

RECYT

Año 22 / N° 34 / 2020 / 96–100

Resistencia a fosfomicina, tigeciclina y colistina en enterobacterias provenientes de ambientes acuáticos del Chaco, Argentina

Resistance to fosfomicin, tigecycline and colistin in enterobacteria from aquatic environments from Chaco, Argentina

José Alexander Balcaza¹, Ingrid Kurz¹, Cristela Itatí Macin¹, María Silena Mosquera¹, Alejandro Sandi¹, Diego López¹, Salvador Rolando Leyes¹, Liliana Silvina Lösch¹, Luis Antonio Merino^{1,*}

1- Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.

* E-mail: luisantoniomerino@gmail.com

Recibido: 03/07/2019; Aprobado: 29/10/2020

Resumen

El objetivo fue detectar la resistencia frente a fosfomicina (FOS), colistina (COL) y tigeciclina (TGC) en enterobacterias recuperadas de fuentes superficiales y profundas de agua del Chaco (Argentina).

Se incluyeron aislamientos provenientes de muestras de agua de ríos, lagunas y pozos.

Se analizaron 70 muestras de agua (40 de origen superficial y 30 subterráneas). Se obtuvieron 106 aislamientos de enterobacterias (68 en fuentes superficiales y 38 en fuentes subterráneas). En aguas superficiales se encontraron 10 (14,7%) aislamientos resistentes a alguno de los antimicrobianos estudiados mientras que en aguas subterráneas resultaron resistentes 3 (7,9%) aislamientos; en total: FOS (8), TGC (1), COL (1), FOS+TGC (2) y FOS+COL (1).

El presente es el primer trabajo realizado en nuestro país cuyo foco es la detección de enterobacterias resistentes a FOS, COL y TGC en ambientes acuáticos. El número de aislamientos resistentes encontrados es bajo pero su sola presencia debe alertar sobre el posible pasaje de este tipo de bacterias desde el ambiente al hombre, considerando al agua como un reservorio y medio de transmisión.

Palabras clave: Fosfomicina; Colistina; Tigeciclina; Enterobacterias; Ambientes acuáticos

Abstract

The objective was to detect resistance against fosfomicin (FOS), colistin (COL) and tigecycline (TGC) in enterobacteria recovered from surface and deep water sources in the province of Chaco (Argentina). Isolations from water samples from rivers, lagoons and wells were included. Resistance profiles were studied by disk diffusion and broth dilution. A total of 70 water samples were analyzed (40 from a surface origin and 30 from the underground). 106 enterobacteria isolates were obtained (68 from the superficial sources and 38 from the underground ones). In surface waters 10 isolates (14.7%) were resistant to some of the antimicrobials studied while in groundwater, 3 (7.9%) isolates were resistant. It made a total of FOS (8), TGC (1), COL (1), FOS+TGC (2) y FOS+COL (1). This is the first study carried out in our country that focusses on the detection of enterobacteria resistant to FOS, COL and TGC in aquatic environments. Although the amount of resistant isolation found is relatively low, its mere presence should alert about the possible passage of this type of bacteria from the environment to humans, considering water as a reservoir and means of transmission.

Keywords: Fosfomicin, Colistin, Tigecycline, Enterobacteria, Aquatic environments.

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos supone una amenaza a la esencia misma de la medicina moderna y a la sostenibilidad de una respuesta de salud pública mundial eficaz ante la amenaza persistente de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el mal uso y el abuso sistemático de estos fármacos, así como las prácticas clínicas sobre humanos y animales, en agricultura y en la producción animal (usos profilácticos, metafilácticos y como promotores del crecimiento) han puesto en riesgo a todas las naciones [1][2].

Se sabe que el ambiente (incluyendo el suelo y el agua) puede constituirse en reservorio de bacterias resistentes que llegan a través de efluentes domésticos, hospitalarios y agropecuarios o por contaminación directa con desechos humanos y animales [3]but to date there is still lack of a quantitative model to properly assess the risks. Concerns over the health risk of antibiotic residues in the environment are mainly (1.

Estas bacterias multirresistentes pueden llegar al hombre ya sea por contacto directo con el suelo o el agua o de forma indirecta a través de alimentos contaminados

(principalmente frutas y verduras que se consumen crudas), a la vez que se ha postulado que el uso abusivo de desinfectantes y la presencia de metales pesados en el ambiente contribuyen a la selección de bacterias resistentes a diferentes familias de antibióticos [4].

Dado que estas bacterias se asocian con una mortalidad considerable, se llegó a la necesidad de reevaluar y reintroducir algunos agentes terapéuticos ya existentes como la fosfomicina, colistina y tigeciclina para colocarlos en la lista de los pocos antibióticos de última elección para tratar infecciones causadas por bacterias resistentes a varias familias de medicamentos [5][6][7].

La vigilancia de la resistencia antimicrobiana es una herramienta inestimable para entender la epidemiología de su diseminación y asegurar una información exacta que permita establecer y modificar pautas del tratamiento [8].

Con el propósito de contribuir a la vigilancia de la resistencia antimicrobiana desde la perspectiva de “Una Salud” planteada por la Organización Mundial de la Salud, para el presente trabajo se estableció el objetivo de detectar la resistencia frente a fosfomicina (FOS), colistina (COL) y tigeciclina (TGC) en enterobacterias recuperadas de fuentes superficiales y profundas de agua de la provincia del Chaco.

Materiales y métodos

Se utilizó un diseño observacional descriptivo con recolección prospectiva de datos. El muestreo fue no probabilístico por conveniencia, tratando de seleccionar diferentes tipos de fuentes agua, en base a su ubicación con respecto a los centros urbanos y de acuerdo a la actividad antrópica por los que se ven afectados.

De cada sitio seleccionado (ríos, lagunas y pozos) se tomaron muestras de 1 litro de agua, las que fueron remitidas inmediatamente al laboratorio para su estudio. Cien mililitros de cada muestra se colocaron en caldo Lauril Sulfato para su enriquecimiento [9]. Luego de 24 hs de incubación a $35\pm 2^\circ\text{C}$ se realizó siembra para aislamiento en placas de agar Eosina Azul de Metileno. Tras 24 hs de incubación a $35\pm 2^\circ\text{C}$, se identificaron las colonias mediante pruebas bioquímicas clásicas.

En aquellos aislamientos pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae* se evaluó el perfil de sensibilidad/resistencia frente los tres antimicrobianos por el método de difusión con discos en agar Mueller Hinton utilizando discos de FOS (50 μg), COL (10 μg) y TGC (15 μg) y se utilizaron como controles cepas de la *American Type Culture Collection* (ATCC), según procedimientos estandarizados [10][11][12]. La interpretación de los resultados se realizó según recomendaciones vigentes, según se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Puntos de corte para interpretar los resultados de las pruebas de difusión con discos.

| Antimicrobiano | Sensible | Intermedio | Resistente | Referencia |
|----------------|--------------|--------------|--------------|---|
| Fosfomicina | ≥ 15 mm | 13-14 mm | ≤ 12 mm | [13] routine laboratories are forced to test these drugs using minimum inhibitory concentration (MIC) |
| Colistina | ≥ 14 mm | Realizar CIM | ≤ 10 mm | [10] |
| Tigeciclina | ≥ 18 mm | - | ≤ 17 mm | [12] |

En los aislamientos que se consideraron resistentes a FOS, COL y/o TGC en el antibiograma, se confirmó la resistencia mediante la determinación de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) por microdilución en caldo mediante el sistema *Sensititre* (*Thermo Scientific*^{MR}) de acuerdo a las especificaciones del fabricante [14]. Los valores considerados para la interpretación se muestran en la Tabla 2.

No se tuvieron en cuenta las resistencias intrínsecas de los aislamientos estudiados (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella* y *Serratia* son naturalmente resistentes a COL; *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* son naturalmente resistentes a TGC; *Morganella morganii* es resistente natural a FOS) [11].

Tabla 2: Puntos de corte para interpretar los resultados de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas mediante microdilución en caldo.

| Antimicrobiano | Sensible | Resistente | Referencia |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|------------|
| Fosfomicina | ≤ 32 $\mu\text{g/ml}$ | ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ | [12] |
| Colistina | ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ | ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ | [11] |
| Tigeciclina | $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ | ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ | [12] |

Resultados

En total se analizaron 70 muestras de agua (40 de origen superficial y 30 subterráneas), a partir de las que se obtuvieron 106 aislamientos de enterobacterias (68 provenientes de fuentes superficiales y 38, de fuentes subterráneas).

En aguas superficiales se encontraron 10 (14,7%) aislamientos resistentes a alguno de los antimicrobianos estudiados mientras que en aguas subterráneas resultaron resistentes 3 (7,9%) aislamientos (Gráfico 1).

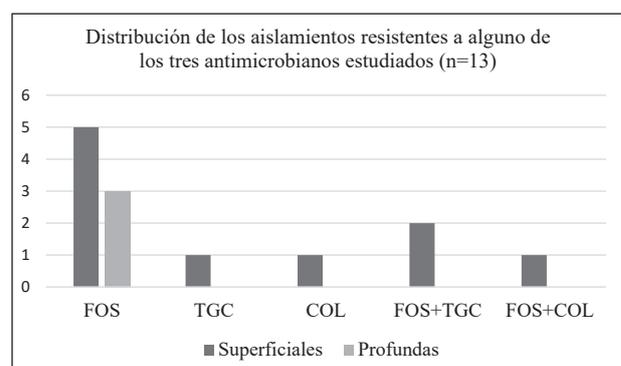


Gráfico 1: distribución de los aislamientos resistentes a alguno de los tres antimicrobianos estudiados (n=13).

Los resultados de las resistencias encontradas teniendo en cuenta los antimicrobianos por separado se muestran en el Gráfico 2.

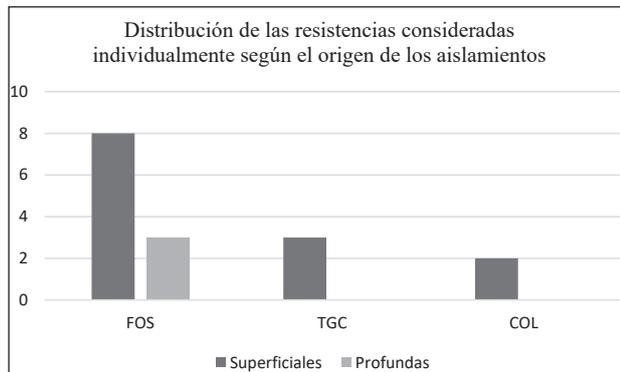


Gráfico 2: Distribución de las resistencias consideradas individualmente según el origen de los aislamientos.

Los aislamientos resistentes desagregados de acuerdo al género y/o especie se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Distribución de los aislamientos resistentes según el género y/o la especie involucrada.

| Género | FOS | TIG | COL | FOS+TIG | FOS+COL | Total |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| <i>Citrobacter spp</i> | | | | 1 | | 1 |
| <i>Cedecea spp</i> | | 1 | | | | 1 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | | 1 | | | 2 |
| <i>Escherichia coli</i> | 2 | | | | 1 | 3 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 5 | | | | 1 | 6 |
| Total | 8 | 1 | 1 | 1 | 2 | 13 |

Discusión

Estudios previos mostraron la contribución del agua como reservorio de bacterias resistentes a los antimicrobianos, incluyendo al agua potable urbana [15], a los sistemas de tratamiento de aguas residuales [16], y a los ríos receptores [17], destacando el efecto de diferentes actividades antropogénicas en la distribución de estas bacterias.

Sin embargo, el único antecedente publicado sobre bacterias resistentes a antimicrobianos en ambientes acuáticos en nuestro país data del año 2008 y en esa oportunidad no se probó la resistencia a FOS, COL y TGC [18].

Por su parte, en diversos países se estudió la presencia de bacterias resistentes en medios acuáticos pero en muy pocos se focalizó el estudio sobre esos tres antimicrobianos, sino que se buscaron bacterias resistentes a drogas de uso común en clínica humana [19–21].

En China, sobre 30 muestras de agua de río, detectaron 18 aislamientos resistentes a colistina (17 *Escherichia coli* y 1 *Enterobacter cloacae*); esa elevada prevalencia estaría justificada por la gran cantidad de bacterias resistentes a ese antimicrobiano en el país de estudio, principalmente relacionada con la cría intensiva de cerdos [22].

En playas de Brasil, se estudiaron 11 muestras de agua de mar y se recuperaron 3 aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a COL, lo que debería resaltar la importancia de las aguas de uso recreacional como reservorios medioambientales de bacterias resistentes en sitios con elevado recambio turísticos [23].

En Argelia se estudiaron 152 muestras de agua de mar partir de 62 playas durante el verano de 2016, recuperándose solamente 2 aislamientos de resistentes a colistina [24].

En lo que respecta a enterobacterias resistentes a FOS en muestras de agua, los estudios son más escasos.

En Columbia Británica (Canadá) se aisló una cepa de *Enterobacter cloacae* resistente a fosfomicina en una muestra de agua proveniente de las proximidades de la desembocadura del río Salmon [25].

Kappell y cols. encontraron entre un 17% y un 48% de aislamientos de *E. coli* resistentes a FOS en muestras provenientes de agua de puertos y efluentes en Milwaukee (Wisconsin, Estados Unidos) [26].

Los informes sobre enterobacterias resistentes a TGC se presentan con respecto a entornos médicos, pero son raros los relacionados con el medio ambiente, uno de ellos es el informe de dos aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a TGC recuperados del río Mura en Graz (Austria) [27].

Los hallazgos propios y los publicados por otros autores resaltan la gran variación en la frecuencia de aparición de aislamientos resistentes a COL y FOS, lo que está influenciado principalmente por las actividades antrópicas y las características geográficas de cada sitio de muestreo.

De acuerdo a Ben y cols, los residuos de antibióticos en el ambiente condicionan la supervivencia de bacterias resistentes y las principales necesidades futuras de investigación para permitir una mejor evaluación de la resistencia a los antibióticos asociada con los residuos de antibióticos en el medio ambiente son las siguientes: a) configuración de una guía estandarizada de monitoreo de los residuos de antibióticos y de la resistencia antimicrobiana en el medio ambiente, b) estudio de la relación entre los niveles de antibióticos y el desarrollo bacterias patógenas resistentes en diferentes entornos y c) determinar la relación dosis-respuesta entre bacterias patógenas resistentes a los antibióticos y diversas enfermedades infecciosas [3].

Conclusiones

El presente es el primer trabajo realizado en nuestro país cuyo foco es la detección de enterobacterias resistentes a FOS, COL y TGC en ambientes acuáticos.

El número de aislamientos resistentes encontrados es bajo pero su sola presencia debe alertar sobre el posible pasaje de este tipo de bacterias desde el ambiente al hombre, considerando al agua como un reservorio y medio de transmisión.

La identificación de reservorios ambientales de

bacterias resistentes contribuye al entendimiento de la epidemiología de estos patógenos a la vez que permite evaluar, localmente, en qué situaciones deben extremarse las medidas para prevenir la diseminación de la multirresistencia.

Bibliografía

1. OMS. *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos* [Internet]. Ginebra, Suiza; 2016. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255204/1/9789243509761-spa.pdf>
2. Davies J, Davies D. *Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2010;74(3):417–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805405>
3. Ben Y, Fu C, Hu M, Liu L, Wong MH, Zheng C. *Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review*. Environ Res [Internet]. 2019;169(July 2018):483–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
4. Waseem H, Williams MR, Stedtfeld RD, Hashsham SA. *Antimicrobial Resistance in the Environment*. Water Environ Res. 2017;89(10):921–41.
5. Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V. *The revival of fosfomicin*. Int J Infect Dis [Internet]. 2011;15(11):e732–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2011.07.007>
6. Giske C. *Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin*. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2015 May 28 [cited 2015 Aug 11];21(10):899–905. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X15005546>
7. Greer N. *Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics*. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2006;19(2):155–61.
8. Masterton R. *The importance and future of antimicrobial surveillance studies*. Clin Infect Dis [Internet]. 2008;47 Suppl 1:S21–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713046>
9. APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association. 23° ed. Washington, DC. 2017.
10. WHONET. *Protocolo de Trabajo Red WHONET Argentina* [Internet]. CABA; 2018. Available from: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-agosto-2014-FINAL-2.pdf>
11. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA; 2018.
12. EUCAST. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone Version 9.0, 2019*. [Internet]. 2019. Available from: <http://www.eucast.org>.
13. Pasteran F, Lucero C, Rapoport M, Guerriero L, Barreiro I, Albornoz E, et al. *Tigecycline and intravenous fosfomicin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for Enterobacteriaceae*. J Infect Dev Ctries. 2012;6(5):452–6.
14. ANMAT. *Disposición No1313* [Internet]. CABA; 2015. Available from: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/febrero_2015/Dispo_1313-15.pdf
15. Xu L, Ouyang W, Qian Y, Su C, Su J, Chen H. *High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems*. Environ Pollut [Internet]. 2016;213:119–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.013>
16. Di Cesare A, Eckert EM, D'Urso S, Bertoni R, Gillan DC, Wattiez R, et al. *Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants*. Water Res [Internet]. 2016;94:208–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.049>
17. Zheng J, Gao R, Wei Y, Chen T, Fan J, Zhou Z, et al. *High-throughput profiling and analysis of antibiotic resistance genes in East Tiaoxi River, China*. Environ Pollut [Internet]. 2017;230:648–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.025>
18. Lösch L, Alonso J, Merino L. *Occurrence of antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae in water from different sources in a subtropical region of Argentina*. Ocorrência de Enterobacteriaceae resistentes aos antimicrobianos nas águas de diferentes fontes em uma região subtropical de Arge. Rev Ambient Agua. 2008;3(2):28–36.
19. Szekeres E, Chiriac CM, Baricz A, Szőke-Nagy T, Lung I, Soran ML, et al. *Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas*. Environ Pollut. 2018;236:734–44.
20. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria*. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2018;45:131–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>
21. Su HC, Liu YS, Pan CG, Chen J, He LY, Ying GG. *Persistence of antibiotic resistance genes and bacterial community changes in drinking water treatment system: From drinking water source to tap water*. Sci Total Environ [Internet]. 2018;616–617:453–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.318>
22. Luo Q, Yu W, Zhou K, Guo L, Shen P, Lu H, et al. *Molecular epidemiology and colistin resistant mechanism of mcr-positive and mcr-negative clinical isolated Escherichia coli*. Front Microbiol. 2017;8(NOV):1–13.
23. Fernandes M, Sellera F, Esposito F, Sabino C, Cerdeira L, Lincopan N. *Colistin-resistant mcr-1-positive Escherichia coli on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters*. Antimicrob Agents Chemother.

2017;61(7):7–10.

24. **Drali R, Berrazeg M, Zidouni LL, Hamitouche F, Abbas AA, Deriet A, et al.** *Emergence of mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from seawater.* *Sci Total Environ* [Internet]. 2018;642:90–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.387>
25. **Xu L, Ouyang W, Qian Y, Su C, Su J, Chen H.** *High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems.* *Environ Pollut.* 2016;213:119–26.
26. **Kappell AD, De Nies MS, Ahuja NH, Ledebøer NA, Newton RJ, Hristova KR.** *Detection of multi-drug resistant Escherichia coli in the urban waterways of Milwaukee, WI.* *Front Microbiol.* 2015;6(APR):1–12.
27. **Hladicz A, Kittinger C, Zarfel G.** *Tigecycline resistant Klebsiella pneumoniae isolated from Austrian river water.* *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(10):11–3.