 (0)	0	15
A237-6 (2)	2 (0)	0	8
A224-7 (3)	3 (0)	0	8
A224-8 (3)	7 (1)	1	13
A231-5 (3)	2 (0)	1	16
A231-12 (3)	4 (2)	0	6
A238-6 (3)	7 (0)	0	11

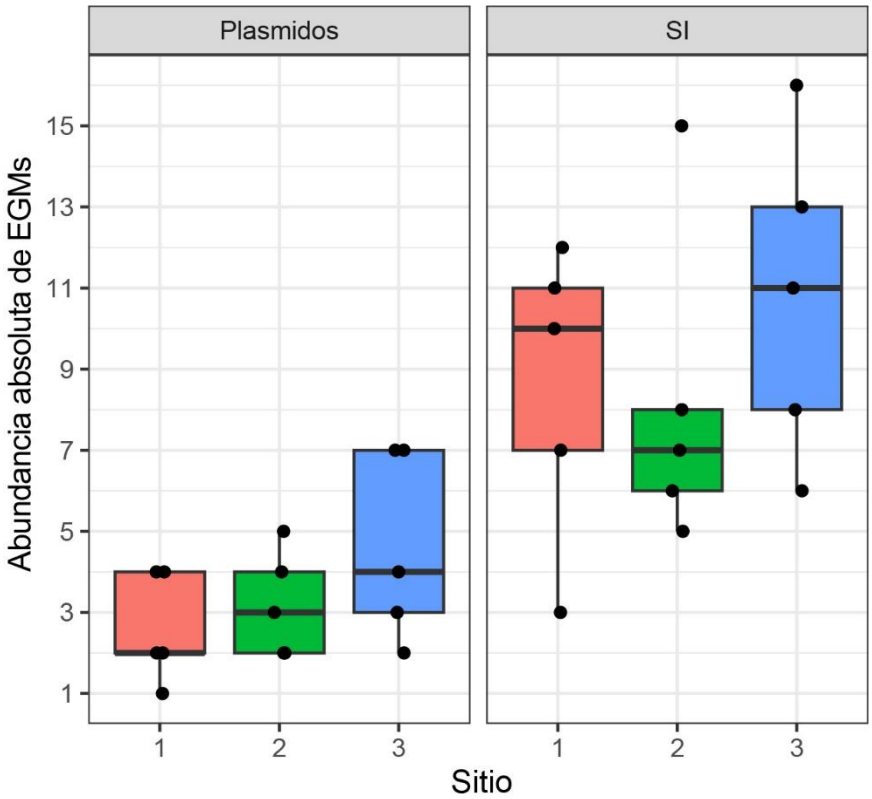


Figura 5. Abundancia absoluta de EGMs encontrados por sitio. Cada punto en el gráfico representa el número de EGMs encontrados en el genoma de un aislamiento.

De los 52 plásmidos puativos, solamente cinco presentaron GRAs en su estructura. A continuación, se presenta una descripción detallada de la estructura de estos potenciales plásmidos con sus GRAs:

Plásmidos pPAC802: Para la descripción de este plásmido se utilizó la información del ensamblaje híbrido (Illumina y PacBio). Este plásmido putativo se encontró incorporado dentro del cromosoma en el aislamiento *Shigella* sp. A224-8 del Sitio 3 y presentó un total de siete GRAs y un integron incompleto de clase 1 (ausencia de integrasa). Dicha región de multirresistencia presenta una secuencia de replicación asociada con el grupo de incompatibilidad IncQ1 (Fig. 6). El integron incompleto contiene 2 GRAs (*sul1* y *aadA5*) y un gen de resistencia a biocidas *qacE* que fue anotado por la herramienta IntegronFinder 2.0. Este plásmido no presenta aparentes genes asociados al mecanismo de transferencia horizontal ni la relaxasa, por lo que no se considera como un plásmido movilizable, sugiriendo que ha perdido la capacidad de salir del cromosma. El plásmido con mayor similitud encontrado en las bases de datos fue el plásmido pASL01 proveniente de *Escherichia coli* (distancia de mash: 0,051; cobertura: 57%; identidad: 99,88%) de un tamaño de 27kb.

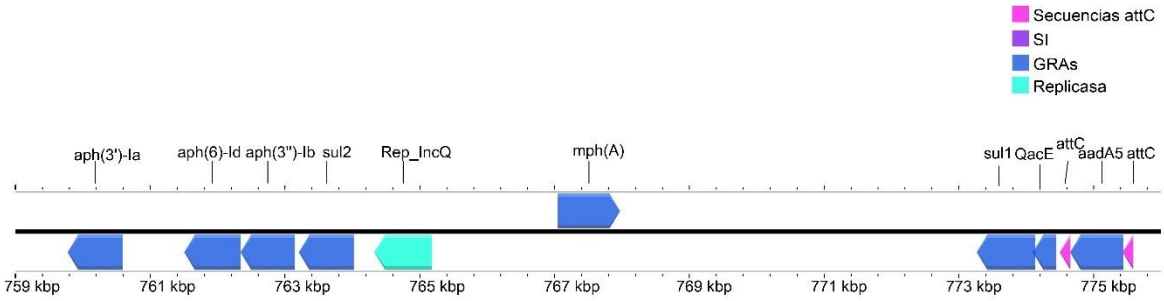


Figura 6. Sección del cromosoma del aislamiento *Shigella* sp. A224-8 que contiene el plásmido potencial incorporado, obtenido por el ensamblaje híbrido (Illumina y PacBio). Se resaltan los GRAs, secuencias *attC* y la replicasa del grupo IncQ1 que asocia la región con un plásmido de dicho grupo.

Plásmido pAB190: Para la descripción de este plásmido se utilizó la información del ensamblaje híbrido. Este plásmido al igual que el PAC802, se encuentra en el aislamiento *Shigella* sp. A224-8 y presentó cinco GRAs: *tet(X)*, *tet(B)*, *aph(3")-Ib*, *aph(6)-Id* y *floR*, y cuatro SI: tres de la familia IS5 y una de la familia IS110. Tiene un tamaño esperado de 77kb (Fig. 7). No se encontró una secuencia de replicación ni tampoco presenta los elementos conjugativos, pero sí la secuencia asociada a la relaxasa de la clase MOBF, por lo que se clasifica como un plásmido mobilizable. El plásmido más similar en las bases de datos es uno proveniente de *Escherichia fergusonii* denominado como pEFER (distancia de mash: 0,017; cobertura: 66%; identidad: 99,46%).

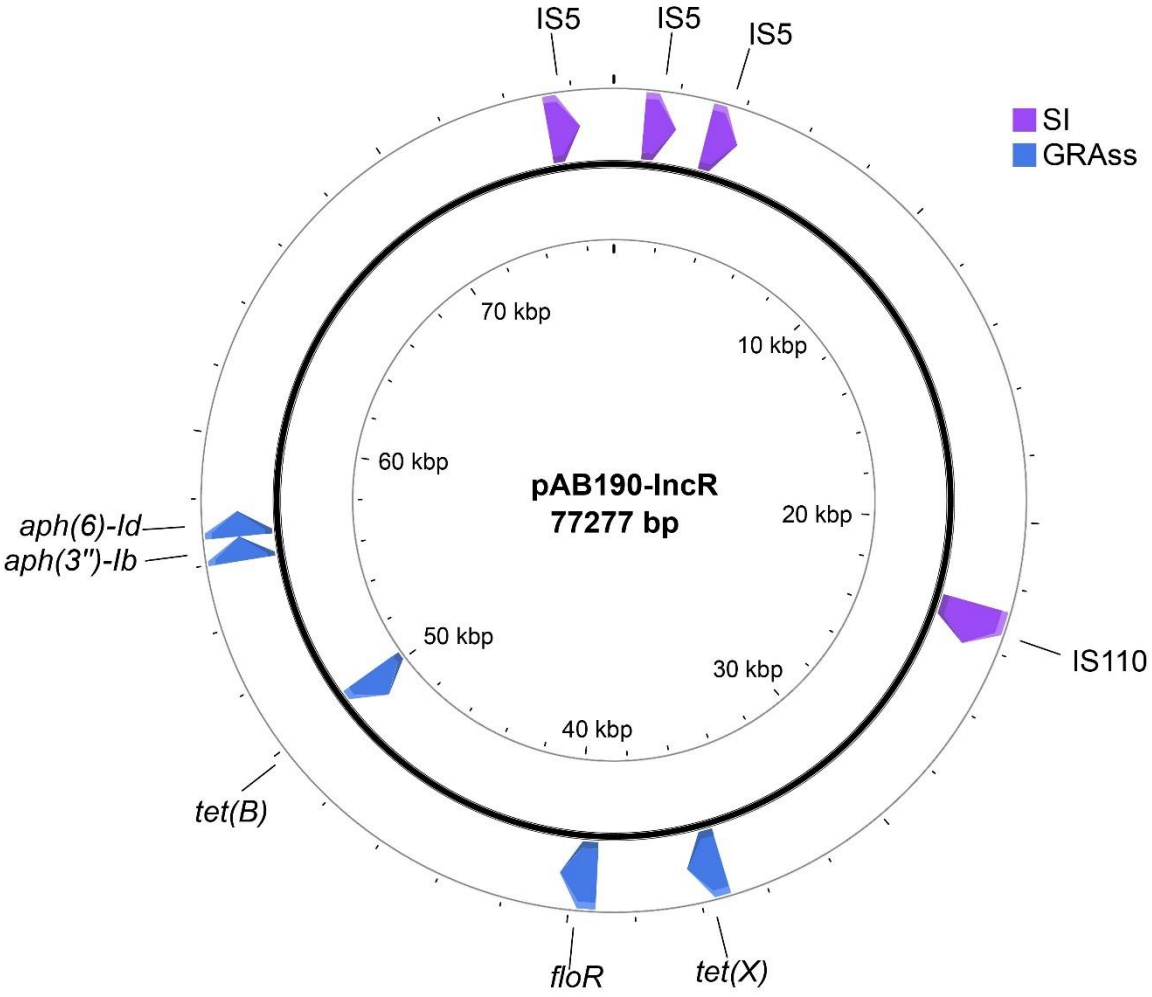


Figura 7. Estructura putativa del plásmido AB190 identificado por el software MOB-suite con los datos de ensamblaje híbridos asociado al aislamiento *Shigella* sp. A224-8 (Sitio 3). Se resaltan los GRAs y secuencias de inserción (SI).

Plásmido pA998: Para la descripción de este plásmido se utilizó la información del ensamblaje híbrido. Plásmido encontrado en el aislamiento *Shigella* sp. A231-12 siendo el que contiene el mayor número de GRAs, su estructura se muestra en la Figura 8. Se encontraron un total de 12 GRAs de los cuales 3 (*sul1*, *aadA2*, *drfA12*) se encuentran en un potencial integron de clase 1, junto con un gen de resistencia a biocidas (*qacE*). Este integron si contiene una integrasa (*intl*), por lo que se puede considerar como un integron completo y funcional. El integron se encuentra en una región de multirresistencia donde están los otros 9 GRAs (*blaCTX-M-115*, *mph(A)*, *blaTEM-1*, *aac(3)-IId*, *tet(B)*, *aph(6)-Id*, *aph(3)-Ib*, *aph(3)-Ia*, *sul2*), una región de que va desde los 110kb hasta los 160kb (Fig. 9). Presenta un tamaño estimado considerablemente grande de 235kb y se encontraron replicasas de los grupos IncFIA e IncQ1. El plásmido además contiene dos SI de las familias ISL3 e IS5 y todos los genes necesarios para el proceso de conjugación, por lo que se considera un plásmido conjugativo. El plásmido con mayor similitud encontrado en la base de datos fue el pF8475 (distancia de mash: 0,003 cobertura: 89%; identidad: 99,98%), quien se hospeda en la especie *Salmonella enterica*.

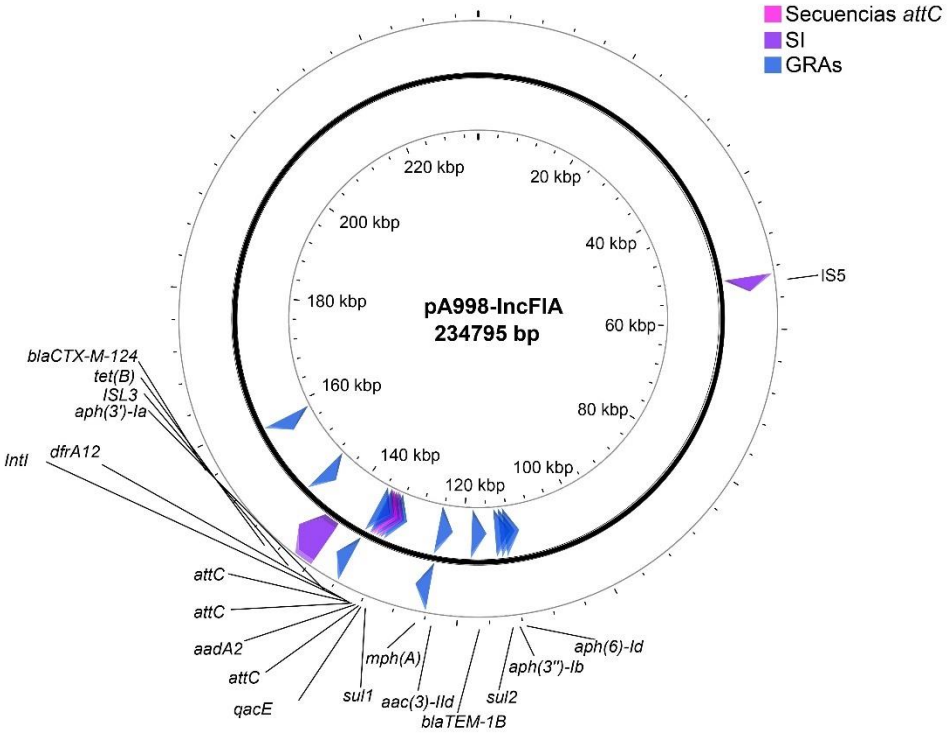


Figura 8. Estructura putativa del plásmido A998 identificado por el software MOB-suite con los datos del ensamblaje híbrido asociados al aislamiento *Shigella* sp. A231-12. Se resalta los GRAs, secuencias de inserción (SI) y secuencias *attC*.

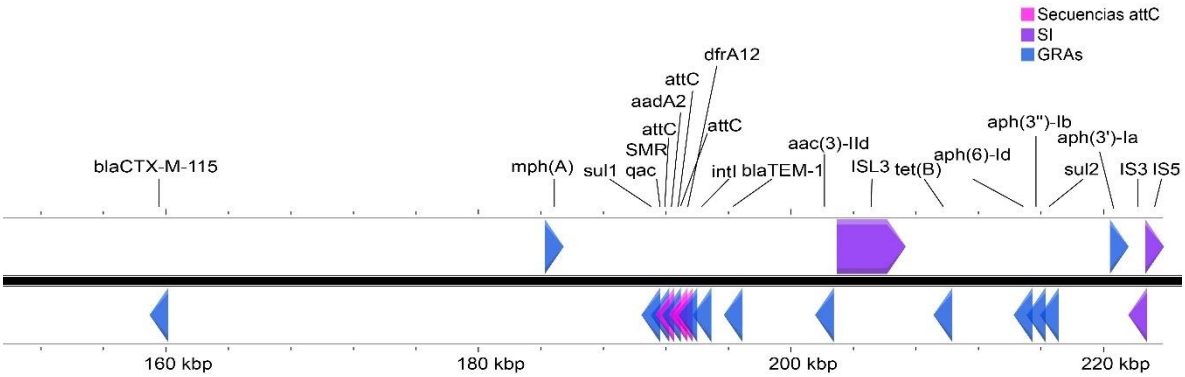


Figura 9. Estructura putativa de la región multirresistente del plásmido A998 presente en el aislamiento *Shigella* sp. A231-12 para los datos del ensamblaje híbrido. En ambos casos se resalta los GRAs, secuencias de inserción (SI) y secuencias *attC*.

Plásmido pAB595: Este plásmido se encontró en el aislamiento *K. pneumoniae* A238-6 aislado del Sitio 3, y tuvo un tamaño aproximado de 6,8kb (Fig. 10). No se encontró la presencia de la secuencia de replicación, por lo que no se asoció con alguno de los grupos de incompatibilidad; además de no presentar los elementos conjugativos ni la relaxasa, siendo considerado un plásmido no movilizable. Se encontraron tres GRAs (*blaTEM-1* junto a su promotor, *sul2* y *dfr26*) y una SI de la familia IS3 (Fig. 10). Este comparte mayor similitud con el plásmido RCS86_pI (distancia de mash: 0,036; cobertura: 47%; identidad: 100%) encontrado en *E. coli* según las bases de datos.

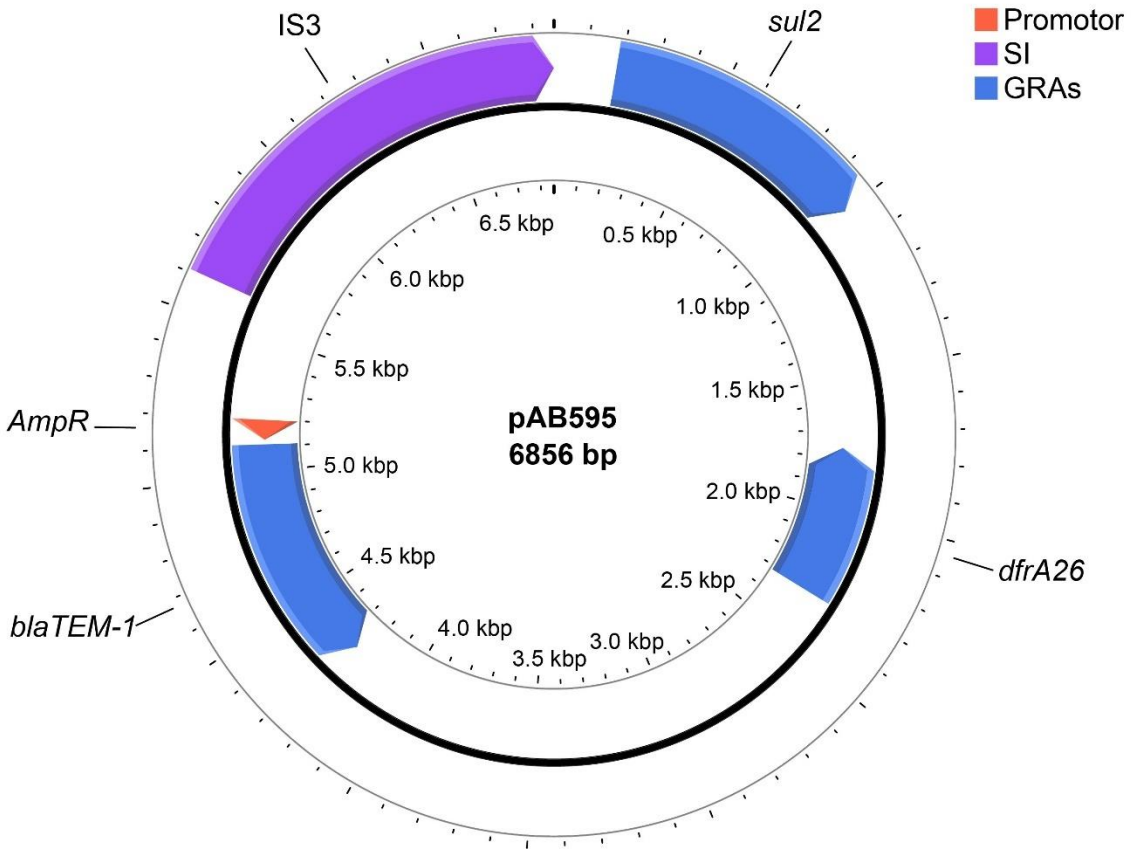


Figura 10. Estructura putativa del plásmido AB595 identificado por el software MOB-suite con los datos de Illumina asociado al aislamiento *K. pneumoniae* A238-6. Se resaltan los GRAs y secuencias de inserción (SI).

Plásmido pPAC305: Este plásmido se detectó en el aislamiento *C. gillenii* A223-5, el único aislamiento del género *Citrobacter* proveniente del Sitio 2. Tiene un tamaño esperado de 43kB y su secuencia de replicación se asocia con la familia IncX2. Presenta tres GRAs (*tet(B)*, *aph(3)-Ib* y *aph(3)-Id*) y no se encontraron SI en este plásmido (Fig. 10). Dicho elemento móvil contiene toda la maquinaria para realizar el proceso de conjugación, siendo probablemente un plásmido con la capacidad de movilizarse autónomamente. El plásmido más cercano en la base de datos es el plásmido R6K de *E. coli* (distancia de mash: 0,015; cobertura: 76%; identidad: 99,99%).

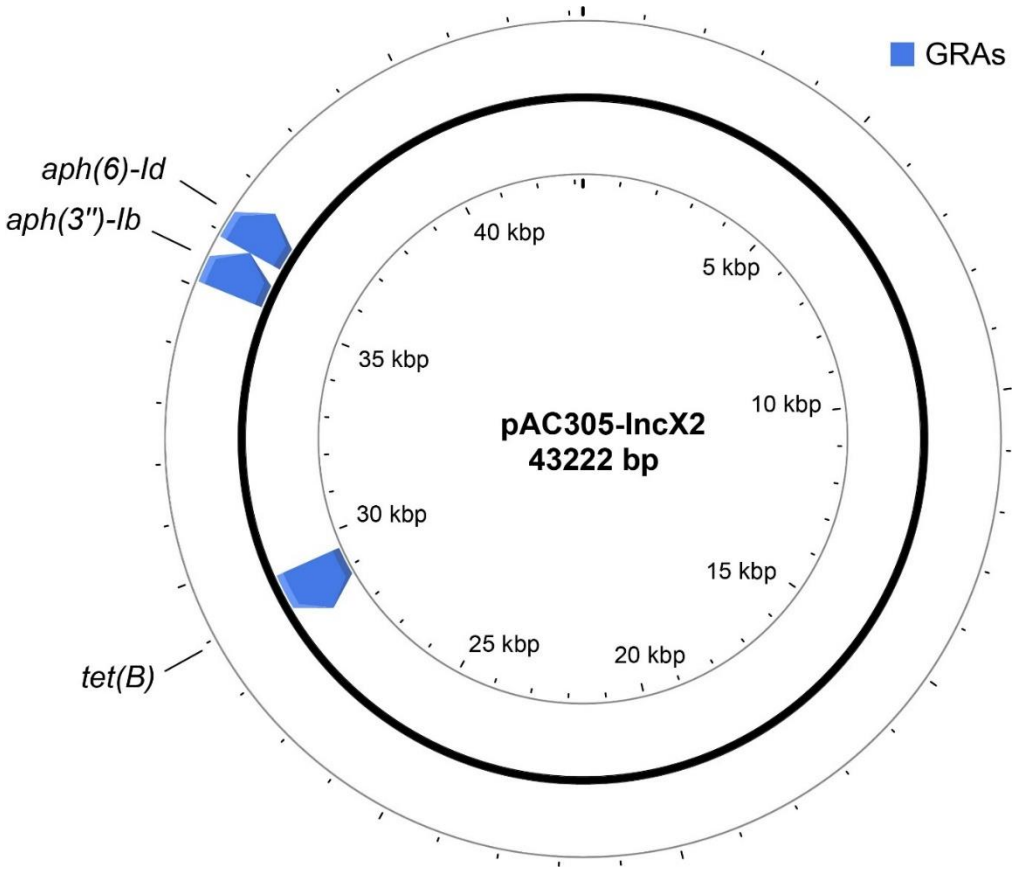


Figura 11. Estructura putativa del plásmido PAC305 identificado por el software MOB-suite con los datos de Illumina asociado al aislamiento *C. gillenii* A223-5. Se resaltan los GRAs.

Búsqueda de mutaciones que confieren fenotipo de resistencia a antibióticos

Al realizar el análisis del gen *gyrA*, únicamente se encuentra una mutación en el aislamiento *Shigella* sp. A224-8 del Sitio 3, quién había mostrado resistencia a ciprofloxacina. Esta mutación fue en el aminoácido 83, teniendo un cambio puntual de serina a leucina (S83L). Además, en el cuadro 5 se muestran las mutaciones encontradas para cada aislamiento en los genes analizados (*nfsA* y *nfsB*) en conjunto con potenciales genes asociados con resistencia a la nitrofurantoína. El aislamiento *C. gillenii* A223-7 no fue analizado debido a que no se contaba con más aislamientos del género *Citrobacter* ni tampoco presentó resistencia a ninguno de los antibióticos probados.

En el grupo de aislamientos del género *Klebsiella* sí se identifican algunas mutaciones en el gen *nfsA* presentes únicamente en los aislamientos resistentes, tales como; E29A, G125W y G204S en el aislamiento *K. pneumoniae* A238-6 y la mutación Q195L en el aislamiento A231-5. Además, se detectó la presencia de genes del grupo Oqx asociado con bombas de eflujo que se han relacionado con resistencia a nitrofurantoína. Los otros aislamientos del género también presentaban diferentes mutaciones y genes *oqx*, por lo que puede haber otros factores asociados con el desarrollo de la resistencia a nitrofurantoína. En el caso de los aislamientos del género *Shigella*, ninguno de los aislamientos resistentes presentó mutaciones en el gen *nfsA*,y aunque sí presentaron algunas en el gen *nfsB*, estas últimas también estuvieron presentes en aislamientos sensibles a la nitrofuratoína (cuadro 5).

Cuadro 5. Mutaciones y genes asociados con la resistencia a nitrofurantoina para los aislamientos pertenecientes a los géneros *Shigella* y *Klebsiella*. Se utilizó como referencia los genomas de las cepas *E. coli* K12 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, ambas susceptibles a la nitrofurantoína.

Aislamiento (No. Sitio de aislamiento)	Fenotipo	Especie	Mutaciones en *nfsA*	Mutaciones en *nfsB*	Genes asociados al fenotipo de resistencia a nitrofurantoina
A238-6 (3)	Resistente	*K. pneumoniae*	E29A, G125W, G204S		*oqxB, oqxA*
A231-5 (3)	Resistente	*K. pneumoniae*	Q195L		*oqxB11*, *oqxA5*
A237-6 (2)	Resistente	*K. pneumoniae*	K222R		*oqxB25*, *oqxA6*
A224-7 (3)	Sensible	*K. variicola*	R59Q, T117I, E144A, R180H, E191D	G25S, V167I	*oqxB15*, *oqxA6*
A230-7 (2)	Resistente	*Shigella* sp.		M75I, V93A, H107R	
A230-5 (2)	Resistente	*Shigella* sp.		V93A, H107R	
A231-12 (3)	Sensible	*Shigella* sp.		M75I, V93A, H107R	
A230-8 (2)	Sensible	*Shigella* sp.		H107R	
A236-12 (2)	Sensible	*Shigella* sp.		H107R	
A236-7 (2)	Sensible	*Shigella* sp.	L157F	M75I, V93A, H107R	
A229-12 (1)	Sensible	*Shigella* sp.	E28G	M75I, V93A, H107R	
A224-8 (3)	Sensible	*Shigella* sp.		H107R	
A222-7 (1)	Sensible	*Shigella* sp.		M75I, V93A, H107R	
A229-5 (1)	Sensible	*Shigella* sp.		V93A, H107R	*oqxB11 oqxA10*

Secuenciación de los genomas de los aislamientos *Shigella* sp. A224-8 y *Shigella* sp. A231-12 por la tecnología de PacBio para confirmación de plásmidos

Los resultados del ensamblaje se pueden encontrar en el cuadro 1. En general, para ambos aislamientos se logró ensamblar el genoma en un solo "contig" para el cromosoma y varios "contigs" más que representan a los plásmidos presentes en la célula. Al realizar el análisis de búsqueda de GRAs, se encontraron un total de 13 GRAs únicos para el aislamiento *Shigella* sp. A231-12 y 11 para *Shigella* sp. A224-8. En el análisis inicial con sólo los datos de secuenciación de Illumina el aislamiento A224-8 presentaba sólo 10 GRAs (cuadro suplementario 2), encontrando un GRAs nuevo: *aph(3'')-Ib* y *mdf(A)* pero con la ausencia del gen *blaEC*. En el aislamiento A231-12 aunque tienen el mismo número de GRAs, hubo diferencias en que en el primer análisis sólo con los datos de secuenciación de Illumina se encontró el gen *blaEC-18* que posteriormente en el ensamblaje híbrido estuvo ausente, pero se encontró el gen *mdf(A)*, ausente en el primer análisis. Toda la información de los GRAs encontrados en los genomas de estos dos aislamientos ensamblados con el set de datos híbrido se puede encontrar en el cuadro suplementario 4.

En cuanto a los EGM, se encontró el mismo integron de clase 1 que, en el primer análisis, estando incompleto en el aislamiento *Shigella* sp. A224-8 pero completo en el *Shigella* sp. A231-12. Para el aislamiento *Shigella* sp. A224-8, primero se obtuvieron siete plásmidos en total, pero en el ensamblaje híbrido se redujo el número a cuatro. Asimismo, para el aislamiento *Shigella* sp. A231-12 se obtuvo un total de cinco plásmidos con los datos de Illumina, mientras que al realizar el ensamblaje híbrido se obtuvo tres, demostrando una posible sobreestimación de plásmidos al tener datos de lecturas cortas únicamente. La información sobre los EGMs para los genomas ensamblados con el método híbrido completa, se presenta en el cuadro suplementario 5.

VI. DISCUSIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es un problema global que debe abordarse bajo una metodología multidisciplinaria como se propone en el concepto de “Una Salud”. Debido a esto, recientemente se han realizado múltiples estudios que buscan establecer la relación entre la contaminación ambiental y la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) y los elementos genéticos móviles (EGMs) que ayudan a su movilización (102, 103). Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae han sido uno de los principales blancos de estudio debido a su alto desarrollo de resistencia a los antibióticos betalactámicos (104). En esta investigación, se brinda información de aislamientos de bacterias entéricas, en un río urbano, que presentan EGMs, GRAs y fenotipos de resistencia de interés para la salud. Estos fueron aislados en puntos de la cuenca del río donde el impacto de la actividad humana se refleja en los índices de calidad de aguas. Los hallazgos muestran la necesidad de ampliar la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos con muestras ambientales.

Uno de los géneros aislados fue *Shigella*, el cual pertenece a la familia Enterobacteriaceae y alberga cuatro especies (*S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*) que pueden causar shigelosis, una infección bacteriana en el revestimiento de los intestinos que causa un cuadro diarreico o incluso disentería (105). Si bien este género se relaciona con patogenicidad humana, muchos de estas bacterias viven en el ambiente o como huéspedes comensales de diferentes primates (106, 107), pero bajo diferentes condiciones pueden generar una enfermedad infecciosa (diarrea, disentería o incluso septicemia). La taxonomía de las especies de este género se asigna según el serotipo basado en componentes de la cadena lateral O-específica del lipopolisacárido de membrana, pero este puede tener resultados erróneos debido a la reactividad cruzada entre los individuos de *Shigella* sp. y *E. coli*. Lo anterior ha vuelto de suma importancia la implementación de nuevas técnicas de biología molecular para su caracterización (108).

La clasificación taxonómica de los aislamientos asignados al género *Shigella*, no logró resolverse en su totalidad, ya que, si bien la base de datos del GTDB encontró que el genoma con mayor similitud fue el de *S. flexneri*, al realizar los análisis filogenómicos, las relaciones evolutivas de los diferentes aislamientos con las demás cepas del género *Shigella*, no parecen estar totalmente claras (Fig. 2). Cinco de los aislamientos asignados como *Shigella* sp. se ubicaron en un clado totalmente aislado de las demás especies y los otros

cinco parecen estar más relacionados con una cepa de *S. sonnei* de origen ambiental, pero separados de las cepas de la misma especie de origen clínico (Fig. 2). La falta de resolución entre las especies de este género en términos moleculares es algo que se ha reportado previamente (108, 109), sugiriendo que la asignación de especies basada en aspectos serológicos y bioquímicos no se ven representadas por clados filogenómicos. Por tanto, considerando que para cumplir nuestro objetivo no existe una necesidad indispensable de conocer las especies de los aislamientos, estos serán tratados como *Shigella* sp. en el resto del estudio. Sin embargo, es de importancia recalcar la presencia de individuos de este género en el río Virilla, un río con alto impacto urbano; por lo que se recomienda mantener un monitoreo constante que permite dar seguimiento a las cepas de este género que podrían estar siendo identificadas erróneamente como *E. coli* (Fig. 2).

Escherichia coli es una especie que ha sido utilizada desde mucho tiempo atrás como una bacteria indicadora fecal (BIF), debido a que se creía que esta bacteria sólo podía reproducirse dentro del intestino (110), lo que podía usarse para generar una relación directa entre la cantidad de células bacterianas encontradas de esta especie y el grado de contaminación fecal. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que esta especie es capaz de sobrevivir y reproducirse en diferentes ambientes; volviéndose parte de la microbiota nativa del ecosistema e incluso llegando a establecer genotipos de vida libre que se diferencian de aquellos que se hospedan en animales (111, 112).

El género *Shigella*, como se mencionó anteriormente es asociado con patogenicidad humana, y que se ha considerado como un linaje derivado a partir de *E. coli* (113). El encontrar en un grupo de aislamientos que parece tener mayor relación evolutiva con cepas del género *Shigella* de origen ambiental, plantea la incertidumbre de si estos aislamientos son una representación de los niveles de contaminación fecal en el río Virilla o si son bacterias que ya forman parte de la microbiota nativa de este río. En Costa Rica se tuvo un brote de diarrea asociado con *Shigella* que afectó a más de 7000 personas en el año 2001 y fue asociado con una transmisión a través del recurso hídrico (114, 115). La mayoría de estos aislamientos presentaron resistencia a múltiples antibióticos utilizados en infecciones diarréicas como trimetoprim/sulfametoxazole, tetraciclina, ampicilina, eritromicina y en menor medida a otros como cloranfenicol, cefalotina, amikacina y amoxicilina (115); demostrando la necesidad de mantener un monitoreo de potenciales patógenos y sus perfiles

de resistencia en muestras ambientales que podría ayudar a prevenir o estar mejor preparados para casos como estos.

Para los aislamientos clasificados dentro del género *Klebsiella* según la herramienta del GTDB, los análisis filogenómicos confirmaron su identidad. Tres de estos se agruparon con cepas de la especie *K. pneumoniae* y otro con la especie *K. variicola*. *K. pneumoniae* es una especie causante de un gran número de infecciones a lo largo del mundo y que en los últimos años ha aumentado la preocupación global debido a un aumento en el número de muertes causantes y el desarrollo de resistencia a antibióticos, en especial a los betalactámicos (116). Por otro lado *K. variicola* es una bacteria encontrada en diferentes ambientes como plantas, insectos, humanos y otros animales (117) y que, aunque se ha asociado más como un microorganismo ambiental, en los últimos años se han identificado como causantes de severas infecciones (117). También se ha especulado que la falta de técnicas precisas para su identificación ha subestimado su prevalencia en dichas infecciones; así como se ha demostrado que dichas bacterias pueden funcionar como un reservorio de GR a múltiples antibióticos como las carbapenemasas y de resistencia a la colistina (117, 118).

El último aislamiento identificado se asignó a la especie *Citrobacter gillenii* tanto por el GTDB como por los análisis filogenómicos. *Citrobacter* es un género comprendido por 12 especies que forma parte del microbiota intestinal de diferentes organismos, pero que pueden actuar como patógenos oportunistas. Aunque *C. gillenii* se ha asociado más con problemas infecciosos en la acuicultura (119, 120), el aumento de la presencia de GRAs en esta especie no deja de ser una preocupación debido a la propagación en el ambiente que pueden ocasionar, en especial si dichos genes son movilizados en plásmidos.

De los 15 aislamientos, siete presentaron un fenotipo de resistencia a al menos uno de los antibióticos probados y dos fueron multirresistentes (resistencia a tres o más antibióticos). De esos siete, cinco presentaron resistencia a la nitrofurantoína, los cuales fueron dos clasificados como *Shigella sp*. (A230-5 y A230-7) y los tres aislamientos de la especie *Klebsiella pneumoniae* (A231-5, A237-6 y A238-6). La nitrofurantonía es un antimicrobiano utilizado en terapia de primera línea contra infecciones urinarias (121) que, si bien no se tiene total certeza sobre su mecanismo de acción, se conoce que al ingresar a la célula se reduce su grupo nitro; lo que origina su forma activa que logra unirse a los ribosomas bacterianos e inhibe la síntesis de ADN (121). Se ha reportado que los aislamientos

del género *Klebsiella* suelen presentar altos porcentajes de resistencia a dicho antibiótico (69.2%) al igual que las del género *Enterobacter* (63%) (122). Si bien no es muy común encontrar reportes de cepas clínicas de *Shigella* sp. resistentes a nitrofurantoína ya que no es un antibiótico utilizado en casos de diarrea o shigellosis, los aislamientos de su especie hermana *E. coli* suelen ser en su mayoría susceptibles a dicho antibiótico (123).

El desarrollo de su resistencia se asocia principalmente con mutaciones en los genes *nfsA* y *nfsB* que codifican para las nitro-reductasas involucradas en la activación del antimicrobiano. Además, en cepas de laboratorio también se ha encontrado resistencia a la nitrofurantoina debido a deleciones en el gen *ribE*, que codifica una lumazina sintetasa necesaria para la síntesis de riboflavina (124). Asimismo, la resistencia a este antimicrobiano también se ha asociado con la presencia de bombas de eflujo de la familia RND que son codificadas por genes *oqx* movilizados en plásmidos o insertados en el cromosoma (121, 125). Al analizar los genomas de los aislamientos de los géneros *Shigella* y *Klebsiella*, se encuentran diferentes mutaciones en los genes *nfsA* y *nfsB* según el genoma de referencia *E. coli K12 y Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, ambas cepas susceptibles. Sin embargo, para el caso de los aislamientos asignados como *Shigella* sp., no se encontraron mutaciones específicas asociadas previamente con resistencia a nitrofurantoína, ni tampoco mutaciones que estuvieran presentes únicamente en los aislamientos resistentes. Asimismo, sólo un aislamiento (*Shigella* sp. A229-5) presentó genes *oqx* en su genoma y fue sensible al antibiótico (ver Cuadro 5).

Los dos aislamientos asignados al género *Shigella* que fueron resistentes a la nitrofurantoína, presentan un alto grado de similitud genómica con otros dos aislamientos de este estudio. El aislamiento *Shigella* sp. A230-5 (resistente) comparte un 99,5% de ANI con el aislamiento *Shigella* sp. A229-5 (sensible) y el aislamiento *Shigella* sp. A230-7 (resistente) un 100% de ANI con el aislamiento *Shigella* sp. A236-7 (sensible) (Fig. 1). Sin embargo, los aislamientos que no presentaron resistencia a la nitrofurantoína fueron aislados del Sitio 1, a diferencia de los que sí presentaron resistencia que se aislaron del Sitio 2. El asilamiento *Shigella* sp. A230-5 junto con el aislamiento *Shigella* sp. A229-5 fueron los únicos con genomas incompletos luego del proceso de ensamblaje. La pérdida de información del genoma puede haber incluido genes o mutaciones asociados con la resistencia a la nitrofurantoína o bien, la presencia de otro microorganismo en el cultivo de estos

aislamientos influenciado en la resistencia al antibiótico. El aislamiento *Shigella* sp. A230-7 si tuvo una completitud de 100% y una redundancia de apenas 1.4%, por lo que no parece que haya habido contaminación del cultivo por otro microorganismo que hubiera aportado a la resistencia a la nitrofurantoína.

Tres aislamientos del género *Klebsiella* presentaron fenotipo de resistencia a la nitrofurantoína: *K. pneumoniae* A238-6 y *K. pneumoniae* A231-5, ambas aisladas del Sitio 3 y el aislamiento *K. pneumoniae* A237-6 aislado del Sitio 2. Por otro lado, el aislamiento *K. variicola* A224-7 aislado del Sitio 3 fue susceptible a dicho antibiótico. Al hacer la anotación de los GRAs en las bacterias del género *Klebsiella* se observa la presencia de múltiples variantes de la familia de genes *oqx*, así como diferentes mutaciones en los genes *nfsA* y *nfsB* (cuadro 5). Los aislamientos *K. pneumoniae* A238-6, *K. pneumoniae* A231-5 y *K. pneumoniae* A237-6 presentaron tanto mutaciones en los genes *nfs* como genes *oqx* diferentes al aislamiento sensible A224-7. Esto podría sugerir que las mutaciones E29A, G125W, G204S, Q195L y K222R, asociadas con genes de la familia *oqx*, podrían estar involucradas en el desarrollo de resistencia la nitrofurantoína. Es probable que el desarrollo de dicha resistencia conlleve una combinación entre la presencia de mutaciones en los genes *nfsA* o *nfsB* que disminuyan el grado de activación del antimicrobiano, así como de la presencia de transportadores de la familia RND con cierto grado de especificidad hacia el compuesto.

Los aislamientos asignados como *Shigella* sp. A230-7 (Sitio 2), y *Shigella* sp. A231-12 (Sitio 3) y el aislamiento asignado como *K. penumoniae* A238-6 (Sitio 3) presentaron resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol. Este antibiótico es utilizado principalmente en tratamientos contra infecciones urinarias y funciona actuando como un inhibidor competitivo en el metabolismo del ácido fólico, impidiendo su producción y ocasionando una detención del ciclo celular de las bacterias (126). La resistencia al sulfametoxazol se ha asociado a mutaciones en el gen *folP* que codifica la enzima dihidropteroato sintasa, la cual está involucrada en la síntesis de folatos (nutriente esencial para las bacterias y otros organismos); así como con la propagación y adquisición de los genes *sul*, siendo genes que codifican variantes de la misma enzima (127). Para el trimetropim la resistencia se asocia con la presencia de los genes *dfrA*, que codifican una variante de la dihidrofolato reductasa, produciendo también enzimas no afines al antibiótico (128).

Los genes *sul* y *dfrA* se mueven generalmente en plásmidos y/o integrones (muy asociados con integrones de clase 1) (129, 130) tal y como fueron encontrados en los genomas de algunos de los aislamientos resistentes. El aislamiento *Shigella* sp. A231-12 contaba con los genes *sul1*, *sul2* y *dfrA12* en el plásmido A998; además, los genes *sul1* y *dfrA12* se encontraban dentro de un integron de clase 1 consistente con los resultados encontrados en otros estudios (129, 130). Por otro lado, el aislamiento *K. penumoniae* A238-6 presentó los genes *sul2* y *dfrA26* que se encontraban en el plásmido AB595, sugiriendo que la presencia de estos genes en conjunto debido a un efecto de co-selección en EGMs (131) da como resultado el fenotipo de resistencia. Finalmente, el aislamiento *Shigella* sp. A230-7, aunque presentaba el fenotipo de resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol, al igual que con la resistencia a la nitrofurantoína, no se encontraron GR asociados con dicho fenotipo.

La ampicilina/sulbactam fue el otro antibiótico en dónde más de un aislamiento fue resistente al mismo, presentando el aislamiento *Shigella* sp. A230-7 un grado de resistencia intermedio (MIC: 16) y el aislamiento *Shigella* sp. A231-12 una resistencia mayor (MIC: 32). En el genoma del aislamiento *Shigella* sp. A230-7 únicamente se encontró un GRA que fue el *blaEC-18*, el cual codifica para una betalactamasa de espectro extendido de clase C, que otorga resistencia a un grupo amplio de antibióticos betalactámicos, incluida la ampicilina; además los inhibidores de betalactamasas como el sulbactam aplicado no tienen efecto sobre estas enzimas (132). Aunque la presencia de este gen podría estar explicar el fenotipo de resistencia, el aislamiento *Shigella* sp. A236-7 quién tuvo un ANI del 100% con el aislamiento *Shigella* sp. A230-7 también presentó el gen *blaEC-18* y no presentó el fenotipo de resistencia al antibiótico.

Los genes que codifican betalactamasas de espectro extendido de clase C, también están asociados con la resistencia a la mayoría de los betalactámicos con excepción de las metoxi-imino-cefalosporinas, como la cefepima y los carbapenémicos (133). Por lo que si dicho gen se estuviera expresando se hubiera visto resistencia a alguna de las cefalosporinas probadas en el VITEK2. Además, el aislamiento *Shigella* sp. A230-12 (Sitio 2) también tenía presente dicho gen *blaEC-18* y aunque fue aislado del mismo sitio no presentó el fenotipo de resistencia a ningún antibiótico. Sin embargo, los genes de dicha familia de resistencia *blacEC* contienen miles de variantes que podrían proporcionar diferentes patrones de resistencia a diferentes antibióticos betalactámicos. También es importante considerar que

las muestras provienen de un ambiente dinámico con un flujo continuo y diferentes compuestos orgánicos que pudieron desencadenar la expresión del gen *blaEC* de diferente forma en diferentes aislamientos, otorgando una posible respuesta al patrón encontrado (132).

El grado de contaminación puede influenciar en el desarrollo de la resistencia tanto directa como indirectamente, debido a una mayor presencia del mismo antibiótico u otras moléculas con efecto similar que puedan desencadenar la selección de mecanismos de resistencia (134). Asimismo se ha reportado que la contaminación puede incrementar las tasas de mutación, lo que puede llevar a crear y seleccionar nuevas variantes de enzimas que generen resistencia a ciertos antibióticos (135, 136). Además, el estrés celular ocasionado por un alto nivel de contaminantes puede disparar la sobreexpresión de ciertos genes relacionados con múltiples procesos, como el sistema SOS, resistencia a antimicrobianos o bien los involucrados con la transferencia horizontal de genes (55, 137).

Si bien estos aislamientos ya no se encuentran en el medio con contaminantes orgánicos, la memoria de respuesta en las bacterias, que se define como la expresión genética persistente luego de remover el inductor externo, puede perdurar a través de varias generaciones, en especial en ambientes fluctuantes, manteniendo el fenotipo por un tiempo prolongado (138). Este fenotipo de persistencia en algunas poblaciones bacterianas, puede ser producto de mecanismos epigenéticos, como el bloqueo de la metilación en el ADN para promover la expresión de ciertos genes (139). Estas células que heredan la capacidad de resistir al estrés son conocidas como células persistentes y representan una baja proporción de la población celular (poblaciones heterorresistentes); sin embargo, en condiciones de alto estrés pueden funcionar como un banco semilla que tiene la capacidad de sobrevivir al ambiente. Se cree que el hecho de que haya células persistentes en una población bacteriana que pueden ser mantenidas por herencia epigenética, es un mecanismo que proporciona una base para la evolución adaptativa de las bacterias (140).

Estos fenómenos podrían estar involucrados con el fenotipo de resistencia a la nitrofurantoína, el trimetoprim/sulfametoxazol e incluso la ampicilina/sulbactam en el aislamiento *Shigella* sp. A230-7, pero ausente en el aislamiento *Shigella* sp. A236-7 con quién comparte un 100% de ANI; ya que como se mencionó previamente, la única diferencia notable en nuestros resultados es que el aislamiento *Shigella* sp. A230-7 fue aislado de un

sitio con mayor contaminación (Sitio 2) que el *Shigella* sp. A236-7 (Sitio 1). Por lo que la cantidad de agentes ambientales que promueven el estrés en las poblaciones y por ende la presencia de células persistentes a los antibióticos es probablemente mayor en el Sitio 2. Sin embargo, para poder comprobar esto, es necesario que futuros estudios evalúen el efecto de los contaminantes presentes en el río en la expresión de GRAs en diferentes aislamientos.

Adicional a los mecanismos epigenéticos y desde el punto de vista de mecanismos de resistencia en plásmidos, las bacterias en cultivo pueden perder estos elementos debido a que ya no confieren una ventaja adaptativa y se da una inestabilidad segregacional (141). Es posible que un bajo número de copias del plásmido o bien, una baja cantidad de células bacterianas en la población con el plásmido (subpoblaciones heterorresistentes), hayan hecho inefectiva su reconstrucción (142). Esto ocasionaría la pérdida de los genes asociados con la resistencia a los antibióticos en el proceso de ensamblaje del aislamiento *Shigella* sp. A230-7. De hecho, las fallas en la predicción de genotipos de resistencia son parte de las limitaciones que tienen los datos producidos por secuenciación de nueva generación (en especial los de secuencias cortas), generando así falsos negativos que han sido previamente reportados en otras especies y para distintos antibióticos (143, 144).

Una posible solución para evitar los falsos negativos generados por la secuención de Illumina podría ser el empleo de secuenciación de nueva generación de lecturas largas como PacBio o Nanopore, para poder tener un ensamblaje de mejor calidad, ya que en este trabajo sólo fue posible ensamblar los genomas de los aislamientos *Shigella* sp. A224-8 y *Shigella* sp. A231-12 bajo esa modalidad. O en el caso de que se trate de subpoblaciones heterorresistentes, producir un enriquecimiento de las células persistentes y posteriormente su extracción de ADN y secuenciación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el proceso de secuenciación representa un momento único del estado genómico de una bacteria, por lo que es importante que futuros estudios también desarrollen metodologías de seguimiento a las generaciones posteriores para comprender las dinámicas de cambio de los EGMs y GRAs presentes en la población bacteriana.

En cuanto al aislamiento *Shigella* sp. A231-12 que presentó incluso una mayor MIC con la ampicilina/sulbactam, este albergaba dos GRA asociados con la resistencia a los betalactámicos; el gen *blaCTX-M-115* que pertenece a las betalactamasas de espectro extendido clase A y el gen *blaTEM-1* que codifica para betalactamasas de amplio espectro

clase A TEM-1. Este aislamiento fue el que presentó resistencia a un mayor número de antibióticos, incluidas todas las cefalosporinas probadas (Fig. 3). Según la clasificación de Bush & Jacoby (145), las enzimas codificadas por las familias de genes *blaTEM-1 y blaCTX* se encuentran en los grupos 2b y 2be, respectivamente. El grupo 2b confiere un fenotipo resistente a las penicilinas y algunas de las cefalosporinas de primera generación, mientras que el grupo 2be a un espectro extendido de cefalosporinas. Algo importante es que tanto el gen *blaCTX-M-115* como el gen *blaTEM-1* se encontraban en el plásmido A998. Esto sugiere que la presencia de dichas betalactamasas confiriendo resistencia a todas las cefalosporinas se encuentran en un mismo plásmido con las herramientas conjugativas para movilizarse en el ambiente y esparcir así, los GRAs a diferentes bacterias.

En Costa Rica se ha reportado anteriormente la presencia de bacterias productoras de BLEE (146–148). Utilizando bacterias aisladas en el año 2005 del Hospital San Juan de Dios en Costa Rica, Arya-Fonseca y colaboradores (146) determinaron que un 18% de las *E. coli* y un 40% de las *K. pneumoniae* que causaron infecciones nosocomiales presentaron el fenotipo de BLEE positivo. Un 94% de las bacterias identificadas como *E. coli* presentaron BLEE de tipo TEM y apenas un 3% del tipo CTX. Respecto a los identificados como *K. penumoniae* un 100% de los aislamientos resistentes presentaron enzimas tipo TEM y un 30% de tipo CTX. Asimismo, en el informe técnico de RAM emitido por el Centro Nacional de Referencia de Bacteriología de Costa Rica en el periodo 2018-2023 reporto que un 9,41% de las *E. coli* y un 19,59% de las *K. pneumoniae* aisladas de orina fueron BLEE positivas (149). El mismo centro de referencia reporta que en el año 2018 de 54 aislamientos de *K. pneumoniae* que fueron BLEE positivo, 50 presentaban los *blaCTX-M*, encontrando un porcentaje de estas bacterias con dicho genotipo mayor al 90% (149). Por lo que, el generar información sobre la presencia de aislamientos BLEE positivos y la identificación de los genes *blaTEM-1 y blaCTX* en bacterias ambientales, contribuye a los esfuerzos constantes de monitoreo intrahospitalario que se realizan en Costa Rica.

El aislamiento *Shigella* sp. A224-8 fue el único con resistencia a la ciprofloxacina (Fig. 3). La resistencia se da debido a la presencia de la mutación S83L en el gen *gyrA*, siendo esta no sólo una de las mutaciones más comunes encontradas en el ambiente, sino también la que parece conferir mayores niveles de resistencia al antibiótico (150). Anteriormente se ha intentado relacionar los niveles de contaminación de fluoroquinolonas en el ambiente con la

resistencia a estos antibióticos; y aunque se encontró que las mutaciones en el gen *gyrA* también pueden aparecer en ambientes acuáticos no contaminados, no se descarta que la mayoría de las mutaciones más comunes como S83L aparecen en mayor medida en los ambientes con mayores niveles de contaminación (151). El hecho de que el único aislamiento con una mutación que confiere resistencia a ciprofloxacina fue del sitio más contaminado podría relacionarse con una mayor concentración de fluoroquinolonas en el ambiente, siendo esta una molécula poco biodegradable y que puede estimular la resistencia bacteriana en bajas concentraciones (152, 153); o bien de otros contaminantes emergentes que puedan tener un efecto similar en la célula. Sin embargo, para comprobar esto será necesario diseñar experimentos que permitan medir los niveles de contaminación de fluoroquinolonas en los sitios de muestreo, así como aumentar el número de cepas resistentes al tipo de antibióticos.

En términos generales, al analizar tanto el fenotipo como genotipo de los GRAs, se puede encontrar que los aislamientos del tercer sitio presentan mayores perfiles de resistencia en comparación con los aislamientos de los demás sitios. En la Figura 4 se aprecia como el número de GRAs es mayor en los genomas de aislamientos del Sitio 3, seguidos por los del Sitio 2 y siendo los aislamientos del Sitio 1 los que presentan menor número de GRAs. Un patrón muy similar fue encontrado al analizar el número de plásmidos encontrados por sitio (Fig. 5). Existe una relación entre los resultados del mayor número de GRAs y del mayor número de plásmidos en los sitios de mayor contaminación. Determinamos que 27 GRAs de los 56 encontrados estuvieron presentes en plásmidos, y como se mostró en la Figura 2, los únicos aislamientos con GRAs en plásmidos fueron *Shigella* sp. A231-12 (12 GRAs), *Shigella* sp. A224-8 (9) y *K. pneumoniae* A238-6 (3) aislados del Sitio 3, además del aislamiento *C. gillenii* A223-7 (3) aislado del Sitio 2. Por lo que, el mayor número de GRAs en aislamientos del Sitio 3 podría deber a la presencia de plásmidos que movilizan dichos genes.

La presencia de algunos contaminantes sólidos como microplásticos por ejemplo, pueden crear un área dónde los microorganismos se bioacumulan; esto facilita el contacto físico de las bacterias promoviendo la tasa de transferencia de GRAs por el proceso de conjugación (70). También se ha demostrado en experimentos de laboratorio que la presencia de microplásticos acelera las tasas de transformación comparado con sustratos orgánicos debido a un aumento en la expresión de genes relacionados con la formación del biofilm

(*motA* y *pgaA*) y el proceso de transformación (*pilX* y *comA*) (154). Asimismo, la presencia de contaminantes orgánicos, farmacéuticos o productos de cuidado personal pueden ocasionar un aumento en los niveles de estrés celular de las bacterias en el ambiente, generando una alta producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en las células. Las ERO se han asociado con la regulación de las tasas de THG, de hecho, se ha observado que una producción de ERO provocada por contaminantes promueve la THG (54, 155, 156).

El Sitio 3 muestreado fue seleccionado previamente debido a que se conocía como un punto de referencia en el gradiente de contaminación del río Virilla, siendo de los tres sitios muestreados el que albergaba mayores valores de contaminación según los índices del BMWP-CR (Biological Monitoring Working Party modificado para Costa Rica) (valor entre 17-26 “muy contaminado”) e Índice Holandés (valor de 11 “severo”). Si bien se cuenta con un limitado número de aislamientos por sitio, el hecho de que la mayor cantidad de GRAs y sus vehículos móviles (plásmidos) se encuentran en los aislamientos de este sitio, genera la preocupación de si los niveles de contaminación tan diversos asociados al urbanismo en este cauce estén ejerciendo una presión selectiva que aumenta las dinámicas de transferencia y distribución de plásmidos con GRAs.

Indicios similares se han encontrado en otras zonas del planeta, como por ejemplo en regiones costeras del centro de Tailandia dónde la contaminación urbana parece influenciar en la alta prevalencia de GRAs y EGMs en aguas y sedimentos (157); asimismo en ambientes acuáticos de los Andes Bolivianos se encontró una co-relación significativa entre la contaminación fecal y el aumento de GRAs y el gen *intl1* (Integron de clase 1) (158). Esto a su vez guarda relación con experimentos de comunidades microbianas (microcosmos) como el realizado por Aoife y Rima (159), en dónde las bacterias resistentes a antibióticos proliferaron con mayor eficacia en microcosmos tratados con aguas residuales que aquellos tratados sólo con agua de río; demostrando que las bacterias con GRAs que sobreviven al tratamiento de aguas residuales pueden proliferar y persistir en el ambiente acuático luego de su liberación. Adicionalmente, un estudio demostró que en microcosmos creados a partir de aguas residuales de una planta de tratamiento en Escandinavia, se aumentaron las tasas de conjugación ante la exposición de bajas concentraciones de antibióticos y biocidas (160). Lo que refuerza a su vez la necesidad de desarrollar más estudios en diferentes cuerpos lóticos de agua, en especial aquellos con alta influencia urbana.

Otro punto que resaltar sobre el gradiente de contaminación analizado es haber aislado varias bacterias del género *Shigella* en los tres sitios de muestreo, pero con diferentes perfiles de GRAs. En la Figura 2 se reslató como las cepas *Shigella* sp. A224-8 y *Shigella* sp. A231-12 siendo las únicas aisladas del Sitio 3, destacan en el número de GRAs (debido a la presencia de plásmidos que los acarrean) si se comparan con las otras Shigellas de los sitios 1 y 2 ubicadas en los mismos clados. Esto es un indicativo de que en ambos clados filogenómicos, hay Shigellas que comparten orígenes evolutivos, así como un alto porcentaje de nucleótidos (Fig.1), pero la presencia de plásmidos con GRAs se da únicamente en las dos Shigellas ubicadas en el Sitio 3. Lo que podría sugerir de nuevo, que el ambiente altamente contaminado podría estar influenciando en la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia. Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de estudios más relacionados con validar dicha hipótesis; como estudios de metagenómica en el agua y sedimento que puedan cuantificar en mejor medida la cantidad total de GRAs y EGMs en el gradiente de contaminación, o bien estudios que midan las tasas de conjugación y transformación en nuestros aislamientos bajo la presencia de dichos contaminantes.

Respecto a los 52 plásmidos potenciales que fueron reconstruidos por la herramienta MOB-suite, sólo cinco presentaron GRAs, por lo que se visualizaron resaltando los GRAs y otros EGMs que tuvieran en su estructura. El primer plásmido presentado fue el pPAC802 de la familia IncQ, presente en el aislamiento *Shigella* sp. A224-8 aislado del Sitio 3 (Fig. 5). Este fue el plásmido que al realizar la re-construcción mediante secuenciación PACBIO, parece estar presente en la bacteria integrado en el cromosoma, manteniendo la replicasa y los GRAs, pero no los genes para llevar a cabo la conjugación. Los plásmidos de la familia IncQ se caracterizan por ser plásmidos pequeños con la capacidad de replicarse en un amplio rango de bacterias (161). El plásmido en las bases de datos con mayor similitud según la herramienta MOB-suite fue el pASL01a presente en *E. coli* (162). Dicho plásmido se ha asociado con la diseminación de la resistencia al trimetoprim debido a la presencia del gen *dfrA7* y la presencia de múltiples elementos transponibles de la familia TN21 (162). Sin embargo, el plásmido potencial que se encontraba en nuestro aislamiento no presentaba ninguno de estos elementos. Por otra parte, preservaba otros GRAs compartidos con el plásmido pASL01a que probablemente han quedado luego de posibles eventos de recombinación, como los genes *sul1*, *sul2* y el gen de resistencia a biocidas *qacE* (162).

Anteriormente se ha reportado que un plásmido de la familia IncQ se ha integrado dentro del genoma de uno de sus hospederos, siendo el caso del plásmido pRAS3.2 que se integró en el cromosoma del parásito intracelular *Chlamydia suis*, generando una isla de patogenicidad de alrededor de 10kb en la cepa R19 (163). Además, se han reportado casos en que bacterias del género *Shigella* han integrado plásmidos acarreando genes de resistencia o de virulencia dentro de su cromosoma (164, 165); Prabaa y colaboradores (164) demostraron que en una cepa de *S. sonnei* había integrado un plásmido de la familia IncFII dentro del cromosoma, el cuál acarreaba genes de resistencia como *mphA*, s*ul1*, *bla-DHA1*, *qnrB4* y *tetR*. Dicha bacteria logró expresar resistencia a Azitromicina conferida por el gen *mphA*, demostrando la importancia de monitorear estos eventos de integración que pueden conferir mecanismos de resistencia a antibióticos y permanecer dentro del cromosoma de las bacterias.

Este mismo aislamiento (*Shigella* sp. A224-8) también acarreó el plásmido pAB190 (Fig. 6), identificado como de la familia IncR. Se ha discutido anteriormente que este grupo de incompatibilidad de plásmidos no suele presentar relaxasa ni elementos conjugativos, sin embargo, en este estudio se reporta una relaxasa de la familia MOB_F. A pesar de no presentar elementos conjugativos, estos plásmidos suelen encontrarse en una amplia variedad de hospederos, por lo que se hipotetiza que son movilizables (166). Dicha incongruencia podría deberse a una mala caracterización de las relaxasas presentes en los plásmidos de esta familia que les permitan movilizarse con los elementos conjugativos de otros plásmidos en la misma célula bacteriana. El plásmido en la base de datos con mayor similitud fue el plásmido pEFER proveniente de *E. fergusonii* cepa ATCC 35469. Este plásmido fue sometido al Genbank directamente y no hay un artículo asociado al mismo por lo que la información de su estructura es más restringida; sin embargo, se sabe que alberga una región de multirresistencia a antibióticos y dos mecanismos de resistencia a fagos conocidos como BREX y BrxU (167).

El plásmido con mayor número de GRAs en su estructura fue el pA998 en el asilamiento *Shigella* sp. A231-12 (Fig. 7), del Sitio 3 y que también obtuvo el mayor número de fenotipos resistentes a los antibióticos probados (Fig. 3). Este plásmido fue reconstruido utilizando los datos tanto de la secuenciación de Illumina como de PacBio. Dicho plásmido contenía la presencia de 12 GRAs, y el plásmido con mayor similitud en la base de datos fue

el pF8475, proveniente de *Salmonella enterica* pero que se ha sugerido tuvo origen inicialmente en una *E. coli*. En términos generales, el plásmido pA998 es un plásmido de gran tamaño (arriba de 200kb) que porta múltiples GRAs, entre ellos los genes *blaTEM-1B* y *blaCTX-M-124* que confieren resistencia a una amplia variedad de antibióticos betalactámicos, especialmente del grupo de las cefalosporinas, lo que se relaciona con el resultado del VITEK2 (Fig. 3). De estos genes sólo el gen *blaTEM* está presente en el plásmido de referencia pF8475, pero no así el *blaCTX-M* (168).

Asimismo, el aislamiento A231-12 presentó el fenotipo de resistencia a los antibióticos trimetoprima/sulfametoxazol, y gentamicina; y en el plásmido pA998 se encontraban los genes *dfrA12*, *sul* (1 y 2) y *aac(3)-IId* que confieren resistencia a los antibióticos mencionados respectivamente. Estos mismos genes se pueden encontrar en el plásmido de referencia pF8475. Lo anterior apoya el hecho de que la resistencia a los antibióticos que presentó el aislamiento *Shigella* sp. A231-12 es conferida por dicho plásmido. Sin embargo, para poder confirmar esto es necesario realizar experimentos enfocados en probar la expresión del plásmido en este u otros modelos bacterianos.

Los genes *sul1* y *dfrA12* encontrados en el plásmido pA998 se encontraron dentro de la estructura de un integron de clase 1 (Fig. 8) en conjunto con los genes, *aadA2* y *SMR-qacE* al igual que como se encuentran en el plásmido pF8475; si bien este último gen no es considerado como un GRAs, confiere resistencia a compuestos de amonio cuaternario (qac, por sus siglas en inglés), por lo que su propagación puede beneficiar el fenómeno de co-resistencia (169). Los integrones juegan un papel importante en la propagación y expresión de GRAs en las bacterias, debido a su capacidad de intercambiar casetes genéticos conteniendo GRAs con las células bacterianas y movilizarse entre múltiples ambientes. Los integrones de clase 1 se han relacionado especialmente con la presencia de genes que confieren resistencia a los qac, debido a que son compuestos altamente liberados en el ambiente, por lo que aumenta la ventaja adaptativa otorgada por estos genes y su prevalencia dentro de los integrones y poblaciones bacterianas se ve beneficiada (60, 170).

Muchos estudios han reportado una relación constante entre los integrones de clase 1 y la resistencia a sulfametoxazol de diferentes especies bacterianas (129, 130, 168, 171), debido a la presencia de los genes *sul1*, *sul2* o *sul3* dentro de la estructura del integron. Esto ocasiona que la probabilidad de encontrar alguno de los genes *sul* en conjunto con el gen *qac*

dentro de un integron clase 1 en aquellas cepas resistentes a sulfametoxazol aumente cada vez más, ya que al ser seleccionado uno de los genes debido a la presión selectiva del antibiótico o el biocida, se co-seleccione el otro, favoreciendo el fenómeno de co-resistencia (131). Otro de los arreglos más comunes encontrados dentro de integrones de clase 1 es la combinación o co-existencia de los genes *dfrA12* y *aadA2* (172, 173), la cual se ha reportado en múltiples ocasiones, siendo encontrada incluso en conjunto con los genes *sul* (173). En el caso del plásmido A998, la estructura del integron de clase 1 contiene los cuatro genes mencionados, siendo un arreglo de los genes *dfrA12-aadA2-sul1-qac*, que no sólo confiere la resistencia necesaria para desarrollar resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol, sino que también confiere potencial resistencia a biocidas a base de compuestos de amonio cuaternarios y a la estreptomicina.

Tomando la información anterior en cuenta, el plásmido A998 tiene los genes necesarios para llevar a cabo el proceso de conjugación, y además contiene 12 GRAs, dónde cuatro de esos genes y uno de resistencia a qac, están organizados en un integron completo. Esto representa un punto clave a tomar en cuenta en este estudio, ya que habla de la posibilidad de que este u otros plásmidos similares estén esparciéndose en el ambiente y siendo co-seleccionados debido a la presencia de compuestos orgánicos que facilitan su transferencia y permanencia en las poblaciones. Además de que, aunque parece tener una historia más marcada en especies del género *Salmonella*, el compartir un posible origen con *E. coli* hace que sea potencialmente compatible con otras especies de la familia Enterobacteriaceae, como es el caso del aislamiento *Shigella* sp. A231-12. Debido a esto, se refuerza la importancia de mantener un constante monitoreo ambiental de plásmidos con GRAs, ya que la presencia de arreglos genéticos que confieren resistencia a múltiples antibióticos como el encontrado en un integron de clase 1 en este plásmido (*dfrA12-aadA2-sul1-qac*) representa un alto riesgo de generar nuevas cepas multirresistentes que pueden llegar a tener un impacto directo en la salud humana.

Los otros dos plásmidos con presencia de GRAs fueron el pAB595 (Fig. 9) y el pPAC305 (Fig. 10) que fueron encontrados en los aislamientos *K. pneumoniae* A238-6 (Sitio 3) y *C. gillenii* A223-7 (Sitio 2), respectivamente. El plásmido pAB595 presentó tres GRAs que fueron *blaTEM-1*, *dfrA28* y *sul2*. El aislamiento *K. pneumoniae* A238-6 que acarreaba el plásmido presentó resistencia a la trimetoprima/sulfametoxazol, lo que podría relacionarse

con la presencia de los genes *dfrA28* y *sul2* que confieren dicho fenotipo. Este plásmido fue relacionado con el plásmido RCS86_pI proveniente de *E. coli*; sin embargo, no se encontró información sobre dicho plásmido por lo que parece haber sido anotado directamente al GenBank sin ninguna publicación asociada. Además, no se logró anotar la replicasa por lo que se desconoce su grupo de incompatibilidad. A pesar de la falta de información sobre dicho plásmido, se evidencia un evento de co-selección de GRAs que confieren resistencia a una combinación de antibióticos altamente utilizada en infecciones clínicas (especialmente urinarias).

Finalmente, el último plásmido pPAC305 fue el único con presencia de GRAs encontrado en una bacteria que no fuera aislada del Sitio 3, siendo el aislamiento *C. gillenii* A223-7. Este plásmido fue asociado con el plásmido R6K de *E. coli* en la base de datos; plásmido que ha sido utilizado como un plásmido modelo en estudios de replicación desde hace décadas (174). Ambos plásmidos son conjugativos, de la familia IncX2 y con un tamaño alrededor de los 40kpb. Los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncX suelen tener un tamaño de 30-50kpb aproximadamente, y se han detectado principalmente en cepas de *Salmonella* y *E. coli* de origen humano y animal (44). Si bien este aislamiento no presentó resistencia a ninguno de los antibióticos probados según la prueba de VITEK2, la estructura de dicho plásmido presenta 3 GRAs, *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* (que confieren resistencia a la estreptomicina) y el gen *tet(B)* (que confiere resistencia a la tetraciclina). Ninguno de estos antibióticos fue probado en el VITEK2, por lo que para comprobar la expresión de dichos genes y la función del plásmido será necesario elaborar ensayos a futuro con antibióticos específicos que nos ayuden a diseminar el verdadero papel de este y otros plásmidos encontrados. También es importante mencionar que 47 de los plásmidos putativos no presentaron GRAs, por lo que podrían estar cumpliendo funciones distintas a la RAM que deberán ser elucidadas en estudios posteriores.

VII. CONCLUSIONES

- La mayoría de los aislamientos (10/15) pertenecen al género *Shigella*, y aunque aislamos bacterias de este género en los tres sitios, sólo los del Sitio 3 (el más contaminado), presentaron GRAs en plásmidos.
- El aislamiento *Shigella* sp. A231-12 del Sitio 3 presentó el mayor número de fenotipos de resistencia a los antibióticos probados (7 antibióticos) y un mayor número de GRAs en un sólo plásmido (11 ARG).
- Los perfiles fenotípicos de resistencia fueron mayores en los aislamientos de los Sitios 2 y 3, prevaleciendo la resistencia a nitrofurantoína, trimetoprim/sulfametoxazol y antibióticos betalactámicos; relacionado con la presencia de genes *sul*, *dfrA* y *bla* en elementos móviles como plásmidos y un integrón de clase 1.
- En general, los resultados muestran la necesidad de incluir bacterias ambientales en la vigilancia de la RAM, para obtener información que pueda usarse para realizar referencias cruzadas con determinantes de resistencia clínicos y comunitarios. También destaca la necesidad de abordar la RAM como parte de los desafíos que plantea el aumento de la urbanización.

VIII. FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por el proyecto de Fondos del Sistema CONARE para la Investigación ***Análisis del plasmidoma microbiano en aguas contaminadas y sus posibles efectos en la salud y el ambiente"***, el proyecto inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica número C2650 "***Análisis del plasmidoma microbiano en aguas contaminadas y sus posibles efectos en la salud y el ambiente-fase2***"

IX. REFERENCIAS

1. Schwarzenbach RP, Egli T, Hofstetter TB, von Gunten U, Wehrli B. 2010. Global Water Pollution and Human Health. Annu Rev Environ Resour 35:109–136.

2. Persson L, Carney Almroth BM, Collins CD, Cornell S, de Wit CA, Diamond ML, Fantke P, Hassellöv M, MacLeod M, Ryberg MW, Søgaard Jørgensen P, Villarrubia-Gómez P, Wang Z, Hauschild MZ. 2022. Outside the Safe Operating Space of the Planetary Boundary for Novel Entities. Environ Sci Technol 56:1510–1521.

3. Farré M la, Pérez S, Kantiani L, Barceló D. 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. TrAC Trends Anal Chem 27:991–1007.

4. Strokal M, Bai Z, Franssen W, Hofstra N, Koelmans AA, Ludwig F, Ma L, van Puijenbroek P, Spanier JE, Vermeulen LC, van Vliet MTH, van Wijnen J, Kroeze C. 2021. Urbanization: an increasing source of multiple pollutants to rivers in the 21st century. 1. Npj Urban Sustain 1:1–13.

5. Wilkinson JL, Boxall ABA, Kolpin DW, Leung KMY, Lai RWS, Galbán-Malagón C, Adell AD, Mondon J, Metian M, Marchant RA, Bouzas-Monroy A, Cuni-Sanchez A, Coors A, Carriquiriborde P, Rojo M, Gordon C, Cara M, Moermond M, Luarte T, Petrosyan V, Perikhanyan Y, Mahon CS, McGurk CJ, Hofmann T, Kormoker T, Iniguez V, Guzman-Otazo J, Tavares JL, Gildasio De Figueiredo F, Razzolini MTP, Dougnon V, Gbaguidi G, Traoré O, Blais JM, Kimpe LE, Wong M, Wong D, Ntchantcho R, Pizarro J, Ying G-G, Chen C-E, Páez M, Martínez-Lara J, Otamonga J-P, Poté J, Ifo SA, Wilson P, Echeverría-Sáenz S, Udikovic-Kolic N, Milakovic M,

Fatta-Kassinos D, Ioannou-Ttofa L, Belušová V, Vymazal J, Cárdenas-Bustamante M, Kassa BA, Garric J, Chaumot A, Gibba P, Kunchulia I, Seidensticker S, Lyberatos G, Halldórsson HP, Melling M, Shashidhar T, Lamba M, Nastiti A, Supriatin A, Pourang N, Abedini A, Abdullah O, Gharbia SS, Pilla F, Chefetz B, Topaz T, Yao KM, Aubakirova B, Beisenova R, Olaka L, Mulu JK, Chatanga P, Ntuli V, Blama NT, Sherif S, Aris AZ, Looi LJ, Niang M, Traore ST, Oldenkamp R, Ogunbanwo O, Ashfaq M, Iqbal M, Abdeen Z, O'Dea A, Morales-Saldaña JM, Custodio M, de la Cruz H, Navarrete I, Carvalho F, Gogra AB, Koroma BM, Cerkvenik-Flajs V, Gombač M, Thwala M, Choi K, Kang H, Ladu JLC, Rico A, Amerasinghe P, Sobek A, Horlitz G, Zenker AK, King AC, Jiang J-J, Kariuki R, Tumbo M, Tezel U, Onay TT, Lejju JB, Vystavna Y, Vergeles Y, Heinzen H, Pérez-Parada A, Sims DB, Figy M, Good D, Teta C. 2022. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. Proc Natl Acad Sci 119:e2113947119.

6. McEwen SA, Collignon PJ. 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. Microbiol Spectr 6:6.2.10.

7. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. 2017. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. Cureus 9.

8. Frieri M, Kumar K, Boutin A. 2017. Antibiotic resistance. J Infect Public Health 10:369–378.

9. Qin L-T, Liu S-S, Zhang J, Xiao Q-F. 2011. A novel model integrated concentration addition with independent action for the prediction of toxicity of multi-component mixture. Toxicology 280:164–172.

10. Bawa-Allah KA, Ehimiyein AO. 2022. Ecotoxicological effects of human and veterinary antibiotics on water flea (*Daphnia magna*). Environ Toxicol Pharmacol 94:103932.

11. Brandt KK, Amézquita A, Backhaus T, Boxall A, Coors A, Heberer T, Lawrence JR, Lazorchak J, Schönfeld J, Snape JR, Zhu Y-G, Topp E. 2015. Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. Environ Int 85:189–205.

12. Ramírez-Morales D, Masís-Mora M, Montiel-Mora JR, Cambronero-Heinrichs JC, Pérez-Rojas G, Tormo-Budowski R, Méndez-Rivera M, Briceño-Guevara S, Gutiérrez-Quirós JA, Arias-Mora V, Brenes-Alfaro L, Beita-Sandí W, Rodríguez-Rodríguez CE. 2021. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in water samples by liquid chromatography- mass spectrometry: Quality assessment and application to the risk assessment of urban-influenced surface waters in a metropolitan area of Central America. Process Saf Environ Prot 153:289–300.

13. Spongberg AL, Witter JD, Acuña J, Vargas J, Murillo M, Umaña G, Gómez E, Perez G. 2011. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. Water Res 45:6709–6717.

14. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. 2015. Horizontal gene transfer: building the web of life. 8. Nat Rev Genet 16:472–482.

15. Achtman M, Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. Nat Rev Microbiol 6:431–440.

16. Wiedenbeck J, Cohan FM. 2011. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. FEMS Microbiol Rev 35:957–976.

17. Philippe H, Douady CJ. 2003. Horizontal gene transfer and phylogenetics. Curr Opin Microbiol 6:498–505.

18. Groisman EA, Ochman H. 1996. Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. Cell 87:791–794.

19. Riley DR, Sieber KB, Robinson KM, White JR, Ganesan A, Nourbakhsh S, Hotopp JCD. 2013. Bacteria-Human Somatic Cell Lateral Gene Transfer Is Enriched in Cancer Samples. PLOS Comput Biol 9:e1003107.

20. Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M, Cruz F de la. 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. Mol Microbiol 45:1–8.

21. Ilhan J, Kupczok A, Woehle C, Wein T, Hülter NF, Rosenstiel P, Landan G, Mizrahi I, Dagan T. 2019. Segregational Drift and the Interplay between Plasmid Copy Number and Evolvability. Mol Biol Evol 36:472–486.

22. Wein T, Hülter NF, Mizrahi I, Dagan T. 2019. Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. 1. Nat Commun 10:2595.

23. Winter M, Buckling A, Harms K, Johnsen PJ, Vos M. 2021. Antimicrobial resistance acquisition via natural transformation: context is everything. Curr Opin Microbiol 64:133–138.

24. Mazaheri Nezhad Fard R, Barton MD, Heuzenroeder MW. 2011. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. Lett Appl Microbiol 52:559–564.

25. Billard-Pomares T, Fouteau S, Jacquet ME, Roche D, Barbe V, Castellanos M, Bouet JY, Cruveiller S, Médigue C, Blanco J, Clermont O, Denamur E, Branger C. 2014. Characterization of a P1-Like Bacteriophage Carrying an SHV-2 Extended-Spectrum β-Lactamase from an Escherichia coli Strain. Antimicrob Agents Chemother 58:6550–6557.

26. Varga M, Kuntová L, Pantůček R, Mašlaňová I, Růžičková V, Doškař J. 2012. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 clone. FEMS Microbiol Lett 332:146–152.

27. McDaniel LD, Young E, Delaney J, Ruhnau F, Ritchie KB, Paul JH. 2010. High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. Science 330:50–50.

28. Marrs B. 1974. Genetic Recombination in Rhodopseudomonas capsulata. Proc Natl Acad Sci 71:971–973.

29. Stanton TB, Humphrey SB, Sharma VK, Zuerner RL. 2008. Collateral Effects of Antibiotics: Carbadox and Metronidazole Induce VSH-1 and Facilitate Gene Transfer among Brachyspira hyodysenteriae Strains. Appl Environ Microbiol 74:2950–2956.

30. Soler N, Forterre P. 2020. Vesiduction: the fourth way of HGT. Environ Microbiol 22:2457–2460.

31. Lee AR, Park SB, Kim SW, Jung JW, Chun JH, Kim J, Kim YR, Lazarte JMS, Jang HB, Thompson KD, Jung M, Ha MW, Jung TS. 2022. Membrane vesicles from antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* transfer antibiotic-resistance to antibiotic-susceptible *Escherichia coli*. J Appl Microbiol 132:2746–2759.

32. Garcillán-Barcia MP, Redondo-Salvo S, de la Cruz F. 2023. Plasmid classifications. Plasmid 126:102684.

33. Hedges RW. 1974. R factors from Providence. Microbiology 81:171–181.

34. Christie PJ, Whitaker N, González-Rivera C. 2014. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res 1843:1578–1591.

35. Robertson J, Nash JHE. 2018. MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. Microb Genomics 4.

36. Jesus TF, Ribeiro-Gonçalves B, Silva DN, Bortolaia V, Ramirez M, Carriço JA. 2019. Plasmid ATLAS: plasmid visual analytics and identification in high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Res 47:D188–D194.

37. Frost LS, Koraimann G. 2010. Regulation of Bacterial Conjugation: Balancing Opportunity With Adversity. Future Microbiol 5:1057–1071.

38. Alderliesten JB, Duxbury SJN, Zwart MP, de Visser JAGM, Stegeman A, Fischer EAJ. 2020. Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a meta-analysis. BMC Microbiol 20:135.

39. Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Philos Trans R Soc B Biol Sci 364:2275–2289.

40. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F. 2010. Mobility of Plasmids. Microbiol Mol Biol Rev 74:434–452.

41. Christie PJ, Vogel JP. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends Microbiol 8:354–360.

42. Thomas CM, Nielsen KM. 2005. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. Nat Rev Microbiol 3:711–721.

43. Wilkins BM, Chilley PM, Thomas AT, Pocklington MJ. 1996. Distribution of Restriction Enzyme Recognition Sequences on Broad Host Range Plasmid RP4: Molecular and Evolutionary Implications. J Mol Biol 258:447–456.

44. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J. 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 73:1121–1137.

45. Fortini D, Fashae K, García-Fernández A, Villa L, Carattoli A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance and β-lactamases in Escherichia coli from healthy animals from Nigeria. J Antimicrob Chemother 66:1269–1272.

46. Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. 2004. Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolates from Animals in Italy. Antimicrob Agents Chemother 48:903–908.

47. Venditti C, Fortini D, Villa L, Vulcano A, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Nisii C, Carattoli A, Di Caro A. 2017. Circulation of blaKPC-3-Carrying IncX3 Plasmids among Citrobacter freundii Isolates in an Italian Hospital. Antimicrob Agents Chemother 61:10.1128/aac.00505-17.

48. Pál T, Ghazawi A, Darwish D, Villa L, Carattoli A, Hashmey R, Aldeesi Z, Jamal W, Rotimi V, Al-Jardani A, Al-Abri SS, Sonnevend Á. 2017. Characterization of NDM-7 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolates in the Arabian Peninsula. Microb Drug Resist 23:871–878.

49. García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. 2009. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. J Antimicrob Chemother 63:274–281.

50. Yau S, Liu X, Djordjevic SP, Hall RM. 2010. RSF1010-Like Plasmids in Australian *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Origin of Their *sul2-strA-strB* Antibiotic Resistance Gene Cluster. Microb Drug Resist 16:249–252.

51. Kotsakis SD, Tzouvelekis LS, Lebessi E, Doudoulakakis A, Bouli T, Tzelepi E, Miriagou V. 2015. Characterization of a Mobilizable IncQ Plasmid Encoding Cephalosporinase CMY-4 in Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 59:2964–2966.

52. Hengge-Aronis R. 2002. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σS (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. Microbiol Mol Biol Rev 66:373–395.

53. Qiu Z, Yu Y, Chen Z, Jin M, Yang D, Zhao Z, Wang J, Shen Z, Wang X, Qian D, Huang A, Zhang B, Li J-W. 2012. Nanoalumina promotes the horizontal transfer of multiresistance genes mediated by plasmids across genera. Proc Natl Acad Sci 109:4944–4949.

54. Wang Y, Lu J, Zhang S, Li J, Mao L, Yuan Z, Bond PL, Guo J. 2021. Non-antibiotic pharmaceuticals promote the transmission of multidrug resistance plasmids through intra- and intergenera conjugation. 9. ISME J 15:2493–2508.

55. Ding P, Lu J, Wang Y, Schembri MA, Guo J. 2022. Antidepressants promote the spread of antibiotic resistance via horizontally conjugative gene transfer. Environ Microbiol 24:5261–5276.

56. Wang Y, Lu J, Mao L, Li J, Yuan Z, Bond PL, Guo J. 2019. Antiepileptic drug carbamazepine promotes horizontal transfer of plasmid-borne multi-antibiotic resistance genes within and across bacterial genera. 2. ISME J 13:509–522.

57. Lu J, Wang Y, Li J, Mao L, Nguyen SH, Duarte T, Coin L, Bond P, Yuan Z, Guo J. 2018. Triclosan at environmentally relevant concentrations promotes horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across bacterial genera. Environ Int 121:1217–1226.

58. Xiao X, Zeng F, Li R, Liu Y, Wang Z. 2022. Subinhibitory Concentration of Colistin Promotes the Conjugation Frequencies of Mcr-1- and blaNDM-5-Positive Plasmids. Microbiol Spectr 10:e02160-21.

59. Little JW, Mount DW. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell 29:11–22.

60. Chacón L, Kuropka B, González-Tortuero E, Schreiber F, Rojas-Jiménez K, Rodríguez-Rojas A. 2023. Mechanisms of low susceptibility to the disinfectant benzalkonium chloride in a multidrug-resistant environmental isolate of A*eromonas hydrophila*. Front Microbiol 14.

61. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, Bernardini A, Sanchez MB, Martinez JL. 2016. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. 1. Microorganisms 4:14.

62. Sincak M, Šoltisová K, Luptakova A, Sedlakova-Kadukova J. 2023. Overproduction of Efflux Pumps as a Mechanism of Metal and Antibiotic Cross-Resistance in the Natural Environment. 11. Sustainability 15:8767.

63. Qin T-T, Kang H-Q, Ma P, Li P-P, Huang L-Y, Gu B. 2015. SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance. Ann Transl Med 3:358.

64. Andersson DI, Hughes D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. Nat Rev Microbiol 12:465–478.

65. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. 6969. Nature 427:72–74.

66. Torres-Barceló C, Kojadinovic M, Moxon R, MacLean RC. 2015. The SOS response increases bacterial fitness, but not evolvability, under a sublethal dose of antibiotic. Proc R Soc B Biol Sci 282:20150885.

67. Mao D, Luo Y, Mathieu J, Wang Q, Feng L, Mu Q, Feng C, Alvarez PJJ. 2014. Persistence of Extracellular DNA in River Sediment Facilitates Antibiotic Resistance Gene Propagation. Environ Sci Technol 48:71–78.

68. Davison J. 1999. Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. Plasmid 42:73–91.

69. Chacón-Jiménez L, Rojas-Jiménez K. 2020. Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. Acta Médica Costarric 62:7–12.

70. Arias-Andres M, Klümper U, Rojas-Jimenez K, Grossart H-P. 2018. Microplastic pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems. Environ Pollut 237:253–261.

71. Liu Y, Liu W, Yang X, Wang J, Lin H, Yang Y. 2021. Microplastics are a hotspot for antibiotic resistance genes: Progress and perspective. Sci Total Environ 773:145643.

72. Iredell J, Brown J, Tagg K. 2016. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. BMJ h6420.

73. Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. Int J Med Microbiol 303:298–304.

74. Rivera-Montero L, Acuña G, Barrantes K, Rojas-Jimenez K, Chacón L. 2023. Multidrug-Resistant Escherichia coli in Costa Rican Domestic Wastewater Treatment Plants Maintains Horizontal Transfer Capacity of Resistance Determinants in Effluents. Water Air Soil Pollut 234:397.

75. Jia Y, Wang Z, Fang D, Yang B, Li R, Liu Y. 2021. Acetaminophen promotes horizontal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance genes. Sci Total Environ 782:146916.

76. Zhuang M, Achmon Y, Cao Y, Liang X, Chen L, Wang H, Siame BA, Leung KY. 2021. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. Environ Pollut 285:117402.

77. Echeverría-Sáenz S, Mena F, Pinnock M, Ruepert C, Solano K, de la Cruz E, Campos B, Sánchez-Avila J, Lacorte S, Barata C. 2012. Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jiménez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica). Sci Total Environ 440:106–114.

78. Vélez VPP, Esquivel-Hernández G, Cipriani-Avila I, Mora-Abril E, Cisneros JF, Alvarado A, Abril-Ulloa V. 2019. Emerging Contaminants in Trans-American Waters. Rev Ambiente Água 14.

79. Ramírez-Morales D, Masís-Mora M, Montiel-Mora JR, Cambronero-Heinrichs JC, Briceño-Guevara S, Rojas-Sánchez CE, Méndez-Rivera M, Arias-Mora V, Tormo-Budowski R, Brenes-Alfaro L, Rodríguez-Rodríguez CE. 2020. Occurrence of pharmaceuticals, hazard assessment and ecotoxicological evaluation of wastewater treatment plants in Costa Rica. Sci Total Environ 746:141200.

80. Vargas-Villalobos S, Hernández F, Fabregat-Safont D, Salas-González D, Quesada-Alvarado F, Botero-Coy AM, Esperón F, Martín-Maldonado B, Monrós-Gonzalez J, Ruepert C, Estrada-König S, Rivera-Castillo J, Chaverri-Fonseca F, Blanco-Peña K.

2024. A case study on pharmaceutical residues and antimicrobial resistance genes in Costa Rican rivers: A possible route of contamination for feline and other species. Environ Res 242:117665.

81. Blanco-Peña K, Quesada-Alvarado F, Salas-González D, Estrada-König S, Salom-Pérez R, Arroyo-Arce S, Villalobos-Araya A, Rivera-Castillo J, Martín-Maldonado B, Corrales-Gutiérrez D, Gallardo-Castro V, Gutiérrez-Espeleta G, Chaves A, Esperón F, Chaverri-Fonseca F. 2024. A multidisciplinary approach to analyze the antimicrobial resistance in natural ecosystems. Environ Res 251:118549.

82. SINIGIRH - Sistema Nacional de Información para la Gestión Integrada del Recurso Hídrico. https://mapas.da.go.cr/mapnew.php. Retrieved 18 September 2022.

83. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data – ScienceOpen. https://www.scienceopen.com/document?vid=de674375-ab83-4595-afa9-4c8aa9e4e736. Retrieved 10 March 2024.

84. BBTools. DOE Jt Genome Inst. https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/. Retrieved 10 March 2024.

85. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J Comput Biol 19:455–477.

86. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29:1072–1075.

87. Eren AM, Kiefl E, Shaiber A, Veseli I, Miller SE, Schechter MS, Fink I, Pan JN, Yousef M, Fogarty EC, Trigodet F, Watson AR, Esen ÖC, Moore RM, Clayssen Q, Lee MD, Kivenson V, Graham ED, Merrill BD, Karkman A, Blankenberg D, Eppley JM, Sjödin A, Scott JJ, Vázquez-Campos X, McKay LJ, McDaniel EA, Stevens SLR, Anderson RE, Fuessel J, Fernandez-Guerra A, Maignien L, Delmont TO, Willis AD. 2021. Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvi'o. Nat Microbiol 6:3–6.

88. Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. 2018. HMMER web server: 2018 update. Nucleic Acids Res 46:W200–W204.

89. Olm MR, Brown CT, Brooks B, Banfield JF. 2017. dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. ISME J 11:2864–2868.

90. Chaumeil P-A, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. 2020. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. Bioinformatics 36:1925–1927.

91. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2009. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. Mol Biol Evol 26:1641–1650.

92. Letunic I, Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Res 49:W293–W296.

93. Melvin P. Weinstein, James S. Lewis II, April M. Bobenchik, Shalley Campeau, Sharon K. Cullen, Marcelo F. Galas, Howard Gold, Romney M. Humphries, Thomas J. Kirn, Brandi Limbago, Amy J. Mathers, Tony Mazzulli, Michael Satlin, Audrey N. Schuetz, Patricia J. Simner, Pranita D. Tamma. 2024. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (30).

94. Néron B, Littner E, Haudiquet M, Perrin A, Cury J, Rocha EPC. 2022. IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of Integrons across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in *Klebsiella*. 4. Microorganisms 10:700.

95. Wishart DS, Ren L, Leong-Sit J, Saha S, Grant JR, Stothard P, Singh U, Kropielnicki A, Oler E, Peters H, Gautam V. 2023. PlasMapper 3.0—a web server for generating, editing, annotating and visualizing publication quality plasmid maps. Nucleic Acids Res 51:W459–W467.

96. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, Hoffmann M, Pettengill JB, Prasad AB, Tillman GE, Tyson GH, Klimke W. 2021. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. 1. Sci Rep 11:12728.

97. Seemann T. 2024. tseemann/abricate. Perl.

98. Feldgarden M, Brover V, Fedorov B, Haft DH, Prasad AB, Klimke W. 2022. Curation of the AMRFinderPlus databases: applications, functionality and impact. Microb Genomics 8:000832.

99. R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

100. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30:2068–2069.

101. Shaiber A, Eren AM. 2019. Composite Metagenome-Assembled Genomes Reduce the Quality of Public Genome Repositories. mBio 10:10.1128/mbio.00725-19.

102. Feng G, Huang H, Chen Y. 2021. Effects of emerging pollutants on the occurrence and transfer of antibiotic resistance genes: A review. J Hazard Mater 420:126602.

103. Buelow E, Ploy M-C, Dagot C. 2021. Role of pollution on the selection of antibiotic resistance and bacterial pathogens in the environment. Curr Opin Microbiol 64:117–124.

104. De Angelis G, Del Giacomo P, Posteraro B, Sanguinetti M, Tumbarello M. 2020. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β-Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. 14. Int J Mol Sci 21:5090.

105. Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. 2018. Shigellosis. The Lancet 391:801–812.

106. Lederer I, Much P, Allerberger F, Voracek T, Vielgrader H. 2005. Outbreak of shigellosis in the Vienna Zoo affecting human and non-human primates. Int J Infect Dis 9:290–291.

107. Beisner BA, Balasubramaniam KN, Fernandez K, Heagerty A, Seil SK, Atwill ER, Gupta BK, Tyagi PC, Chauhan NetrapalPS, Bonal BS, Sinha PriyaR, McCowan B. 2016. Prevalence of enteric bacterial parasites with respect to anthropogenic factors among commensal rhesus macaques in Dehradun, India. Primates 57:459–469.

108. Sahl JW, Morris CR, Emberger J, Fraser CM, Ochieng JB, Juma J, Fields B, Breiman RF, Gilmour M, Nataro JP, Rasko DA. 2015. Defining the Phylogenomics of Shigella Species: a Pathway to Diagnostics. J Clin Microbiol 53:951–960.

109. Pettengill EA, Pettengill JB, Binet R. 2016. Phylogenetic Analyses of Shigella and Enteroinvasive Escherichia coli for the Identification of Molecular Epidemiological Markers: Whole-Genome Comparative Analysis Does Not Support Distinct Genera Designation. Front Microbiol 6.

110. Winfield MD, Groisman EA. 2003. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 69:3687–3694.

111. Ishii Shatoshi, Winfried B. Ksoll, Randall E. Hicks, Michael J. Sadowsky1. Presence and Growth of Naturalized Escherichia coli in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. Applied and Environmental Microbiology 72:612–621.

112. Tymensen LD, Pyrdok F, Coles D, Koning W, McAllister TA, Jokinen CC, Dowd SE, Neumann NF. 2015. Comparative accessory gene fingerprinting of surface water *Escherichia coli* reveals genetically diverse naturalized population. J Appl Microbiol 119:263–277.

113. Lan R, Reeves PR. 2002. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of Shigella. Microbes Infect 4:1125–1132.

114. Mora-Mora M, Soto L, Salvador G. 2003. Diarreas asociadas a Shigella con un patrón de resistencia antimicrobiana alto en el cantón de Coto Brus, Costa Rica. Rev Costarric Cienc Médicas 24:55–60.

115. Barrantes K, Pardo V, Achí R. 2004. Brote de Diarrea Asociado a *Shigella Sonnei* debido a Contaminación Hídrica, San José, Costa Rica, 2001. Rev Costarric Cienc Médicas 25:15–24.

116. Paczosa MK, Mecsas J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev 80:629–661.

117. Rodríguez-Medina N, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Garza-Ramos U. 2019. Klebsiella variicola: an emerging pathogen in humans. Emerg Microbes Infect 8:973–988.

118. Potter RF, Lainhart W, Twentyman J, Wallace MA, Wang B, Burnham C-AD, Rosen DA, Dantas G. 2018. Population Structure, Antibiotic Resistance, and Uropathogenicity of *Klebsiella variicola*. mBio 9:10.1128/mbio.02481-18.

119. Duman M, Saticioglu IB, Buyukekiz AG, Balta F, Altun S. 2017. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of atypical *Citrobacter gillenii* and *Citrobacter* sp. isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Glob Antimicrob Resist 10:136–142.

120. Concha C, Miranda CD, Rojas R, Godoy FA, Romero J. 2021. Characterization of a Novel Variant of the Quinolone-Resistance Gene qnrB (qnrB89) Carried by a Multi-Drug Resistant *Citrobacter gillenii* Strain Isolated from Farmed Salmon in Chile. 3. Antibiotics 10:236.

121. Huttner A, Verhaegh EM, Harbarth S, Muller AE, Theuretzbacher U, Mouton JW. 2015. Nitrofurantoin revisited: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. J Antimicrob Chemother 70:2456–2464.

122. Munoz-Davila MJ. 2014. Role of Old Antibiotics in the Era of Antibiotic Resistance. Highlighted Nitrofurantoin for the Treatment of Lower Urinary Tract Infections. 1. Antibiotics 3:39–48.

123. Zhang X, Zhang Y, Wang F, Wang C, Chen L, Liu H, Lu H, Wen H, Zhou T. 2018. Unravelling mechanisms of nitrofurantoin resistance and epidemiological characteristics among *Escherichia coli* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents 52:226–232.

124. Osei Sekyere J. 2018. Genomic insights into nitrofurantoin resistance mechanisms and epidemiology in clinical Enterobacteriaceae. Future Sci OA 4:FSO293.

125. Sandegren L, Lindqvist A, Kahlmeter G, Andersson DI. 2008. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in Escherichia coli. J Antimicrob Chemother 62:495–503.

126. Eliopoulos GM, Huovinen P. 2001. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. Clin Infect Dis 32:1608–1614.

127. Venkatesan M, Fruci M, Verellen LA, Skarina T, Mesa N, Flick R, Pham C, Mahadevan R, Stogios PJ, Savchenko A. 2023. Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. Nat Commun 14:4031.

128. Sánchez-Osuna M, Cortés P, Llagostera M, Barbé J, Erill I. 2020. Exploration into the origins and mobilization of di-hydrofolate reductase genes and the emergence of clinical resistance to trimethoprim. Microb Genomics 6.

129. Shin HW, Lim J, Kim S, Kim J, Kwon GC, Koo SH. 2015. Characterization of Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance Genes and Their Relatedness to Class 1 Integron and Insertion Sequence Common Region in Gram-Negative Bacilli. J Microbiol Biotechnol 25:137–142.

130. de los Santos E, Laviña M, Poey ME. 2021. Strict relationship between class 1 integrons and resistance to sulfamethoxazole in *Escherichia coli*. Microb Pathog 161:105206.

131. Beavan AJS, Domingo-Sananes MR, McInerney JO. 2024. Contingency, repeatability, and predictability in the evolution of a prokaryotic pangenome. Proc Natl Acad Sci 121:e2304934120.

132. Schmidt J, Zdarska V, Kolar M, Mlynarcik P. 2023. Analysis of BlaEC family class C beta-lactamase. FEMS Microbiol Lett 370:fnad097.

133. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Catry B, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. 2008. Diversity of Extended-Spectrum β-Lactamases and

Class C β-Lactamases among Cloacal Escherichia coli Isolates in Belgian Broiler Farms. Antimicrob Agents Chemother 52:1238–1243.

134. dos Santos C, dos Santos LS, Franco OL. 2021. Fosfomycin and nitrofurantoin: classic antibiotics and perspectives. J Antibiot (Tokyo) 74:547–558.

135. Kulik K, Lenart-Boroń A, Wyrzykowska K. 2023. Impact of Antibiotic Pollution on the Bacterial Population within Surface Water with Special Focus on Mountain Rivers. 5. Water 15:975.

136. Lu J, Jin M, Nguyen SH, Mao L, Li J, Coin LJM, Yuan Z, Guo J. 2018. Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation. Environ Int 118:257–265.

137. Rowe WPM, Baker-Austin C, Verner-Jeffreys DW, Ryan JJ, Micallef C, Maskell DJ, Pearce GP. 2017. Overexpression of antibiotic resistance genes in hospital effluents over time. J Antimicrob Chemother 72:1617–1623.

138. Lambert G, Kussell E. 2014. Memory and Fitness Optimization of Bacteria under Fluctuating Environments. PLOS Genet 10:e1004556.

139. Hughes D, Andersson DI. 2017. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 41:374–391.

140. Ghosh D, Veeraraghavan B, Elangovan R, Vivekanandan P. 2020. Antibiotic Resistance and Epigenetics: More to It than Meets the Eye. Antimicrob Agents Chemother 64:10.1128/aac.02225-19.

141. Smith MA, Bidochka MJ. 1998. Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. Can J Microbiol 44:351–355.

142. Hernandez-Beltran JCR, Rodríguez-Beltrán J, Aguilar-Luviano OB, Velez-Santiago J, Mondragón-Palomino O, MacLean RC, Fuentes-Hernández A, San Millán A, Peña-Miller R. 2024. Plasmid-mediated phenotypic noise leads to transient antibiotic resistance in bacteria. Nat Commun 15:2610.

143. Zwe YH, Chin SF, Kohli GS, Aung KT, Yang L, Yuk H-G. 2020. Whole genome sequencing (WGS) fails to detect antimicrobial resistance (AMR) from heteroresistant subpopulation of *Salmonella enterica*. Food Microbiol 91:103530.

144. Nurjadi D, Zizmann E, Chanthalangsy Q, Heeg K, Boutin S. 2021. Integrative Analysis of Whole Genome Sequencing and Phenotypic Resistance Toward Prediction of Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance in *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol 11.

145. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54:969–976.

146. Araya-Fonseca C, Boza-Cordero R, Arguedas-Soto L, Badilla-Baltodano G, García-Santamaría F. 2007. Infecciones nosocomiales por bacterias productoras de ß lactamasa de espectro ampliado: prevalencia, factores de riesgo y análisis molecular. Acta Médica Costarric 49:90–96.

147. Barrantes K, Chacón LM, Morales E, Ramírez-Carvajal L. 2020. Draft Genome Sequence of an *Escherichia coli* Strain Harboring blaCTX-M-115, blaCMY-2,

Aminoglycoside, Tetracycline, and Sulfonamide Resistance Genes, Isolated from a Costa Rican Wastewater Treatment Plant. Microbiol Resour Announc 9:10.1128/mra.01015-19.

148. Jiménez Pearson Antonieta, Chaverri Murillo Jorge, Pérez Corrales Cristian, Ramirez Cardoce Manuel, Bolaños Acuña Hilda María, Grupo de trabajo de la Estrategia para la Vigilancia de Laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos en microorganismos de importancia en salud pública. 2020. Informe técnico: Estrategia Vigilancia de laboratorio de la resistencia a los antimicrobianos de microorganismos de importancia en salud pública, 2018.

149. EVILABRA. 2023. Reporte de la estrategia para la vigilancia de Laboratorio de la RAM (EVILABRA); 2018-2022. INCIENSA, San José, Costa Rica.

150. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. Int J Antimicrob Agents 25:358–373.

151. Johnning A, Kristiansson E, Fick J, Larsson DGJ. 2015. Resistance Mutations in gyrA and parC are Common in Escherichia Communities of both Fluoroquinolone-Polluted and Uncontaminated Aquatic Environments. Front Microbiol 6.

152. Frade VMF, Dias M, Teixeira ACSC, Palma MSA. 2014. Environmental contamination by fluoroquinolones. Braz J Pharm Sci 50:41–54.

153. Janecko N, Pokludova L, Blahova J, Svobodova Z, Literak I. 2016. Implications of fluoroquinolone contamination for the aquatic environment—A review. Environ Toxicol Chem 35:2647–2656.

154. Wang H, Xu K, Wang J, Feng C, Chen Y, Shi J, Ding Y, Deng C, Liu X. 2023. Microplastic biofilm: An important microniche that may accelerate the spread of antibiotic resistance genes via natural transformation. J Hazard Mater 459:132085.

155. Michel B. 2005. After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us. PLOS Biol 3:e255.

156. Van Acker H, Coenye T. 2017. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. Trends Microbiol 25:456–466.

157. Thongsamer T, Neamchan R, Blackburn A, Acharya K, Sutheeworapong S, Tirachulee B, Pattanachan P, Vinitnantharat S, Zhou X-Y, Su J-Q, Zhu Y-G, Graham D, Werner D. 2021. Environmental antimicrobial resistance is associated with faecal pollution in Central Thailand's coastal aquaculture region. J Hazard Mater 416:125718.

158. Agramont J, Gutiérrez-Cortez S, Joffré E, Sjöling Å, Calderon Toledo C. 2020. Fecal Pollution Drives Antibiotic Resistance and Class 1 Integron Abundance in Aquatic Environments of the Bolivian Andes Impacted by Mining and Wastewater. 8. Microorganisms 8:1122.

159. Mahaney AP, Franklin RB. 2022. Persistence of wastewater-associated antibiotic resistant bacteria in river microcosms. Sci Total Environ 819:153099.

160. Jutkina J, Marathe NP, Flach C-F, Larsson DGJ. 2018. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. Sci Total Environ 616–617:172–178.

161. Loftie-Eaton W, Rawlings DE. 2010. Evolutionary Competitiveness of Two Natural Variants of the IncQ-Like Plasmids, pRAS3.1 and pRAS3.2. J Bacteriol 192:6182–6190.

162. Labar AS, Millman JS, Ruebush E, Opintan JA, Bishar RA, Aboderin AO, Newman MJ, Lamikanra A, Okeke IN. 2012. Regional Dissemination of a Trimethoprim-Resistance Gene Cassette via a Successful Transposable Element. PLOS ONE 7:e38142.

163. Dugan J, Rockey DD, Jones L, Andersen AA. 2004. Tetracycline Resistance in Chlamydia suis Mediated by Genomic Islands Inserted into the Chlamydial inv-Like Gene. Antimicrob Agents Chemother 48:3989–3995.

164. Muthuirulandi Sethuvel DP, Anandan S, Murugan D, Asokan K, Vasudevan K, Jacob JJ, Walia K, Michael JS, Veeraraghavan B. 2020. Hybrid genome assembly of *Shigella sonnei* reveals the novel finding of chromosomal integration of an IncFII plasmid carrying a mphA gene. Access Microbiol 3:000189.

165. Zagaglia C, Casalino M, Colonna B, Conti C, Calconi A, Nicoletti M. 1991. Virulence plasmids of enteroinvasive Escherichia coli and *Shigella flexneri* integrate into a specific site on the host chromosome: integration greatly reduces expression of plasmid-carried virulence genes. Infect Immun 59:792–799.

166. Bielak E, Bergenholtz RD, Jørgensen MS, Sørensen SJ, Hansen LH, Hasman H. 2011. Investigation of diversity of plasmids carrying the blaTEM-52 gene. J Antimicrob Chemother 66:2465–2474.

167. Picton DM, Luyten YA, Morgan RD, Nelson A, Smith DL, Dryden DTF, Hinton JCD, Blower TR. 2021. The phage defence island of a multidrug resistant plasmid uses both BREX and type IV restriction for complementary protection from viruses. Nucleic Acids Res 49:11257–11273.

168. Kubasova T, Cejkova D, Matiasovicova J, Sekelova Z, Polansky O, Medvecky M, Rychlik I, Juricova H. 2016. Antibiotic Resistance, Core-Genome and Protein Expression in IncHI1 Plasmids in *Salmonella Typhimurium*. Genome Biol Evol 8:1661–1671.

169. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. 2011. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. Curr Opin Pharmacol 11:477–485.

170. Jechalke S, Schreiter S, Wolters B, Dealtry S, Heuer H, Smalla K. 2014. Widespread dissemination of class 1 integron components in soils and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. Front Microbiol 4.

171. Chang L-L, Lin H-H, Chang C-Y, Lu P-L. 2007. Increased incidence of class 1 integrons in trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 59:1038–1039.

172. Wannaprasat W, Padungtod P, Chuanchuen R. 2011. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. Int J Antimicrob Agents 37:457–461.

173. Hu L-F, Chang X, Ye Y, Wang Z-X, Shao Y-B, Shi W, Li X, Li J-B. 2011. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. Int J Antimicrob Agents 37:230–234.

174. Rakowski SA, Filutowicz M. 2013. Plasmid R6K replication control. Plasmid 69:231–242.

175. Marquez Calle G. 2000. Vegetation, population and ecological track as sustainability indicators in Colombia; Vegetacion, poblacion y huella ecologica como indicadores de sostenibilidad en Colombia. Gest Ambiente.

X. ANEXOS

Cuadro suplementario 1. Información de acceso a los genomas de las diferentes cepas externas utilizadas en el árbol filogenómico.

Cepas externas utilizadas en el árbol filogenómico	Código de acceso al genoma (Genbank)
Escherichia coli O7K1 str CE10	ASM22762v1
Shigella flexneri 3b	PDT001042381.1
Shigella flexneri 5	ASM1358v1
Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae HS11286	ASM24018v2
Shimwellia blattae DSM 4481	ASM26230v1
Escherichia coli O119 H4	Ec03-3458
*Shigella flexner*i 6	ASM118406v1
Escherichia coli O119 H6	ASM159250v1
Klebsiella pneumoniae subsp Ozaenae WCHKP030925	ASM285311v2
Citrobacter gillenii MBT-C3	ASM342960v1
Citrobacter freundii FDAARGOS_549	ASM381234v1
Citrobacter braakii MiY-A	ASM964893v1
Klebsiella quasipneumoniae KqPF26	ASM1641570v1
Klebsiella variicola subsp variicola F2R9T	ASM2052554v1
Klebsiella variicola subsp variicola KPN160	ASM2126320v1
Klebsiella pneumoniae subsp Rhinoscleromatis KP4831	ASM2280967v1
Klebsiella variicola subsp tropica BSK_177V2	ASM2680213v1
Citrobacter gillenii AF64-5pH9A	ASM2768166v1
Shigella dysenteriae ATCC 13313	ASM294967v1
Shigella flexneri 2a	ASM295021v1
Escherichia coli DSM 30083	ASM369716v2
Shigella sonnei SE6-1	ASM1337481v1
Shigella boydii ESBL-W3-2	ASM229048v1
Shigella boydii ATCC BAA-1247	ASM295027v1
Shigella sonnei 2015C-3566	ASM222462v1
Shigella boydii 4444 74	ASM26818v1
Shigella boydii S6614	ASM81558v1
Shigella sonnei 09 1032 A	ASM81588v1
Shigella sonnei 3233 85	ASM26800v1
Shigella sonnei 866	ASM326524v1
Shigella sonnei Moseley	ASM28181v1
Shigella sonnei S6513	ASM81550v1

Cuadro suplementario 2. Resultados de los GRAs presentes en los 15 aislamientos que fueron secuenciados por la plataforma Illumina, obtenidos por el software abricate utilizando la base de datos AMR-FinderPlus del NCBI. Se muestra el código del aislamiento, el código del plásmido o si se encontraba en el cromosma del aislamiento, el nombre del gen, la cobertura e identidad contra la referencia utilizada por la base de datos, el código de accesión de la referencia utilizada y el fenotipo de resistencia al que se asocia dicho gen.

Aislamiento	Plásmido	Gen	Cobertura (%)	Identidad (%)	Referencia	Resistencia
A222-7	Cromosoma	*blaEC-18*	100.00	99.91	NG_049083.1	Cefalosporinas
A223-7	Cromosoma	*blaGIL-1*	100.00	99.42	NG_049142.1	Betalactámicos
A223-7	pAC305	*tet(B)*	100.00	100.00	NG_048163.1	Tetraciclina
A223-7	pAC305	*aph(3")-Ib*	100.00	99.88	NG_056002.2	Estreptomicina
A223-7	pAC305	*aph(6)-Id*	100.00	100.00	NG_047464.1	Estreptomicina
A224-7	Cromosoma	*fosA_gen*	100.00	93.81	NG_047881.1	Fosfomicina
A224-7	Cromosoma	*oqxA6*	100.00	96.51	NG_050424.1	Fenicol, quinolona
A224-7	Cromosoma	*oqxB15*	100.00	99.27	NG_050433.1	Fenicol, quinolona
A224-7	Cromosoma	*blaLEN-10*	100.00	99.88	NG_050775.1	Betalactámicos
A224-8	Cromosoma	*blaEC*	100.00	100.00	NG_047494.1	Betalactámicos
A224-8	pAC802	*mph(A)*	100.00	99.67	NG_047986.1	Macrólido
A224-8	pAC802	*sul1*	100.00	100.00	NG_048082.1	Sulfonamida
A224-8	pAC802	*aadA5*	100.00	100.00	NG_047357.1	Estreptomicina
A224-8	pAC802	*tet(B)*	100.00	100.00	NG_048163.1	Tetraciclina
A224-8	pAB190	*floR*	100.00	99.83	NG_047862.1	Florfenicol
A224-8	pAC802	*sul2*	100.00	99.88	NG_048118.1	Sulfonamida
A224-8	pB190	*tet(X)*	100.00	100.00	NG_065852.1	Tetraciclina
A224-8	pAC802	*aph(6)-Id*	100.00	100.00	NG_047464.1	Estreptomicina
A224-8	pAC802	*aph(3')-Ia*	100.00	100.00	NG_047430.1	Kanamicina
A229-5	Cromosoma	*oqxA10*	100.00	94.05	NG_050418.1	Fenicol

						Quinolona
A229-5	Cromosoma	*oqxB11*	100.00	96.23	NG_050429.1	Fenicol Quinolona
A229-5	Cromosoma	*blaEC-15*	100.00	98.50	NG_049081.1	Cefalosporinas
A229-12	Cromosoma	*blaEC-18*	100.00	99.21	NG_049083.1	Cefalosporinas
A230-5	Cromosoma	*blaEC-15*	100.00	98.50	NG_049081.1	Cefalosporinas
A230-7	Cromosoma	*blaEC-18*	100.00	99.21	NG_049083.1	Cefalosporinas
A230-8	Cromosoma	*blaEC*	100.00	100.00	NG_047494.1	Betalactámicos
A231-12	Cromosoma	*blaEC-18*	100.00	99.21	NG_049083.1	Cefalosporinas
A231-12	pAA998	*blaCTX-M-115*	100.00	100.00	NG_048910.1	Cefalosporinas
A231-12	pAA998	*mph(A)*	100.00	99.67	NG_047986.1	Macrólido
A231-12	pAA998	*sul1*	100.00	100.00	NG_048082.1	Sulfonamida
A231-12	pAA998	*aadA2*	100.00	99.87	NG_047343.1	Estreptomicina
A231-12	pAA998	*dfrA12*	100.00	100.00	NG_047689.1	Trimetropim
A231-12	pAA998	*blaTEM-1*	100.00	100.00	NG_050145.1	Betalactámicos
A231-12	pAA998	*aac(3)-IId*	100.00	100.00	NG_047251.1	Gentamicina
A231-12	pAA998	*tet(B)*	100.00	100.00	NG_048163.1	Tetraciclina
A231-12	pAA998	*aph(6)-Id*	100.00	100.00	NG_047464.1	Estreptomicina
A231-12	pAA998	*aph(3")-Ib*	100.00	100.00	NG_056002.2	Estreptomicina
A231-12	pAA998	*sul2*	100.00	99.88	NG_048118.1	Sulfonamida
A231-12	pAA998	*aph(3')-Ia*	100.00	99.88	NG_047430.1	Kanamicina
A231-5	Cromosoma	*blaSHV-187*	100.00	99.19	NG_050053.1	Betalactámicos
A231-5	Cromosoma	*oqxA5*	100.00	99.66	NG_050423.1	Fenicol Quinolona
A231-5	Cromosoma	*oqxB11*	100.00	99.52	NG_050429.1	Fenicol Quinolona

A231-5	Cromosoma	*fosA6*	100.00	99.52	NG_051497.1	Fosfomicina
A236-12	Cromosoma	*blaEC*	100.00	99.91	NG_047494.1	Betalactámicos
A236-7	Cromosoma	*blaEC-18*	100.00	99.21	NG_049083.1	Cefalosporinas
A237-6	Cromosoma	*blaSHV-187*	100.00	99.42	NG_050053.1	Betalactámicos
A237-6	Cromosoma	*oqxB25*	100.00	99.43	NG_050444.1	Fenicol Quinolona
A237-6	Cromosoma	*oqxA6*	100.00	99.83	NG_050424.1	Fenicol Quinolona
A237-6	Cromosoma	*fosA_gen*	98.33	93.70	NG_047881.1	Fosfomicina
A238-6	Cromosoma	*blaSHV-110*	100.00	99.77	NG_050001.1	Betalactámicos
A238-6	Cromosoma	*fosA6*	100.00	99.52	NG_051497.1	Fosfomicina
A238-6	Cromosoma	*oqxB*	100.00	100.00	NG_048025.1	Fenicol Quinolona
A238-6	Cromosoma	*oqxA*	100.00	99.92	NG_048024.1	Fenicol Quinolona
A238-6	pAB595	*sul2*	100.00	100.00	NG_051852.1	Sulfonamida
A238-6	pAB595	*dfrA26*	100.00	100.00	NG_047722.1	Trimetropim
A238-6	pAB595	*blaTEM-1*	100.00	100.00	NG_050145.1	Betalactámicos

Cuadro suplementario 3. Resultados de los elementos genéticos móviles presentes en los 15 aislamientos que fueron secuenciados por la plataforma Illumina, obtenidos por el software MOB-suite. Se muestra el código del plásmido, el código del aislamiento, el tamaño putativo del plásmido y su contenido GC, el grupo de incompatibilidad de las replicasas presentes, la clase de la relaxasa y el tipo de plásmido (conjugativo, movilizable o no mobilizable).

Plásmido	Aislamiento	Tamaño (Mpb)	% GC	Replicasa (s)	Relaxasa (s)	Tipo de plásmido
pAA304	A222-7	90,33	48,75	IncFIB rep_cluster_2244	MOBF	conjugativo
pPAC305	A223-7	43,22	43,06	IncX2	MOBP	conjugativo
novel_fa78	A223-7	22,70	46,84	rep_cluster_1304	-	no movilizable
pAA814	A224-7	117,59	52,80	-	-	no movilizable
novel_7b5d	A224-7	32,67	50,82	IncFIB	-	no movilizable
novel_0564	A224-7	4,06	46,17	ColRNAI_rep_cluster_1987	-	no movilizable
pAB229	A224-8	44,41	43,15	IncX1	MOBP	conjugativo
pAB190	A224-8	30,24	47,36	-	-	movilizable
pAB189	A224-8	13,39	51,41	IncR	-	no movilizable
pAC082	A224-8	44,15	54,25	IncQ1	-	no movilizable
pAD169	A224-8	2,52	45,00	ColRNAI_rep_cluster_1987	-	movilizable
pAD466	A224-8	2,52	48,99	-	MOBV	movilizable
pAD093	A224-8	2,68	46,01	-	-	no movilizable
pAA304	A229-5	81,65	47,85	IncFIA,IncFIB	MOBF	conjugativo
pAD443	A229-5	74,01	51,30	-	-	no movilizable
pAA275	A229-5	71,87	51,24	IncFIB	MOBF,MOBF	conjugativo
pAA143	A229-5	5,61	49,60	rep_cluster_2392	MOBP	movilizable
novel_d433	A230-5	18,90	43,22	IncFIB	-	no movilizable
pAA304	A230-5	76,36	47,17	IncFIA,IncFIB	MOBF	conjugativo
pAA833	A230-5	24,67	50,20	-	-	no movilizable
pAA143	A230-5	5,61	49,60	rep_cluster_2392	MOBP,MOBP	movilizable
pAA304	A230-7	101,94	48,24	IncFIB,rep_cluster_2244	MOBF	conjugativo
pAD672	A230-7	12,20	55,43	-	-	no movilizable
pAF232	A230-7	8,12	54,99	-	-	no movilizable
novel_b2b5	A230-8	52,91	48,49	IncK2/Z	MOBP	movilizable
pAA161	A230-8	6,21	46,75	-	MOBP	movilizable
pAA971	A230-8	5,95	42,91	Col156	MOBQ	movilizable
pAA147	A230-8	5,68	47,34	rep_cluster_2401	MOBP	movilizable

pAB074	A230-8	3,20	51,64	ColRNAI_rep_cluster_1987	-	no movilizable
pAA314	A229-12	44,95	52,47	IncFIA	MOBF	conjugativo
pAA172	A229-12	29,68	49,35	IncFIB,IncFII	-	no movilizable
pAF232	A229-12	6,59	49,55	-	-	no movilizable
novel_0c71	A229-12	4,86	41,85	ColRNAI_rep_cluster_1987 rep_cluster_2358	-	no movilizable
pAD443	A231-5	137,08	51,82	IncFIB	-	no movilizable
pAB076	A231-5	5,37	52,03	ColRNAI_rep_cluster_1987	MOBP	movilizable
pAA474	A231-12	85,09	49,68	IncI-gamma/K1	MOBP	conjugativo
pAA998	A231-12	223,80	47,63	IncFIA,IncQ1	MOBH	conjugativo
pAD486	A231-12	3,24	47,25	rep_cluster_2350	-	movilizable
pAF232	A231-12	1,45	44,73	-	-	no movilizable
pAA304	A236-7	101,89	48,24	IncFIB rep_cluster_2244	MOBF	conjugativo
pAF232	A236-7	9,89	52,61	-	-	no movilizable
pAA887	A236-12	79,22	49,72	IncFIB	MOBC	movilizable
pAA376	A236-12	61,39	45,95	IncY	-	no movilizable
pAD443	A237-6	144,40	50,98	IncFIB,IncFII	-	no movilizable
pAA050	A237-6	29,92	54,12	IncFIA	-	movilizable
pAD443	A238-6	145,44	51,68	IncFIB	-	no movilizable
pAA031	A238-6	22,30	53,31	-	-	no movilizable
pAA029	A238-6	19,41	51,58	-	-	no movilizable
pAA356	A238-6	5,70	47,24	-	-	no movilizable
pAB595	A238-6	6,86	54,17	-	-	no movilizable
pAA129	A238-6	4,77	43,47	ColRNAI_rep_cluster_1987	-	no movilizable
pAE973	A238-6	3,31	46,77	-	-	no movilizable

Cuadro suplementario 4. Resultados de los GRAs presentes en los 2 aislamientos que fueron secuenciados por las plataformas Illumina y PacBio, obtenidos por el software abricate utilizando la base de datos AMR-FinderPlus del NCBI. Se muestra el código del aislamiento, el código del plásmido o si se encontraba en el cromosma del aislamiento, el nombre del gen, la cobertura e identidad contra la referencia utilizada por la base de datos, el código de accesión de la referencia utilizada y el fenotipo de resistencia al que se asocia dicho gen.

Aislamiento	Plásmido	Gen	Cobertura (%)	Identidad (%)	Referencia	Resistencia
A224-8	Cromosoma	*aph(3')-Ia*	100,00	100,00	NG_047430.1	Kanamicina
A224-8	Cromosoma	*aph(6)-Id*	100,00	100,00	NG_047464.1	Estreptomicina
A224-8	Cromosoma	*aph(3")-Ib*	100,00	100,00	NG_056002.2	Estreptomicina
A224-8	Cromosoma	*sul2*	100,00	100,00	NG_048118.1	Sulfonamida
A224-8	Cromosoma	*mph(A)*	100,00	99,67	NG_047986.1	Macrólido
A224-8	Cromosoma	*sul1*	100,00	99,89	NG_048082.1	Sulfonamida
A224-8	Cromosoma	*aadA5*	100,00	100,00	NG_047357.1	Estreptomicina
A224-8	Cromosoma	*mdf(A)*	100,00	99,92	Y08743.1	Macrólido
A224-8	pAB190	*tet(X)*	98,71	95,31	NG_065852.1	Tetraciclina
A224-8	pAB190	*floR*	99,92	98,11	NG_047862.1	Florfenicol
A224-8	pAB190	*tet(B)*	100,00	100,00	NG_048163.1	Tetraciclina
A224-8	pAB190	*aph(3")-Ib*	99,88	100,00	NG_056002.2	Estreptomicina
A224-8	pAB190	*aph(6)-Id*	100,00	100,00	NG_047464.1	Estreptomicina
A231-12	Cromosoma	*mdf(A)*	100,00	98,86	Y08743.1	Macrólido
A231-12	pAA998	*aph(6)-Id*	100,00	100,00	NG_047464.1	Estreptomicina
A231-12	pAA998	*aph(3")-Ib*	100,00	100,00	NG_056002.2	Estreptomicina
A231-12	pAA998	*sul2*	100,00	100,00	NG_048118.1	Sulfonamida
A231-12	pAA998	*blaTEM-1B*	100,00	100,00	NG_048118.1	Sulfonamida
A231-12	pAA998	*aac(3)-IId*	100,00	99,88	NG_047251.1	Gentamicina
A231-12	pAA998	*mph(A)*	100,00	99,67	NG_047986.1	Macrólido
A231-12	pAA998	*sul1*	100,00	99,89	NG_048082.1	Sulfonamida

A231-12	pAA998	*aadA2*	97,92	99,75	NG_047343.1	Estreptomicina
A231-12	pAA998	*dfrA12*	100,00	100,00	NG_047343.1	Estreptomicina
A231-12	pAA998	*aph(3')-Ia*	100,00	99,88	NG_047430.1	Kanamicina
A231-12	pAA998	*tet(B)*	100,00	100,00	NG_048163.1	Tetraciclina
A231-12	pAA998	*blaCTX-M-124*	100,00	99,89	NG_048910.1	Cefalosporinas

Cuadro suplementario 5. Resultados de los elementos genéticos móviles presentes en los 2 aislamientos que fueron secuenciados por las plataformas Illumina y PacBio, obtenidos por el software MOB-suite. Se muestra el código del plásmido, el código del aislamiento, el tamaño putativo del plásmido y su contenido GC, el grupo de incompatibilidad de las replicasas presentes, la clase de la relaxasa y el tipo de plásmido (conjugativo, movilizable o no mobilizable).

Aislamiento	Plásmido	Tamaño (Mpb)	% GC	Replicasa (s)	Relaxasa (s)	Tipo de plásmido
A224-8	pAB190	77,28	50,05	IncR	-	Movilizable
A224-8	pAB229	45,14	43,35	IncX1	MOBP	Conjugativo
A224-8	pAD169	2,56	45,16	ColRNAI_rep_cluster_1987	-	Movilizable
A224-8	pAD466	2,56	49,24	-	MOBV	Movilizable
A231-12	pAA998	234,80	47,79	IncFIA IncQ1	MOBH	Conjugativo
A231-12	pAA474	85,13	49,69	IncI-gamma/K1	MOBP	Conjugativo
A231-12	pAD486	3,29	46,96	rep_cluster_2350	-	Movilizable

1. **<u>Información suplementaria respecto a la densidad poblacional de los sitios de muestreo</u>**
   Realizado con apoyo de Máster Denis Mauricio Salas González (SIG-IRET, UNA)

Para la realización del cálculo poblacional alrededor de cada sitio de muestreo, se realizó un mapeo de infraestructura urbana (casas de habitación, escuelas colegios, talleres, mercados, etc.), considerando una zona de amortiguación de 5 Km y estimaciones en Costa Rica de 4 habitantes por vivienda. Además, como insumo para conocer el estado de alteración de la zona de estudio se consideró el área de cobertura de bosque, mediante el índice de vegetación remanente o RVI, por sus siglas en inglés desarrollado por Márquez (175), y utilizado en otros estudios de genes de resistencia antimicrobiana como contaminantes en aguas rivereñas de Costa Rica (80, 81). Esto dio como resultado una densidad poblacional estimada y RVI que se detalla en el siguiente cuadro:

Cuadro suplementario 6. Información obtenida mediante Sistemas de Información Geográfica para cada uno de los sitios muestreados. Categorías RVI: NT No o escasamente transformado, muy sostenible RVI ≥70%; PT Parcialmente transformado, sostenibilidad media 50%≤RVI<70%; MT Transformación moderada, sostenibilidad media-baja 30%≤RVI<50%; HT Altamente transformado, baja sostenibilidad 10%≤RVI<30%; CT Completamente transformado RVI< 10% (las siglas corresponden al inglés).

Sitio	No. Infraestructuras	Población aproximada	Densidad aproximada (habitantes por Km2)	Área Buffer (km^2)	Remaining vegetation index (RVI)*
1	2697	10788	137,4267516	78,5	57,8471338
2	26471	105884	1348,840764	78,5	8,53503185
3	22163	88652	1129,324841	78,5	26,433121

Cómo resultado los sitios se clasificaron como: (1) Coronado RVI= 57,85 Parcialmente transformado, (2) Tibás RVI=8,53 CT Completamente transformado, (3) Represa RVI=26,43 HT Altamente transformado.

2. **Información de la clasificación de la calidad de las aguas superficiales en las zonas de estudio de la subcuenca del Río Virilla, según Dirección de Aguas-MINAE**

a. Punto de Referencia para el sitio 1: FPC-TAR-01

Interpretación del índice Físico Químico: SIN CONTAMINACIÓN

Interpretación del índice BMWP-CR: CALIDAD EXCELENTE

Referencia:https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiY2VkZTc0ZjYtYjBiMC00Zjk5LThmOTQtMTgxYTI0MjgyNzdhIiwidCI6IjFhYzkwNGRmLWYzNTctNGQwMS1hMjEyLTU4Y2M5MGQxNzUzYSIsImMiOjR9

b. Punto de Referencia para el sitio 2: FPC-TAR-01

Interpretación del índice Físico Químico: SIN CONTAMINACIÓN-INCIPIENTE

Interpretación del índice BMWP-CR: CONTAMINACIÓN MODERADA-MUY CONTAMINADA

Referencia:https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMjU1ZmVlNDAtODRlYy00ODM0LThjYWUtNDVkNWYxMDc5ODRlIiwidCI6IjFhYzkwNGRmLWYzNTctNGQwMS1hMjEyLTU4Y2M5MGQxNzUzYSIsImMiOjR9

c. Punto de Referencia para el sitio 3: FPC-TAR-04

Interpretación del índice Físico Químico: SEVERA

Interpretación del índice BMWP-CR: MUY CONTAMINADA

https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiOWMxMGI5YzEtMzE3OS00ZmMwLWIxZWQtODM3NTE1YWU4MDA2IiwidCI6IjFhYzkwNGRmLWYzNTctNGQwMS1hMjEyLTU4Y2M5MGQxNzUzYSIsImMiOjR9