

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* POSTERIOR A LA CRIOPRESERVACIÓN A -80 °C DURANTE UN PERÍODO DE 6 AÑOS.

Pidhirnyj, María Inés^A.

^AFacultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), UNL.

Área: Ciencias Biológicas.

Sub-Área: Bioquímica.

Grupo: X

Palabras clave: *Escherichia coli*, susceptibilidad, crioconservación.

INTRODUCCIÓN

Uno de los métodos de elección frecuentemente empleados para la conservación y manutención de colecciones de microorganismos es la criopreservación a -80 °C ya que permite conservar microorganismos de interés, cumpliendo los requisitos de viabilidad, pureza, homogeneidad y estabilidad genética durante largos períodos de tiempo (García y col, 2000). En cuanto a la estabilidad genética, si bien es una propiedad necesaria para garantizar determinados estudios post-conservación, el cumplimiento de este objetivo puede presentar dificultades debido a que, durante el almacenamiento, el conservado está expuesto a alteraciones genotípicas que pueden resultar en cambios en la actividad fisiológica, es decir, en la expresión fenotípica (Floccari, 1998). Un ejemplo de ello es la modificación del perfil de susceptibilidad a antibióticos que pueden presentar algunos microorganismos luego de largos períodos de conservación.

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, la especie *Escherichia coli* (*E.coli*) es el patógeno más común en infecciones bacterianas en todo el mundo y es el causante de alrededor de un 80 % de las infecciones urinarias (Auer y col, 2010). Aquellos microorganismos, como *E. coli*, que causan las infecciones más frecuentes tienen una sensibilidad a los antibióticos variable y muchas veces impredecible, es por esto que deben realizarse estudios que permitan evaluar la sensibilidad a distintos antibióticos. Existen métodos *in vitro* cualitativos, como por ejemplo los ensayos de difusión en disco, que permiten clasificar a los microorganismos en sensibles, intermedios o resistentes (Livermore, 2009).

OBJETIVOS

Evaluar la estabilidad de los perfiles de susceptibilidad a antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* luego de un período de crioconservación de 6 años a -80 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico.

Proyecto: "Betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas de interés clínico".

Director del proyecto: José Di Conza.

Director del becario: Marina Rico.

Co-director del becario: Romina Andrea Joris.

Aislamientos de *E. coli* recolectados a partir de urocultivos durante el mes de julio del año 2010. Los aislamientos provenían de muestras clínicas de pacientes ambulatorios e internados en dos centros de la ciudad de Santa Fe: el Hospital de Niños “Orlando Alassia” y la Red de laboratorios ambulatorios de la ciudad de Santa Fe – Interlab.

A todos los aislamientos se les determinó el perfil de susceptibilidad en el año 2010, como parte del trabajo de investigación de una tesina de grado (Joris, 2015). Luego de este estudio, los mismos fueron conservados en ultrafreezer a -80 °C en caldo tripteína soya (CTS) en glicerol al 10%.

Reactivación de los conservados.

Los aislamientos fueron reactivados (previo descongelamiento a temperatura ambiente), tomando una ansada del criotubo y realizando la técnica de 5 estrías sobre una placa de agar tripteína soya (ATS). Luego se incubaron a 37 °C durante 24 horas hasta crecimiento visible de las colonias. Se realizó tinción de Gram y observación microscópica de los aislamientos para corroborar su pureza.

Determinación cualitativa de la resistencia de los microorganismos.

La sensibilidad a los distintos antibióticos ensayados se determinó por el método de difusión con disco en medio sólido (o antibiograma) siguiendo las recomendaciones del CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”) (CLSI, 2010).

A partir de un cultivo de 16-18 h de incubación se realizó una suspensión de cada uno de los aislamientos, en solución fisiológica (NaCl 0,85 % v/v) de turbidez comparable con el patrón 0,5 de la escala de Mc Farland. Con hisopos estériles embebidos en cada suspensión, se inocularon placas de Petri con 25 ml de agar Mueller-Hinton. En cada placa se colocaron 6 monodiscos de antibióticos y se incubaron durante 24 hs a 37 °C. Los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos y comparados con tablas estándares, informándose la categoría de susceptibilidad a la que pertenece el microorganismo: sensible (S) o resistente (R).

Para la determinación de la sensibilidad cualitativa se utilizó como cepa estándar *Escherichia coli* ATCC 25922.

Las interpretaciones de los diámetros de los halos generados por los distintos antibióticos fueron comparadas con aquellas realizadas previamente a la conservación de los aislamientos (Tavano, 2012).

Agentes antimicrobianos.

Se emplearon los siguientes discos de antibióticos de la marca Britania (Argentina):

- Aminoglucósidos: gentamicina (GEN) 10 µg;
- Antifolatos: trimetoprima/sulfametoxazol (TMS) 1,25 µg;
- Quinolonas: ciprofloxacina (CIP) 5 µg;
- β-lactámicos: ampicilina (AMP) 10 µg; ampicilina sulbactam (AMS) 10 µg; cefotaxima (CTX) 30 µg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron 31 aislamientos de *E. coli* que fueron recolectados a partir de urocultivos durante el mes de julio del año 2010.

Las interpretaciones de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos luego de la reactivación para los distintos antibióticos ensayados, fueron comparadas con las arrojadas por los estudios previos a la conservación realizados en 2010. En la Tabla 1 se encuentran los datos correspondientes.

Aislamiento	AMP	AMS	CTX	GEN	CIP	TMS
3	R / R	R / R	-	R / R	R / R	S / S
6	S / S	R / R	-	R / S	R / R	R / R
9	S / S	S / S	-	S / S	S / S	S / S
11	R / R	S / S	S / S	R / R	R / R	S / S

13	R/R	S/S	S/S	S/S	R/R	R/R
14	R/R	R/R	R/S	S/S	R/R	R/R
18	S/S	S/S	-	S/S	S/S	S/S
20	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
21	S/S	S/S	S/S	S/S	R/R	R/R
27	R/R	R/R	S/S	R/R	R/R	S/S
30	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
31	R/R	S/S	S/S	S/S	R/R	R/R
34	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
37	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
40	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
41	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
42	R/R	S/R	S/S	R/R	R/R	R/R
44	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
45	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
48	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
50	R/R	R/R	S/S	R/R	S/S	R/R
53	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
54	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
61	R/R	R/R	S/S	S/S	R/R	R/R
62	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
63	S/R	S/R	S/R	S/R	S/S	S/S
70	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
73	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
79	R/R	R/R	R/R	R/R	S/S	R/R
80	S/R	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
82	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S

Tabla 1: Perfil de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos determinado por el método de difusión con disco, antes (izquierda) y después (derecha) de su conservación a -80 °C. Para cada antibiótico se indica la interpretación del halo siguiendo tablas del CLSI: R-resistente, S-sensible. Se indica en gris los casos en que ocurrieron cambios en el perfil de susceptibilidad (S/R o R/S).

Se encontró que el 83,9% (26/31) de los aislamientos reactivados no mostró diferencias en la interpretación, es decir, se conserva el perfil de susceptibilidad pre y post conservación.

El 16,1% (5/31) restante mostró diferencias en sus perfiles de resistencia. Dos de los aislamientos pasaron de la categoría resistente a la categoría sensible para un solo antibiótico. Por otro lado, otros dos aislamientos modificaron su categoría de sensible a resistente para un solo antibiótico. Un único aislamiento presentó modificación del perfil de susceptibilidad para 4 de los antibióticos ensayados, pasando de la clasificación sensible a resistente.

Durante la conservación no es posible la adquisición de unidades genéticas extracelulares, de modo que consideramos que los cambios ocurridos en los perfiles de susceptibilidad pueden deberse a distintas razones, según sea el caso.

Para intentar explicar los dos casos de los aislamientos que perdieron resistencia a un antibiótico, debemos considerar que, durante la conservación, las bacterias no fueron sometidas a presión selectiva con antibiótico. Por esta razón, pensamos que posiblemente haya ocurrido una pérdida de elementos genéticos (como plásmidos, transposones e integrones) que confieren resistencia a las bacterias, pero que no revisten ninguna ventaja para la supervivencia de las mismas bajo las condiciones de conservación (Andersson y col, 2010). Dado que la resistencia a antibióticos implica un alto costo metabólico para las bacterias, es posible que ocurran reversiones en condiciones desfavorables o de estrés (Schulz zur Wiesch y col, 2010).

Por otra parte, una teoría que explicaría los tres casos en que los aislamientos

adquirieron resistencia a antibióticos es la de ocurrencia de mutaciones espontáneas en genes cromosómicos como consecuencia de las condiciones a las que son expuestos los microorganismos durante y posterior a la conservación. Si bien la técnica de conservación empleada es un método de elección a largo plazo con conocida estabilidad genética, creemos que los cambios en los perfiles de susceptibilidad podrían deberse a mutaciones provocadas por presiones ejercidas sobre las bacterias, debido al estrés del congelamiento y descongelamiento (Zerin y col, 2007). Se conoce la existencia de sistemas sensores de estrés externo o de la envoltura celular, que desencadenan cascadas de señalización específicas según el tipo de estrés (Kennelly y col, 1996) y que, en última instancia, regulan factores de transcripción que ayudan a combatir el daño celular (Chung y col, 2006). Una posibilidad es la activación de genes de resistencia a antibióticos.

CONCLUSIÓN

La crioconservación a -80 °C es un método de elección que efectivamente permite la conservación de microorganismos por largos períodos de tiempo, manteniendo sus características fenotípicas y genotípicas. No obstante, no se puede descartar que en algunos casos aparezcan mutaciones relacionadas con la necesidad del microorganismo para adaptarse a situaciones de estrés y que conlleven a una pérdida en la estabilidad genética. Queda planteada la necesidad de llevar a cabo los estudios pertinentes del microorganismo en cuestión para asegurarse de que el método de conservación elegido no perjudique al proceso de investigación debido a la pérdida de características fundamentales del mismo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- García M., Uruburu F.,** 2000. La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM 30: 12-16.
- Flocari M.,** 1998. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Revista Argentina de Microbiología, 30: 42-51.
- Auer S., Wojna A., Hell M.,** 2010. Oral treatment options for ambulatory patients with urinary tract infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 54:4006-4008.
- Livermore D.M.,** 2009. Has the era of untreatable infections arrived? J. Antimicrob. Chemother. 64 Suppl. 1: i29–i36.
- Joris R.,** 2015. Evaluación de PMQR e integrones en enterobacterias provenientes de urocultivos. Análisis de la supervivencia de los aislamientos conservados. Tesina de grado, Licenciatura en Biotecnología, FBCB, UNL.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI),** 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement, M100-S20. Wayne, USA.
- Tavano A.,** 2012. Recuperación de bacilos gram negativos preservados por métodos alternativos de conservación. Evaluación de la estabilidad de la susceptibilidad a antibióticos. Tesina de grado, Licenciatura en Biotecnología, FBCB, UNL.
- Andersson D.I., Hughes D.,** 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol. 8(4): 260-71.
- Schulz zur Wiesch P., Engelstädter J., Bonhoeffer S.,** 2010. Compensation of Fitness Costs and Reversibility of Antibiotic Resistance Mutations. Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 54 no. 5 2085-2095.
- Zerin M., Khalil I., Roy P., Ibna M.,** 2007. Analysis of antibiotics susceptibility of old and fresh ATCC strain of *Staphylococcus aureus* by standard agar diffusion technique. Bangladesh J Microbiol, 24(2): 137-142.
- Kennelly P. J., Potts M.,** 1996. Fancy meeting you here! A fresh look at prokaryotic protein phosphorylation. J Bacteriol 178:4759–64.
- Chung H. J., Bang W., Drake M. A.,** 2006. Stress response of *Escherichia coli*. Comprehensive reviews in food science and food safety, Vol. 5.