



ARTÍCULO ORIGINAL

## Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras ambientales

*Biotypes and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli strains isolated from environmental samples*

Beatriz Romeu Alvarez<sup>1\*</sup>, Heidi Quintero Alvarez<sup>2</sup>, Nidia Mercedes Rojas Hernández<sup>1</sup> y Mayra Heydrich Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Centro de Inmunoderivados, Cuba

\* Autor para correspondencia:  
[bromeu@fbio.uh.cu](mailto:bromeu@fbio.uh.cu)

### RESUMEN

La contaminación de los ecosistemas acuáticos y la presencia de microorganismos patógenos para el ser humano en estos ecosistemas es uno de los problemas más serios que afronta la humanidad en la actualidad. Teniendo en cuenta estos aspectos el objetivo del presente trabajo fue determinar los biotipos y la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de agua procedentes de ríos contaminados y no contaminados del occidente de Cuba. De los 16 biotipos primarios descritos por Chrichton y Old (1982), el 42% de las cepas aisladas en los ríos de La Habana presentaron los biotipos 3 y 9 mientras que 67% que las cepas aisladas en el río San Juan (Artemisa) presentaron los biotipos 1 y 3. Todos los biotipos mayoritarios (1, 3 y 9) se asocian a cepas patógenas (patotipos) de la especie *E. coli*. El 14% de las cepas aisladas en los ríos de La Habana fueron multirresistentes, situación que no se observó en las cepas aisladas del río San Juan donde solo se aisló una cepa multirresistente. La presencia de cepas de *E. coli* con multirresistencia y biotipos relacionados a los patotipos de esta especie en las aguas de los ríos evaluados indica claramente el riesgo biológico que implica el uso de las mismas en diferentes actividades por parte de la población.

**Palabras clave:** biotipos, susceptibilidad antimicrobiana, ecosistemas acuáticos

### ABSTRACT

The contamination of aquatic ecosystems and the presence of pathogenic microorganisms for humans in these ecosystems is one of the most serious problems facing mankind today. The objective of the present study was to determine the biotypes and antimicrobial susceptibility *in vitro* of *Escherichia coli* strains isolated from water samples from contaminated and uncontaminated rivers of Cuban western. Of the 16 primary biotypes described by Chrichton and Old (1982), 42% of the isolated strains in the Havana rivers

**Recibido:** 2015-07-08

**Aceptado:** 2016-11-10

presented biotypes 3 and 9 while 67% isolated strains in the San Juan River (Artemisa) biotypes 1 and 3. All these biotypes (1, 3 and 9) are associated with pathogenic strains (pathotypes) of the *E. coli* species. Fourteen percent of strains isolated in Havana's rivers were multiresistant, a situation that was not observed in strains isolated from the San Juan River where only one multidrug resistant strain was isolated. The presence of *E. coli* strains with multiresistance and biotypes related to the pathotypes of this species in the waters of the rivers evaluated clearly indicates the biological risk involved in the use of these waters in different activities by the population.

**Keywords:** *Biotypes, antimicrobial susceptibility, aquatic ecosystems*

## INTRODUCCIÓN

El agua es fundamental para el desarrollo de la vida y las actividades diarias, convirtiéndose en uno de los recursos naturales más necesarios en el planeta (Campos-Pinilla *et al.*, 2008). Conservar y mantener la calidad de las fuentes naturales de agua de manera que se garantice su sostenibilidad y aprovechamiento para las futuras generaciones es esencial (Siew-Leng *et al.*, 2012).

A pesar de que en nuestro país existe un marcado interés por el rescate y la preservación de los ecosistemas acuáticos, muchos de los ecosistemas dulceacuícolas del país se encuentran seriamente afectados por la contaminación.

Los ríos de La Habana reciben a su paso por la ciudad numerosos aportes de aguas residuales de distintas procedencias que alteran la calidad de sus aguas (Rua de Cabo *et al.*, 2006, Varcárcel *et al.*, 2010). Uno de los problemas más serios asociados a esta situación es la presencia de microorganismos patógenos para el ser humano, muchos de ellos resistentes a los antibióticos de uso común para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (Acevedo *et al.*, 2015, Bécares *et al.*, 2011).

Por otra parte, ecosistemas dulceacuícolas no contaminados como el río San Juan en la provincia de Artemisa, principal atracción del complejo turístico "Baños del San Juan", ubicado en la comunidad Las Terrazas podría verse también afectado por el fenómeno de la contaminación debido al incremento de las actividades recreativas en este complejo turístico (Romeu *et al.*, 2015).

*Escherichia coli* es uno de los principales indicadores de contaminación microbiológica de las aguas pero a su vez la especie presenta cepas patógenas que poseen factores de virulencia específicos que les permiten causar un amplio espectro de enfermedades aún en individuos sanos (Kaper *et al.*, 2004). Sobre la base de su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican en: *E. coli*

patógenas intestinales (ECPI) entre las que se ubican seis patotipos reconocidos, responsables de enfermedades diarreicas agudas (EDA) así como cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ECPEX), las cuales son responsables de infecciones del tracto urinario (ITU), bacteriemias y/o meningitis respectivamente (Croxen y Finlay, 2013).

La necesidad de identificar las cepas patógenas de *E. coli* del resto de las cepas de esta especie que son miembros de la microbiota normal del tracto gastrointestinal, así como la diferenciación entre los diferentes grupos patógenos de esta especie obliga al empleo de diferentes sistemas de clasificación intraespecíficos. No existe un método ideal por lo que para lograr la identificación correcta se emplean métodos fenotípicos (biotipado, serotipado, presencia de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, etc) y genotípicos (PCR para búsqueda de genes de virulencia, plásmidos de resistencia, etc) (Swaminathan y Matar, 2001).

La búsqueda de los grupos patógenos o patotipos de la especie *E. coli* así como la evaluación de su susceptibilidad antimicrobiana en ecosistemas acuáticos contaminados se ha incrementado en los últimos años a nivel internacional y comienzan a considerarse como criterios para la evaluación de la calidad microbiológica de las aguas (Sinclair *et al.*, 2012).

En Cuba, la búsqueda de estos grupos patógenos se ha realizado fundamentalmente a partir de muestras clínicas. Sin embargo, a partir de muestras ambientales solo se cuenta con los estudios realizados por Romeu *et al.* (2009) sobre la presencia de estos patotipos en ecosistemas dulceacuícolas contaminados de La Habana. Además, este tipo de estudios tampoco se han llevado a cabo en ecosistemas dulceacuícolas no contaminados como el río San Juan en la comunidad Las Terrazas en la provincia de Artemisa.

Por lo antes expuesto y por la importancia que reviste a nivel nacional e internacional la vigilancia microbiológica y epidemiológica de esta especie, así como la diseminación de cepas resistentes a los agentes

antimicrobianos, el objetivo del presente trabajo fue determinar los biotipos y la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de agua procedentes de ríos contaminados y no contaminados del occidente de Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon para el estudio 64 cepas de *Escherichia coli* conservadas en glicerol a -30 °C que forman parte de la colección bacteriana del Laboratorio de Ecología microbiana del Departamento de Microbiología y Virología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Las cepas fueron aisladas a partir de muestras de agua colectadas en 12 estaciones de muestreo, ubicadas en la zona urbana de los ríos capitalinos Almendares, Quibú y Luyanó (55 cepas) y de tres estaciones del río San Juan (9 cepas) ubicado en la comunidad La Terrazas, Artemisa.

La biotificación primaria de las cepas de *E. coli* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Crichton y Old (1982). Para ello se evaluó la utilización de los azúcares rafinosa, dulcitol y sorbosa en caldo rojo fenol después de 72 h, 48h y 24h a 37 °C respectivamente así como la descarboxilación del aminoácido L-ornitina en medio MIO (Merck).

La susceptibilidad a agentes antimicrobianos se determinó mediante el método de Bauer *et al.* (1966) de difusión radial en medio agarizado con discos de antibióticos, según lo recomendado por las Guías del Comité Nacional de Normas del Laboratorio Clínico (CLSI) (2015). Los antibióticos empleados fueron: macrólidos: eritromicina (E, 15mg), quinolonas: norfloxacina (NOR, 10mg), β-lactámicos: ampicilina/sulbactam (AMS, 20 mg), aztreonam (ATM, 30 mg), cefazolina (KZ, 30 mg), ceftriaxona (CRO, 30 mg), cefepime (FEP, 30 mg), sulfonamidas: trimetropin-sulfametoxazol (SXT, 25 mg), fosfomicina (FOS, 200 mg), aminoglucósidos: amikacina (AK, 30 mg).

Las cepas control utilizadas para comprobar la correcta realización de la técnica y la calidad de los discos de antibióticos utilizados fueron: *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Se consideraron microorganismos multirresistentes a aquellas cepas que fueron resistentes a tres o más familias de antibióticos de las evaluadas de acuerdo a los criterios de López-Pueyo *et al.* (2011).

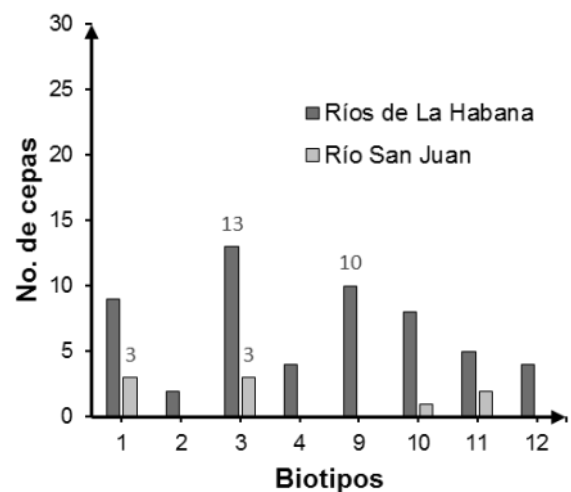
## RESULTADOS

En la Tabla 1 y la Fig. 1 se muestran los resultados de la biotificación primaria de las 64 cepas de *E. coli* aisladas de los ríos estudiados. Los biotipos 3 y 9 fueron los más frecuentes entre las cepas aisladas de los ríos de La Habana y los biotipos 1 y 3 entre las cepas del río San Juan.

**Tabla 1.** Perfiles bioquímicos de cada uno de los biotipos primarios encontrados entre las cepas de *E. coli* aisladas de los cuatro ecosistemas acuáticos evaluados

**Table 1.** Biochemical profiles of the primary biotypes of *E. coli* strains isolated from the four aquatic ecosystems evaluated

Biotipo	Azúcares			Aminoácido
	Sorbitol	Dulcitol	Rafinosa	Ornitina
1	+	+	+	+
2	+	-	+	+
3	+	+	+	-
4	+	-	+	-
9	+	+	-	+
10	+	-	-	+
11	+	+	-	-
12	+	-	-	-



**Figura 1.** Biotipos de *Escherichia coli* identificados en las cepas aisladas de los cuatro ecosistemas acuáticos evaluados

**Figure 1.** *Escherichia coli* biotypes of strains isolated from the four aquatic ecosystems evaluated.

### Análisis susceptibilidad

En el presente estudio las 64 cepas de *E. coli* evaluadas fueron resistentes al menos a uno de los diez antibióticos probados. El mayor número de cepas resistentes se presentó frente a la eritromicina, seguido por norfloxacino, cefazolina, trimetropim/sulfametoxazol, aztreonam, ceftriaxona, ampicilina/sulbactan, fosfomicina y amikacina (Fig. 2).

Se obtuvieron valores de resistencia intermedia frente a los antibióticos eritromicina, ampicilina/sulbactan, aztreonam, cefazolina, cefepime, fosfomicina y amikacina entre las cepas aisladas de los ríos de La Habana, aunque es importante resaltar que también se encontraron valores de resistencia intermedia frente al antibiótico eritromicina entre las cepas aisladas en el río San Juan (Fig. 2).

### Análisis de la multiresistencia

Entre las cepas aisladas de los ríos de La Habana el 14% (9 cepas) mostraron resistencia frente a tres o más antibióticos de familias diferentes por lo que se consideraron cepas multiresistentes.

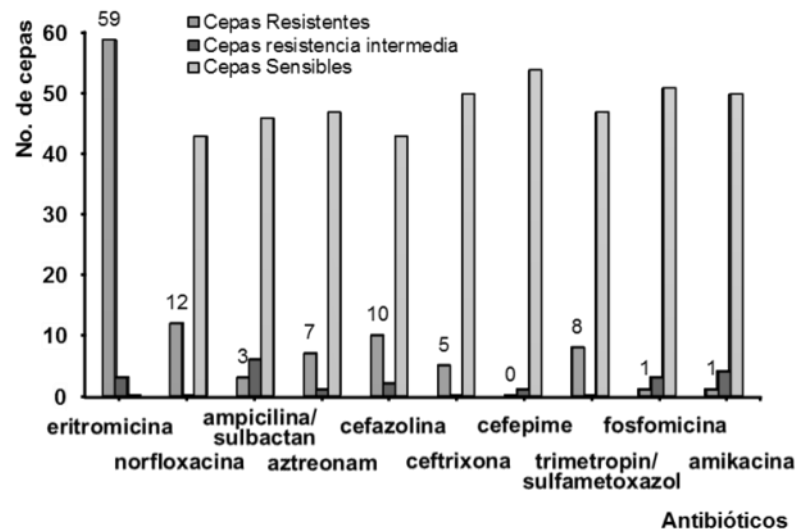
Se encontraron 15 patrones de resistencia diferentes entre estas cepas, de los cuales nueve expresaron multiresistencia (combinaciones de 3, 4, 5, 6 y 7 antibióticos). El patrón de resistencia más frecuente fue E (eritromicina) con 26 cepas, seguido por E-NOR

(eritromicina-norfloxacina) con seis cepas, el patrón E-AK (eritromicina-amikacina) con tres cepas y los patrones E-ATM (eritromicina-aztreonam), E-SXT (eritromicina-trimetropin/sulfametoxazol) y E-SXT-NOR (eritromicina-trimetropin/sulfametoxazol-norfloxacina) con dos cepas cada uno, el resto de los patrones estuvo integrado por una sola cepa (Tabla 2).

Entre las ocho cepas aisladas del río San Juan solo se encontraron dos patrones de resistencia. En este caso, solo una cepa de las ocho cepas resistentes aisladas mostró resistencia frente a cuatro antibióticos de familias diferentes (eritromicina, norfloxacina, aztreonam y fosfomicina) siendo la única cepa multiresistente. Las restantes siete cepas solo fueron resistentes a la eritromicina.

### DISCUSIÓN

En un estudio realizado en Inglaterra con cepas de origen clínico Crichton y Old (1992) obtuvieron que los biotipos 1 y 3 eran los predominantes. En ese estudio un porcentaje elevado de las cepas de *E. coli* que pertenecían al biotipo 1 fueron aisladas de muestras de orina por lo que este biotipo es el que presentan frecuentemente cepas de *E. coli* uropatógenicas, reconocidas como uno de los patotipos extraintestinales de esta especie bacteriana. Jalaluddin *et al.* (1998) en un



**Figura. 2.** Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de los cuatro ecosistemas dulceacuícolas evaluados.

**Figure. 2.** *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from the four aquatic ecosystems evaluated.

**Tabla 2.** Patrones de resistencia encontrados entre las cepas de *Escherichia coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó de La Habana.

**Table 2.** Patterns of resistance of *E. coli* strains isolated from Almendares, Quibú and Luyanó rivers of Havana

No. de	Patrón	No.	Total	
1	E	29	26	
	E-NOR	6		
	E-AK	3		
2	E-ATM	2	13	
	E-SXT	2		
	E-FOS	1		
	E-SXT-NOR	2		
3	E-SXT-AMS	1	4	
	E-NOR-CRO	1		
	E-CRO-ATM-KZ	1		
4	E-CRO-ATM-AK	1	3	
	E-SXT-AMS-NOR	1		
5	E-SXT-ATM-NOR-CRO	1	1	
6	E-SXT-NOR-CRO-KZ-ATM	1	1	
7	E-SXT-AMS-CRO-ATM-KZ-NOR	1	1	

**Abreviaturas:**  
E (eritromicina)  
NOR (norfloxacina)  
AK (amikacina)  
ATM (aztreonam)  
SXT (trimetropin-sulfametoxazol)  
FOS (fosfomicina)  
AMS (ampicilina-sulbactam)  
CRO (ceftriaxona)  
KZ (cefazolina)

estudio similar pero con cepas de *E. coli* aisladas de muestras de heces procedentes de niños congolese con diarrea demostró la prevalencia de cepas de *E. coli* enteroagregativa (ECEA) que presentaban los biotipos fenotípicos 1, 3 y 9, los cuales coinciden con los biotipos mayoritarios encontrados entre las cepas ambientales de *E. coli* evaluadas en la presente investigación.

De acuerdo a estos informes de la literatura se podría afirmar que el 59% de las cepas evaluadas presentan un biotipo que podría corresponder con el de cepas patógenas de esta especie, aunque será necesario su confirmación por métodos moleculares mediante la búsqueda de los genes de virulencia específicos para cada patotipo.

Los resultados obtenidos para el caso de las cepas aisladas del río San Juan constituyen el primer informe sobre biotipificación de cepas de *E. coli* aisladas de este ecosistema acuático de la provincia de Artemisa, considerado un ecosistema no contaminado.

Chiroles *et al.* (2007) en un estudio realizado con cepas de *E. coli* ambientales aisladas del río Almendares encontró que también los biotipos mayoritarios en su estudio fueron el 1 y el 3, aunque este autor también encontró un número elevado de cepas del biotipo 2 poco representado entre las cepas del presente estudio.

La diferencia entre los biotipos presentes en el estudio realizado por Chiroles en el año 2007 y el presente estudio podría estar relacionado con el origen de las cepas que llegan al río. Los vertimientos de aguas residuales cargados de materia fecal, aunque son continuos a estos ríos, la fuente de los mismos cambia constantemente de un año a otro y entre ambos trabajos hay una diferencia de nueve años.

Como puede apreciarse existe una estrecha relación entre la capacidad de fermentar azúcares y/o descarboxilar determinados aminoácidos (esquema de Crichton y Old) por las cepas de *E. coli* y su patogenicidad. Se ha demostrado que el serotipo O157:H7 de la especie *E. coli* perteneciente al patotipo *E. coli* enterohemorrágica y responsable de severas enfermedades gastrointestinales y renales como diarrea acuosa, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (HUS) (Murakami *et al.*, 2014) no fermenta sorbitol (Díaz *et al.*, 2011) característica que facilita su identificación desde el punto de vista fenotípico. En el caso de las cepas aisladas en la presente investigación todas presentaron la capacidad de fermentar el sorbitol por lo que ninguna pertenece al serotipo antes mencionado lo que constituye un resultado positivo debido a la implicación que desde el punto de vista clínico-epidemiológico tendría el hallazgo de este serotipo en los ecosistemas dulceacuícolas evaluados.

El biotipaje descrito por Crichton y Old (1982) aplicado en esta investigación es un esquema económico, sencillo y de fácil ejecución. Por sus ventajas en Cuba se ha empleado en la biotipificación de cepas de *E. coli* de origen clínico, específicamente para diferenciar cepas de *E. coli* aisladas de muestras de orina de pacientes pediátricos en el Hospital Pediátrico Docente "Juan Manuel Marqués" de La Habana, lo cual ha constituido una herramienta importante en el manejo de las infecciones urinarias producidas por esta bacteria (Hernández *et al.*, 2015). Por tal motivo, teniendo en cuenta la variabilidad encontrada entre las cepas de *E. coli* halladas en este trabajo mediante el método de biotipaje podría constituir también una alternativa para la caracterización de cepas ambientales de *E. coli*, las cuales podrían ser responsables de diversas enfermedades infecciosas en personas que se pongan en contacto con las aguas contaminadas de estos ríos habaneros.

Por otra parte, se conoce que los ecosistemas acuáticos son uno de los más impactados con los desechos líquidos de la industria farmacéutica. Además, continuamente también se vierten en ellos aguas residuales que contienen antibióticos provenientes de instituciones de salud y la comunidad. Esta situación ha influido directamente en la aparición de microorganismos resistentes o con resistencia intermedia frente a los antibióticos (Harakeh *et al.*, 2006; Pignato *et al.*, 2009) debido fundamentalmente a que los microorganismos tienen acceso a un amplio rango de genes itinerantes que se mueven de una célula bacteriana a otra por diferentes mecanismos genéticos (Korzeniwska *et al.*, 2013).

Los valores de resistencia antimicrobiana obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los obtenidos por Romeu *et al.* (2012) en un estudio realizado con cepas de *E. coli* aisladas de los mismos ríos habaneros estudiados en esta investigación. Aunque estos investigadores solo emplearon seis de los diez antibióticos utilizados en el presente trabajo (amikacina, aztreonam, cefazolina, cefepime, ceftriaxona y trimetropim-sulfametoxazol) los valores de resistencia encontrados para los antibióticos en común son similares a los informados por estos autores cuatro años atrás.

Sin embargo, se debe destacar la alta resistencia encontrada entre las cepas de *E. coli* evaluadas frente a la eritromicina. El grupo de los macrólidos aunque se ha considerado por décadas como una de las mejores opciones de tratamiento para las infecciones causa-

das por los cocos Gram positivos debido a su buena actividad y seguridad frente a estas infecciones se emplean también para el tratamiento de determinadas infecciones producidas por bacterias Gram negativas a pesar de su modesta potencia frente a los miembros de la familia Enterobacteriaceae (Nguyen *et al.*, 2009). Algunos de los antibióticos de esta familia como la azitromicina se recomiendan por la Academia Americana de Pediatría para el tratamiento de la shigelosis en niños (CDC, 2005) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como segunda línea de tratamiento en adultos (WHO, 2009). Sin embargo, en la literatura ya se ha informado el fallo terapéutico con azitromicina de brotes de shigelosis debido a la emergencia de cepas resistentes a este antibiótico mediada por plásmidos que han adquirido mediante la transferencia de genes entre *Shigella* spp. y *E. coli* (Boumghar-Bourtchai *et al.*, 2008). Por lo tanto, se considera que *E. coli* constituye un reservorio de genes de resistencia a macrólidos que pueden posteriormente transferirse a especies de *Shigella*, como por ejemplo *Shigella sonnei*. Todos estos genes podrían conferir resistencia a la azitromicina y a la eritromicina, los dos miembros más importantes en la familia de los macrólidos.

En un estudio realizado en 2009 por Nguyen y colaboradores determinaron que el plásmido *mph(A)* detectado en las cepas de *S. sonnei* evaluadas fue el gen de resistencia a macrólidos más frecuente, detectado también en cepas de *E. coli* aisladas en cinco países diferentes de cuatro continentes del mundo. El plásmido fue detectado en cepas de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de pacientes que habían recibido algún tratamiento antimicrobiano o que habían estado hospitalizados. Además las cepas de *E. coli* presentaban coreistencia a la amoxicilina y al cotrimoxazol.

En la presente investigación el 95% de las cepas ambientales de *E. coli* evaluadas presentaron resistencia frente a la eritromicina lo que pone de manifiesto que pueden constituir un reservorio importante de genes de resistencia a los macrólidos y otras familias de antibióticos para los microorganismos que se encuentren en estos ecosistemas acuáticos.

A principios de la década de los años 90 era infrecuente hallar resistencia a las fluoroquinolonas en los aislamientos clínicos de *E. coli* pero, desde entonces, su frecuencia se incrementó en todo el mundo y se informó que en el Reino Unido, entre 1991 y 1996,

más del 90% de los aislamientos mostraban un elevado nivel de resistencia al ciprofloxacino. Además, las fluoroquinolonas también se utilizan en medicina veterinaria para el tratamiento de los animales destinados a la producción de alimentos (Van Boeckel *et al.*, 2015).

Se ha encontrado una relación temporal entre el incremento en la aparición de menor sensibilidad a ciprofloxacino en especies de *Salmonella* zoonótica en seres humanos y la aprobación del uso de enrofloxacin (otro miembro de esta familia) en animales destinados a la producción de alimentos, como el ganado, en el Reino Unido en 1993. El enrofloxacin puede seleccionar mutantes de *Salmonella* resistentes al ácido nalidíxico y a las fluoroquinolonas *in vivo*. Las cepas resistentes a enrofloxacin muestran menor sensibilidad a ciprofloxacino. Es posible que el uso de enrofloxacin en medicina veterinaria contribuya al incremento en la resistencia a ciprofloxacino en especies zoonóticas de *Salmonella* en las infecciones de seres humanos (Hopkins *et al.*, 2005). En la presente investigación la resistencia frente al norfloxacino fue una de las que se presentó con mayor número de cepas. El vertimiento de aguas residuales cargadas de heces humanas y/o heces animales (cerdos, ganado vacuno, etc) provenientes de viviendas y corrales u otros sitios de cría cercanos a las márgenes de los ríos evaluados podría estar contribuyendo a la llegada de estas cepas resistentes a los miembros de esta familia.

Con relación a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos evaluados en el presente trabajo, se plantea que uno de los principales mecanismos de resistencia es la hidrólisis enzimática, debido a la presencia de enzimas  $\beta$ -lactamasas. En la última década se ha descrito un aumento en la importancia clínica de enterobacterias como *E. coli* que poseen BLEE y que afecta la actividad de cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Seiffert *et al.*, 2013). Por tanto, la resistencia encontrada entre las cepas de *E. coli* evaluadas en la presente investigación frente a los antibióticos de esta familia podría estar dada en gran medida por este mecanismo de resistencia.

La propagación de genes de resistencia en los ecosistemas naturales puede desafiar la dinámica poblacional y la fisiología de las poblaciones microbianas naturales. La contaminación por los genes de resistencia a antibióticos puede aumentar las posibilidades de patógenos humanos para la adquisición de la resistencia (Parisien *et al.* 2008, Baquero *et al.* 2008).

Los mecanismos de resistencia a sulfonamidas (trimetropin/sulfometoxazol) que ha desarrollado *E. coli* están muy relacionados con la adquisición de genes mutantes mediante elementos móviles (Mosquito *et al.*, 2011, Acevedo *et al.*, 2015). El medio acuático brinda la posibilidad de la transferencia de estos elementos móviles entre los microorganismos presentes en estos ecosistemas lo que justificaría los porcentajes de resistencia encontrados entre las cepas de *E. coli* evaluadas en la presente investigación.

Para el resto de los antibióticos evaluados los porcentajes de resistencia se encontraron por debajo del 12 % lo cual no representa una alarma y pueden continuar formando parte de los que se sugieren para el uso clínico en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por esta bacteria.

Sin embargo, el decrecimiento en los niveles de susceptibilidad (resistencia intermedia) es un fenómeno que cada vez se observa con mayor frecuencia en aislamientos ambientales, especialmente en ecosistemas acuáticos impactados por la contaminación. Este fenómeno se observó frente a siete de los diez antibióticos probados, es decir más del 50 % de los antimicrobianos evaluados, lo que sin duda constituye una alerta. Este fenómeno favorece el incremento de bacterias resistentes en este tipo de ambiente y pone de manifiesto el papel decisivo que puede tener el ambiente y específicamente los ecosistemas acuáticos en la diseminación de microorganismos resistentes a los antibióticos en la comunidad (Acevedo *et al.*, 2015).

Los porcentajes de aislamientos de *E. coli* multirresistentes (14%) en los ríos de La Habana están por debajo de los obtenidos por autores como Ram *et al.* (2009) y Chandran *et al.* (2008), quienes han informado valores de multirresistencia de 47% y 95% respectivamente, en cepas de *E. coli* aisladas de ríos de la India.

Sin embargo, el mal uso de los antimicrobianos en la clínica, en medicina veterinaria y en la agricultura dan lugar a fuertes presiones sobre las comunidades de bacterias ambientales (Acevedo *et al.*, 2015). Uno de los principales efectos de esta situación es la aparición de cepas multirresistentes en los ambientes acuáticos. Otros efectos incluyen la toxicidad aguda o crónica de especies de plantas y animales expuestos a estos fármacos, debido principalmente a que la mitad de los antibióticos administrados a los seres humanos y los animales se excreta en forma activa sin cambios

principalmente a través de la orina y heces fecales. La literatura informa una absorción incompleta hasta del 95 % de los antibióticos administrados y la producción de sus metabolitos, estos últimos pueden ser más tóxicos que el compuesto original y pueden llegar a acumularse en todas las matrices ambientales, principalmente las aguas superficiales, subterráneas, suelos y sedimentos (Ajit *et al.*, 2006, Durso *et al.*, 2013, Acevedo y Severiche, 2013).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo es necesario continuar con la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de estos ecosistemas contaminados y realizar estudios de transferencia genética sobre todo teniendo como receptor cepas autóctonas de estos ecosistemas acuáticos para evaluar el papel que pueden tener estas estructuras genéticas en la diseminación de genes de resistencia en diversos ambientes. Además, la presencia en ambientes naturales de biotipos que pudieran pertenecer a patotipos de *E. coli* constituye, sin duda alguna, un riesgo para la salud humana.

En el caso del río San Juan, las personas mantienen un contacto directo con el agua y aunque se considera un ecosistema no contaminado, no se está exento del riesgo debido a que también, aunque en una frecuencia muy baja, se observó la presencia de cepas que presentaron un biotipo primario relacionado con patotipos de *E. coli* y se aisló una cepa multirresistente.

En el caso de los ríos de La Habana, se conoce del mal uso que se le da a sus aguas por parte de la población que vive en la cuencas a las que pertenecen estos ríos, de ahí la preocupación y el impacto que significa encontrar cepas multirresistentes de *E. coli* que expresen biotipos relacionados con patotipos de esta especie.

Por tanto, la correlación entre el biotipo, la clínica y la susceptibilidad antimicrobiana podría resultar muy útil también en la caracterización de cepas de *E. coli* de origen ambiental que accidentalmente podrían llegar a la comunidad y ser responsables de una enfermedad infecciosa debido al mal uso de aguas contaminadas con estas cepas.

#### LITERATURA CITADA

- Acevedo R. y C. Severiche. 2013. Identificación de Bacterias Resistentes a Di-Bromo-Mercurio aisladas de Sedimentos en Playas de Cartagena de Indias, Caribe Colombiano. *Rev. Av. Inv. Ing.* 10 (2): 73-79.
- Acevedo R.L., C.A. Severiche y J.C. Jaimes 2015. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción + Limpia.* 10 (2): 160-172.
- Ajit S., M. Meyer y A. Boxall 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere.* 65: 725-759.
- Baquero F., J. Martínez, R. Canto. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotech.* 19: 260–265.
- Baüer A.W., W.M. Kirby, J.C. Cherris, M. Truck. 1966. Antibiotic susceptibility testing standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 42: 493.
- Bécares E., J. Villacorta, M. Hijosa, R. Cardona 2011. Bacterias resistentes a antibióticos en el medio ambiente acuático. *Seguir. Med. Amb.* 124: 25-40.
- Boumghar-Bourthai L., P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen, I. Filliol, A. Dhalluin, S.A. Ifrane. *et al.* 2008. Macrolide-resistant *Shigella sonnei*. *Emerg Infect Dis.* 14:1297–1299.
- Campos-Pinilla C., M. Cárdenas, A. Guerrero. 2008. Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en diferentes tipos de agua de la sabana de Bogotá (Colombia). *Universitas Scientiarum.* 13 (2): 103-108.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Outbreaks of multidrug-resistant *Shigella sonnei* gastroenteritis associated with day care centers—Kansas, Kentucky, and Missouri, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 55:1068–1071.
- Chandran A., A. A Mohamed, S. Varguese, K. MonySheeja. 2008. Prevalence of multiple drug resistant *Escherichia coli* serotypes in a tropical estuary, India. *Microbes Environ.* 23 (2):153-158.
- Chiroles S., M.I. González, T. Torres, M. Valdés, I. Domínguez. 2007. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Hig. San. Ambient.* (3): 222-227.
- Chrichton P.B. y D. C. Old. 1992. Numerical index of the discriminatory ability of biotyping and resistotyping for strains of *Escherichia coli*. *Epidemiol. Infect.* 108: 279-286.
- Chrichton, P.B. y D. C. Old. 1982. A biotyping scheme for the subspecific discrimination of *Escherichia coli*. *Med Microbiol.* 15: 233-242.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests, Twelfth edition. Documento M02-A12. 35 (1).
- Croxen M.A. y B. B. Finlay 2013. Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 11 (2):141.
- Díaz S., D. Vidal, S. Herrera-León y S. Sánchez. 2011. Sorbitol-Fermenting, b-Glucuronidase-Positive, Shiga Toxin-Negative *Escherichia coli* O157:H7 in Free-Ranging

- Red Deer in South-Central Spain. *Food Pathogens Dis.* 8 (12): 1313-1315.
- Durso L., P. Gregory, G. Harhay, J. Bono, T. Smith. 2011. Virulence-associated and antibiotic resistance genes of microbial populations in cattle feces analyzed using a metagenomic approach. *J. Microb. Meth.* 84: 278-282.
- Harakeh S., H. Yassine y I. M. El-Fade. 2006. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. *Environ. Pollution.* 143: 269-277.
- Hopkins K.L., R.H. Davies y E.J. Threlfall. 2005. Mechanisms of Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent Developments. *Int J of Antim Agents.* 25(5): 358-373.
- Jalaluddin S., P. de Mol, W. Hemelhof, N. Bauma, D. Bras-seur, P. Hennart, R. E. Lornoyo, B. Rowe, J. P. Butzler. 1998. Isolation and characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAaggEC) by genotypic and phenotypic markers, isolated from diarrheal children in Congo. *Clin Microbiol Infect.* 4(4): 213-219.
- Kaper J.B., J. P. Nataro y H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2): 123-140.
- Korzeniewska E., A. Korzeniewska y M. Harnisz (2013) Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotox Environ Safety.* 91: 96-102.
- López-Pueyo M.J., F. Barcenilla-Gaite, R. Amaya-Villar, J. Garnacho-Montero. 2011. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Med Intensiva.* 35 (1):41-53
- Mosquito S., J. Ruiz, J. L. Bauer, T.J. Ochoa. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociada a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 28 (4):648-56.
- Murakami K., Y. Etoh, S. Ichihara, E. Maeda, S. Takenaka, K. Horikawa, H. Narimatsu, K. Kawano, Y. Kawamura, K. Ito. 2014. Isolation and Characteristics of Shiga Toxin 2f-Producing *Escherichia coli* among Pigeons in Kyushu, Japan. *PLoS ONE.* 9(1): 137
- Nguyen M. C. P., P.L. Woerther, M. Bouvet, A. Andremont, R. Leclercq, A. Canu. 2009. *Escherichia coli* as Reservoir for Macrolide Resistance Genes. *Emerg Infectious Diseases.* 15 (10): 1648-1650.
- Parisien A., B. Alain y J. Zhang. 2008. Novel Alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1-13.
- Pignato S., M. A. Coniglio, G. Faro, F. X. Weill, G. Giammanco. 2009. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *J Water Health.* 7 (3): 251-258.
- Ram S., P. Vajpajee, R. L. Singh, R. Shanker. 2009. Surface water of a perennial river exhibits multi-antimicrobial resistant shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli*. *Ecotox Environ Safe.* 72: 490-495.
- Romeu B., N. Rojas, D. Lugo, C. A. Eslava, E. P. Salazar, A. Navarro. 2009. Evaluación de la presencia de cepas enterovirulentas de *Escherichia coli* en ecosistemas dulceacuícolas de la Ciudad de La Habana. Taller por el Día Mundial del Medio Ambiente. Universidad de La Habana. Editorial Universitaria. ISBN 978-959-16-1083-6.
- Romeu B., P. Salazar, D. Lugo, N. Rojas, C. Eslava. 2012. Evaluación de la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana. *Rev Cub. Med Trop.* 64 (2): 90-95.
- Romeu B., H. Quintero, J. Larrea, N. Rojas, M. Heydrich. 2015. Calidad química y microbiológica de las aguas del río San Juan, Artemisa (Cuba) Hig. Sanid. Ambient. 15 (4): 1367-1374.
- Rua de Cabo A., I.M. Valdivia y E. Vicente. 2006. Conflictos ambientales en la cuenca hidrográfica del río Quibú. *Revista de Geografía da UFC.* 5 (10): 20-28.
- Seiffert S.N., M. Hiltya, V. Perreten y A. Endimiani. 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health?. *Drug Resistance Updates.* 16: 22-45.
- Siew-Leng L., G. F. Anthony, B. K. William, L. Teik-Thye. 2012. Emergency water supply: A review of potential technologies and selection criteria. *Water Res.* 46 (10): 3125-3151.
- Sinclair R.G., J. B. Rose, S. A. Hashsham, C. P. Gerba, C.N. Haas. 2012. Criteria for Selection of Surrogates Used To Study the Fate and Control of Pathogens in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (6): 1969-1977.
- Swaminathan B. y G.M. Matar. 2001. Molecular typing methods: definition, applications, and advantages. En: Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J. Eds. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications.* Washington, DC: America Society for Microbiology; pp. 26-50.
- Van Boeckel T.P. et al. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *PNAS.* 112: 5649-5654
- Varcárcel L., J. Borroto, N. Alberro, J. Griffith, M. Derivet, P. Flores, J. Cuesta, M. Rodríguez, Z. Herrero, A. Rodríguez, J. Domínguez. 2010. Modelación de la calidad del agua en el segmento medio del río Luyanó. *Nucleus.* 47 (4): 16-23.
- World Health Organization (WHO). 2009. Guidelines for the control of shigellosis including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. Disponible en <http://www.who.int/child-adolescent-health/publications/pubemergencies.htm>



Editor para correspondencia: Dra. Annia Hernández