

Vigilancia comunitaria de genes críticos de resistencia antimicrobiana en aguas residuales urbanas de Santiago, Chile

Community surveillance of critical antimicrobial resistance genes in urban wastewater from Santiago, Chile

Diego Lira-Velásquez¹, Karina Alvarez-Mondaca¹, Nicolás Núñez-Pérez¹, Diego Olivares-Meneses² y Jorge Olivares-Pacheco¹

¹Grupo de Resistencia Antimicrobiana en Bacterias Patógenas y Ambientales, (GRABPA), Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

²Innovación Aguas Andinas, Santiago, Chile.

Los autores declaran no tener conflicto alguno de interés.

Este estudio fue financiado por FONDECYT Regular N° 1240316

Recibido: 26 de enero de 2026 / Aceptado: 8 de septiembre de 2026

Correspondencia a: Jorge Olivares Pacheco
jorge.olivares@pucv.cl

ISSN 0717-6341



Resumen

Introducción: La resistencia antimicrobiana constituye una amenaza para la salud pública, y las aguas residuales son una matriz complementaria para su vigilancia. **Objetivo:** Evaluar la frecuencia y distribución temporal de *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *mcr-I* en aguas residuales de Santiago, Chile. **Material y Métodos:** Se analizaron 97 muestras semanales recolectadas entre julio de 2020 y julio de 2021 en las plantas de tratamiento de aguas residuales de La Farfana y Mapocho-Trebal. Los genes se detectaron mediante RPC. Las frecuencias se compararon mediante prueba exacta de Fisher y las tendencias temporales mediante Cochran-Armitage. **Resultados:** En La Farfana, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *mcr-I* se detectaron en 92%, 62%, 28% y 34%, respectivamente; en Mapocho-Trebal, en 96%, 70%, 34% y 49%. No hubo diferencias significativas entre plantas. Solo *bla*_{NDM} mostró tendencia temporal creciente significativa en ambas plantas. **Conclusión:** Las aguas residuales permiten complementar la vigilancia de genes de resistencia antimicrobiana en Chile.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana; vigilancia ambiental; aguas residuales; detección de carbapenemasas por RPC; *mcr-I*.

Abstract

Background: Antimicrobial resistance is a threat to public health, and wastewater serves as a complementary matrix for its surveillance. **Aim:** To assess the frequency and temporal distribution of *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, and *mcr-I* in wastewater in Santiago, Chile. **Materials and Methods:** 97 weekly samples collected from July 2020 to July 2021 at the La Farfana and Mapocho-Trebal wastewater treatment facilities were analyzed. The genes were detected using PCR. Frequencies were compared using Fisher's exact test, and temporal trends were assessed using the Cochran-Armitage test. **Results:** In La Farfana, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, and *mcr-I* were detected in 92%, 62%, 28%, and 34% of cases, respectively; in Mapocho-Trebal, in 96%, 70%, 34%, and 49% of cases. There were no significant differences between the facilities. Only *bla*_{NDM} showed a significant upward trend over time in both plants. **Conclusion:** Wastewater can be used to supplement the monitoring of antimicrobial resistance genes in Chile.

Keywords: antimicrobial resistance; environmental surveillance; wastewater; PCR detection of carbapenemases; *mcr-I*.

Introducción

La resistencia antimicrobiana (RAM) constituye una de las principales amenazas para la salud pública mundial, debido al aumento sostenido de infecciones causadas por bacterias multirresistentes, asociadas a mayor mortalidad, hospitalizaciones prolongadas y elevados costos sanitarios¹. En este contexto, organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) han impulsado el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia epidemiológica, tradicionalmente basados en aislados clínicos provenientes de establecimientos de salud². Si bien esta estrategia es fundamental, presenta limitaciones para estimar la circulación comunitaria de bacterias resistentes y de los genes que confieren resistencia antimicrobiana³. La vigilancia basada en aguas residuales ha emergido como una herramienta complementaria para monitorear la RAM a nivel poblacional, ya que integra aportes de individuos infectados y colonizados, tanto del ámbito comunitario como hospitalario⁴. Las aguas residuales urbanas constituyen, además, un reservorio de bacterias resistentes, genes de resistencia antimicrobiana, residuos de antimicrobianos y otros determinantes asociados a presión antropogénica, por lo que su análisis permite aproximarse a la dinámica de circulación de la RAM en entornos urbanos^{5,6}.

Entre los determinantes de mayor relevancia epidemiológica se encuentran los genes que codifican para carbapenemasas, como *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} y *bla*_{VIM}, debido a su relación con bacterias gramnegativas multirresistentes y a su frecuente localización en elementos genéticos móviles^{7,8}. En Chile, KPC se ha consolidado como una de las principales carbapenemasas detectadas en aislados clínicos, mientras que NDM y VIM han adquirido creciente importancia en los últimos años^{9,10}. De manera complementaria, el gen *mcr-1*, asociado a resistencia a colistina, representa una señal de alerta por su potencial impacto en terapias de última línea frente a infecciones causadas por bacterias multirresistentes^{11,12}.

En América Latina, y particularmente en Chile, la información sobre la circulación comunitaria de genes de resistencia antimicrobiana mediante vigilancia de aguas residuales aún es limitada. Este vacío resulta especialmente relevante considerando la alta concentración urbana, la presión asistencial observada durante la pandemia por COVID-19 y el incremento en el uso de antimicrobianos descrito durante este período^{13,14}. En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia y distribución temporal de los genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *mcr-1* durante la pandemia de COVID-19 en aguas residuales urbanas provenientes de dos plantas de tratamiento de la ciudad de Santiago de Chile, como una aproximación epidemiológica a la vigilancia comunitaria de la resistencia antimicrobiana.

Material y Métodos

Diseño del estudio, origen y procesamiento de muestras de aguas residuales

Se realizó un estudio observacional descriptivo orientado a la detección molecular de genes de resistencia antimicrobiana en

aguas residuales urbanas de la ciudad de Santiago de Chile. Para ello, se analizaron muestras almacenadas en el biorepositorio de aguas residuales del Grupo de Resistencia Antimicrobiana en Bacterias Patógenas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, correspondientes a dos plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS), La Farfana y Mapocho-Trebal. Las muestras fueron obtenidas mediante muestreo puntual semanal entre el 15 de julio de 2020 y el 12 de julio de 2021 en La Farfana, y entre el 21 de julio de 2020 y el 12 de julio de 2021 en Mapocho-Trebal, totalizando 97 muestras. En cada ocasión se recolectó 1 L de aguas residuales, de los cuales 500 mL fueron procesados mediante un protocolo de precipitación previamente descrito, que permitió concentrar la muestra hasta un volumen final aproximado de 3 mL¹⁵. Desde este concentrado, se utilizaron 300 µL para la extracción de ADN total y posterior análisis molecular.

Ambas PTAS difieren en la población atendida y en las características sociodemográficas de sus áreas de cobertura. La planta La Farfana, ubicada en el sector centro-poniente de Santiago, atiende aproximadamente a 3.621.486 habitantes en una superficie de 617,44 km² (densidad: 5.865 habitantes/km²) y se asocia a 207 establecimientos de salud. En contraste, la planta Mapocho-Trebal, localizada en el sector sur de la ciudad, da cobertura a 2.654.773 habitantes distribuidos en 407,25 km² (densidad: 6.503 habitantes/km²) y se vincula a 131 establecimientos de salud.

Extracción de ADN

La extracción de ADN total se realizó mediante un método de lisis térmica utilizando resina Chelex® 100 (Bio-Rad, EE.UU.), estrategia previamente aplicada en matrices ambientales acuáticas complejas, incluyendo aguas superficiales y residuales, por su utilidad para obtener ADN compatible con amplificación molecular y reducir el efecto de inhibidores de la reacción de polimerasa en cadena-RPC (del inglés: PCR)¹⁶.

Selección y evaluación de partidores

Se efectuó una revisión de la literatura científica con el objetivo de identificar estudios que reportaran la detección de los genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *mcr-1* en matrices de aguas residuales mediante RPC con el fin de evaluar el universo de partidores utilizados. Se excluyeron aquellos partidores diseñados exclusivamente para detección clínica, aun cuando hubiesen sido utilizados posteriormente en estudios ambientales. Para cada gen, se construyó una base de datos de alelos disponibles en NCBI, incluyendo 113 alelos para *bla*_{KPC}, 58 para *bla*_{NDM}, 84 para *bla*_{VIM} y 37 para *mcr-1*. Estas bases fueron evaluadas utilizando la herramienta Primer-BLAST¹⁷, seleccionándose únicamente aquellos pares de partidores que presentaron 100% de hibridación con al menos 90% de los alelos analizados. Los partidores finalmente seleccionados y evaluados experimentalmente se detallan en las Tablas suplementarias 1 y 2.

Amplificación por RPC

Con el fin de minimizar el efecto de inhibidores presentes en las muestras ambientales, los extractos de ADN fueron diluidos

en forma seriada a 10^{-2} (1:100) y 10^{-3} (1:1.000) previo a la amplificación. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para mejorar la eficiencia de la RPC en matrices ambientales complejas¹⁸⁻²⁰. Las reacciones de RPC se realizaron utilizando GoTaq® Green Master Mix (Promega®, E.U.A.). Las condiciones térmicas consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a la temperatura específica de cada par de partidores (Tabla suplementaria 2) y extensión a 72°C, finalizando con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Cada reacción fue validada mediante la inclusión de controles positivos y negativos en cada amplificación. Los controles positivos correspondieron a amplicones clonados de cada gen blanco insertados en el vector pCRTM2.1-TOPO® (Invitrogen™, E.U.A.), mientras que los controles negativos correspondieron a controles sin templado. Las dos diluciones empleadas simultáneamente (10^{-2} y 10^{-3}) actuaron como estrategia de control de inhibición, dado que los compuestos inhibitorios frecuentes en aguas residuales tienden a reducir su efecto con el incremento de la dilución.

Secuenciación y análisis de los productos amplificados

Con el objetivo de confirmar la especificidad de la amplificación, se seleccionaron aleatoriamente tres amplicones por cada gen detectado, los cuales fueron enviados a secuenciación (Macrogen Inc. Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante Clustal Omega²¹ y su identidad fue confirmada utilizando la herramienta BLAST del NCBI²².

Análisis estadístico

Las variables consideradas para el análisis fueron: a) detección individual de los genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *mcr-1*, definida como una variable dicotómica (positiva o negativa) para cada muestra analizada y expresada mediante frecuencias absolutas y porcentajes; b) planta de tratamiento de aguas residuales, correspondiente a La Farfana o Mapocho-Trebal, utilizada como variable categórica para la comparación espacial; y c) semana de muestreo, considerada como variable temporal ordenada para evaluar tendencias en la detección de cada gen durante el periodo de estudio.

La frecuencia de detección de cada gen se calculó como el número de muestras positivas dividido por el total de muestras analizadas en cada planta de tratamiento. Para cada gen, la proporción de muestras positivas se comparó entre La Farfana y Mapocho-Trebal mediante la prueba exacta de Fisher, utilizando una tabla de contingencia 2 × 2 definida por la planta de tratamiento (La Farfana/Mapocho-Trebal) y el resultado de detección del gen (positivo/negativo). Este análisis se realizó utilizando GraphPad Prism 9. Para evaluar la existencia de una tendencia temporal en la proporción de muestras positivas para cada gen durante el periodo de estudio, se aplicó la prueba de tendencia de Cochran-Armitage utilizando RStudio. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

Comité de Ética

Este estudio no requirió evaluación por un comité de ética o bioética, ya que se basó exclusivamente en el análisis de muestras ambientales de aguas residuales urbanas. No se incluyeron muestras extraídas de humanos ni animales, no se realizó intervención sobre individuos y no se utilizaron datos personales, clínicos ni información identificable.

Resultados

Selección y validación de partidores para la detección de genes de resistencia antimicrobiana

La evaluación experimental de los partidores seleccionados mediante revisión bibliográfica y análisis *in silico* mostró que, para cada gen evaluado, solo un par permitió obtener amplificación específica y reproducible en muestras de aguas residuales. Para *bla*_{VIM}, el par D3_F/D2_R generó un fragmento de 147 pb; para *bla*_{NDM}, D1_F/D4_R produjo un amplicón de 250 pb; para *bla*_{KPC}, D1_F/D2_R amplificó un producto de 798 pb; y para *mcr-1*, D3_F/D2_R permitió obtener un fragmento específico de 230 pb (Figura 1).

Frecuencia de detección de genes de resistencia antimicrobiana en aguas residuales

El análisis de las muestras recolectadas mostró diferencias descriptivas en la frecuencia de detección de los genes de resistencia antimicrobiana entre las dos plantas de tratamiento evaluadas (Figura 2). En La Farfana, *bla*_{KPC} fue el gen detectado con mayor frecuencia, presente en 46 de 50 muestras (92%), seguido de *bla*_{NDM} en 31 (62%), *mcr-1* en 17 (34%) y *bla*_{VIM} en 14 (28%). En Mapocho-Trebal, *bla*_{KPC} fue detectado en 45 de 47 muestras (96%), seguido de *bla*_{NDM} en 33 (70%), *mcr-1* en 23 (49%) y *bla*_{VIM} en 16 (34%). La comparación de la proporción de muestras positivas entre ambas plantas mediante la prueba exacta de Fisher no mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los genes evaluados.

Distribución temporal de los genes detectados

La distribución temporal de las detecciones de los genes de resistencia antimicrobiana a lo largo del periodo de estudio se presenta en la Figura 3. La evaluación mediante la prueba de tendencia de Cochran-Armitage mostró una tendencia temporal creciente estadísticamente significativa únicamente para *bla*_{NDM} en ambas plantas de tratamiento (La Farfana: $p \leq 0,001$; Mapocho-Trebal: $p \leq 0,001$). En contraste, no se observaron tendencias temporales estadísticamente significativas para *bla*_{KPC} (La Farfana: $p = 0,219$; Mapocho-Trebal: $p = 0,915$), *bla*_{VIM} (La Farfana: $p = 0,513$; Mapocho-Trebal: $p = 0,734$) ni *mcr-1* (La Farfana: $p = 0,450$; Mapocho-Trebal: $p = 0,273$).

Confirmación por secuenciación de los productos amplificados

El análisis de las secuencias amplificadas reveló una identidad de 100% con las secuencias de referencia correspon-

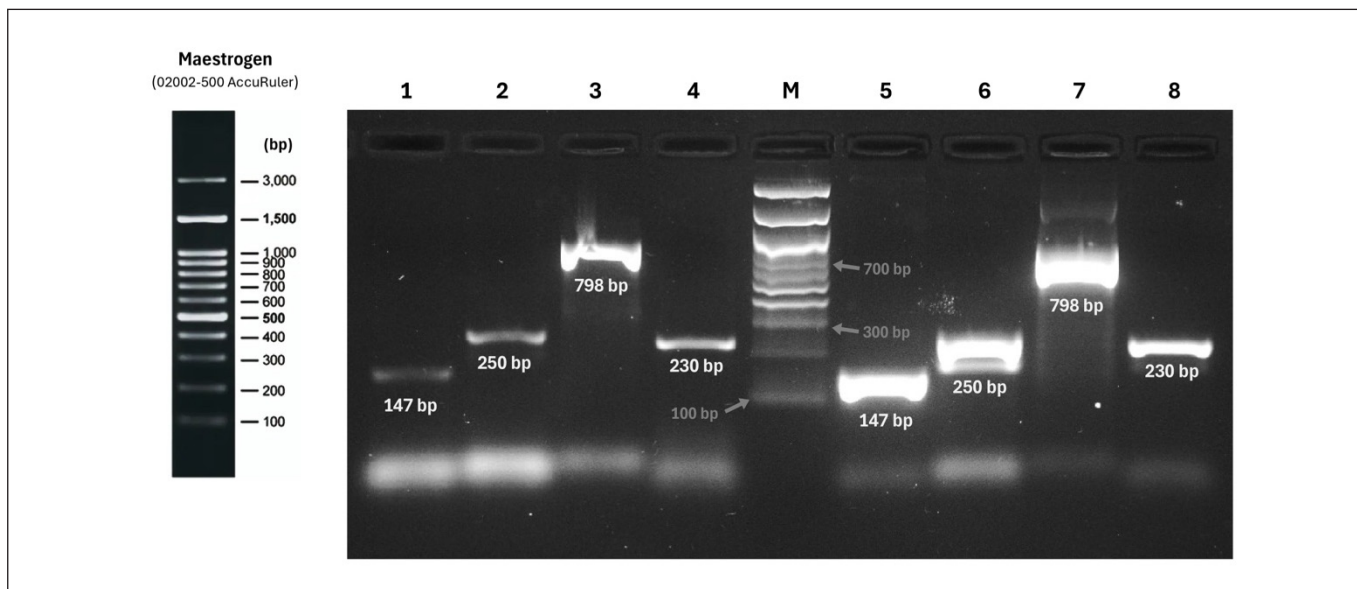


Figura 1. Productos de amplificación por reacción de polimerasa en cadena (RPC) de los genes de resistencia antimicrobiana detectados en muestras de aguas residuales. Carriles 1-4: muestras de aguas servidas; carriles 5-8: controles positivos; carril M: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 1 y 5: *bla_{VIM}*; carriles 2 y 6: *bla_{NDM}*; carriles 3 y 7: *bla_{KPC}*; carriles 4 y 8: *mcr-1*.

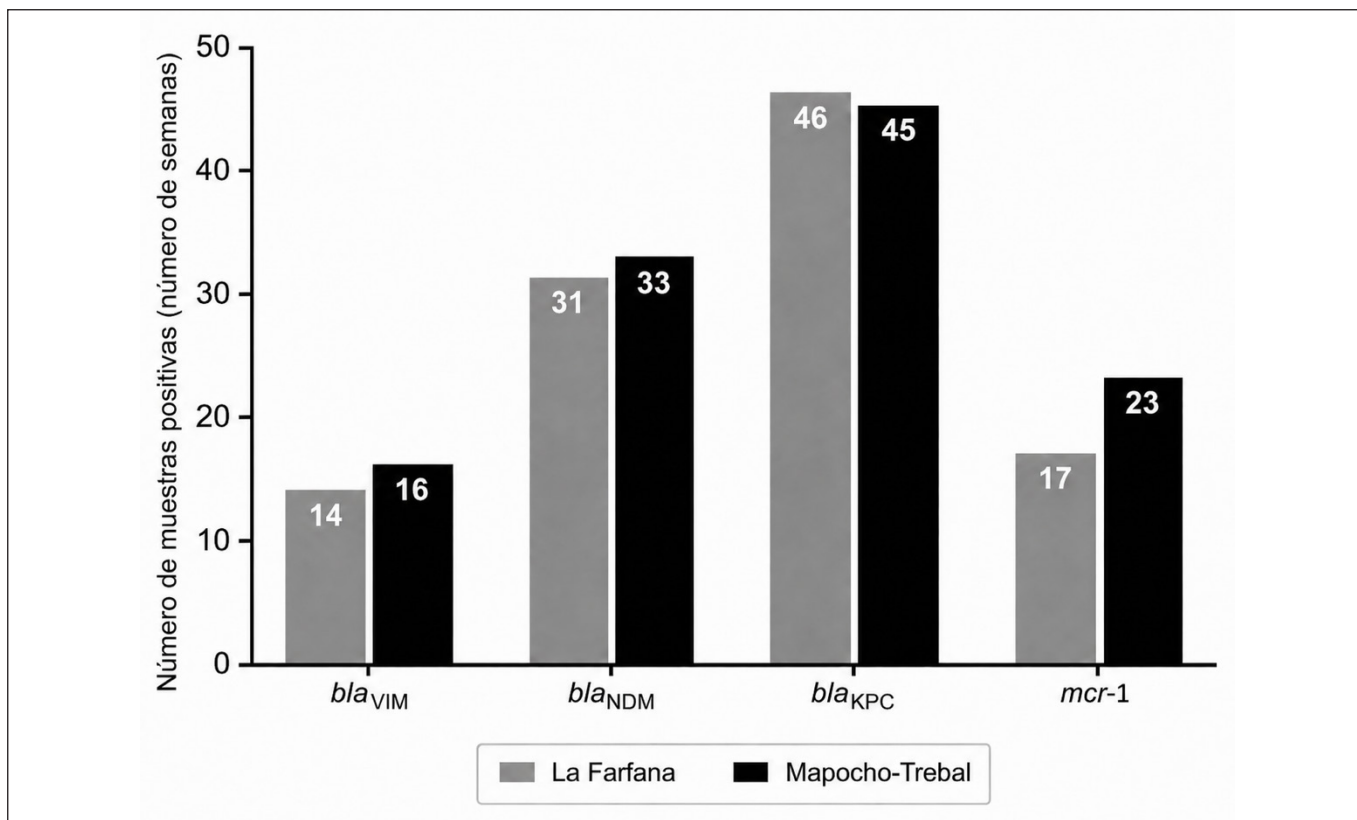


Figura 2. Frecuencia de detección de los genes *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* y *mcr-1* en muestras de aguas residuales de las plantas de tratamiento Mapocho-Trebal y La Farfana. Los valores corresponden al porcentaje de semanas con detección positiva respecto del total de semanas muestreadas en cada planta.

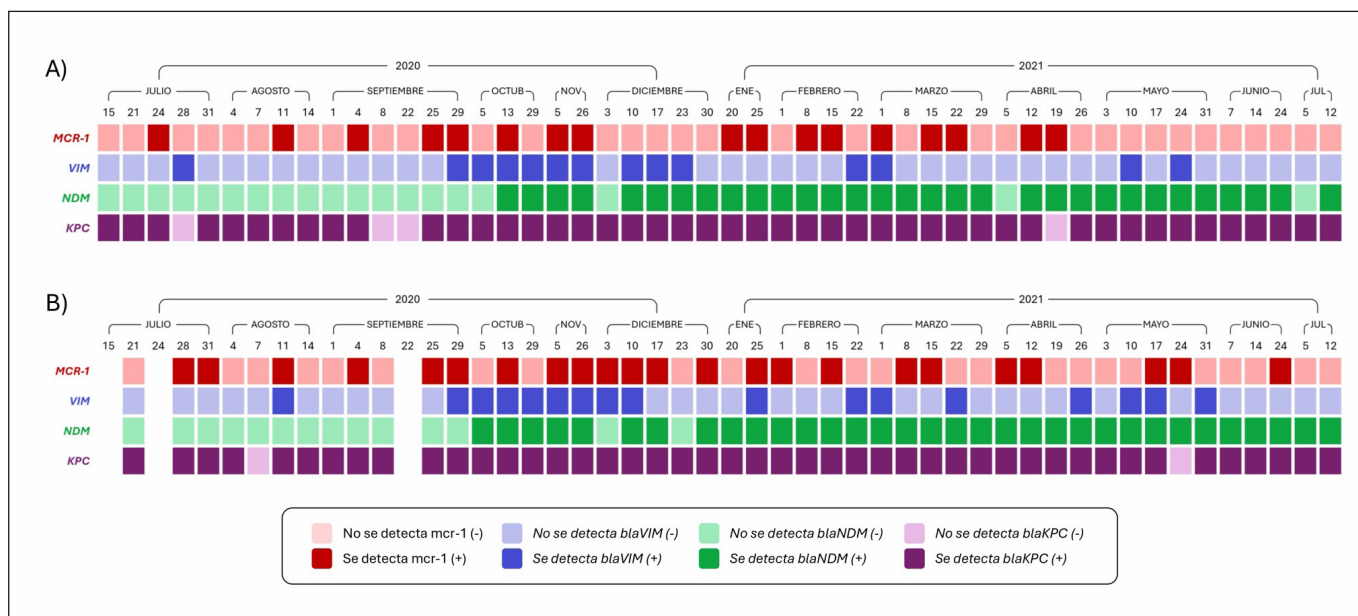


Figura 3. Distribución temporal semanal de la detección de genes de resistencia antimicrobiana en aguas residuales de las plantas La Farfana (A) y Mapocho-Trebal (B) entre julio de 2020 y julio de 2021. Se muestra la presencia de *bla_KPC*, *bla_NDM*, *bla_VIM* y *mcr-1* a lo largo del período de estudio. Las barras representan el número de semanas con detección positiva para cada gen en relación con el total del período de muestreo.

dientes, lo que confirmó la especificidad de los productos de RPC para *bla_KPC*, *bla_VIM*, *bla_NDM* y *mcr-1*. Todas las secuencias fueron depositadas en GenBank bajo los siguientes números de acceso: *bla_KPC* (PV871614, PV871615 y PV871616), *bla_VIM* (PV883387, PV883388 y PV883389), *bla_NDM* (PV940331, PV940332 y PV940333) y *mcr-1* (PV833297, PV833298 y PV833299).

Discusión

El principal hallazgo de este estudio fue la detección recurrente de genes críticos de resistencia antimicrobiana en aguas residuales urbanas de Santiago de Chile, particularmente genes asociados a resistencia a carbapenémicos, como *bla_KPC*, *bla_NDM* y *bla_VIM*. Desde una perspectiva clínica y epidemiológica, estos resultados son relevantes porque las carbapenemasas constituyen uno de los mecanismos de resistencia de mayor impacto en bacilos gramnegativos multirresistentes, limitando severamente las alternativas terapéuticas disponibles. En Chile, KPC ha sido identificada como la carbapenemasa predominante en aislados clínicos de Enterobacterales desde su primera descripción en 2012, consolidándose como uno de los principales mecanismos de resistencia a carbapenémicos a nivel hospitalario^{9,10}. En concordancia con este escenario, *bla_KPC* fue el gen detectado con mayor frecuencia en ambas plantas de tratamiento, lo que constituye una señal ambiental relevante de presencia recurrente de este determinante genético en aguas residuales urbanas.

La detección de *bla_NDM* y *bla_VIM* también resulta relevante, dado que estas metalo-β-lactamasas se asocian a fenotipos de multirresistencia y a una creciente preocupación epidemiológica. Aunque su frecuencia clínica en Chile ha sido históricamente menor que la de KPC, reportes recientes han descrito un aumento progresivo de NDM y VIM en aislados hospitalarios durante la última década¹⁰. En este estudio, la prueba de tendencia de Cochran-Armitage mostró un incremento temporal significativo únicamente para *bla_NDM* en ambas plantas de tratamiento, lo que sugiere una mayor frecuencia de detección hacia el final del período analizado. Este hallazgo es concordante con lo descrito por Allel y cols., quienes reportaron en un hospital terciario de Santiago un aumento significativo de Enterobacterales productores de carbapenemasas después del inicio de la pandemia, con una expansión particularmente marcada de aislados portadores de *bla_NDM*¹⁴. Asimismo, Acuña y cols., en un análisis multicéntrico de 59 UCIs chilenas entre 2015 y 2024, mostraron que la incidencia de bacterias multirresistentes continúa siendo elevada en nuestro país y se asocia al uso de carbapenémicos y quinolonas²³. No obstante, dado que el presente estudio no incluyó cuantificación, aislamiento bacteriano ni correlación directa con datos clínicos territoriales, la tendencia observada para *bla_NDM* debe interpretarse como una señal ambiental compatible con la epidemiología clínica reciente, pero no como evidencia de asociación causal directa.

La detección del gen *mcr-1*, asociado a resistencia a colistina, representa otro hallazgo de interés sanitario. Colistina continúa siendo considerada una alternativa terapéutica de última línea para

infecciones causadas por bacterias multirresistentes, particularmente cuando existe resistencia concomitante a carbapenémicos¹¹. En este estudio, *mcr-1* fue detectado de manera recurrente en ambas plantas, alcanzando su mayor frecuencia en Mapocho-Trebal. Si bien estos resultados no permiten inferir abundancia relativa ni identificar los hospederos bacterianos del gen, su presencia en aguas residuales urbanas constituye una señal de alerta desde la perspectiva de salud pública, debido al potencial impacto de la resistencia a colistina sobre la efectividad futura de terapias de rescate¹².

Desde el punto de vista espacial, las frecuencias de detección fueron numéricamente mayores en Mapocho-Trebal que en La Farfana para todos los genes evaluados. Sin embargo, la comparación mediante prueba exacta de Fisher no mostró diferencias estadísticamente significativas entre plantas. Por lo tanto, las diferencias porcentuales observadas deben interpretarse como variaciones descriptivas y no como diferencias estadísticamente demostradas entre ambas áreas de cobertura. Este resultado sugiere que, durante el período estudiado, ambas plantas reflejaron una presencia comparable de genes críticos de resistencia antimicrobiana en las zonas urbanas evaluadas. Aun así, no es posible descartar qué factores demográficos, urbanísticos, sanitarios o asociados al uso diferencial de antimicrobianos en los centros de salud que tributan a las plantas puedan influir en la distribución ambiental de estos determinantes, como ha sido sugerido previamente para ambientes urbanos²⁴⁻²⁶.

Los hallazgos de este estudio se insertan en un contexto internacional en el que las aguas residuales han sido progresivamente reconocidas como una matriz útil para complementar la vigilancia de la resistencia antimicrobiana. Estudios realizados en aguas residuales municipales, hospitalarias y agropecuarias han reportado la presencia de genes de carbapenemasas, *mcr-1* y otros determinantes de resistencia crítica en diversos escenarios ambientales²⁷⁻³². En particular, se ha descrito la detección de carbapenemasas clínicamente relevantes en bacterias gramnegativas recuperadas desde aguas residuales en Finlandia²⁸, así como variantes de *bla*_{NDM} en aguas residuales hospitalarias en China²⁹. También se ha reportado la presencia de genes de alto riesgo, como *bla*_{NDM} y *mcr-1*, en residuos de origen animal³⁰, y genes de resistencia emergentes, tanto en aguas residuales municipales como hospitalarias^{31,32}. En conjunto, estos antecedentes respaldan que las aguas residuales pueden integrar señales provenientes de la comunidad, hospitales, actividades productivas y otros reservorios ambientales, lo que refuerza su utilidad bajo un enfoque One Health.

Las detecciones fueron recurrentes durante gran parte del período analizado, observándose con menor frecuencia al inicio y hacia el final del muestreo. Este intervalo se superpone con un período de alta presión asistencial asociada a COVID-19 en Chile^{33,34}, durante el cual diversos estudios documentaron un aumento en el uso empírico de antimicrobianos para el manejo de infecciones bacterianas secundarias^{13,14,35,36}. Este contexto podría haber favorecido la selección y diseminación de bacterias resistentes o de sus determinantes genéticos. Sin embargo, esta

interpretación debe considerarse con cautela, ya que el presente estudio no evaluó consumo de antimicrobianos, carga hospitalaria específica por área de cobertura ni correlación directa con reportes clínicos de resistencia antimicrobiana. Por ello, la coincidencia temporal observada plantea una hipótesis epidemiológica que deberá ser evaluada en estudios posteriores.

Entre las fortalezas del estudio destaca el análisis semanal de muestras provenientes de dos plantas de tratamiento que cubren una proporción importante de la población urbana de Santiago, lo que permite una aproximación inicial a la detección comunitaria de genes de resistencia antimicrobiana de alta relevancia clínica. Asimismo, aunque la validación de partidores no constituye el eje clínico principal del trabajo, representa una fortaleza metodológica necesaria para sustentar la interpretación de los resultados. La complejidad de las aguas residuales, caracterizada por alta diversidad de ADN ambiental y presencia de compuestos inhibitorios, puede afectar la especificidad de la amplificación^{37,38}. Por ello, la validación experimental de los partidores en la matriz de estudio fue fundamental, especialmente considerando que algunos diseños con adecuada cobertura alélica *in silico* no generaron amplificaciones específicas, concordando con lo descrito por Gorecki y cols.³⁹.

Las principales limitaciones del estudio derivan de su enfoque cualitativo. La RPC convencional permite determinar presencia o ausencia de genes de resistencia, pero no cuantificar su abundancia relativa. En consecuencia, no es posible estimar carga genética, comparar abundancias entre plantas ni evaluar cambios cuantitativos a lo largo del tiempo. Además, la ausencia de cultivos bacterianos y de caracterización de especies portadoras impide asociar los genes detectados con microorganismos específicos, clones circulantes o perfiles fenotípicos de resistencia. También debe considerarse el potencial sesgo asociado al muestreo puntual semanal, ya que este diseño puede no capturar completamente las variaciones diarias o intradiarias propias de los sistemas de aguas residuales. Finalmente, no se evaluó la correlación entre los genes detectados y reportes clínicos de resistencia antimicrobiana a nivel geográfico o regional, aspecto que sería clave para estimar con mayor precisión la utilidad de esta estrategia como herramienta de vigilancia territorial.

En conjunto, los resultados de este estudio refuerzan el valor de las aguas residuales como matriz complementaria para la vigilancia comunitaria de genes críticos de resistencia antimicrobiana en Chile. La detección recurrente de *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *mcr-1* refleja la interconexión entre el ámbito comunitario, hospitalario y ambiental, y subraya la necesidad de integrar enfoques One Health en las estrategias nacionales de vigilancia de la resistencia antimicrobiana. Futuros estudios deberían incorporar metodologías cuantitativas, como qPCR o metagenómica, estrategias de muestreo compuesto, aislamiento bacteriano y análisis integrados con datos clínicos, consumo de antimicrobianos e información territorial. Esta integración permitiría fortalecer la interpretación epidemiológica de la vigilancia ambiental y explorar su potencial aplicación como sistema complementario de alerta temprana en salud pública.

Conclusión

Este estudio demuestra que las aguas residuales urbanas constituyen una matriz útil para complementar la vigilancia de la RAM en centros urbanos como Santiago de Chile. La detección recurrente de *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* y *mcr-1* en las plantas La Farfana y Mapocho-Trebal evidencia la presencia de determinantes genéticos de alta relevancia clínica asociados a resistencia a carbapenémicos y colistina en el sistema de aguas residuales urbano. Si bien estos resultados no permiten estimar carga génica, identificar especies bacterianas portadoras ni establecer una correlación directa con la epidemiología clínica territorial, aportan

una señal ambiental relevante para orientar futuras estrategias de vigilancia integrada. La ausencia de diferencias significativas entre plantas y la tendencia temporal creciente observada para *bla_{NDM}* refuerzan el valor de esta aproximación como complemento de la vigilancia clínica tradicional y apoyan su desarrollo futuro bajo una perspectiva One Health.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Aguas Andinas, empresa sanitaria de la Región Metropolitana, por facilitar las muestras de aguas residuales utilizadas en este estudio y por su apoyo logístico durante el desarrollo del proyecto.

Material suplementario

Tabla suplementaria 1: Partidores previamente descritos para la detección de los genes *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *mcr-1* y *bla_{KPC}* en matrices de aguas residuales.

Gen	Nombre del cebador	Dirección del cebador	Secuencia (5'→3')
<i>blaVIM</i>	<i>blaVIM_D1_F</i>	Forward	TGTCCGTGATGGTGATGAGT
	<i>blaVIM_D2_R</i>	Reverse	CTTYTCAATCTCCGCGAGAAG
	<i>blaVIM_D3_F</i>	Forward	GTTTGTYGCATATCGCAAC
	<i>blaVIM_D4_R</i>	Reverse	AATGCGCAGCACCAGGATAG
<i>blaNDM</i>	<i>blaNDM_D1_F</i>	Forward	ATGGAATTGCCAATATTATGC
	<i>blaNDM_D4_R</i>	Reverse	CGCCATCCCTGACGATCAAA
	<i>blaNDM_D3_F</i>	Forward	CTGAGCACCGCATTAGCCG
<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1_D1_F</i>	Forward	TGTTCTTGTCGCGAGTGTTG
	<i>mcr-1_D2_R</i>	Reverse	CGCGCCCATGATTAATAGCA
	<i>mcr-1_D3_F</i>	Forward	CGGTCAGTCCGTTTGTTT
	<i>mcr-1_D4_R</i>	Reverse	CTTGGTCGGTCTGTAGGG
	<i>mcr-1_D5_F</i>	Forward	ACGCCATCTGCAACACCAA
	<i>mcr-1_D6_R</i>	Reverse	GCCAACGAGCATACCGACAT
	<i>mcr-1_D7_F</i>	Forward	GTCGGTATGCTCGTTGGCTTAG
	<i>mcr-1_D8_R</i>	Reverse	CATAGGCATTGCTGTGCGTCTG
	<i>mcr-1_D9_R</i>	Reverse	ATCATCGGTGGCAAGCAAGG
<i>blaKPC</i>	<i>blaKPC_D1_F</i>	Forward	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG
	<i>blaKPC_D2_R</i>	Reverse	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG

Se indican el gen blanco, el nombre asignado a cada cebador y la secuencia nucleotídica (5'→3').

Tabla suplementaria 2. Combinaciones de partidores evaluadas para la amplificación de genes de resistencia antimicrobiana mediante RPC* convencional.

Gen	Cebadores		Tamaño del amplicón (bp)	Temperatura de alineamiento (°C)	Tiempo de elongación reacción de RPC* (seg)
	Forward	Reverse			
blaVIM	D3_F	D4_R	386	56	30
	D1_F	D2_R	85	56	30
	D3_F	D2_R	147	56	30
	D1_F	D4_R	324	56	30
blaNDM	D1_F	D4_R	250	60	20
	D3_F	D4_R	214	60	20
mcr-1	D1_F	D2_R	217	56	30
	D3_F	D4_R	309	58	30
	D5_F	D6_R	59	60	30
	D7_F	D8_R	271	60	30
	D1_F	D4_R	296	58	30
	D1_F	D6_R	1069	58	60
	D1_F	D9_R	1273	58	70
	D3_F	D2_R	230	58	20
blaKPC	D1_F	D2_R	798	55	45

Se detallan los pares de partidores utilizados para cada gen, el tamaño esperado del producto de amplificación, la temperatura de alineamiento y el tiempo de extensión empleados en cada reacción. * RPC: reacción de polimerasa en cadena

Referencias bibliográficas

- Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022; 399(10325): 629-55. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- World Health Organization. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/e5cc3da6-f46e-4355-a352-8d16820e0dd1/content>
- Aarestrup FM, Woolhouse MEJ. Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance. *Science* 2020; 367(6478): 630-2. doi: 10.1126/science.aba3432.
- Huijbers PMC, Larsson DGJ, Flach CF. Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environ Pollut* 2020; 261:114200. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114200.
- Papajová I, Šmigová J, Gregová G, Šoltys J, Venglovský J, Papaj J, et al. Effect of wastewater treatment on bacterial community, antibiotic-resistant bacteria and endoparasites. *Int J Environ Res Public Health* 2022; 19(5): 2750. doi: 10.3390/ijerph19052750.
- Li S, Ondon BS, Ho SH, Jiang J, Li F. Antibiotic resistant bacteria and genes in wastewater treatment plants: from occurrence to treatment strategies. *Sci Total Environ* 2022; 838(Pt 4): 156544. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156544.
- Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis* 2017; 215(Suppl 1): S28-S36. doi: 10.1093/infdis/jiw282.
- van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence* 2017; 8(4): 460-9. doi: 10.1080/21505594.2016.1222343.
- Vera-Leiva A, Barria-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, Domínguez M, et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, principal carbapenemase en enterobacterias. *Rev Chilena Infectol*. 2017; 34(5): 476-84. doi: 10.4067/S0716-10182017000500476.
- Velo M, Arros P, Acosta J, Rojas R, Berríos-Pastén C, Varas M, et al. Antimicrobial resistance, pathogenic potential, and genomic features of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in Chile: High-risk ST25 clones and novel mobile elements. *Microbiol Spectr* 2023; 11(5): e00399-23. doi: 10.1128/spectrum.00399-23.
- Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1179. doi: 10.1038/s41467-018-03205-z.
- Lekunberri I, Balcázar JL, Borrego CM. Detection and quantification of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in wastewater. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 50(6): 734-6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.08.018.
- Álvarez-Moreno C, Valderrama-Beltrán S, Rodríguez-Morales AJ. Implications of antibiotic use during the COVID-19 pandemic: the example of associated antimicrobial resistance in Latin America. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10(3): 328. doi: 10.3390/antibiotics10030328.
- Alle K, Peters A, Conejeros J, Martínez JRW, Spencer-Sandino M, Riquelme-Neira R, et al. Antibiotic consumption during the coronavirus disease 2019 pandemic and emergence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* lineages among inpatients in a

- Chilean hospital: A time-series study and phylogenomic analysis. Clin Infect Dis. 2023; 77(Suppl 1): S20-S28. doi: 10.1093/cid/ciad151.
15. Guerrero-Latorre L, Ballesteros I, Villacrés-Granda I, Granda MG, Freire-Paspuel B, Ríos-Touma B. SARS-CoV-2 in river water: implications in low sanitation countries. Sci Total Environ 2020; 743: 140832. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140832.
16. Anceno AJ, Katayama H, Houpt ER, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Chuluun B, Shipin OV. IMS-free DNA extraction for the PCR-based quantification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in surface and waste water. Int J Environ Health Res 2007; 17(4): 297-310. doi: 10.1080/09603120701372573.
17. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012; 13: 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
18. Schriewer A, Wehlmann A, Wuertz S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. J Microbiol Methods 2011; 85(1): 16-21. doi: 10.1016/j.mimet.2010.12.027.
19. Sidhu JPS, Hodgson L, Ahmed W, Chong MN, Toze S. Prevalence of human pathogens and indicators in stormwater runoff in Brisbane, Australia. Water Res 2012; 46(20): 6652-60. doi: 10.1016/j.watres.2012.03.012.
20. Harwood VJ, Staley C, Badgley BD, Borges K, Korajkic A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. FEMS Microbiol Rev 2014; 38(1): 1-40. doi: 10.1111/1574-6976.12031.
21. Sievers F, Higgins DG. Clustal omega. Curr Protoc Bioinformatics. 2014; 48: 3.13.1-3.13.16. doi: 10.1002/0471250953.bi0313s48.
22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215(3): 403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
23. Acuña MP, Ross P, Carcamo G, Arancibia JM, Rosales R, Ceron I, et al. Trends and drivers of multidrug-resistant bacteria incidence in 59 Chilean intensive care units, 2015-2024: a Bayesian hierarchical analysis. Lancet Reg Health Am. 2026; 58: 101467. doi: 10.1016/j.lana.2026.101467.
24. Hendriksen RS, Munk P, Njage P, van Bunnik B, McNally L, Lukjancenko O, et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. Nat Commun. 2019;10(1):1124. doi: 10.1038/s41467-019-08853-3.
25. Su JQ, An XL, Li B, Chen QL, Gillings MR, Chen H, et al. Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistance in China. Microbiome 2017; 5: 84. doi: 10.1186/s40168-017-0298-y.
26. Bijlsma L, Xu L, Gracia-Marín E, Pitarch E, Serrano R, Kasprzyk-Hordern B. Understanding associations between antimicrobial agents usage and antimicrobial resistance genes prevalence at the community level using wastewater-based epidemiology: a Spanish pilot study. Sci Total Environ 2024; 926: 171996. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.171996.
27. Schages L, Wichern F, Kalscheuer R, Bockmühl D. Winter is coming - impact of temperature on the variation of beta-lactamase and *mcr* genes in a wastewater treatment plant. Sci Total Environ 2020; 712: 136499. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136499.
28. Tiwari A, Paakkanen J, Österblad M, Kirveskari J, Hendriksen RS, Heikinheimo A. Wastewater surveillance detected carbapenemase enzymes in clinically relevant Gram-negative bacteria in Helsinki, Finland; 2011-2012. Front Microbiol 2022; 13: 887888. doi: 10.3389/fmicb.2022.887888.
29. Wang T, Zhou Y, Zou C, Zhu Z, Zhu J, Lv J, et al. Identification of a novel *bla*NDM variant, *bla*NDM-33, in an *Escherichia coli* isolate from hospital wastewater in China. mSphere. 2021; 6(5): e00776-21. doi: 10.1128/mSphere.00776-21.
30. Yang F, Gu Y, Zhou J, Zhang K. Swine waste: a reservoir of high-risk *bla*NDM and *mcr-I*. Sci Total Environ 2019; 683: 308-16. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.251.
31. Pires J, Santos R, Monteiro S. Antibiotic resistance genes in bacteriophages from wastewater treatment plant and hospital wastewaters. Sci Total Environ 2023; 892: 164708. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164708.
32. Hutinel M, Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance genes of emerging concern in municipal and hospital wastewater from a major Swedish city. Sci Total Environ 2022; 812: 151433. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151433.
33. Ayala A, Villalobos Dintrans P, Elorrieta F, Maddaleno M, Vargas C, Iturriaga A. COVID-19 en Chile: análisis de su impacto por olas y regiones. Rev Méd Chile 2023; 151(3): 269-79. doi: 10.4067/S0034-98872023000300269.
34. Vásquez-Gómez JA, Saracini C. Insights from Chilean NCDs hospitalization data during COVID-19. Medicina (Kaunas) 2024; 60(5): 770. doi: 10.3390/medicina60050770.
35. Langford BJ, So M, Simeonova M, Leung V, Lo J, Kan T, et al. Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. Lancet Microbe 2023; 4(3): e179-e191. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00355-X.
36. Yang X, Li X, Qiu S, Liu C, Chen S, Xia H, et al. Global antimicrobial resistance and antibiotic use in COVID-19 patients within health facilities: A systematic review and meta-analysis of aggregated participant data. J Infect 2024; 89(1): 106183. doi: 10.1016/j.jinf.2024.106183.
37. Zafeiriadou A, Nano K, Thomaidis NS, Markou A. Evaluation of PCR-enhancing approaches to reduce inhibition in wastewater samples and enhance viral load measurements. Sci Total Environ 2024; 955: 176768. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.176768.
38. Zhuang M, Achmon Y, Cao Y, Liang X, Chen L, Wang H, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. Environ Pollut 2021; 285: 117402. doi: 10.1016/j.envpol.2021.117402.
39. Gorecki A, Decewicz P, Dziurzynski M, Janeczko A, Drewniak L, Dziewit L. Literature-based, manually-curated database of PCR primers for the detection of antibiotic resistance genes in various environments. Water Res 2019; 161: 211-21. doi: 10.1016/j.watres.2019.06.009.