



Bacterial load determination and potentially pathogenic bacteria detection from air conditioning filter samples collected from domestic environments in Mexico's northeast region

Determinación de carga bacteriana y detección de bacterias con potencial patogénico a partir de muestras de filtros de aire acondicionado recolectadas en ambientes domésticos del noreste de México

Omar Alejandro Cabrero-Martínez¹, Wendy Lizeth Cruz-Pulido², María Isabel Sánchez-Pérez², Kristal Lira-Porras¹, Itzel Guadalupe Heredia-Mireles², Virgilio Bocanegra-García^{1*}

¹Laboratorio Interacción Ambiente-Microorganismo, Laboratorio Medicina de Conservación. Centro de Biotecnología Genómica - Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, Mexico. ²Universidad Valle de México, Campus Reynosa, Tamaulipas, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: vbocanegg@hotmail.com (V. Bocanegra-García)

Article history:

Received: 14 December 2018 / Received in revised form: 16 March 2019 / Accepted: 18 March 2019 / Published online: 1 April 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.2.23>

ABSTRACT

Airborne pathogens can adversely affect human health not solely through infections but causing allergic responses or toxic effects. These microorganisms can find an ideal environment for growing in air conditioning units, and although innovations for cleaner and healthier airflow is available, users in developing countries have older models or lack of an adequate cleaning routine of the filters employed, which presents a health hazard for vulnerable populations, spending long periods of time in climatized environments. Therefore, our objective was to detect by microbiological and molecular methods the presence of pathogens in filter samples collected in Tamaulipas, Mexico. Our findings exhibit a mean bacterial load surpassing the 2,300,000 CFU (colony forming units)/g, evidence of β -hemolysis in more than 20% of blood agar cultures, growth in selective media for

Staphylococcus sp. and members of the Enterobacteriaceae family in over 50% of samples, the latter confirmed by molecular assays, which also showed a low prevalence of genes related to antibiotic resistance. These results indicate that accumulated dust in air conditioning grid filters can effectively serve as reservoir for bacteria with pathogenic characteristics.

Keywords: domestic environment, air conditioning, microbiology, PCR, pathogenic bacteria, *Enterobacteriaceae*

RESUMEN

Los patógenos en aire pueden afectar la salud humana, no solo por infecciones, sino causando respuestas alérgicas o efectos tóxicos. Estos microorganismos pueden encontrar un ambiente ideal de desarrollo en unidades de aire acondicionado y aunque existen innovaciones para un flujo de aire más limpio y saludable, usuarios en países en desarrollo tienen modelos anteriores o carecen de una rutina de limpieza adecuada de filtros empleados, representando un peligro para poblaciones vulnerables que pasan mucho tiempo en ambientes climatizados. Por esto, nuestro objetivo fue detectar mediante métodos microbiológicos y moleculares la presencia de patógenos en muestras de Tamaulipas, México. Nuestros hallazgos muestran una carga bacteriana media superando las 2,300,000 UFC (unidades formadoras de colonia) /g, β-hemólisis en más del 20% de los cultivos en agar sangre, crecimiento en medios selectivos para *Staphylococcus* sp. y *Enterobacteriaceae* en más del 50% de las muestras, esta última confirmada por ensayos moleculares, los cuales también mostraron una baja prevalencia de genes relacionados con resistencia a antibióticos. Estos resultados nos indican que el polvo acumulado en las rejillas de aires acondicionados puede efectivamente ser reservorio de bacterias con capacidad patogénica

Palabras clave: ambiente doméstico, aire acondicionado, microbiología, PCR, bacterias patógenas, *Enterobacteriaceae*

1. INTRODUCCIÓN

Debido a las altas temperaturas registradas en el estado de Tamaulipas, su población suele resguardarse extensos periodos de tiempo en lugares confinados con sistemas de aire acondicionado, este fenómeno es común en poblaciones que presentan promedios elevados de temperatura y es notable que la adquisición de unidades de climatización se ha convertido en una necesidad debido a estas condiciones (CONUEE, 2016). Diferentes características de estos sistemas de climatización los propone como posibles reservorios de microorganismos potencialmente patógenos, debido a que presentan condiciones ideales para su proliferación, como la acumulación de humedad al interior del equipo, el tipo de flujo de aire y la falta de una limpieza periódica y adecuada de los filtros de aire

utilizados en los equipos. Esto puede favorecer la proliferación de microorganismos, lo cual se puede traducir en un riesgo potencial para personas vulnerables que permanecen por largos periodos de tiempo en ambientes climatizados (CDC-NCEH, 2006).

Un fenómeno de interés actual, que también abordamos en el actual trabajo es la resistencia a antimicrobianos que presentan algunas bacterias patogénicas. Se estima que para el 2050, 10 millones de muertes se atribuirán a bacterias resistentes a antimicrobianos, mientras que actualmente alrededor de 700,000 muertes anuales están relacionadas a estos microorganismos (O'Neill J, 2016). Una forma indirecta de detectar la presencia de bacterias con resistencia a antimicrobianos en diversos nichos es detectar secuencias de DNA relacionadas a la resistencia a antibiótico, ya que permite la caracterización rápida de una muestra para que después pueda ser complementada con evaluación.

Entre las secuencias de DNA relacionadas a este fenómeno, se pueden mencionar los genes *mec* (*mecA*, *mecB* y *mecC*) que codifican para la proteína PBP2a (proteína de unión a la penicilina 2a) con una baja afinidad a antibacterianos β -lactámicos y su adquisición es considerada el mecanismo más común de resistencia a la meticilina (Duarte et al, 2018) y marcador de multiresistencia, por otra parte, existen los casetes de resistencia a antibióticos presentes en el integrón clase 1, considerado el más ubicuo y más comúnmente reportado en bacterias gram negativas de origen clínico, confiere resistencia a sales cuaternarias de amonio y las familias de antibióticos: sulfonamidas, β -lactámicos y aminoglucósidos (Deng et al, 2015), además de que está asociado a la presencia de beta lactamasas de espectro extendido. De igual manera, se conoce que esta clase de integrones ayuda en la transferencia horizontal genética entre bacilos gram-negativos de origen clínico responsable de la distribución de casetes de genes de resistencia a antibióticos (Liu et al, 2013). Por lo anterior expuesto, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia bacterias con potencial patogénico y resistencia a antimicrobianos a partir de muestras recolectadas de filtros de aire acondicionado de viviendas localizadas en municipios noreste del estado de Tamaulipas en México.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención y procesamiento inicial de muestras

Un total de 82 muestras de filtros de sistemas de climatización fueron recolectadas en viviendas de Tamaulipas, México de los municipios de Reynosa (73), Río Bravo (7) y Camargo (2). El muestreo se realizó colectando el polvo acumulado de los filtros de las unidades utilizando hisopos estériles y colocando la muestra en tubos estériles, para su posterior transporte al laboratorio en refrigeración. A partir de las muestras se tomaron 0.4 g del polvo recolectado, dado que la cantidad de material que se obtuvo no fue uniforme para todos los sitios de muestreo. Los 0.4 g de

polvo recolectado se suspendieron en 15 mL de solución salina estéril al 0.85% en tubos estériles para usarse posteriormente en pruebas microbiológicas.

2.2. Procesamiento microbiológico

La muestra suspendida se utilizó para la inoculación directa en placas estériles con medios de cultivo selectivos como Sal y manitol (para bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus* sp), MacConkey (para bacterias Gram-negativas de la familia *Enterobacteriaceae*) y medio base sangre, para la obtención de bacterias con requerimientos nutricionales adicionales, dado que en este medio es el que favorece el crecimiento no-selectivo de bacterias, después del análisis morfológico, a partir de las colonias que crecieron, se obtuvo la biomasa para posteriores pruebas moleculares. Todas las placas inoculadas se incubaron durante 24 h a 37° C, para la inspección de características macroscópicas y de cultivo. Para la determinación del contenido de carga bacteriana total se realizaron diluciones seriales (10^{-1} - 10^{-6}) de las muestras con agua desionizada y estéril, colocando un volumen de 100 μ L de cada una de las diluciones en placas con medio de agar Soya Trypticaseína, y se incubaron 24 h a 37°C para la determinación del crecimiento bacteriano en cada una de las diluciones.

2.3. Recolección de material genético, PCR punto final y electroforesis en gel

A partir de la biomasa total obtenida de las placas de cultivo en agar base sangre, se llevó a cabo una suspensión en agua desionizada estéril, posteriormente, se expuso la muestra a lisis térmica, incubando a 95° C durante 15 minutos en un equipo ThermoMixer® (Eppendorf, Alemania), para con esto liberar los ácidos nucleicos, después de centrifugación, el sobrenadante se utilizó como muestra para llevar a cabo las reacciones de amplificación para la detección de genes relacionados con características de patogenicidad.

Las condiciones de reacción de PCR y los programas de amplificación implementadas para la detección de las secuencias de DNA de interés son las siguientes: 1) En el caso de los iniciadores para el gen 16S rRNA utilizado como control interno de las muestras, se agregó en un volumen final de 15 μ L, 3 μ L de Buffer 5X GoTaq® Flexi (Promega, USA), 1.1 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 0.4 μ L de dNTP's 10 mM (Promega, USA), 0.9 μ L de los iniciadores 3A-F (5'- gta tta ccg cgg ctg ctg -3') y 5B-R (5'- ttg gag agt ttg atc ctg gct c -3') en una concentración de 10 μ M cada uno, 0.07 μ L de GoTaq® Flexi ADN polimerasa 5 U/ μ L, adicionando un 1 μ L del lisado bacteriano como fuente de DNA, completando el volumen con agua desionizada estéril, siendo el programa de amplificación para esta PCR una desnaturalización inicial de 95° C por 4 minutos y 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 53° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos y una extensión final a 72° C durante 7 minutos; 2) para los iniciadores del gen *rrl* del 23S rRNA, para la detección de enterobacterias las condiciones usadas en un volumen final de 15 μ L

fueron de 3 μL de Buffer 5X GoTaq® Flexi (Promega, USA), 1.8 μL de MgCl_2 25 mM, 0.3 μL de dNTP's 10 mM (Promega, USA), 0.1 μL de los iniciadores rrl-F (5'- gcc aat caa acc ggg aga ta -3') y rrl-R (5'- ctc atc tcg ggg caa gtt tc -3') en una concentración de 10 μM cada uno, 0.07 μL de GoTaq® Flexi ADN polimerasa 5 U/ μL y 2 μL del lisado bacteriano como fuente de DNA, completando el volumen con agua desionizada estéril, siendo el programa de amplificación una desnaturalización inicial de 95° C por 4 minutos y 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, 62° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto y una extensión final a 72° C durante 5 minutos; 3) para la amplificación del gen *mecA* que codifica para la proteína PBP2a se agregó a un volumen final de 15 μL , un volumen de 3 μL de Buffer 5X GoTaq® Flexi (Promega, USA), 1.8 μL de MgCl_2 25 mM, 0.3 μL de dNTP's 10 mM (Promega, USA), 0.2 μL de los iniciadores mecA-F (5'- ggg atc ata gcg tca tta ttc -3') y mecA-R (5'- aac gat tgt gac acg ata gcc -3') en una concentración de 10 μM cada uno, 0.07 μL de GoTaq® Flexi ADN polimerasa 5 U/ μL y 2 μL del lisado bacteriano como fuente de DNA, completando el volumen con agua desionizada estéril e implementando el programa de amplificación con una desnaturalización inicial de 95° C por 4 minutos y 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos y una extensión final a 72° C durante 7 minutos; 4) por último, para la amplificación del gen *int1* del casete de resistencia a antibióticos, se agregó en un volumen final de 15 μL , un volumen de 3 μL de Buffer 5X GoTaq® Flexi (Promega, USA), 1.8 μL de MgCl_2 25 mM, 0.3 μL de dNTP's 10 mM (Promega, USA), 0.2 μL de los iniciadores int1-F (5'- ggg tca agg atc tgg att tcg -3') y int1-R (5'- aca tgg gtg taa atc atc gtc -3') en una concentración de 10 μM cada uno, 0.07 μL de GoTaq® Flexi ADN polimerasa 5 U/ μL y 2 μL del lisado bacteriano como fuente de DNA, completando el volumen con agua desionizada estéril e implementando el programa de amplificación con una desnaturalización inicial de 95° C por 4 minutos y 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 63° C por 1 minuto, 72° C por 40 segundos y una extensión final a 72° C durante 5 minutos. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en el equipo termociclador modelo GeneAmp™ 9700 PCR system (Applied Biosystems, USA).

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a un voltaje de 90 V con un corrimiento del gel de 50 minutos, utilizando el buffer de carga SYBR™ Gold (Thermo Fisher Scientific, USA) y el marcador molecular de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA). Por último, la visualización de los productos en gel se realizó en un equipo transiluminador UV (PROBIOTEK, México) con el gabinete y la cámara del sistema KODAK Gel Logic 100, el cuál utiliza el software KODAK Molecular Imaging v 4.0 (KODAK, USA) para la documentación de los productos.

3. RESULTADOS

3.1. Cultivo microbiológico

Un total de 45 muestras (54.87%, 45/82) mostraron crecimiento en el medio de cultivo Mac Conkey, indicando presencia de cepas de la familia

Enterobacteriaceae, observándose diferentes coloraciones del medio, desde el rosa oscuro hasta las colonias incoloras, dependiendo de su capacidad de fermentación de la lactosa presente en el medio; mientras que 51 muestras (62.19%, 51/82) mostraron crecimiento en el medio de cultivo Sal y Manitol, indicando la presencia de bacterias del género *Staphylococcus*, donde detectamos cepas color rosa (presuntivamente *Staphylococcus coagulasa* negativos) y cepas color amarillo, que es prueba presuntiva positiva para *S. aureus*. Adicionalmente, se observó que 78 muestras (95.12% 78/82) mostraron crecimiento abundante en el medio de cultivo agar base Sangre, en las cuales pudimos detectar β -hemolisis en 18 cultivos (23.07%), α -hemolisis en 30 cultivos (38.46%) y γ -hemolisis en 30 cultivos (38.46%), respectivamente. Por último, con respecto a la determinación de la carga bacteriana, se reportó un promedio de 2,338,100 UFC/g en la totalidad de las muestras, tres diferentes muestras mostrando valores incontables por la alta proliferación de las bacterias, siete muestras con valores superiores a 1,000,000 UFC/g y catorce muestras con valores que superan los 100,000 UFC/g.

3.2. PCR punto final para secuencias de DNA de interés

Es importante mencionar que todas las placas de cultivo con medio de agar base sangre fueron utilizadas para la detección de las secuencias de DNA de interés, dado que permiten el crecimiento de bacterias con mayores requerimientos nutricionales y consideramos que el crecimiento en este medio sería mas representativo de las poblaciones bacterianas presentes en las muestras. En la detección del gen 16s, 69 muestras (84.14%, 69/82), resultaron positivas, indicando la presencia de DNA bacteriano. Un total de 48 muestras (51.22% 48/82) fueron positivas para la presencia del gen *rrl*, mientras que 5 muestras (6.09% 5/82) fueron positivas para la presencia del gen *mecA* y solamente 4 muestras (4.88% 4/82) fueron positivas para el casete de resistencia a antibióticos *int1*. En la figura 1 se muestran algunos cultivos representativos de los resultados obtenidos.

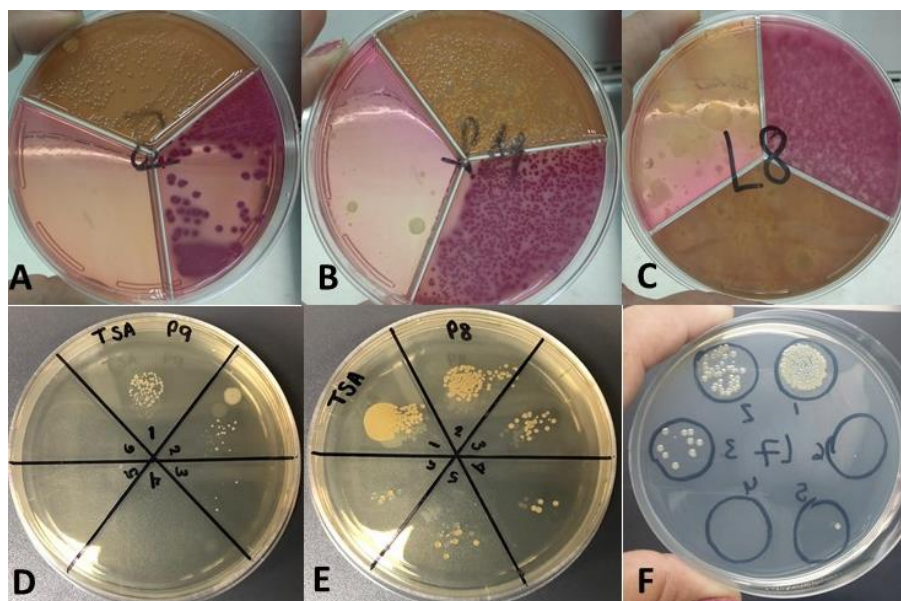


Fig. 1. Colonias representativas de los resultados obtenidos. Cultivos en medio selectivos, se puede observar el crecimiento y diversidad de colonias (A-C). Cultivos realizados con diluciones seriadas en placa para el conteo bacteriano (D-F).

4. DISCUSIONES

En cultivos selectivos y base sangre, pudimos detectar crecimiento bacteriano en 95% de las muestras de polvo de las rejillas de aires acondicionados, un poco más de la mitad, el 54% de las muestras presentó crecimiento en medio selectivo para enterobacterias, y 62% en medio selectivo para gram positivos como *Staphylococcus* sp, lo que nos indica que dichos residuos de polvo si pueden fungir como reservorios de grupos específicos de bacterias, que pueden tener miembros que son patógenos para el humano, particularmente detectamos beta hemólisis en 23% de los cultivos presentes en medio base sangre, lo cual aunque es un resultado inespecífico, ya nos indica la presencia de bacterias con capacidad hemolítica similar a la que se encuentra en bacterias patógenas.

Respecto a la carga bacteriana, si bien no tenemos referencia de un valor mínimo esperado, los conteos que obtuvimos fueron en el orden de 10^5 - 10^6 UFC/g, considerando solo las bacterias viables presentes en los residuos de polvo, indicando que la proliferación de bacterias viables en polvo acumulado es alta, aumentando el riesgo de la presencia de especies patogénicas (Acerbi et al, 2017; Hugenholtz & Fuerst, 1992; Ross et al, 2004).

Para tener una idea más clara sobre el riesgo a la salud que estos aislados puedan representar, decidimos hacer una caracterización del microbiota

bacteriana total obtenida, tomando como base los aislados presente en el medio base sangre, dado que, por su alta cantidad de nutrientes, permite el crecimiento inespecífico de un mayor número y tipo de bacterias. Al DNA obtenido por lisis térmica le aplicamos la técnica de PCR para detectar genes asociados a patogenicidad o resistencia a antimicrobianos. De los marcadores genéticos que buscamos en dichas muchas muestras, detectamos un 51% de las muestras positivas para el gen *rrl* correspondiente a enterobacterias, lo cual concordó con los resultados obtenidos por cultivo en medio EMB (Chandra et al, 2013). Mas interesante aun, detectamos 6% de las muestras positivas para el gen *mecA*, que está presente en cepas de *Staphylococcus* sp, multirresistentes a antimicrobianos, y 4% de las muestras positivas al marcador *int1*, que es condicionante de multi resistencia en gram negativos. La prevalencia de genes de resistencia encontrados en las muestras difiere con los trabajos reportados anteriormente en evaluaciones ambientales y clínicas (Deng et al, 2015; Kaden et al., 2018; Khairalla et al, 2017; Liu et al, 2013; Rolo et al, 2017; Xu et al, 2015), sin embargo consideramos importantes los hallazgos, dado que detectamos un número importante de bacterias viables, con capacidad hemolítica, y aunque los marcadores de multi resistencia estuvieron presentes en un porcentaje menor (5-6%), el hallazgo nos provee evidencia que el polvo acumulado en las rejillas de aires acondicionados puede efectivamente ser reservorio de bacterias con capacidad patogénica.

Para poder establecer dicho riesgo, se necesita de estudios microbiológicos y moleculares confirmatorios y más específicos, como la completa caracterización de los aislados obtenidos para conocer las especies encontradas, así como la generación de pruebas fenotípicas de resistencia a antibióticos para poder establecer la resistencia aislado analizado. Es importante mencionar que no existe normatividad oficial mexicana sobre este asunto en particular, al tratarse de viviendas privadas, sin embargo, representan un interés científico sobre el posible reservorio de patógenos que existen en este ambiente.

AGRADECIMIENTOS

VBG agradece al SNI, COFAA y EDI por la beca otorgada.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en la elaboración y desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

Acerbi E., Chénard C., Miller D., Gaultier N. E., Heinle C. E., Chang V. W.-C. & Lauro F. M. 2017. Ecological succession of the microbial communities of an air-conditioning cooling coil in the tropics. *Indoor Air*. 27(2): 345–353.

CDC-NCEH. (2006). Healthy Housing Reference Manual. Healthy housing reference manual. Obtenido de: www.cdc.gov/healthyhomes/publications.html (consultado octubre del 2018)

Chandra M., Cheng P., Rondeau G., Porwollik S. & McClelland, M. 2013. A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(4): 210–216.

CONUEE. Estudio de Caracterización del Uso de Aire Acondicionado en Viviendas de Interés Social en México (2016). Obtenido de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/182038/Estudio_de_Caracterizaci_n_del_uso_de_Aire_Acondicionado.pdf (consultado octubre del 2018)

Deng Y., Bao X., Ji L., Chen L., Liu J., Miao J. & Yu, G. 2015. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 20(10): 14-45.

Duarte F. C., Danelli T., Tavares E. R., Morguette A. E. B., Kerbauy G., Grion C. M. C. & Yamada-Ogatta S. F. 2019. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: First report in a tertiary hospital of southern Brazil. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 25(4): 293-297.

Hugenholtz, P., & Fuerst, J. A. 1992. Heterotrophic bacteria in an air-handling system. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(12): 3914-3920.

Kaden R., Engstrand L., Rautelin H. & Johansson, C. (2018). Which methods are appropriate for the detection of *Staphylococcus argenteus* and is it worthwhile to distinguish *S. argenteus* from *S. aureus*? *Infection and Drug Resistance*. 21(11): 2335-2344.

Khairalla A. S., Wasfi R., & Ashour, H. M. 2017. Carriage frequency, phenotypic, and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dental health-care personnel, patients, and environment. *Scientific Reports*. 7(1): 7390.

Liu L. T., Wan L. H., Song X. H., Xiong Y., Jin S. J. & Zhou, L. M. 2013. Relevance of class 1 integrons and extended-spectrum β -lactamases in drug-resistant *Escherichia coli*. *Molecular Medicine Reports*. 8(4): 1251–1255.

O'Neill J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. Wellcome Trust.

Rolo J., Worning P., Boye-Nielsen, J., Sobral R., Bowden R., Bouchami O. & Miragaia, M. 2017. Evidence for the evolutionary steps leading to *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci. PLoS Genetics. 13(4): e1006674.

Ross C., De Menezes J. R., Estivalet-Svidzinski T. I., Albino U., & Andrade G. 2004. Studies on fungal and bacterial population of air-conditioned environments. Brazilian Archives of Biology and Technology. 47(5): 827–835.

Xu Z., Mkrtchyan H. V. & Cutler, R. R. 2015. Antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. Frontiers in Microbiology. 9(6): 947.