
Higiene y Sanidad Ambiental, 12 (4): 913-917 (2012)

Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de diversas fuentes de agua del Chaco (Argentina)

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM DIFFERENT WATER SOURCES IN CHACO (ARGENTINA)

Liliana Silvina LÖSCH, Luis Antonio MERINO

Área de Bacteriología- Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste. Av. Las Heras 727. CP 3500. Resistencia. Chaco. Argentina. E-mail: silvinalosch@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue estudiar el perfil de sensibilidad/resistencia frente a compuestos beta lactámicos y quinolonas de aislados de *Escherichia coli* procedentes de fuentes de agua de la provincia del Chaco, Argentina. Las muestras de agua fueron tomadas de fuentes superficiales, profundas y de red de la Provincia del Chaco. Como técnica de enriquecimiento inicial se utilizó la prueba de presencia/ausencia y la susceptibilidad antibiótica se estudió por el método de difusión en placas. Sobre 525 muestras de agua estudiadas, se obtuvieron 114 aislamientos de *Escherichia coli*, de las cuales el 31,5% fue resistente a los compuestos betalactámicos y el 1,8%, a las quinolonas. Los hallazgos del presente trabajo sugieren que las bacterias de los ambientes acuáticos de la Provincia del Chaco pueden contribuir al problema global de la diseminación de la resistencia antibiótica.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana, *Escherichia coli*, ambientes acuáticos, betalactámicos, quinolonas.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the profile of sensitivity/resistance to quinolones and beta-lactam compounds in *Escherichia coli* isolated from water sources in the province of Chaco, Argentina. Water samples were taken from surface and deep sources, and from drinking water network of the Province of Chaco. The presence/absence test was used as initial enrichment technique and the antibiotic susceptibilities were studied by the disk diffusion method. A total of 525 samples were studied and 114 isolates of *Escherichia coli* were obtained, the 31,5% of these were resistant to beta-lactam compounds and the 1,8% were resistant to quinolones. The findings of this work suggest that the bacteria present in the aquatic environments of the province of Chaco may contribute to the global concern about the antimicrobial resistance spreading.

Keywords: antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, aquatic environments, beta-lactams, quinolones.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales problemas de salud pública por la aparición de una creciente población de microorganismos resistentes como así también nuevos mecanismos de resistencia [1]. El mayor incremento de bacterias resistentes se da en aquellos países donde

existe una excesiva prescripción por parte del personal de la salud o un uso indiscriminado por parte de población en general [2, 3]. Asimismo, el uso de estos compuestos en medicina veterinaria con fines terapéuticos o como promotores de tratamiento contribuye a agravar el problema [4].

Además de las consecuencias para la salud humana, otro aspecto importante es la contaminación

de las aguas superficiales y profundas con microorganismos resistentes, genes codificadores de resistencia y residuos de los antimicrobianos o sus metabolitos [5, 6]. A diferencia de otros compuestos químicos, los antibióticos ejercen una acción directa sobre los microorganismos presentes en los diferentes compartimentos acuáticos pudiendo actuar como contaminantes persistentes [7, 8].

La gran mayoría de los trabajos de vigilancia de la resistencia bacteriana se realizan a partir de gérmenes aislados de muestras clínicas. Sin embargo, también se debe extender a bacterias recuperadas de muestras ambientales con el objeto de evaluar su papel como posible reservorio de genes codificadores de resistencia y su capacidad para transferirlos horizontalmente a microorganismos patógenos humanos [7, 9]. Es por ello que la vigilancia es fundamental como estrategia de contención de la resistencia antimicrobiana a fin de detectar cambios en los patrones de sensibilidad, implementar medidas de control del uso de antimicrobianos, prevenir la diseminación de cepas bacterianas (resistentes y multirresistentes) y evaluar el impacto de las intervenciones.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil de sensibilidad/resistencia frente a compuestos beta lactámicos y quinolonas de aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de fuentes de agua de la Provincia del Chaco (Argentina), debido a que la detección y enumeración de este organismo en forma conjunta con los coliformes totales y *Pseudomonas aeruginosa* se utiliza para evaluar la calidad microbiológica del agua destinada al consumo humano [10].

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de las muestras

Se estudiaron muestras de agua procedentes de fuentes superficiales, profundas y de red, según la siguiente distribución:

- *Sitios de obtención de agua superficiales*: Ríos Salado, Bermejito, Bermejo, Negro, Paraná, Paraguay, Teuco, Riacho Barranqueras, Arroyo Malá, Lagunas El Tigre, Argüello, Francia, Prosperidad y Colussi y Remanso Negro.

- *Sitios de obtención de agua subterráneas*: Perforaciones y pozos de Las Breñas, Paraje Puesta Negra, Pampa Cantón, Castelli, La Eduvigis, Interfluvio Teuco-Bermejo, Paraje Toroltay, Paraje Pozo del Toro, Quitilipi, Resistencia, General San Martín, Sáenz Peña, Corzuela, Fortín Lavalle, La Escondida, Machagai, Miraflores, Paraje Loro Blanco, Puerto Bastiani, La Leonesa, Basail, Hermoso Campo, Plaza, Charata, General Vedia, Villa Ángela, La tigre, Tres Isletas, Santa Sylvia, Pampa del Infierno.

- *Sitios de obtención de aguas de red* (se incluyen tanques domiciliarios y cisternas): Saenz Peña, La Leonesa, Resistencia, General San Martín, Villa Ángela, Resistencia, El Sauzal, El Sauzalito, Castelli,

Tartagal, Fortín Belgrano, Quitilipi, Machagai, Fortín Lavalle y Tres Pozos.

Obtención de las muestras de agua

Las muestras se recogieron en botellas estériles de 250 ml. Según el origen de la muestras, los procedimientos empleados fueron los siguientes [11]:

a) Agua de red: se abrió completamente el grifo y se dejó correr el agua durante 2 ó 3 minutos; posteriormente se flameó la boca del grifo antes de realizar la toma de muestra. Como agente neutralizante de desinfectantes se utilizó tiosulfato de sodio (0,1 ml al 10%).

b) Fuentes superficiales: las muestras se tomaron a una profundidad de 15-30 cm, en sentido contrario de la corriente y a 1 metro de la orilla.

c) En fuentes subterráneas se realizó el muestreo a la salida de las bombas usadas para su extracción o en su ausencia, se tomó directamente del pozo utilizando la botella esterilizada como lastre.

En todos los casos las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su llegada al laboratorio donde se realizó su procesamiento.

Cultivo e identificación bioquímica de *E. coli*

Como técnica de enriquecimiento inicial para *E. coli* se utilizó la prueba de presencia/ausencia, agregando 50 ml de la muestra a una botella estéril conteniendo igual volumen de caldo Mac Conkey al doble de concentración. Una vez inoculadas, las botellas se incubaron a $35\pm 0,5^\circ\text{C}$ y se inspeccionaron a las 24 y 48 horas. A partir de las botellas en las que se evidenció desarrollo bacteriano se sembró en placas de Agar Eosina Azul de Metileno, las que se incubaron a $35\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Los aislamientos fueron tipificados por pruebas bioquímicas clásicas [12].

Susceptibilidad antibiótica

Se estudió por el método de difusión en placas siguiendo los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [13]. Los antimicrobianos ensayados fueron ampicilina, ampicilina/sulbactama, cefalotina y ácido nalidíxico. En el caso de detectarse resistencia a ampicilina y/o cefalotina, los aislamientos se ensayaron frente a cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima. Los aislamientos resistentes al ácido nalidíxico se enfrentaron posteriormente a ciprofloxacina.

Estudio de mecanismos de resistencia antibiótica

1.- En las cepas de *E. coli* que evidenciaron sensibilidad disminuida o resistencia a cefalotina se realizó un cribado con placas conteniendo oxacilina [14]. Para ello se prepararon sendas placas de Mueller Hinton suplementadas con 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina (Sigma Inc. USA). Se prepararon las suspensiones bacterianas en la escala 0,5 de McFarland y se inocularon dos placas con cada una

de las diferentes concentraciones de oxacilina y una placa sin antibiótico para ser utilizada como control. Finalmente se colocaron discos de cefalotina en las tres placas. Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922. Se consideró como prueba positiva el aumento en la zona de inhibición de cefalotina desde la placa blanco hacia las placas con concentraciones crecientes de esta droga. Ante una prueba positiva se consideró una desrepresión parcial de la betalactamasa de tipo AMP-C.

2.- En las cepas de *E. coli* que fueron resistentes a ampicilina, ampicilina/sulbactama y cefalotina, se realizó la detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por el método de difusión con doble disco en placas de Müeller Hinton, según las recomendaciones de Famiglietti y col. [15].

3.- A fin de detectar la presencia de bombas de expulsión de tipo AcrAB, se suplementaron placas de Müeller-Hinton con un inhibidor de la bomba de eflujo (Phe-Arg- β -naphthylamide - Sigma) [16], se inocularon las suspensiones bacterianas sobre las placas con y sin inhibidor y se colocaron monodiscos de ácido nalidíxico y ciprofloxacina. Se compararon en paralelo las zonas de inhibición de ambas placas.

Como cepa control se utilizó *E. coli* ATCC 25922. Ante una diferencia de más de 5 mm entre ambas placas se consideró la presencia de una bomba de eflujo tipo AcrAB.

RESULTADOS

Sobre un total de 525 muestras estudiadas se recuperaron 114 aislamientos de *Escherichia coli*, 49 provenían de fuentes subterráneas, 44 de superficiales y 21 de red. De las 114 cepas estudiadas, 36 (31,5%) evidenciaron resistencia hacia compuestos betalactámicos y 2 (1,8%) hacia quinolonas.

En cuatro aislamientos (3,5%) se observó resistencia solamente a ampicilina, de las cuales dos provenían de fuentes subterráneas, 1 de red y la restante de fuente superficial.

Seis aislamientos de *Escherichia coli* (5,3%), fueron resistentes a ampicilina y cefalotina, 4 de ellas provenían de fuentes subterráneas y 2, de superficiales.

En dos aislamientos (1,8%) se observó resistencia combinada hacia ampicilina, ampicilina-sulbactama y cefalotina. Al realizar en estas dos cepas el ensayo para detectar la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ambas resultaron negativas.

Finalmente, en 24 aislamientos, (21%), se observó sensibilidad disminuida hacia cefalotina: 10 muestras procedían de fuentes subterráneas, 6 de red y 8 de fuentes superficiales.

En dos cepas (1,8%), una de fuente superficial y la otra subterránea, se observó resistencia hacia el ácido nalidíxico. Al enfrentar estas cepas a ciprofloxacina se comprobó que la de origen superficial

fue sensible mientras que el aislamiento de origen subterráneo también era resistente hacia esta quinolona, arrojando negativa la prueba de bomba de expulsión.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinó que el 67% de las cepas de *E. coli* estudiadas se corresponden con fenotipos silvestres, ya que no evidenciaron resistencia hacia ninguno de los antimicrobianos ensayados, mientras que el resto fueron resistente a uno, dos o tres antibióticos.

E. coli posee la enzima AMP-C de forma constitutiva no inducible y habitualmente con un mínimo de expresión, que no confiere resistencia hacia los compuestos betalactámicos [17], pero ésta puede manifestarse ante la desrepresión de la enzima. La adquisición de betalactamasas plasmídicas de espectro ampliado (BLEA) como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, son las responsables de la resistencia hacia ampicilina y amoxicilina, pero las cepas portadoras de estas enzimas mantienen su sensibilidad hacia las cefalosporinas, carbapenemes y monobactamas. El aumento de la producción de BLEA en la célula bacteriana determina la resistencia hacia las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación excepto hacia cefoxitina [15, 18].

En cuatro de los aislamientos se observó resistencia solamente hacia ampicilina, mientras que en seis hacia ampicilina y cefalotina. Estos fenotipos de resistencia están relacionados con la presencia de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) sin estar afectada la sensibilidad frente a cefoxitina. La sensibilidad/resistencia de las cepas hacia este último compuesto permite diferenciar las cepas que poseen BLEA de las hiperproductoras de AMP-C que son resistentes a este antibiótico.

En la Argentina es frecuente el aislamiento de cepas de *E. coli* de origen hospitalario que producen β -lactamasas de espectro ampliado, mayoritariamente TEM-1, y dependiendo del nivel de producción de esta enzima se observará diferentes fenotipos de resistencia [15].

En dos cepas se observó la resistencia combinada a ampicilina, ampicilina-sulbactama y cefalotina, manteniéndose la sensibilidad a la cefoxitina y a las cefalosporinas de 3ª generación. Al realizar el *screening* de BLEE se obtuvo resultado negativo, lo que indica una hiperproducción de BLEA.

Por otro lado, en 24 cepas de *E. coli* se determinó sensibilidad disminuida ó resistencia hacia cefalotina sin estar afectados ninguno de los otros betalactámicos. Este particular fenotipo es consistente con una desrepresión parcial de la AMP-C constitutiva de *E. coli* [18].

Por otra parte, en este trabajo de detectaron dos cepas de *Escherichia coli* resistentes al ácido nalidíxico y presentando una de ellas, resistencia también frente a ciprofloxacina. El mecanismo de

resistencia implicado podría corresponder a una mutación en el gen que codifica para la ADN girasa, lo que determina la resistencia frente al ácido nalidíxico sin afectar a la ciprofloxacina; sin embargo, como resultado de una segunda mutación en dicho gen, se ve afectada la sensibilidad frente a las dos quinolonas. En estas cepas también se estudió la presencia de bombas de eflujo observándose que la resistencia no se debió a la presencia del sistema de expulsión activa tipo AcrA [19, 20].

En el presente trabajo se determinó que 4 cepas (9 %) de *E. coli* recuperadas de fuentes superficiales eran portadoras de una BLEA con diferentes fenotipos de expresión. Este porcentaje de aislamientos es superior al determinado por Hamelin y col. del 6,1% [21].

Al comparar los resultados del presente trabajo con los obtenidos por Lin y col. [22, 23] se evidencia un porcentaje similar de resistencia hacia el ácido nalidíxico, pero la resistencia hacia los compuestos betalactámicos fueron inferiores a los valores encontrados por esos autores. Coincidentemente, tampoco se detectaron cepas resistentes a ciprofloxacina en las fuentes superficiales.

Watkinson y col. [24] encontraron que los porcentajes de resistencia de cepas de *E. coli*, recuperadas de los ríos Brisbane y Bremer de Australia, fueron de un 15% frente a ampicilina, 14% para cefalotina y 5% frente al ácido nalidíxico. En las aguas superficiales del Chaco hallamos un mayor porcentaje de resistencia hacia cefalotina y menor hacia el ácido nalidíxico y la ampicilina.

En el presente trabajo el porcentaje de resistencia a ampicilina y cefalotina en aguas fuentes superficiales fue del orden de 2,3% y 18%. Estos valores son inferiores a los encontrados por Baldini y Cabezali [25] quienes hallaron valores de 8-9% y no aislaron cepas resistentes a ciprofloxacina, y a los encontrados por Junco Diaz y cols. [26] y por Sayah y cols. [27]

Además, los porcentajes de resistencia de cepas de origen subterráneo presentados por McKeon y col. [28] hacia cefalotina, ampicilina y ácido nalidíxico son notablemente superiores a los obtenidos de las mismas fuentes y para los mismos compuestos en la Provincia del Chaco.

Córdoba y col. [29] investigaron la presencia de coliformes injuriados en la red de agua de la ciudad de La Plata con resistencia hacia ampicilina-sulbactama y nitrofurantoína, no encontrando *E. coli*. En el presente trabajo se aislaron cepas de *E. coli* tanto en la red, como en tanques y cisternas, las cuales fueron resistentes a ampicilina (5%), ampicilina/sulbactama y cefalotina (5%), en porcentajes bajos, pero con sensibilidad disminuida a cefalotina (28%). Considerando este último hallazgo resulta evidente la necesidad de promover el adecuado tratamiento del agua destinada a consumo humano, la integridad de los sistemas de distribución y la limpieza periódica de tanques y cisternas; dado que la presencia de este indicador determina la no aptitud

del agua para el consumo humano por la amenaza para la salud de las personas, ya sea por ingestión o contacto directo. [30, 31].

En el presente trabajo se encontraron porcentajes de resistencia frente a compuestos β -lactámicos y a quinolonas en aislamientos de *E. coli* superiores a los esperables en cepas de origen ambiental, por lo que se reafirma la necesidad de extender la red de vigilancia de la resistencia antimicrobiana a contaminantes del agua y el suelo, dado que los antimicrobianos nos enfrentan a efectos irreversibles en el medioambiente, los cuales se ejercen incluso a muy bajas concentraciones, característica que no lo presentan otros compuestos químicos.

Por su parte, la presencia de indicadores de contaminación en aguas de red y en los sistemas de almacenamiento determina la necesidad de implementar medidas para el control del correcto proceso de desinfección del agua y del adecuado almacenamiento, por el riesgo que implica para la salud de aquellos que la consumen.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Fundación "Alberto J Roemmers" por el apoyo económico brindado y al personal del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" por la provisión de las cepas utilizadas como control.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Academy of Microbiology. Antimicrobial Resistance: An ecological perspective. Puerto Rico; American Society for Microbiology. 1999.
2. Cohen ML. Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance. Ciba Found Symp. 1997; 207: 223-31.
3. Okeke IN, Lamikanra A, Edelman R. Socioeconomic and behavioural factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. Emerg Infect Dis 1999; 5 (1): 18-27.
4. Davies JE. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. Ciba Found Symp. 1997; 207:15-27.
5. Alonso A, Sánchez P, Martínez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Minireview Environ Microbiol 2001; 3 (1): 1-9.
6. Seveno NA, Kallifidas D, Smalla K, van Elsas JD, Collard JM, Karagouni AD, et al. Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. Rev Med Microbiol 2002; 13 (1): 15-27.
7. Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol 2006; 8 (7): 1137-1144.

8. Constanzo SD, Murby J, Bates J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Poll Bull* 2005; 51: 218-223.
9. Jorgensen SE, Halling-Sorensen B. Drugs in the environment. *Chemosphere* 2000; 40: 691-699.
10. Ministerio de Salud y Acción Social. Código Alimentario Argentino. Capítulo XII: Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. Artículo 982, 1994.
11. Organización Mundial de la Salud. Guías para la Calidad del Agua Potable. Volumen I: Recomendaciones. Ginebra. 1995.
12. American Public Health Association. American Water Works Association. Water Pollution Control Federation. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ediciones Díaz De Santos S.A. 1992.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth international supplement. M100-S15. Wayne (PA); 2005.
14. IV Curso Regional para el Diagnóstico de la Resistencia a los Antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Octubre de 2005. Resistencia, Chaco.
15. Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, et al. Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacterias. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 57-66.
16. Ribera A, Ruiz JM, Jimenez de Anta T, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemoth* 2002; 49: 697-698.
17. Bush K, Jacoby GA, Medeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
18. Risueño FN, Cardona EM, Otero BM. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20 (5): 225-34.
19. Alós JJ. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27(5): 290-297.
20. Cortez Páez GA, Sánchez MA, Zúñiga Morales M. Resistencia de *Escherichia coli* a las fluoroquinolonas. *Rev Fac Med* 2005; 10(1): 7-16.
21. Hamelin K, Bruant G, El-Shaarawi A, Hill S, Edge TA, Fairbrother J, et al. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair river and Detroit river areas. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(2): 477-484
22. Lin J, Biyela PT. Convergent acquisition of antibiotic resistance determinants amongst the *Enterobacteriaceae* isolates of the Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). *Water SA* 2005; 31(2): 23-28.
23. Lin J, Biyela PT, Puckree T. Antibiotic resistance profiles of environmental isolates from Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). *Water SA* 2004; 30(1): 23-28.
24. Watkinson AJ, Micalizzi GB, Graham GM, Bates JB, Costanzo SD. Antibiotic-resistance *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters and oysters from an urban riverine system. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73 (17): 5667-5670.
25. Baldini MD, Cabezalí CB. Occurrence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from environmental samples. *Marine Poll Bull* 1991; 22 (10): 500-503.
26. Junco Díaz RA, Suárez Pita MT, Weng Alemán Z, Chiroles Rubalcaba S, Díaz Rosa OE, Rodríguez Zalazar MC. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. *Hig Sanid Ambient* 2006; 6:150-159.
27. Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Rose Ann Miller R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic – and wild- animal fecal samples, human sewage, and surface water. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(3): 1394–1404.
28. McKeon DM, Calabrese JP, Bissonnette GK. Antibiotic resistance Gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. *Water Res* 1995; 29(8): 1902-1908.
29. Córdoba MA, Roccia IL, De Luca MM, Pezzani BC, Basualdo JA. Resistance to antibiotics in injured coliforms isolated from drinking water. *Microbiol Immunol* 2001; 45(5): 383-386.
30. Basualdo JA, Córdoba MA, De Luca MM, Roccia IL, Pezzani BC, Vay C, et al. Aislamiento y caracterización de coliformes injuriados provenientes de la red de distribución de agua de bebida de La Plata, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 9-14.
31. Victorica J, Galván M. *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. *Water Sci Technol* 2001; 43 (12): 49-52.