

Artículo de investigación
Comunicación corta

Experiencia con el agar spot como método tamiz para la detección de *E. coli* resistentes a colistina

Experience with spot agar as a screening method for the detection of colistin-resistant E. coli

Gabriela Giacoboni¹, Fabio Nievas¹, Clara López², Fabiana Moredo¹¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 118 CP1900, La Plata² Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280, C1427CWO, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

e-mail:giacoboni@fcv.unlp.edu.ar

(Recibido: 2 de septiembre 2020; aceptado 27 de octubre 2020)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es describir la experiencia del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos del Departamento de Microbiología de la FCV-UNLP, sobre la utilización del agar spot como prueba tamiz para la detección de aislamientos de *E. coli* resistentes a colistina. Se estudió el comportamiento de 62 aislamientos provenientes de muestras ambientales (31 de granjas de producción porcina y 31 de aguas del Río de La Plata). Del total, 9 crecieron en agar spot (14,5%), y fueron consideradas con fenotipo resistente; 7/9 portaron el gen *mcr-1*. Los dos *E. coli* restantes podrían portar otros genes que les otorguen el fenotipo resistente. Se concluye que agar spot resultó una prueba tamiz útil para colaborar desde el laboratorio de diagnóstico, en la vigilancia de la resistencia a la colistina.

Palabras clave: agar spot, colistina resistencia, *E. coli*

ABSTRACT

The objective of this paper is to describe the experience of the Bacteriology and Antimicrobial Laboratory of the FCV-UNLP Department of Microbiology, on the use of spot agar as a screening test for the detection of colistin-resistant *E. coli* isolates. The behavior of 62 isolates from environmental samples (31 from pig farms and 31 from waters of the Río de La Plata) was studied. Of the total isolates, 9 grew on spot agar (14.5%), and were considered with a resistant phenotype; 7/9 carried the *mcr-1* gene. The two remaining *E. coli* could carry other genes that give them the resistant phenotype. It is concluded that spot agar was a useful screening test to collaborate from the diagnostic laboratory, in the surveillance of resistance to colistin.

Keywords: agar spot, colistin-resistance, *E. coli*

El primer informe global de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en mayo 2014, informó que la resistencia a los antimicrobianos (RAM) se convirtió en uno de los temas de la salud pública mundial de máxima prioridad¹. Los principales factores que facilitan su diseminación son, entre otros, el saneamiento deficiente, la escorrentía de desechos de la agricultura intensiva, la contaminación ambiental, el movimiento geográfico de humanos y animales infectados y el uso excesivo e inadecuado de antimicrobianos en sectores múltiples como lo son humano, animal y agrícola². Dondequiera que se usen los antimicrobianos, hay gran cantidad de bacterias resistentes y de genes de resistencia. Los reservorios más frecuentes son los humanos y sus ambientes (hospitales y la comunidad), seguidos por animales, granjas de producción de animales para consumo humano^{3,4}, entornos de acuicultura, agua, suelo y muchos otros nichos ecológicos incluido el silvestre. La RAM es un problema ecológico que se caracteriza por interacciones complejas que involucran diversas poblaciones microbianas que afectan la salud de humanos, animales y medio ambiente, por lo cual debe abordarse utilizando un enfoque

coordinado y multisectorial, como lo es "Una Salud".

En este contexto, y en apoyo al Plan Mundial elaborado por la OMS en 2015, la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) propuso estrategias sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente⁵.

En la actualidad, la colistina (polimixina E) se usa como antibacteriano de último recurso, para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias gramnegativas multirresistentes, incluidas *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias resistentes a carbapenemes. La resistencia a la colistina puede ser intrínseca o adquirida siendo el mecanismo más frecuente las mutaciones en genes que codifican el sistema regulador de dos componentes responsable de la síntesis del lípido A, produciendo alteraciones en la carga negativa de la membrana externa y posteriormente reduciendo la unión de colistina. En 2015, se describió la aparición de resistencia a colistina mediada por plásmidos, incluida la descripción del gen *mcr-1* (Mobile Colistin Resistance). Este gen codifica una fosfoetanolamina transferasa que agrega un grupo fosfoetanolamina al lípido A, disminuyendo la carga negativa neta de la pared celular⁶.

Si bien hasta el momento se describieron variantes de esta enzima (*mcr-2* a *mcr-10*), *mcr-1* es el marcador prevalente en todo el mundo^{7,8}.

En los últimos años, en América Latina se observó una explosiva aparición del gen *mcr-1*. Debido al riesgo que implica su rápida diseminación, se convirtió en uno de los temas de investigación más importantes⁹. El gen *mcr-1*, es uno de los más diseminados en bacterias de origen animal. En nuestro país, se reportó su presencia en *E. coli* aislados de cerdos¹⁰, pollos¹¹, mascotas¹² y aves silvestres¹³.

La evaluación del comportamiento de esta polimixina en el laboratorio, presenta diversos problemas. Los más relevantes están relacionados a las propiedades bioquímicas de la droga, pobre difusión en el agar, adsorción al plástico; también se suman los inherentes al medio de cultivo (concentraciones de cationes, pH, etc.)¹⁴. Una de las consecuencias más directas de estas particularidades es la recomendación de no utilizar la prueba de difusión, método empleado rutinariamente en los laboratorios de bacteriología humana y veterinaria¹⁵.

Para definir el comportamiento bacteriano frente a los antimicrobianos, se deben seguir los protocolos elaborados por instituciones como *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test* (EUCAST) quienes sugieren las pautas de trabajo y los puntos de corte clínico (sensible, intermedio, resistente) o epidemiológico. En el caso de la colistina, ambas recomiendan la utilización de la prueba de Concentración Inhibitoria Mínima en caldo (CIM)¹⁴. Debido a la complejidad que tiene su realización, no se utiliza habitualmente en los laboratorios de diagnóstico. Este es el principal motivo por lo cual la prueba tamiz *agar spot* para la detección de aislamientos resistentes, es de gran utilidad.

En este contexto, el objetivo de este trabajo es describir la experiencia del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (LaByAn), sobre la utilización del *agar spot* como prueba tamiz para la detección de aislamientos de *E. coli* resistentes a colistina.

En el marco del desarrollo de diferentes proyectos de

investigación sobre resistencia antimicrobiana que se llevan a cabo en el LaByAn, se aislaron 62 *E. coli* ambientales (31 provenientes del agua del Río de La Plata y 31 de granjas de producción porcina). Para la detección de aislamientos con fenotipo resistente a colistina, se implementó la técnica *agar spot* siguiendo las recomendaciones del Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán"¹⁶. Como droga se utilizó la sal sulfato de colistina (Laboratorio Vetanco, Argentina) potencia 0,0322 µg/UI con la que se preparó una solución de 60 µg/ml (*stock*). En placas de petri de vidrio (90 x 15 mm) se colocó 1 ml de la solución *stock* y 19 ml de agar Müller-Hinton (Laboratorios Britania SA, Buenos Aires, Argentina), templado a 50 °C, obteniendo una concentración final de 3 µg/ml. Sobre cada placa se realizó una cuadrícula de 15 compartimentos de aproximadamente 10 mm de lado. Se sembraron, en cada una con hisopos estériles, 13 aislamientos de *E. coli*, el control positivo (*E. coli* M 19736, resistente a colistina por portación del gen *mcr-1*) y el control negativo (*E. coli* ATCC 25922). Los inóculos bacterianos se estandarizaron con la suspensión 0,5 de la escala de Mc Farland (1,5 x 10⁸ UFC/ml). La prueba se consideró positiva cuando se observaron > 1 colonia y negativa cuando se observó ≤ 1 colonia (Figura 1).

Los aislamientos con fenotipo resistente se estudiaron para determinar la presencia de *mcr-1* por PCR, con los cebadores CLR5-F (5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3') y CLR5-R (5'-CTTGGTCCGGTCTGTA GGG-3'), según el "Protocolo de PCR para la detección del gen *mcr-1* en aislamientos de bacilos gramnegativos" recomendado por el Servicio de Antimicrobianos (INEI-ANLIS)¹⁷.

De los 62 *E. coli* estudiados, 9 crecieron en *agar spot* (14,5%), evidenciando el fenotipo de resistencia a colistina. En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos.

Respecto a la caracterización genotípica, 7 aislamientos portaron el gen *mcr-1* en concordancia con lo publicado por Quiroga y col.⁹. Futuros estudios deberían realizarse para determinar el mecanismo de resistencia que presentaron los dos aislamientos negativos, considerando especialmente los genes *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5* ya que son los descritos en *E. coli* de origen porcino^{18,19}.

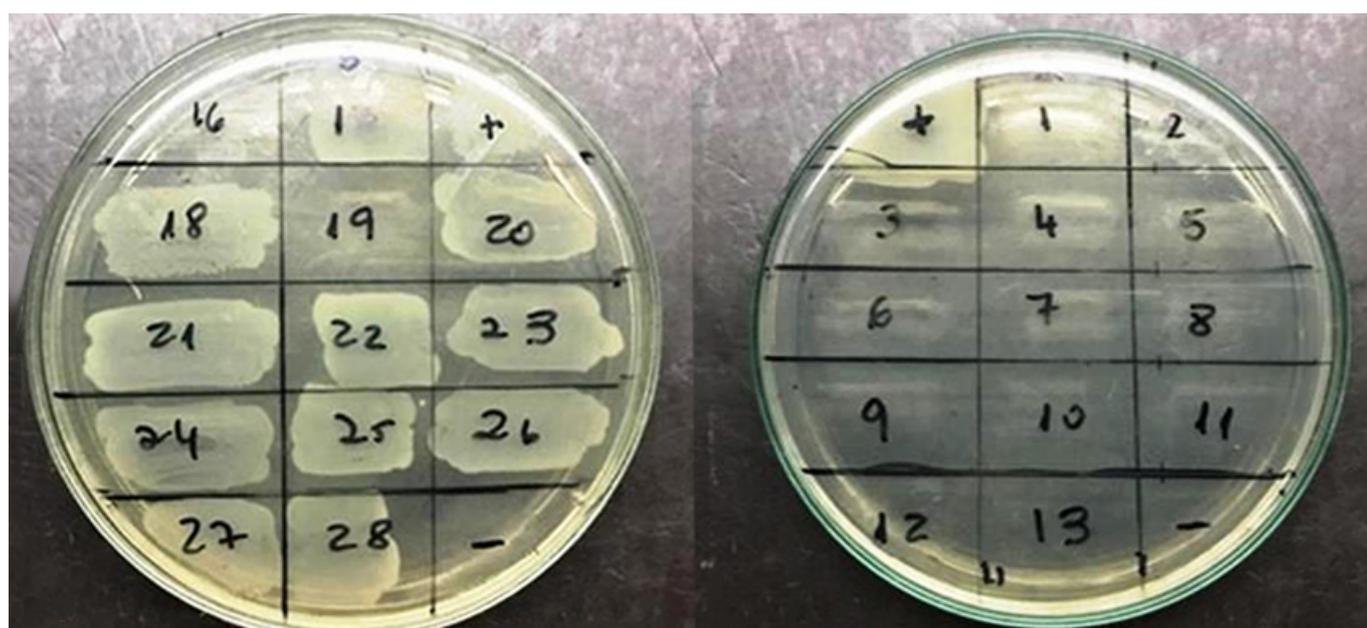


Figura 1. Medio Müller-Hinton adicionado con sulfato de colistina (3µg/ml) *agar spot* sembrado con diferentes cepas de *Escherichia coli*. En ambas placas se observan los controles positivos (+) desarrollo bacteriano y negativos (-) sin desarrollo bacteriano.

Tabla 1: *Escherichia coli* de origen porcino y ambiental resistentes a colistina y portadores del gen *mcr-1*

Origen de las muestras	Cantidad de <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> con Fenotipo resistente en <i>agar spot</i>	<i>E. coli</i> portadores de <i>mcr-1</i>
Granjas de producción porcina	31	7	5
Río de La Plata	31	2	2

Los inconvenientes para evaluar la resistencia a la colistina por pruebas fenotípicas es uno de los principales obstáculos para comenzar a realizar programas de vigilancia, que permitan luego identificar el mecanismo involucrado. Si bien se desarrollaron otros métodos, como elución de discos de colistina²⁰ que tiene resultados comparables a la microdilución en caldo, son muy laboriosos para su implementación en la rutina de los laboratorios de diagnóstico bacteriológico veterinario. En 2019, Gonzales Escalante y col.⁷, propusieron una modificación al protocolo del *agar spot* del Servicio de Antimicrobianos (INEI, ANLIS), agregando EDTA para discriminar enterobacterias cuya resistencia a la colistina es mediada por *mcr* de aquellas que presentan mecanismos cromosomales. Esta modificación ofrecería una manera sencilla de diferenciación.

Debido a esto, la secuenciación del genoma completo sería

la prueba de referencia (con las limitaciones de laboratorios para enviar a secuenciar y los costos económicos que representa), ya que la técnica de PCR necesita de cebadores específicos para cada tipo y variante de gen¹⁵.

En nuestro estudio, los resultados obtenidos con el *agar spot* justificaron su utilización como prueba tamiz, tanto por la facilidad de realización y bajo costo como por la eficacia de la misma. Resultó ser una herramienta prometedora para colaborar desde el laboratorio de diagnóstico con la vigilancia de la resistencia a la colistina.

Agradecimientos

Laboratorio Vetanco, Argentina.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

- WHO, 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. World Health Organization (ISBN: 9241564741).
- Collignon PJ, McEwen SA. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Trop Med Infect Dis* 2019; 4(1):22. doi:10.3390/tropicalmed4010022.
- Agga GE, Arthur TM, Durso LM, Harhay DM, Schmidt JW. Antimicrobial-resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. *PLoS ONE* 2015;10(7):e0132586. doi:10.1371/journal.pone.0132586.
- Blaak H, Lynch G, Italiaander R, Hamidjaja RA, Schets FM, de Roda Husman AM. Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. *PLoS ONE* 2015;10(6):e0127752. doi:10.1371/journal.pone.0127752.
- OIE. Estrategia de la OIE sobre la resistencia de los agentes antimicrobianos y su uso prudente.2016. En: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/PortalAMR/ES_OIE-AMRstrategy.pdf.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J. y col. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161-168.
- Gonzales Escalante E, Condor KY, Di Conza JA, Gutkind GO. Phenotypic detection of plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2019;58:e01555-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01555-19>.
- Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect* 2020;9(1):508-516.
- Quiroga C, Nastro M, Di Conza J. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. *Rev Argent Microbiol* 2019;51:93-100.
- Facone D, Fabiana, Moredo FA, Giacoboni GI, Albornoz E, Alarcón L, Victorio F. Nievas VF y col. Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *blaCTX-M* genes isolated from swine in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist* 2019;18:160-162.
- Dominguez JE, Redondo LM, Figueroa Espinosa RA, Cejas D, Gutkind GO, y col. Simultaneous carriage of *mcr-1* and other antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* from poultry. *Front Microbiol* 2018;9:1679.
- Rumi MV, Mas J, Elena A, Cerdeira L, Muñoz ME, Lincopan N, y col. Co-occurrence of clinically relevant β -lactamases and MCR-1 encoding genes in *Escherichia coli* from companion animals in Argentina. *Vet Microbiol* 2019;230:228-234.
- Lorenti E, Moredo FA, Origlia J, Díaz J, Cremonte F, Giacoboni GI. Gulls as carriers of antimicrobial resistance genes in different biogeographical areas of South America. *An Acad Bras Cienc*. Aceptado para su publicación (julio de 2020).
- Bakthavatchalama YD, Pragasama AK, Biswas B, Veeraraghavana B. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;12:124-136.
- Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*

- 2017;30:557-596.
16. Servicio de Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI, ANLIS "Carlos Malbrán". Método de Screening "COLISTIN AGAR-SPOT" En: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Agar-spot-COL-2017-version2-Agosto2017.pdf>.
 17. Servicio de Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI, ANLIS "Carlos Malbrán". Protocolo de PCR para la detección del gen mcr-1 en aislamientos de bacilos gramnegativos. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2016/01/Detecci%C3%B3n-mcr-1.pdf>.
 18. Wang Z, Fu Y, Schwarz S, Yin W, Walsh T, Zhou Y y col. Genetic environment of colistin resistance genes mcr-1 and mcr-3 in *Escherichia coli* from one pig farm in China. *Vet Microbiol* 2019;230:56-61.
 19. García-Meniño I, Díaz-Jiménez D, García V, de Toro M, Flament-Simon SC, Blanco J y col. Genomic Characterization of Prevalent mcr-1, mcr-4, and mcr-5 *Escherichia coli* Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain. *Front. Microbiol* 2019;10:2469. doi: 10.3389/fmicb.2019.02469.
 20. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, y col. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2019 57:e01163-18. <https://doi.org/10.1128/JCM>.



Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons. Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>