

Higiene y Sanidad Ambiental, **14** (4): 1253-1257 (2014)

Cepas bacterianas resistentes a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, clindamicina, gentamicina, imipenem, meropenem y vancomicina, aisladas de agua de mar en la ciudad de Comodoro Rivadavia (Argentina)

BACTERIAL STRAINS RESISTANT TO AMPICILLIN, CEFOTAXIME, CEFTAZIDIME, CLINDAMYCIN, GENTAMICIN, IMIPENEM, MEROPENEM AND VANCOMYCIN, ISOLATED FROM SEAWATER IN THE CITY OF COMODORO RIVADAVIA (ARGENTINA)

Adriana Valeria MUÑOZ, Oscar Héctor PUCCI, Graciela Natalia PUCCI*

Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Ciencias Naturales. Ciudad Universitaria Km 4, 9000. Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. *Correo-e: granapu@unpata.edu.ar

RESUMEN

Se sabe que el uso de aguas recreacionales con contaminación fecal incrementa el riesgo de enfermedades en la población. El volcado indiscriminado de líquidos cloacales en las costas de Comodoro Rivadavia, incluyendo los de los hospitales, hace que muchas de sus playas sean no aptas, aunque igualmente estas son usadas por la población. Este trabajo tuvo como objetivos la búsqueda de bacterias resistentes a antibióticos: ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, clindamicina, gentamicina, imipenem, meropenem y vancomicina, en el vertido de líquido cloacal en la playa de Km 8. Se utilizaron medios de cultivo con los antibióticos probados y se aislaron nueve cepas, identificadas por FAMES (Sherlock 6.0) y métodos bioquímicos. Se obtuvieron cuatro cepas *Enterococcus faecalis*, cuatro cepas *Proteus mirabilis* y dos cepas *Streptococcus mitis*; las cuales fueron todas resistentes a ampicilina 70 ug/mL, imipenem 40 ug/mL y meropenem 40 ug/mL. La respuesta de las cepas a los demás antibióticos probados resultó variable.

Palabras clave: Resistencia, antibióticos, agua de mar, medio ambiente.

ABSTRACT

It is known that the use of recreational waters for fecal contamination increases the risk of disease in the population. The indiscriminate dumping of sewage into the coasts of Comodoro Rivadavia, including hospitals, means that many of its beaches are unfit, but also these are used by the population. This study aimed to search for bacteria resistant to antibiotics: ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, clindamycin, gentamicin, imipenem, meropenem and vancomycin, in the discharge of sewage water on the beach at Km 8. Media with antibiotics were used and were isolated nine strains tested, identified by FAMES (Sherlock 6.0) and biochemical methods. Were obtained four strains *Enterococcus faecalis*, four strains *Proteus mirabilis* and two strains *Streptococcus mitis*; which were all resistant to ampicillin 70 ug / mL, imipenem 40 ug / mL meropenem and 40 ug / mL. The response of strains to other antibiotics tested was variable.

Keywords: Resistance, antibiotics, seawater, environment.

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de los antimicrobianos ejerce una fuerte presión selectiva entre las bacterias, lo que trae consigo la selección y diseminación de genes resistentes a los antimicrobianos, con mayor intensidad en los hospitales, y en los efluentes que estos tiran y que terminan en las playas de la ciudad con poco o ningún tratamiento pudiendo ser un reservorio importante de bacterias que presentan resistencia a diferentes antibióticos. Diversos autores hacen mención a microorganismos del género *Enterococcus* (Blanch et al, 2003; Vilanova et al, 2002; Torres et al, 1994) que se hallan frecuentemente en lugar con contaminación por aguas negras (Streitenberger y Baldini, 2010; Silva et al, 2005). Los enterococos forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal humano y animal (Blaimont et al, 1995; Devriese y Cruz Cloque et al, 1992; Devriese y Laurier et al, 1992; Dutka y Kwan, 1978; Kibbey et al, 1978), también son uno de patógenos nosocomiales, en claro ascenso durante las últimas décadas. La especie aislada con mayor frecuencia es *Enterococcus faecalis* (80-90%) (Facklam et al, 1999).

El género *Enterococcus* constituye un problema importante para la salud pública por su resistencia intrínseca a numerosos antibióticos de uso común en la práctica clínica y su habilidad para adquirir resistencia, por mutaciones o a través de transferencia de plásmidos o transposones (Quiñonez, 2001; Centinkaya et al, 2000; Morrison et al, 1997).

En Argentina se viene trabajando hace ya algunos años en el estudio del fenómeno de la resistencia bacteriana en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y su control. Sin embargo, existen escasos reportes de la susceptibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas del medio ambiente (Junco Diaz et al, 2006)

En Comodoro Rivadavia, no existen estudios publicados sobre la presencia de bacterias resistentes del género *Proteus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* aislados de las playas en donde se realizan las descargas de aguas negras. El objetivo es la búsqueda de cepas bacterianas resistentes a antibióticos que se están utilizando en el ámbito de la clínica humana, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, clindamicina, gentamicina, imipenem, meropenem y vancomicina en muestras extraídas del efluente que se vuelca en la playa de Km 8.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestra

Las muestras de agua de mar fueron tomadas durante el mes de agosto de 2013. La extracción se realizó en una playa ubicada en la zona de Km 8 de Comodoro Rivadavia, de una fuente sub-superficial donde se vierten aguas residuales; incluidas las que provienen del Hospital Militar. Se tomaron 4 litros de

muestra, respetando 30 cm de profundidad, en sentido contrario a la corriente y en un área no muy cercana a la orilla. El resultante se conservó en botellas de vidrio color caramelo estéril, se homogeneizó y procesó en un lapso menos a 6 horas. El resto se almacenó a 4°C.

Análisis microbiológico

Se realizó una prueba de presencia-ausencia. Se colocó un inóculo de 100 ml de muestra en 100 ml de caldo tripteína soya TSC (Tripteína 17 g/L, peptona de soya 3 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, fosfato dipotásico 2,5 g/L, glucosa 2,5 g/L) doble concentración, en botellas de 500 ml de capacidad, para facilitar su homogeneización esterilizados en autoclave 15 minutos a 121°C. Se añadió a los medios estériles los siguientes antibióticos en concentración final: ampicilina (35 ug/ml), cefotaxima (35 ug/ml), ceftazidima (35 ug/ml), clindamicina (15 ug/ml), gentamicina (10 ug/ml), imipenem (20 ug/ml), meropenem (20 ug/ml) y vancomicina (35 ug/ml), considerando el doble de la CIM (García Martos et al, 1997); incubados a 37°C durante 72 horas.

Para el aislamiento y purificación se utilizó la técnica de diseminación en superficie empleando diluciones seriadas con solución fisiológica, en medio sólido tripteína soya agar TSA (Tripteína 17 g/L, peptona de soya 3 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, fosfato dipotásico 2,5 g/L, glucosa 2,5 g/L, agar agar 15 g/L) aumentando al doble la concentración de antibióticos: ampicilina (70 ug/ml), cefotaxima (70 ug/ml), ceftazidima (70 ug/ml), clindamicina (30 ug/ml), gentamicina (20 ug/ml), imipenem (40 ug/ml), meropenem (40 ug/ml) y vancomicina (70 ug/ml); incubados a 37°C durante 72 horas.

Se utilizó como control positivo del crecimiento: medio sólido tripteína soya agar sin antibiótico.

Selección y aislamiento de cepas bacterianas

Como criterio para seleccionar los cultivos a estudiar, se tomó el de aislar, a partir de las placas de recuento, todas las cepas que se observaron formando colonias aisladas. Las cepas seleccionadas fueron aisladas hasta cultivo puro con sucesivos repiques en medio sólido agar nutritivo (pluripeptona 5 g/L, extracto de carne 3 g/L, cloruro de sodio 8 g/L, agar agar 15 g/L). En todos los ensayos se incluyó la cepa de *E faecalis* ATCC 29212 como control.

La identificación se realizó por metil ésteres de ácidos grasos (FAME) mediante tratamiento de 40 mg de masa celular crecida en la tercera estría de un cultivo en medio tripteína soya agar glucosado TSBA (tripteína 15 g/L, peptona de soya 5 g/L, cloruro sódico 5 g/L, glucosa 5 g/L, agar agar 15 g/L) de 24 horas efectuando una saponificación con alcohol metílico-hidróxido sódico-agua (150mL:45 g:150 mL) seguida de una metilación con ácido clorhídrico 6N y alcohol metílico (325 mL:275 mL) y a continuación una extracción con n-hexano-metil térbutil éter (1:1) y lavado con hidróxido de sodio-agua (10,8 g-900 mL).

Las muestras fueron procesadas por triplicado y se almacenaron a -20°C hasta realizar la cromatografía correspondiente. Los ácidos grasos obtenidos se determinaron como metil ésteres (FAME) por cromatografía gaseosa, utilizando una columna capilar Ultra2 de 25m de longitud y 0,2mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 serie II GC (inyección splitless; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-250°C a 5°C.min⁻¹, 260-310°C a 40 °C.min⁻¹, 1,5 min de permanencia a 310°C, detector por ionización de llama) controlado por Chemstation 10,0x (Hewlett Packard). La integración se realizó según el sistema MIDI Sherlock versión 6.0

A las bacterias no identificadas por el sistema se les realizaron pruebas metabólicas (Koneman y Allen, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron cuatro cepas resistentes de *E. faecalis*. E1 se aisló de medio TSA con imipenem, E2 se aisló de medio TSA con gentamicina, E3 se aisló de TSA con meropenem y E4 se aisló de medio TSA con ampicilina. Por otra parte, se identificaron cuatro cepas resistentes de *P. mirabilis*. P1 se aisló de medio TSA con imipenem, P2 se aisló de medio TSA con vancomicina, P3 se aisló de medio TSA con ampicilina y P4 se aisló de medio TSA con ceftazidima y 2 cepas resistentes de *S. mitis*. S1 se aisló de medio TSA con meropenem y S2 se aisló de medio TSA con cefotaxima (Tabla 1).

Los antibióticos probados poseen distintas estructuras químicas y ejercen su efecto por distintos mecanismos de acción celular. En cuanto al espectro de acción ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, gentamicina, imipenem y meropenem poseen un amplio espectro, es decir, son capaces de atacar microorganismos grampositivos y gramnegativos. Vancomicina posee un espectro reducido contra microorganismos grampositivos y clindamicina posee un espectro aún más reducido contra microorganismos grampositivos del género *Streptococcus*, entre otros. Las diez cepas identificadas *E. faecalis* (E1, E2, E3 y

E4), *P. mirabilis* (P1, P2, P3 y P4), *S. mitis* (S1 y S2) resultaron resistentes a ampicilina 70 ug/mL. Este hallazgo, coincide con Junco Díaz et al, 2006; quien también encontró cepas de *E. faecalis* resistentes. Esta resistencia se relaciona con una alteración de las proteínas fijadoras de penicilina, principalmente las PBP (Rice, 2001; Ligotzzi et al, 1995) La información genética de estas proteínas se encuentra codificada en el genoma bacteriano y no en plásmidos; sin embargo, elementos que regulan la expresión de esos genes sí puede ser codificada en un plásmido (Vignoli y Seija, 2007).

Además, las diez cepas identificadas resultaron resistentes a los antibióticos imipenem 40 ug/mL y meropenem 40 ug/mL. Los microorganismos resistentes a carbapenems requieren de la combinación de varios mecanismos de resistencia; la producción de enzimas beta lactamasas, principalmente AmpC y carbapenemasas; y la pérdida de porinas que provocan la disminución de la permeabilidad de la membrana externa del microorganismo. Las enzimas beta lactamasas tipo AmpC presentan baja afinidad a los carbapenem; sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplasmático permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se registre resistencia a los carbapenem (Suarez et al, 2011; Livermore, 2002; Bradford et al, 1997; Lee et al, 1991).

Las cuatro cepas identificadas *E. faecalis* (E1, E2, E3 y E4), dos cepas *S. mitis* (S1 y S2) y solo una cepa *P. mirabilis* (P4) resultaron resistentes a ceftazidima 70 ug/mL. En cambio, cuatro cepas *E. faecalis* (E1, E2, E3 y E4) y dos cepas *S. mitis* (S1 y S2) resultaron resistentes a cefotaxima 70 ug/mL. Los microorganismos resistentes a las cefalosporinas de tercera generación producen principalmente enzimas beta lactamasas, seguido por alteración de la permeabilidad. La inactivación enzimática se produce en el proceso de transporte del antibiótico hacia el interior de la célula para alcanzar el ribosoma.

Los microorganismos el género *Enterococcus* poseen una resistencia intrínseca frente al antibiótico clindamicina. Este antibiótico posee un espectro reducido actuando sobre microorganismos grampositivos del género *Streptococcus*. Solo una cepa *S. mitis* (S2) resultó resistente a clindamicina 30 ug/mL.

Hay una prevalencia creciente de la resistencia frente a determinados agentes antimicrobianos, como clindamicina por diferentes mecanismos en *Streptococcus* del grupo *viridans*, fundamentalmente del *mitis* (Prieto Prieto y Calvo, 2004). El *S. mitis* es

Tabla 1. Respuesta de las cepas identificadas a los antibióticos probados. El símbolo + indica resistencia positiva.

	<i>E. faecalis</i>				<i>P. mirabilis</i>				<i>S. mitis</i>	
	E1	E2	E3	E4	P1	P2	P3	P4	S1	S2
Ampicilina 70 ug/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cefotaxima 70 ug/mL	+	+	+	+					+	+
Ceftazidima 70 ug/mL	+	+	+	+				+	+	
Clindamicina 30 ug/mL	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Gentamicina 20 ug/mL	+	+			+	+	+	+		
Imipenem 40 ug/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Meropenem 40 ug/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vancomicina 70 ug/mL	+				+	+	+	+		+

un microorganismo integrante de la flora normal bucal, que se adhiere, tanto a los dientes como a las mucosas, siendo posible la transferencia de genes de resistencia a patógenos respiratorios, como *S. pneumoniae* (Verolo et al, 2010).

Las cuatro cepas *P. mirabilis* (P1, P2, P3 y P4) y solo dos cepas *E. faecalis* (E1 y E2) resultaron resistentes al antibiótico gentamicina 20 ug/mL. La resistencia a la gentamicina puede deberse a alteraciones de la permeabilidad, ya que los aminoglicósidos ingresan al microorganismo por un mecanismo complejo que implica la adherencia a moléculas de carga negativa, y luego se produce la entrada al espacio periplásmico del antibiótico; a diferencia del trabajo de Junco Díaz et al, 2006; que no halló cepas de *E. faecalis* resistentes.

Una sola cepa *E. faecalis* (E1) y una sola cepa *S. mitis* (S2) resultaron resistentes al antibiótico vancomicina 70 ug/mL. Estos resultados coinciden con el trabajo de Junco Díaz et al, 2006; Tejedor Junco et al, 2001; en el hallazgo de cepas del género *Enterococcus* resistentes y difieren con el trabajo de Ronconi y Merino, 2004. El antibiótico vancomicina posee un espectro de acción reducido, actúa sobre microorganismos grampositivos. En cambio, los microorganismos gramnegativos poseen una resistencia intrínseca. La vancomicina interactúa con el Grupo C terminal D-ala-D-ala de los precursores del peptidoglicano impidiendo la síntesis de la pared celular, por inhibición estérica y por bloqueo del sitio de acción de las reacciones de transglicosilación y transpeptidación, respectivamente. Aquellos microorganismos grampositivos que resultan ser resistentes frente a la acción de la vancomicina poseen mecanismos de resistencia mediada por plásmidos transmisibles. Los precursores del peptidoglicano terminan en D-ala-D-lac o D-ala-D-ser en lugar de D-ala-D-ala. La resistencia a glicopéptidos en bacterias del género *Enterococcus* se atribuye a cuatro fenotipos: VAN A con alto niveles de resistencia inducible a vancomicina (64 - >1000 µg/ml) y teicoplanina (16 - 512 µg/ml), VAN B, que corresponden a cepas resistentes a vancomicina (4 - 1000 µg/ml) pero sensibles a teicoplanina (0,5 - 1 µg/ml), VAN C que presenta bajos niveles de resistencia a vancomicina (2 - 32 µg/ml) y sensibilidad a teicoplanina (0,5 - 1 µg/ml) y VAN D, que expresa una resistencia de nivel medio a vancomicina (16 - 256 µg/ml) y teicoplanina (2-32 µg/ml) (Ronconi y Merino, 2004; Ceriana et al, 1998).

CONCLUSIONES

Las cepas aisladas de *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mitis* resultaron resistentes a los antibióticos ampicilina (70 ug/mL), imipenem (40 ug/mL) y meropenem (40 ug/mL). La respuesta de las cepas a los demás antibióticos probados resultó variable. Estos nuevos conocimientos sobre la resistencia bacteriana en cepas

ambientales en la región son útiles para su monitoreo y control.

BIBLIOGRAFÍA

- Blaimont B., Charlier J., Wausters G. Comparative distribution of Enterococcus species in faeces and clinical samples. *Microb. Ecol Health Dis* 1995; 8: 87 - 92.
- Blanch A.R., Caplin J.L., Iversen I., Kühn I., Manero A. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 994-1002.
- Bradford P.A., Urban C., Mariano N., Projan S.J., Rahal J.J., Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid mediated *ampC* betalactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:563-9.
- Ceriana P., Melano R., Rossi A. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología. Boletín N° 9. Servicio Antimicrobianos Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas ANLIS; 1998.
- Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13(4): 686-707.
- Devriese L.A., Cruz Cloque I.J., De Herdt P., Haesebrouck F. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococci and streptococcal flora of dogs and cats. *J Appl Bacteriol* 1992; 73: 421 - 425.
- Devriese L.A., Laurier L., De Herdt P., Haesebrouck F. (1992) Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *J Appl Bacteriol* 1992; 72: 29 - 31.
- Dutka B.J., Kwan K.K. Comparison of eight media-procedures for recovering faecal streptococci from water under winter conditions. *J. Appl. Bacteriol.* 1987; 45: 333 - 340.
- Facklam R.R., Sham D.F., Teixeira L.M. (1999) Enterococcus. In: Murray P., Baron E., Tenover F., Tenover F., Tenover R. (Ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC. 1997; p. 297-305.
- García Martos, P., Fernández del Barrio, M. T., Paredes Salido, F. *Microbiología Clínica Aplicada*. 1997; p. 121.
- Junco Díaz R. A., Suárez Pita M. T., Weng Alemán Z., Chiroles Rubalcaba S., González González M. I., Díaz Rosa O. E. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. *Hig Sanid Ambient* 2006; 6: 150-9.
- Kibbey H.J., Hagedorn C., Mc Coy L.E. Use of faecal streptococci as indicators of pollution in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978; 35: 711-717.
- Koneman, E. W., Allen, S. *Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto*

- Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana; 2008.
- Lee E.H., Nicolas M.H., Kitzis M.D., Pialoux G., Collatz E., Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1093-8.
- Ligotzzi M., Pittaluga F., Fontana R. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 40: 354-357.
- Livermore D.M. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002; 3:218-24.
- Morrison D., Woodford N., Cookson B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology*, 1997; 83(S1): 89S-99S.
- Prieto Prieto J., Calvo A. Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad a los antibióticos. *Med Oral Patol Cir Buca.* 2004; 9: S11-8.
- Quiñones, P. D. Enterococos. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2001; 1(20): 179-192.
- Rice L.B. Emergence of vancomycin resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:183-187.
- Ronconi, M. C., Merino, L. A. *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a ampicilina (AMP) gentamicina (GEN), estreptomycin (EST) y vancomicina (VAN) aislados de materia fecal de pacientes pediátricos hospitalizados. Universidad Nacional del Nordeste. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* Resumen: M-022; 2004.
- Silva A.J., Loyola S.P., Galleguillos O.J., Rodríguez G.Y., Colque Navarro P., Möllby R., Kühn I. Prevalencia de Enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 1201-1210.
- Streitenberger M.E., Baldini M.D. Deterioro de un área recreacional por efectos del volcado de líquidos cloacales. *Revista Argentina de Microbiología* 2010; 42: 307-310.
- Suárez, C. J., Kattán, J. N., Guzmán, A. M., Villegas, M. V. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio* 2011; 10(2).
- Tejedor Junco M. T., González Martín M., Pita Toledo M. L., Lupiola Gómez P., Martín Barrasa J. L. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2001; 203(4), 363-368.
- Torres, C., Reguera J.A., San Martín M.J., Pérez Díaz J.C., Baquero F. VanA-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus spp* in sewage. *J. Antimicrob. Chemother* 1994; 33: 553-61.
- Verolo, C., Viera, J., Pivel, L. Prevalencia de la resistencia bacteriana en flora bucal en niños de 4 a 8 años. *Odontostomatología* 2010; 12: 51-59.
- Vilanova X., Manero A., Cerda Cuellar M., Blanch A.R. The effect of a sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river waters. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92: 210-214.
- Vignoli, R., Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas De Bacteriología Y Virología Médica* 2007; (35): 649-662.