


## Prevalencia de genes *qnrB*, *qnrA* y *bla<sub>TEM</sub>* en bacteriófagos atemperados de *Escherichia coli* aislados en agua residual y alcantarillas de rastros del Estado de México



Juan Martín Talavera-González <sup>a</sup>

Jorge Acosta-Dibarrat <sup>a</sup>

Nydia Edith Reyes-Rodríguez <sup>b</sup>

Celene Salgado-Miranda <sup>a</sup>

Martín Talavera-Rojas <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Km 15.5, 50200 Toluca, Estado de México, México.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

\* Autor de correspondencia: [talaverarojas@gmail.com](mailto:talaverarojas@gmail.com)

### Resumen:

Los genes de resistencia a los antibióticos (ARG) han sido descritos principalmente en bacterias; sin embargo, en fagos atemperados los estudios han sido escasos. En este estudio se determinó la prevalencia de los genes *qnrB*, *qnrA* y *bla<sub>TEM</sub>* en cepas de *Escherichia coli* y en fagos atemperados obtenidos por inducción del ciclo lítico en dichos aislamientos. Se recolectaron 48 muestras de agua potable, agua residual y alcantarillado en rastros del Estado de México obteniendo 37 aislamientos de *E. coli*. La mayor resistencia fue para tetraciclina 32/37 (86.4 %), seguido de trimetoprim-sulfametoxazol 19/37 (51.3 %) y por último ampicilina y ácido nalidíxico con el mismo número de aislamientos 18/37 (48.6 %). La prevalencia del gen *bla<sub>TEM</sub>* en aislamientos bacterianos fue 37.8 %, mientras que en los

aislamientos fágicos fue 3.5 %. Los genes *qnrA* y *qnrB* fueron encontrados en 8.1 % y 29.7 % respectivamente en aislamientos bacterianos, mientras que en los aislamientos fágicos fueron obtenidos 2.7 y 24.3 % respectivamente. Los resultados muestran que los ARG presentes en aislamientos bacterianos se relacionan en el ADN fágico, lo que indica el papel significativo en la propagación de ARG en los rastros estudiados. Comprender los mecanismos de resistencia a antimicrobianos, permitirá establecer medidas efectivas para disminuir este fenómeno.

**Palabras clave:** Bacteriófagos, *Escherichia coli*, Genes, Resistencia.

Recibido: 13/05/2019

Aceptado: 31/03/2020

La terapia con antibióticos representa uno de los avances médicos más importantes del siglo XX, y es un recurso valioso para el combate de enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Sin embargo, su uso terapéutico ha sido asociado con la aparición de bacterias resistentes a antibióticos<sup>(1)</sup>. Reconocido como un problema global, genera un aumento en el costo de tratamientos debido a la rápida diseminación de las cepas por la migración humana e industrialización tanto alimentaria como animal. Esta resistencia puede ser causada por la presencia de genes de resistencia a los antibióticos (ARG), los cuales pueden ser adquiridos y transferidos mediante elementos genéticos móviles (MGE) como los bacteriófagos<sup>(2)</sup>.

Los bacteriófagos lisogénicos con la presencia de ARG se han encontrado, en su mayoría, en ambientes acuáticos<sup>(2,3)</sup>, pero de igual forma los han reportado en muestras fecales obtenidas en hospitales de pacientes clínicamente sanos, sugiriendo que los fagos pueden estar presentes en todos los ambientes sin ser detectados en programas de inocuidad<sup>(4,5)</sup>. El conjunto de estudios realizados en bacteriófagos lisogénicos no solo muestran la presencia de los ARG que ha cobrado la vida de miles de personas y causado pérdidas millonarias en todo el mundo, sino también la contribución de los fagos en la propagación de los ARG en el ambiente<sup>(1)</sup>. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo colaborar en la comprensión del rol que juegan los bacteriófagos en la propagación de ARG determinando la prevalencia de los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *qnrA* y *qnrB* en el ADN bacteriano y fágico.

Durante septiembre – diciembre de 2015, se realizó un muestreo probabilístico de juicio o de criterio<sup>(6)</sup>, donde se recolectaron 48 muestras con base a la normatividad oficial<sup>(7)</sup> provenientes de cuatro rastros municipales (SLH1, SLH2, SLH3 y SLH4), 16 de estas fueron tomadas de agua potable (AP), 16 de agua residual (AR) y 16 de alcantarillas (AC) ubicadas en el área del sacrificio; para su recolección se utilizó un hisopo, el cual se frotó sobre las

orillas de la superficie de la tapa<sup>(7)</sup>. Para la confirmación genotípica de aislamiento de *E. coli* se usó una PCR punto final amplificando el gen *uidA* siguiendo las condiciones de Aguilar *et al*<sup>(8)</sup>. Los primers usados son mencionados en el Cuadro 1. Se usaron 14 antimicrobianos con diferente margen de concentración para realizar la prueba de sensibilidad mediante el método de difusión en disco de acuerdo a los lineamientos del CLSI<sup>(9)</sup>. La interpretación de los resultados se hizo de acuerdo a los lineamientos de CLSI<sup>(10)</sup>.

**Cuadro 1:** Primers específicos utilizados en la PCR

Primer	Secuencia (5'--- 3')	Gen	Referencia
UAL1939b	ATGGAATTCGCCGATTTTGC	<i>uidA</i>	Aguilar et al. 2015
UAL2105b	ATTGTTTGCCCTCCCTGCTGC		
MultiTSO-F_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	Dallene et al. 2010
MULTITSO-T_rev	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
QnrAm_F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	<i>qnrA</i>	Kraychete et al. 2016
QnrAm_R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
QnrBm_F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	<i>qnrB</i>	
QnrBm_R	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA		

Mediante la metodología descrita por Raya y Hébert<sup>(11)</sup> se realizó el aislamiento fágico con Mitomicina C, comprobando la existencia de lisis fágica con el método de spot test y la prueba de “doble capa”. Para la obtención de ADN fágico se usó el método fenol-cloroformo descrito por Pickard<sup>(12)</sup>. Se confirmó la eliminación de ADN bacteriano y la presencia del ADN fágico por una prueba de PCR de punto final en un termociclador Multigene™ Mini Personal (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA) utilizando como control negativo la amplificación del gen *uidA*<sup>(3)</sup>.

Para la extracción de ADN bacteriano se consideró la metodología propuesta por Ahmed *et al*<sup>(13)</sup>. La concentración y pureza del ADN fágico y bacteriano fueron determinadas usando un espectrómetro (Quawell q500). Para la detección de los genes *qnrA*, *qnrB* y *bla<sub>TEM</sub>* se empleó una PCR de punto final con las condiciones que reporta Kraychete *et al*<sup>(14)</sup> y Dallene *et al*<sup>(15)</sup> respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de correlación lineal usando StatCalc Version 8.2.2 (Copyright © 2016 AcaStat Software). Se consideraron diferencias significativas a un nivel de  $P < 0.05$ .

De las 48 muestras recolectadas se obtuvieron 37 (77 %) aislamientos de *Escherichia coli* mostrando diferentes índices de resistencia (Cuadro 2). Del total de aislamientos, 13/37 (35.1 %) fueron recolectados de SLH1 mostrando alta significancia en comparación con SLH2, SLH3 y SLH4 donde se aislaron 8/37 (21.6 %) en cada uno, debido al número de sacrificios practicados ( $P < 0.05$ ). Cabe resaltar que hubo una correlación positiva ( $r=1$ ) entre

los 19 (51.3 %) aislamientos procedentes de agua residual y 18 (48.6 %) de alcantarilla, ya que ambos sitios mantienen condiciones similares y necesarias para un crecimiento bacteriano adecuado.

**Cuadro 2:** Patrón de resistencia a antibióticos de los aislamientos de *Escherichia coli* de agua residual y agua de alcantarilla, obtenidos en los rastros municipales de la zona norte del Estado de México

Antib/Conc(µg)	SLH1			SLH2			SLH3			SLH4		
	AR	AC	Total (%)	AR	AC	Total (%)	AR	AC	Total (%)	AR	AC	Total (%)
Ampicilina/10	4	3	7/18 (38.8)	0	2	2/18 (11.1)	4	1	5/18 (27.7)	2	2	4/18 (22.2)
Amikacina/30	0	0	0/1 (0)	0	0	0/1 (0)	1	0	1/1 (100)	0	0	0/1 (0)
Carbenicilina/100	4	3	7/19 (36.8)	2	2	4/19 (21)	3	1	4/19 (21)	2	2	4/19 (21)
Gentamicina/10	1	1	2/5 (40)	0	0	0/5 (0)	2	1	3/5 (60)	0	0	0/5 (0)
Cefalotina/30	0	1	1/5 (20)	1	0	1/5 (20)	1	0	1/5 (20)	1	1	2/5 (40)
Cefotaxima/30	0	0	0/0 (0)	0	0	0/0 (0)	0	0	0/0 (0)	0	0	0/0 (0)
Netilmocina/30	0	0	0/1 (0)	0	0	0/1 (0)	0	0	0/1 (0)	1	0	1/1 (100)
Ciprofloxacina/5	0	0	0/3 (0)	1	1	2/3 (66.6)	1	0	1/3 (33.3)	0	0	0/3 (0)
Norfloxacina/10	0	1	1/3 (33.3)	1	0	1/3 (33.3)	1	0	1/3 (33.3)	0	0	0/3 (0)
Cloranfenicol/30	7	3	10/23 (43.4)	4	3	7/23 (30.4)	1	1	2/23 (8.6)	2	2	4/23 (17.3)
Trimetoprim-sulfametoxazol/25	7	4	11/19 (57.8)	1	3	4/19 (21)	1	0	1/19 (5.2)	2	1	3/19 (15.7)
Nitrofurantoina/300	0	1	1/6 (16.6)	2	0	2/6 (33.3)	1	0	1/6 (16.6)	2	0	2/6 (33.3)
Ácido nalidíxico/30	1	2	3/18 (16.7)	2	3	5/18 (27.7)	2	4	6/18 (33.3)	3	1	4/18 (22.2)
Tetraciclina/30	7	5	12/32 (37.5)	3	4	7/32 (21.8)	3	3	6/32 (18.7)	3	4	7/32 (21.8)

Antib= antibiótico, AR=agua residual, AC= agua de alcantarilla, Conc= concentración.

El número de aislamientos con ARG fue significativamente alto en agua residual comparada con el alcantarillado ( $P<0.05$ ), no se obtuvieron aislamientos de agua potable (Cuadro 3). Debido, probablemente, a la amplia gama de variantes que tienen los ARG y los diferentes mecanismos de resistencia, se obtuvieron aislamientos bacterianos con resistencia fenotípica intermedia y sensibles que amplificaban *bla<sub>TEM</sub>*, *qnrA* y *qnrB*.

**Cuadro 3:** Caracterización fenotípica/genotípica y relación de los aislamientos bacterianos y fágicos recolectados en rastros municipales de la zona norte del Estado de México

Antibiótico	Origen y patrón de resistencia de los aislamientos	Tipo y número de genes encontrados en el ADN bacteriano	Tipo y número de genes encontrados en el ADN fágico		
Ampicilina	AR <sup>a</sup>	R= 10 I= 1 S= 8	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (7) <i>bla<sub>TEM</sub></i> (1) <i>bla<sub>TEM</sub></i> (2)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (2) - -	
	AC <sup>b</sup>	R= 8 I= 2 S= 8	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (3) - <i>bla<sub>TEM</sub></i> (1)	<i>bla<sub>TEM</sub></i> (3) - -	
	AR <sup>a</sup>	R= 8 I= 7 S= 4	<i>qnrA</i> (2), <i>qnrB</i> (3) <i>qnrA</i> (1), <i>qnrB</i> (3) <i>qnrB</i> (1)	<i>qnrA</i> (1), <i>qnrB</i> (1) <i>qnrB</i> (1) -	
	Ácido nalidíxico	AC <sup>b</sup>	R= 10 I= 3 S= 5	<i>qnrB</i> (2) <i>qnrB</i> (1) <i>qnrB</i> (1)	<i>qnrB</i> (2) - -

AR= agua residual, AC= alcantarillado, R= resistente, I= resistencia intermedia, S= sensible.

<sup>abc</sup> Las diferentes literales en columnas indican diferencias estadísticas significativas.

Se obtuvo un pool de bacteriófagos de cada uno de los aislamientos bacterianos para la detección de los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *qnrA*, *qnrB*; todos los aislamientos bacterianos presentaron fagos atemperados. El Cuadro 4 muestra que el gen *bla<sub>TEM</sub>* fue el más prevalente en aislamientos bacterianos y fágicos; estos resultados coinciden con los de Colomer-Lluch *et al*<sup>(3)</sup> quienes reportan a este gen con más prevalencia (80 a 100 %) y altas densidades de copias de genes ( $\pm 3.3 \log_{10}$ ) en muestras recolectadas de plantas tratadoras de agua residual y rastros. El gen *bla<sub>TEM</sub>* es el más reportado a nivel global<sup>(16,17)</sup>, sobre todo en bacterias Gram negativas; esto se supone por su diseminación a través de aves acuáticas migratorias y a la gran cantidad de enzimas  $\beta$ -lactamasas sintetizadas por las bacterias. Por otra parte, la prevalencia de *qnrA* y *qnrB* fue de 8.1 y 29.7 % en aislamientos bacterianos respectivamente, mientras que en aislamientos fágicos, respectivamente, fue de 2.7 y 10.8 %. La prevalencia, en aislamientos fágicos, reportada en este estudio contrasta con lo mencionado por Colomer-Lluch *et al*<sup>(3,18)</sup> en muestras recolectadas de aguas residuales; así mismo, se reporta<sup>(4)</sup> una alta prevalencia alta del gen *qnrA* en muestras obtenidas de un Centro de Salud. Aunque la prevalencia no es alta, actualmente la resistencia a las quinolonas ha ido en aumento; esto se debe al uso indiscriminado en la clínica veterinaria y humana<sup>(18)</sup>.

**Cuadro 4:** Distribución de los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *qnrA* y *qnrB* en los aislamientos bacterianos y fágicos de los rastros municipales de la zona norte del Estado de México

Rastro/No. de aislamientos	<i>bla<sub>TEM</sub></i>		<i>qnrA</i>		<i>qnrB</i>	
	ADN bacteriano (%)	ADN fágico (%)	ADN bacteriano (%)	ADN fágico (%)	ADN bacteriano (%)	ADN fágico (%)
SLH1/13	3 (23)	1 (7.6)	1 (7.6)	-	8 (61.5)	2 (15.3)
SLH2/8	4(50)	1 (2.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)
SLH3/8	4/(50)	1 (2.5)	-	-	1 (12.5)	1 (12.5)
SLH4/8	3 (37.5)	2 (2.5)	1 (12.5)	-	1 (12.5)	-
Total= 37	14 (37.5)	5 (13.5)	3 (8.1)	1 (2.7)	11 (29.7)	4 (10.8)

Se obtuvo una correlación positiva ( $r=0.99$ ) entre la cantidad de ARG registrados en el ADN bacteriano y ADN fágico (Cuadro 4). Este hecho es indicativo que en bacterias multirresistentes existe la presencia de fagos que, según diversos autores, pueden diseminar porciones genómicas bacterianas con la presencia de ARG en el ambiente y transducirlos a bacterias comensales y patógenas, confiriéndoles nuevas habilidades de adaptación (corto plazo) y evolución (largo plazo), y contribuir a la generación de nuevas cepas patógenas causantes de enfermedades mortales.

Además, el mayor número de aislamientos bacterianos con la presencia de los tres genes que confieren resistencia a los antibióticos se registró en SLH1, mientras que en SLH2 se registró la presencia de los tres genes en aislamientos fágicos (Cuadro 4). La contaminación e insalubridad mostrada en los rastros municipales reúnen factores como temperatura, pH, concentración, estado fisiológico bacteriano y fágico necesarios para el desarrollo de una transducción exitosa.

El estilo de vida de los seres humanos ha provocado que la resistencia vaya en aumento, y aunque el uso indiscriminado e innecesario de los antimicrobianos actualmente se comienza a controlar; en diversos estudios reportan bacterias altamente virulentas con una gran resistencia a los antibióticos en diversos sitios de acciones antropogénicas<sup>(1)</sup>. En este estudio, los aislamientos bacterianos y fágicos con la presencia de los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *qnrA* y *qnrB* muestran una distribución muy variable registrando la presencia de al menos uno de estos genes en los rastros. Los fagos, al pertenecer al grupo de MGE, juegan un rol muy importante en la transferencia de ARG, entre bacterias patógenas – comensales y patógenas –

patógenas<sup>(5)</sup>. La comprensión de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos, será útil para el desarrollo de estrategias efectivas para la reducción de este fenómeno.

### Literatura citada:

1. Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. PLoS Pathog 2014;10(7):e1004219.
2. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. PLoS One 2011;6(3):e17549 .
3. Colomer-Lluch M, Calero-Cáceres W, Jebri S, Hmaied F, Muniesa M, Jofre, J. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewater as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. Environment Int 2014a;(73):167-175.
4. Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, Miró E, Argente M, Jofre J, *et al*. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. Antimicrob Agents Chemother 2014;58(1):606-609.
5. Iversen H, L'Ábée-Lund TM, Aspholm M, Arnesen LP, Lindbäck T. Commensal *E. coli* Stx2 lysogens produce high levels of phages after spontaneous prophage induction. Front Cell Infect Microbiol 2015;(5):1-8.
6. Jaramillo ACJ, Martínez MJJ. Epidemiología Veterinaria. 1ra ed. México: El Manual Moderno; 2010.
7. SS. Secretaria de Salud. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. NOM-230-SSA1-2002. Diario Oficial de la Federación, México.
8. Aguilar MOS, Talavera RM, Soriano VE, Barba LJ, Vazquez, NJ. Determination of extended spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. Trop Anim Health Prod 2015;47(5):975-981.
9. CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 19th ed. Approved Standard M02-A11. Wayne, PA: CLSI. 2012.
10. CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 25<sup>nd</sup> informational supplement. M100-S25. Wayne, PA: CLSI. 2015.

11. Raya RR, Hébert EM. Isolation of phage via induction of lysogens. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, characterization, and interactions. UK: Humana Press; 2009:23-32.
12. Pickard DJ. Preparation of bacteriophage lysate and pure DNA. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. Bacteriophages. Methods and protocols, Volume 2: Molecular and Applied Aspects. UK: Humana Press; 2009:3-9.
13. Ahmed AM, Ishida Y, Shimamoto T. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. J Appl Microbiol 2009;106(2):402-409.
14. Kraychete GB, Botelho LA, Campana EH, Picão RC, Bonelli RR. Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. Antimicrob Agents Chemother 2016;60(12):7524-7526.
15. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2010;65(3):490-495.
16. Ouedraogo SA, Sanou M, Kissou A, Sanou S, Solaré H, Kaboré F, *et al.* High prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *enterobacteriaceae* among clinical isolates in Burkina Faso. BMC Infect Dis 2016;(16):326.
17. Jang J, Suh YS, Di DY, Unno T, Sadowsky MJ, Hur HG. Pathogenic *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the Yeongsan River Basin of South Korea. Environ Sci Technol 2012;47(2):1128-1136.
18. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. J Antimicrob Chemother 2014;69(5):1265-1274.