

Aislamiento e identificación de enterobacterias resistentes a ciprofloxacina y sulfametoxazol de agua residual de uso agrícola

Aguilar-Arteaga, K.^{1*} • Pérez Cerón, J. O.¹ • Ponce-Lira, B.¹ • Díaz-Batalla, L.¹

Palabras clave: resistencia bacteriana, ciprofloxacina, sulfametoxazol, agua residual

Key words: bacterial resistance, ciprofloxacin, sulfamethoxazole, wastewater

Introducción

Dentro de los contaminantes emergentes, los antibióticos son los compuestos de mayor preocupación, estos se usan comúnmente en la medicina veterinaria y humana para la prevención y el tratamiento de infecciones microbianas [1]. Los antibióticos detienen y destruye el crecimiento de consorcios bacterianos específicos. Este objetivo lo pueden lograr por diversos mecanismos de acción. Los antibióticos más comunes incluyen varios subgrupos como: lactámicos β (penicilinas, cefalosporina), macrólidos (eritromicina, roxitromicina), sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfadiazina) y quinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina), generalmente empleados en el tratamiento de Infecciones bacterianas en el ganado, la producción

avícola y la salud humana [2]. La ciprofloxacina (CIP) es una fluoroquinolona de segunda generación y de amplio espectro, antibiótico muy efectivo contra organismos Gram positivos y Gram negativos [3]. Es particularmente activo contra bacterias Gram negativas, como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Neisseria* y *Pseudomonas*. Tiene solo una actividad moderada contra bacterias Gram positivas como *Streptococcus*, *Pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*. Debido a la frecuencia de su uso es uno de los más detectados en biosólidos municipales y sus propiedades de sorción [4]. Su efecto está basado en la inhibición de la topoisomerasa de ADN (girasa), parte de la biosíntesis de ADN. Este produce un efecto ge-

1 Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Carretera Tepatepec-San Juan Tapa km. 2, 42660, Francisco I. Madero, Hidalgo, México Tel:+52 (738) 724 1174

* kaguilar@upfim.edu.mx



notóxico en material genético e induce resistencia bacteriana, que se puede transmitir en el proceso de la transferencia horizontal de genes [5]. El sulfametoxazol (SMX) es un antibiótico bacteriostático tipo sulfonamida (benceno sulfonamidas). Es usado como una combinación sinérgica con trimetoprima en una relación 5:1 [6].

Dentro del Distrito de Riego 03 (DR03), ubicado en el estado de Hidalgo, se riegan más de 90 mil hectáreas de cultivos con agua residual sin tratamiento, proveniente de la zona metropolitana de la ciudad de México. El agua residual es utilizada para el riego de cultivos como maíz, alfalfa, lechuga, coliflor, col, frijol, cilantro entre otros, ocasionando la contaminación de los alimentos; además, de otras problemáticas como la contaminación del suelo, acuíferos y aire, afectando seriamente al medio ambiente y la salud pública. Una de las principales preocupaciones a nivel internacional es la presencia de antibióticos en cuerpos de agua y suelos agrícolas, esto puede ocasionar multiresistencia a los antibióticos por parte de bacterias patógenas potencialmente peligrosas. El presente trabajo estuvo enfocado en la evaluación de la susceptibilidad bacteriana a de dos antibióticos ampliamente utilizados, para el tratamiento de infecciones bacterianas, ciprofloxacina (CIP) y sulfametoxazol (SMX). El aislamiento e identificación de enterobacterias resistentes se realizó con cepas presentes en las muestras de agua residual usada para la producción primaria de alimentos. Se realizó la identificación bacteriana a través de pruebas diferenciales selectivas y la evaluación de la sensibilidad de las cepas a los antibióticos, utilizando la prueba Kirby-Bauer.

Metodología

Se realizó el muestreo de agua residual en 5 puntos del DR03, con la finalidad de aislar cepas enterobacterianas patógenas. La Tabla 1, muestra la geolocalización de los 5 puntos de muestreo. Las muestras fueron colectadas en frascos de polipropileno, previamente esterilizados, las muestras fueron conservadas a 4°C para su posterior análisis y tratamiento.

Enriquecimiento y aislamiento de cepas enterobacterianas

Se tomó 1 ml de cada muestra y de una muestra de referencia, para realizar un crecimiento no selectivo, en tubos de vidrio que contenían caldo nutritivo peptonado de caseína (CNP), posteriormente fueron incubados a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Se realizaron siembras en los siguientes medios de cultivo sólidos: Eosina-Azul de Metileno (EMB), agar selectivo y diferencial para *E. coli*, agar Verde Brillante (VB), medio selectivo para el aislamiento de *Salmonella spp* y agar Bismuto-sulfito (BS), medio de cultivo selectivo y diferencial, especialmente formulado para el aislamiento de *Salmonella entérica* subgrupo *entérica* serotipo typhi y otras especies de *Salmonella*. Las siembras se realizaron por triplicado. Dichas siembras se realizaron por estría en placa, partiendo de inóculos de 100 μl de cada una de las muestras. Esto se realizó por quintuplicado.

Los diferentes cultivos fueron incubados a $37.5\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, posteriormente se observó la morfología macroscópica de las colonias, registrando su morfología, elevación, margen y distribución. Se llevó a cabo tinción de Gram para su clasificación

Tabla 1. Geolocalización de los puntos de muestreo para el aislamiento bacteriano.

No. muestra	Cuerpo de agua	Localidad	Coordenadas	
			Altitud	Latitud
1	Pozo "El Rosario"	Mixquiahuala de Juárez	20° 16' 07" N	99° 08' 22" W
2	Canal del Norte	Mixquiahuala de Juárez	20° 15' 32" N	99° 08' 37" W
3	Canal Requena	Francisco I. Madero	20° 13' 32.9" N	99° 05' 34" W
4	Canal Requena	Francisco I. Madero	20° 13' 27" N	99° 05' 11" W
5	Canal Gran Requena	Francisco I. Madero	20° 13' 06" N	99° 05' 20" W

como Gram positivas o Gram negativas. Pruebas bioquímicas de citrato, TSI, SIM y caldo UREA, confirmaron la presencia de cepas enterobacterias de acuerdo a la NOM-114-SSA1-1994 [7].

La sensibilidad microbiana a antibióticos se realizó mediante el método de Kirby-Bauer, comúnmente llamado antibiograma o método de difusión en disco, este método fue realizado de acuerdo a las normas establecidas por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio en el estándar M02 (CLSI por sus siglas en inglés) de Ginebra, Suiza [8].

Para llevar a cabo los antibiogramas los inóculos se ajustaron a 0.05 unidades arbitrarias de absorbancia (UA) correspondientes en la escala McFarland a aproximadamente 1.5×10^8 células/ml.

Con un asa estéril, se tomaron de 3 a 5 colonias de los cultivos bacterianos aislados, se inoculó en caldo nutritivo CNP e incubó a 37 °C. Se comparó con la absorbancia y turbidez obtenida con el estándar marcado con el nivel de 0.5 de la escala McFarland. Posteriormente, en una caja Petri con agar Mueller-Hinton, se depositó el inóculo sembrando a saturación y rotando 60 °.

Los antibiogramas se realizaron con concentraciones de 5 µg de CIP y 25 µg para SMX. Los cultivos se incubaron a 37 °C, utilizando un vernier se midió el diámetro del halo de inhibición y se compararon con los diámetros establecidos como los valores de referencia del CLSI.

Resultados y discusión

Aislamiento de enterobacterias patógenas y análisis de sensibilidad a antibióticos.

Cuatro de las 5 muestras colectadas para el aislamiento de bacterias, mostraron crecimiento bacteriano evidente por la formación de turbidez en el medio nutritivo peptona de caseína en una concentración de 0.25g/l. Indicando la proliferación de bacterias que usan a la peptona como fuente de nutrientes. La muestra 1, corresponde a la muestra de pozo profundo ubicado en Mixquiahuala, Hgo; no presento turbidez. A partir de los inóculos se realizó el análisis microbiológico con el objeto de aislar cepas patógenas de *Salmonella* spp y *E. coli*. La tinción de Gram mostró las características morfológicas particulares de los microorganismos de interés. Los resultados obtenidos de las 4 pruebas bioquímicas demostraron la asociación a bacterias, las que fueron aisladas en agares selectivos y diferenciales asociadas a *Salmonella typhimurium*, *Salmonella tiphy* y *Escherichia coli*. Las pruebas bioquímicas diferenciales realizadas en los agares SIM, TSI y citrato de Simmons fueron asociadas a los cultivos 3EMB, 4EMB, 5EMB que corresponden a la bacteria *E. coli*, al igual que a los cultivos 4VB, 5VB para *Salmonella typhimurium* y 3BS para *Salmonella tiphy*, solo para este cultivo se pudo diferenciar y afirmar la presencia de *Salmonella tiphy*, debido a la fermentación de glucosa. La Tabla 2, muestra la descripción macroscópica de las colonias observadas.

Tabla 2. Descripciones macroscópicas de colonias bacterianas

Agar	Código de muestra	Código de colonia	Superficie	Forma	Coloración	Aspecto y otras características de colonias bacterianas
VB	1	1VB	-	-	-	-
	2	2VB	Acuminada	Irregular	Amarilla	Verde, mucoide
	3	3VB	Convexa y acuminada	Puntiforme e irregular	Blanca y amarilla	Colonias con halo rojo o verdoso
	4	4VB	Convexa	Irregular	Blanca	Colonias con halo rojo
	5	5VB	Convexa	Circular	Blanca	Colonias con halo rojo
BS	1	1BS	-	-	-	-
	2	2BS	Convexa	Irregular	Negra	Brillo metálico
	3	3BS	Convexa	Puntiforme	Clara	Verdoso
	4	4BS	Convexa	Puntiforme	Clara	Verdoso
	5	5BS	Convexa	Puntiforme	Clara	Verdoso
EMB	1	1EMB	-	-	-	-
	2	2EMB	Acuminada	Irregular	Clara	Ámbar, mucoide
	3	3EMB	Convexa	Puntiforme	Negra	Verde metálico
	4	4EMB	Acuminada	Irregular	Negra	Verde metálico
	5	5EMB	Plana	Puntiforme	Clara	Ámbar, mucoide

En la Tabla 3 se muestran los parámetros de sensibilidad bacteriana a los antibióticos evaluados. Los cultivos presentaron resistencia a SMX, esto fue evidenciado por la ausencia del halo de inhibición, a excepción de las muestras 3EMB 4EMB y 5EMB que contienen los cultivos de *E. coli*, mostrando resistencia intermedia.

En el caso de *Salmonella typhimurium* presentes en el cultivo 3VB generaron resistencia intermedia a CIP; sin embargo, el cultivo 4VB y 5VB confirmó resistencia a CIP, antibiótico de segunda generación de amplio espectro.

La Figura 1 muestra, de manera representativa, la apariencia de las pruebas de evaluación de sensibilidad mostrada a CIP y SMX por el método de Kirby-Bauer de los cultivos seleccionados y evaluados.

Conclusión

Las cepas *Salmonella* serotipos *typhy* y *typhimurium* aisladas de las muestras de agua residual colectadas dentro del DR03 presentaron resistencia a ciprofloxacina y sulfametoxazol. Siendo estas una de las principales familias causantes de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos.

Tabla 3. Resultados para la prueba de sensibilidad a antibióticos en cultivos aislados de muestras de agua residual usada para la irrigación de cultivos en el DR03

Código de colonia	Antibiótico	Halo±DE (mm)	Resultado	Antibiótico	Halo±DE (mm)	Resultado
3VB	CIP	15.9±2.4	Resistente	SMX	0	Resistente
4VB	CIP	12.9±8.0	Resistente	SMX	0	Resistente
5VB	CIP	14.8±5.2	Resistente	SMX	0	Resistente
3BS	CIP	18.2±1.4	Resistente	SMX	0	Resistente
3EMB	CIP	24.7±4.6	Sensible	SMX	12.7±3.7	Resistencia intermedia
Antibiótico		Concentración de referencia		Diámetro de halo (mm)		
				Resistente	Intermedia	Sensible
	SMX		25	≤10	11-15	≥16
	CIP		5	≤15	16-20	≥21

DE: Desviación estándar

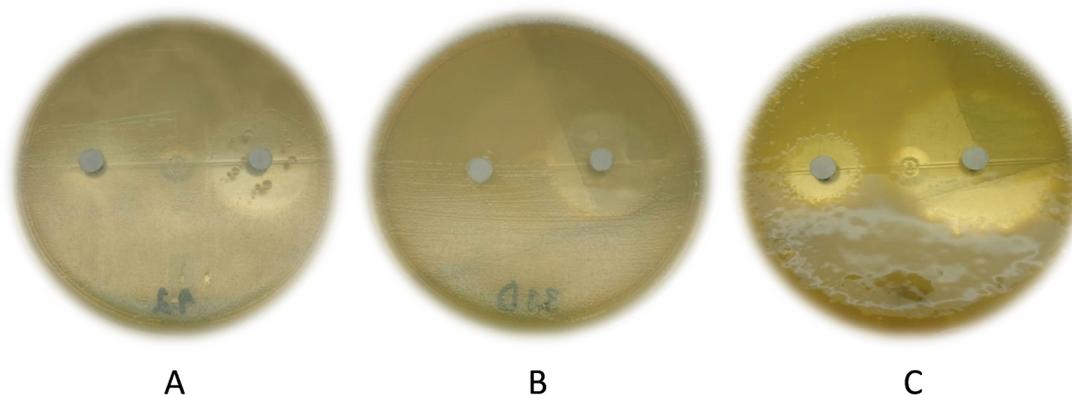


Figura 1. Evaluación de la sensibilidad a antibióticos por el método de Kirby-Bauer en cepas aisladas del DR03 correspondientes a; A) *Salmonella typhimurium*, B) *Salmonella typhi* C) *E. coli*.

Referencias

1. Wei Y, Zhang Y, Xu J, Guo C, Li L, & Fan W. Simultaneous quantification of several classes of antibiotics in water, sediments, and fish muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2014. doi.org/10.1007/s11783-013-0580-6
2. Wang J, He B & Hu X. Human-use antibacterial residues in the natural environment of China: implication for ecopharmacovigilance. *Environmental Monitoring Assessment*. 2015. doi: 10.1007/s10661-015-4514-6.
3. Durán L. Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2018. 29(2), 213-221. doi.org/10.1016/j.rmcl.2018.01.002.
4. Kaplan E, Offek M, Jurkevitch E & Cytryn E. Characterization of fluoroquinolone resistance and qnr diversity in Enterobacteriaceae from municipal biosolids. *Frontiers in Microbiology*. 2013. doi:10.3389/fmicb.2013.00144.
5. Hartmann A, Golet EM, Gartiser S, Alder AC, Koller T & Widmer RM. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1999. doi.org/10.1007/s002449900449.
6. Bedor DCG, Goncalves TM, Ferreira MLL, De Sousa CEM, Menezes AL, Oliveira E J, & De Santana DP. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis: comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B*. 2008. doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.12.027.
7. Norma Oficial Mexicana. "NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios." Método para la determinación de Salmonella en alimentos (1994).
8. Weinstein MP, & Lewis JS. The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. *Journal of clinical microbiology*. 2020. doi.org/10.1128/JCM.01864-19