

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE ALIMENTOS Y AGUAS RESIDUALES EN CUMANÁ, VENEZUELA

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM FOOD AND WASTEWATER FROM CUMANÁ, VENEZUELA

ROSA E. MARTÍNEZ, LUZ B. VILLALOBOS

Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Postgrado en Biología Aplicada. Departamento de Biología. Cumaná, Venezuela

RESUMEN

La susceptibilidad a antimicrobianos de importancia clínica fue determinada para cepas de *E. coli*, 30 aisladas de alimentos y 30 de aguas servidas. La identificación se realizó siguiendo la bioquímica convencional y empleando galerías API ID 32 (BioMerieux). Las cepas aisladas fueron sometidas a ensayos de susceptibilidad mediante la técnica estandarizada por Bauer *et al.*, (1966) con los antibióticos: cloranfenicol (30 µg), Ampicilina (10 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), piperacilina (100 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), ácido nalidixico (30 µg), levofloxacina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (23,75 µg+25 µg), y tetraciclina (30 µg). Los resultados de cada antibiótico fueron interpretados según normativas NCCLS, (2005). El 100% y 80 % de las cepas de *E. coli* aisladas de alimentos y aguas de desecho respectivamente mostraron resistencia a los antibióticos en prueba. En ambos grupos la más alta resistencia se observó frente ampicilina.

PALABRAS CLAVE: *E. coli*, antibióticos, alimentos, aguas residuales.

ABSTRACT

Susceptibility to clinically important antimicrobials was determined for 30 *E. coli* strains isolated from food and 30 from wastewater. The identification was carried out following conventional biochemical tests and API 32 E (BioMerieux). Isolated strains underwent antimicrobial susceptibility testing was performed according to Bauer *et al.*, (1966) disc diffusion method, with the following antibiotics: chloramphenicol (30 µg), ampicillin (10 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), piperacillin (100 µg), gentamicin (10 µg), tobramycin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), levofloxacin (5 µg), ciprofloxacin (5 µg), sulphamethoxazole-trimethoprim (23,75 µg+25 µg), and tetracycline (30 µg). Interpretative criteria for each antimicrobial tested were those recommended by NCCLS, (2005). A 100% and an 80% of *E. coli* strains isolated from food and wastewater, respectively, showed resistance to tested antibiotics. In both strain groups the highest resistance was against ampicillin.

KEY WORDS: *E. coli*, Susceptibility, food, wastewater.

INTRODUCCIÓN

La emergencia y diseminación de resistencia antimicrobiana en bacterias ha sido documentada como un serio problema alrededor del mundo (Schroeder *et al.* 2002).

El uso indiscriminado de los antibióticos se ha planteado como una amenaza grave y cada vez mayor para la salud pública. Desde la aparición de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias, no ha sido factible su total erradicación y el objetivo estratégico debe ser la contención

para que se reduzca al mínimo la aparición y diseminación de los microorganismos resistentes (Hisham *et al.*, 2000).

En cualquier estrategia de contención de la resistencia antimicrobiana, la vigilancia es fundamental ya que proporciona los datos necesarios para localizar el problema, controlar su crecimiento y transmisión. Esta vigilancia se ha realizado en la mayoría de los casos con microorganismos aislados de muestras clínicas; sin embargo, se debe estudiar a las bacterias aisladas de muestras de alimentos y muestras ambientales a fin de conocer su posible papel como reservorio de genes codificadores de resistencia y

su capacidad para transferirlos horizontalmente a los microorganismos patógenos humanos (Junco *et al.* 2006).

Escherichia coli como anaerobio facultativo de la flora intestinal de humanos y animales, pueden perfectamente ser causa importante de infecciones del tracto urinario, meningitis neonatal, septicemia nosocomial, trombocitopenia púrpura, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Schroeder *et al.*, 2002). Las opciones terapéuticas contra las afecciones que puede generar este microorganismo, varía dependiendo de la infección. La evolución del tratamiento y la diseminación de la resistencia antimicrobiana, ha favorecido la emergencia y diseminación de cepas de *E. coli* resistentes. Esta resistencia ha sido atribuida al uso excesivo de antibióticos tales como las tetraciclinas, drogas sulfas, penicilinas y antibióticos de amplio espectro, como las cefalosporinas Van de Bogaard y Stobberring, (1999) usadas en el sector hospitalario y que posteriormente, pueden ser diseminados al medio ambiente a partir de las aguas residuales.

El tema de las descargas de las aguas residuales es un punto de discusión que incluye no sólo la salida de bacterias con características patógenas, sino que también plantea un riesgo como fuente de vectores de transmisión de resistencia a antibióticos.

El tratamiento de las aguas residuales por lo general debe ser realizado antes de su llegada al medio ambiente. Una de las opciones que más se maneja para llevar a cabo este proceso, es a través de la implementación de las denominadas plantas de tratamiento o lagunas de estabilización. Sin embargo, se ha demostrado que estos sistemas pueden llegar a convertirse en depósitos de bacterias entéricas que presentan genes de resistencia a antibióticos, así como de aquellas bacterias que pueden servir de recepción de estos genes. Es por esto que a los sistemas de tratamiento, se les ha atribuido una gran importancia ecológica en la transferencia horizontal de genes de resistencia (Aleksun & Levy, 1999).

Con el fin de determinar si existe diferencias en los patrones de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana entre cepas de origen alimentario y de origen ambiental, se planteó el estudio en cepas de *E. coli* aisladas de muestras de alimentos y de aguas residuales tomadas de una planta de tratamiento, durante el período 2005-2006.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el período de un año (2005-2006) se recolectaron: 30 muestras de alimentos (10 de carne molida,

10 de moluscos bivalvos y 10 de salchichas) de distintos puntos de venta del Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná y 30 muestras de aguas residuales procedentes de una planta de tratamiento a base de reactores biológicos aeróbicos ubicada en el estado Anzoátegui.

Aislamiento e Identificación

El aislamiento de las cepas de *E. coli* a partir de alimentos se realizó de acuerdo a las sugerencias del Bacteriological Analytical Manual (BAM, FDA 1992) realizando siembras de los homogenizados en agar MacConkey (DIFCO) y Agar Eosina según Levine (Merck).

El aislamiento de las cepas a partir de aguas residuales, se realizó siguiendo los procedimientos del número más probable (NMP) en caldo lauril sulfato (Merck), caldo verde bilis brillante (Merck), caldo *E. coli* (Himedia) y agar levine (Merck). (APHA, AWWA, WPCF, 1985).

La identificación de las cepas, se llevó a cabo por pruebas bioquímicas convencionales (IMVIC) y por el sistema de identificación automatizada ATB Expression con galerías Rapid ID-32 de BioMerieux-Zhuoz Pharma.

La susceptibilidad a agentes antimicrobianos se determinó por el método de difusión en placa de Bauer *et al.* (1966) utilizando el agar Mueller-Hinton (Himedia) y empleando 12 antimicrobianos que corresponden a las drogas que comúnmente son utilizadas en el tratamiento de infecciones por *E. coli* en humanos a excepción del Acido Nalidixico, de acuerdo a las sugerencias del National Committe for Clinical Laboratory Standard NCCLS (2005). Estos antimicrobianos fueron: cloranfenicol (30 µg), Ampicilina (10 µg), cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), piperacilina (100 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), ácido nalidixico (30 µg), levofloxacina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (23,75 µg+25 µg), y tetraciclina (30 µg) DIFCO (Dispens-O-Disc Suscetibility Test System). Después de 24 horas de incubación a 37° C, las cepas fueron clasificadas como susceptibles, intermedias y resistentes, de acuerdo con los diámetros de los halos de inhibición indicados por el NCCLS (2005). La cepa *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como cepa control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli* aisladas de alimentos y de aguas residuales, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de *E. coli* susceptibles y resistentes a los antibióticos probados por la técnica de difusión en discos, según su procedencia.

ANTIBIÓTICO	PERFIL	ORIGEN DE LAS CEPAS	
		AGUAS SERVIDAS	ALIMENTOS
ÁCIDO NALIDIXICO	Resistente	10 (33,33 %)	4 (13,3%)
	Sensible	20 (66,66 %)	26 (86,66 %)
CEFTAZIDIME	Resistente	1 (3,33 %)	2 (6,6 %)
	Sensible	29 (96,67%)	28 (93,33%)
TOBRAMICINA	Resistente	1 (3,33%)	3 (10%)
	Sensible	29 (96,7%)	27 (90 %)
CLORANFENICOL	Resistente	0 (0%)	6 (20 %)
	Sensible	30 (100 %)	24 (80 %)
CIPROFLOXACINA	Resistente	0 (0%)	1 (3,33 %)
	Sensible	30 (100 %)	29 (96,66 %)
AMPICILINA	Resistente	22 (73,33%)	20 (66,6 %)
	Sensible	8 (26,66%)	10 (33,33 %)
CEFOTAXIME	Resistente	4 (13,33%)	2 (6,66 %)
	Sensible	26 (86,66%)	28 (93,33 %)
GENTAMICINA	Resistente	0 (0%)	2 (6,66 %)
	Sensible	30 (100 %)	28 (93,33 %)
LEVOFLOXACINA	Resistente	0 (0%)	1 (3,33%)
	Sensible	30 (100 %)	29 (96,66 %)
SULFAMETOZAXOLE- TRIMETROPRIM	Resistente	0 (0%)	12 (40 %)
	Sensible	30 (100 %)	18 (60 %)
PIPERACILINA	Resistente	0 (0%)	16 (53,33%)
	Sensible	30 (100 %)	14 (46,66%)
TETRACICLINA	Resistente	7 (23,33 %)	15 (50 %)
	Sensible	23 (76,6%)	15 (50 %)

Las cepas de *E. coli* aisladas de alimentos mostraron un patrón de susceptibilidad más bajo con respecto a las cepas procedentes de aguas residuales, observándose un porcentaje de resistencia cercano al 30% a 9 de los 12 antibióticos probados: trimetoprim-sulfametoxazol, piperacilina, tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, tobramicina, ceftazidime, gentamicina y levofloxacina. Los resultados de resistencia observadas en este estudio, no se alejan de los reportados por Kumar *et al.*, (2005) donde 9 de los 13 antibióticos probados frente *E. coli* aisladas de alimentos marinos, no mostraron efecto inhibitorio en el crecimiento de este microorganismo.

En cambio las cepas de *E. coli* aisladas de aguas residuales, solamente un 2% de ellas mostraron resistencia a los antibióticos en prueba, a excepción de la ampicilina, donde se observó que el 24% de las cepas fueron resistentes al antibiótico; esto coincide con Reinthaler *et al.*, (2003), quienes observaron un patrón de resistencia del 24% a ampicilina en cepas de *E. coli* aisladas de lodos y aguas de una planta de tratamiento.

El hecho de que las aguas residuales no son más que el producto de las actividades antropogénicas, industriales y agrícolas, se esperaba en este estudio encontrar un mayor porcentaje de resistencia antimicrobiana entre cepas de *E. coli* aisladas de esta fuente. Junco *et al.*, (2006) y Urriza *et al.*, (2000) refieren que el vertido de aguas residuales sin tratar va acompañado de altas concentraciones de bacterias y, junto a éstas, los agentes antimicrobianos son también descargados en grandes cantidades, por lo que se espera que el contacto de las bacterias con diferentes antibióticos a concentraciones diversas, origina una presión selectiva entre las poblaciones bacterianas, dando como resultado un incremento de bacterias con resistencia adquirida a drogas antimicrobianas. Este incremento, refiere Hassani *et al.*, (1999), puede ocurrir por la transferencia de factores R entre bacterias, a partir del proceso de conjugación.

La planta de tratamiento de donde se tomaron las muestras de agua, no recibe descargas de aguas de producción agrícola, clínica, veterinaria o de poblaciones aledañas, solo las originadas por el sector industrial donde ella opera, lo que explicaría que las cepas ambientales recolectadas no han tenido hasta el momento intercambio con cepas de otros orígenes, o no se les ha sometido a una presión selectiva por el uso de estos fármacos para adquirir patrones de resistencias mayores.

En el presente estudio se evidenció un mayor porcentaje de resistencia en cepas de origen alimentario. Schoereder

et al. (2002), Reyes *et al.* (2004), reportan que un factor que está influyendo en el desarrollo de resistencia en bacterias zoonóticas de alimentos, y particularmente en las *E. coli*, es el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento en el ganado. Esta práctica produce una inevitable selección de cepas resistentes dentro de la flora comensal del tracto intestinal de animales de crianza que pueden ser fácilmente transferida a otros animales vía oral-fecal, convirtiéndose esta vía en un potencial extremadamente importante para la amplificación de microorganismos resistentes en la población animal (Taele, 2000).

Este hecho puede tener una relevancia insospechada para la salud pública, por la posibilidad de que esta flora resistente colonice a la población humana a través de la cadena alimenticia o mediante exposición ocupacional. Desde la incorporación de los fármacos antimicrobianos como herramienta de crecimiento en el sector animal, se ha observado que ciertos microorganismos incluyendo *E. coli*, presentan resistencia natural a los antibióticos, o bien la adquieren por diversos mecanismos genéticos (Maiden, 1998; Sherley, 2004).

La resistencia antimicrobiana de *E. coli* es de origen diverso, incluyendo las procedentes de alimentos, se ha convertido en un problema mundial emergente. Los laboratorios de microbiología clínica siempre han hecho pruebas de susceptibilidad de los aislamientos de *E. coli* a los agentes antimicrobianos, con el fin de guiar la quimioterapia frente a este patógeno. No obstante, los laboratorios hoy en día tienen una función más amplia, que incluye la vigilancia permanente de los patrones de susceptibilidad para así detectar nuevos patrones de resistencia que pueden tener un efecto obvio en el tratamiento del paciente individual y repercusiones en la comunidad en general (Prado *et al.* 1995; Levy, 1998).

La información local de los laboratorios de microbiología con control de calidad adecuado debe utilizarse para crear programas de educación continua, para quienes utilizan antimicrobianos y para definir políticas de control en su uso. Con la información, se pueden definir pautas de tratamiento empírico, modificar la disponibilidad de fármacos, así como conocer el verdadero impacto de la resistencia bacteriana en la morbilidad y mortalidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSHUN M.; LEVY S. 1999. "The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic insults.

- Trends. Microbiol. 7: 410-413.
- BAUER A.; KIRBY J.; TRUCK M. 1966. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Pathol. 45: 493-496.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION USA. 1992. Bacteriological Analytical Manual (BAM). 7ma ed. Washington, D.C.
- HASSANI L.; RAFOUK L.; ALLA A. 1999. Short Communication: Antibiotic resistance among faecal coliform bacteria isolated from wastewater before and after treatment by an experimental sand filter. World.J.Microbiol.Biotech. 15: 317-319.
- HISHAM Z.; FINCH R. 2000. Resistencia antibiótica en el año 2000. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 19: 91 – 92.
- JUNCO R.; SUAREZ M.; WENG Z.; CHIROLES S.; GONZALEZ M.; DIAZ O.; RODRÍGUEZ M. 2006. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. Hig. Sanid. Ambient. 6: 150-159.
- KUMAR H.; PARVATHI A.; KARUNASAGAR I.; KARUNASAGAR I. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. World .J. Microbiol. Biotech. 21: 619-623.
- LEVI, S. 1998. The challenge of antibiotics resistance. Sci. Am.; 11: 32-39.
- MAIDEN M. 1998. Horizontal genetics exchange, evolution and spread of antibiotic resistance in bacteria. Clin. Infect. Dis. 27(Suppl 1):S12-S20.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test- ten Informational supplement: approved standard M100-S10 (M2). Wayne, P.A.
- PRADO V.; BASUALDO W.; ARELLANO C.; MARTÍNEZ D.; LEVINE M. 1995. Susceptibilidad *in vitro* de *Escherichia coli* enterohemorrágica frente a 11 antimicrobianos. Rev. Méd. Chile. 123: 1085-90.
- REINTHALER F.; POSCH F.; FEIERL G.; WÜST G.; HAAS D.; RUCKENBAUER G. MASCHER F.; MARTH E. 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. Water Research. 37 (8): 1685-1690.
- REYES R.; NAVARRO R.; REYES B.; SANCHEZ S. 2001. Actualización en infecciones del tracto urinario. Antib. Infecc. 8: 147-152.
- SHERLEY M.; GORDON D.; COLLIGNON P. 2004. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. Microbiology. (150): 1539-46.
- SCHROEDER C.; ZHAO C. 2002. Antimicrobial resistance of *E. coli* O157 isolated from human, cattle, swine and food. App. Environ. Microbiol. 68:576 - 581.
- TEALE C. 2002. Antimicrobial resistance and the food chain. J.Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 92:85s-89s.
- URRIZA M.; CAPDEPUY M.; ARPIN C.; RAYMOND N.; CAUMETTTE P.; QUENTIN C. 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Appl. Envir.Microbiol. 66(1): 125-132.
- VAN DE BOGAARD A., STOBBERING E. 1999. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. Drugs. 58: 589-607.