

Detección de β -lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana

Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from freshwater ecosystems in Havana

Patricia Barroso González¹ <https://orcid.org/0000-0001-6500-3534>

Laura Bocourt Pérez¹ <https://orcid.org/0000-0003-4136-812X>

Daysi Lugo Moya¹ <https://orcid.org/0000-0002-8401-1430>

Beatriz Romeu Álvarez^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-4265-290X>

¹Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Departamento de Microbiología y Virología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: bromeu@fbio.uh.cu, beatrizromeu@gmail.com

RESUMEN

Introducción: Las cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido son patógenos multirresistentes y una de las bacterias que más contribuyen con la resistencia antibiótica bacteriana en la clínica. Sin embargo, se aíslan cada vez con más frecuencia de ambientes naturales, tales como los ecosistemas acuáticos en los cuales se emplea como un indicador de contaminación fecal.

Objetivo: Evaluar la susceptibilidad a los antibióticos y la producción de enzimas β -lactamasas de espectro extendido de aislados de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana.

Métodos: Se analizaron 43 aislados de *E. coli* provenientes de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó de La Habana. Se determinó la susceptibilidad a 18 antibióticos y la producción fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido según las normas del Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico. La detección molecular de las enzimas se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa. Se calculó el índice de multirresistencia a los antibióticos y los patrones de resistencia de cada aislado de *E. coli*- β -lactamasas de espectro extendido.

Resultados: El 65 % de los aislados de *E. coli* fueron resistentes al menos a un antibiótico y el 35 % fueron sensibles a todos los antibióticos. El fenotipo β -lactamasas de espectro extendido fue detectado en siete aislados; de estos, cuatro fueron portadores del gen *bla*_{CTX-M-1} y tres presentaron *bla*_{TEM}. El 37 % de los aislados de *E. coli* mostraron valores de índices de multirresistencia a los antibióticos menores que 0,22; el 16 % de 0,22; el 9,3 % mayor que 0,5; y el 5 % mayor que 0,7. Los aislados de *E. coli*-BLEE mostraron corresponsión a las familias de las tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos y macrólidos.

Conclusiones: La presencia de aislados ambientales multirresistentes de *E. coli* productores de β -lactamasas de espectro extendido en ecosistemas dulceacuícolas de La Habana destaca la necesidad de implementar estrategias de control para prevenir la diseminación de estos aislados en los ambientes naturales.

Palabras clave: *E. coli*; β -lactamasas de espectro extendido; BLEE; ecosistemas acuáticos.

ABSTRACT

Introduction: Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains are multiresistant pathogens and one of the bacteria contributing most greatly to bacterial antibiotic resistance in clinical practice. However, they are increasingly isolated from natural environments, such as aquatic ecosystems, where they are used as fecal pollution indicators.

Objective: Evaluate antibiotic susceptibility and extended-spectrum β -lactamase enzyme production in *Escherichia coli* isolates from freshwater ecosystems in Havana.

Methods: An analysis was conducted of 43 *E. coli* isolates from the rivers Almendares, Quibú and Luyanó in Havana. Determination was made of susceptibility to 18 antibiotics and phenotypic production of extended-spectrum β -lactamasas according to standards from the Clinical and Laboratory Standards Institute. Molecular detection of the enzymes was performed by polymerase chain reaction. Estimation was carried out of the antibiotic multiresistance index and the resistance patterns of each extended-spectrum *E. coli* β -lactamase isolate.

Results: Of the *E. coli* isolates studied, 65% were resistant to at least one antibiotic, whereas 35% were sensitive to all antibiotics. The extended-spectrum β -lactamase phenotype was detected in seven isolates, of which four were carriers of the gene *bla*_{CTX-M-1} and three contained *bla*_{TEM}. 37% of the *E. coli* isolates displayed antibiotic multiresistance index values below 0.22, 16% of 0.22, 9.3% above 0.5 and 5% above 0.7. ESBL *E. coli* isolates displayed co-resistance to the families tetracyclines, quinolones, aminoglycosides and macrolides.

Conclusions: The presence of multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing environmental *E. coli* isolates in Havana freshwater ecosystems highlights the need to implement control strategies aimed at preventing the spread of these isolates in natural environments.

Keywords: *E. coli*; extended-spectrum β -lactamasas; ESBL; aquatic ecosystems.

Recibido: 23/06/2020

Aceptado: 20/12/2020

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos constituye un serio problema a nivel mundial. El uso indiscriminado de antibióticos en seres humanos, animales y la agricultura, unido al incremento de la población mundial, ejerce fuertes presiones sobre las comunidades de bacterias ambientales y contribuye a la difusión de sus genes de resistencia en los ambientes naturales.^(1,2) Esta situación ha facilitado la diseminación de bacterias gramnegativas multirresistentes, entre ellas bacterias productoras de BLEE.^(3,4) Los antibióticos son considerados contaminantes emergentes en los ecosistemas acuáticos y la mitad de los que consumen los seres humanos y los animales se excreta en forma activa a través de la orina y las heces, por lo que estos compuestos pueden llegar a acumularse en todas las matrices ambientales, principalmente las aguas superficiales, subterráneas, suelos y sedimentos.⁽⁵⁾

El agua constituye una importante ruta por la cual se introducen genes de resistencia bacterianos en los ecosistemas naturales, en donde las bacterias patógenas y no patógenas pueden servir como reservorio de genes de resistencia.⁽⁶⁾ *Escherichia coli*, miembro del grupo de los coliformes, es una especie bacteriana de la que se describen tanto cepas patógenas como no patógenas, por lo que es también utilizada como un indicador de la contaminación fecal en los ecosistemas acuáticos.⁽⁷⁾ Como patógeno, puede ser responsable de meningitis neonatal, infecciones urinarias recurrentes, septicemia y gastroenteritis, por lo que su presencia puede asociarse directamente al riesgo sanitario del empleo de aguas contaminadas con este microorganismo.⁽⁸⁾ En los últimos años, *E. coli* ha mostrado una elevada resistencia antibiótica tanto en cepas de origen clínico como ambiental, especialmente frente a los β -lactámicos.⁽⁹⁾

Los β -lactámicos constituyen una familia numerosa y muy utilizada en la práctica clínica. Aunque la resistencia a esta familia está definida por distintos mecanismos, la producción de enzimas β -lactamasas es el principal. Las BLEE, constituyen una de las más difundidas entre las enterobacterias y particularmente en *E. coli*. La mayoría de las BLEE deriva de las β -lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Sin embargo, otra familia de BLEE, la CTX-M, ha iniciado una rápida expansión, aislándose en la actualidad con mayor frecuencia en diversas áreas epidemiológicas y en ambientes naturales.⁽¹⁰⁾

El aumento mundial de las enterobacterias resistentes a los antibióticos en los ambientes acuáticos hace que sea imperativo la vigilancia de la presencia y distribución de estas bacterias y de genes de resistencia procedentes de la clínica al medio ambiente.⁽¹¹⁾ En Cuba, se han realizado estudios de la resistencia de *E. coli* y sus mecanismos en la clínica;⁽¹²⁾ sin embargo, es poco lo que se sabe de la participación e influencia de los ecosistemas dulceacuícolas en la resistencia antibiótica y la diseminación de los mecanismos de resistencia de esta bacteria en esos ambientes. Por otra parte, los ecosistemas dulceacuícolas de La Habana están sometidos a un proceso antrópico acelerado, situación que ha provocado el

deterioro de la calidad de sus aguas y la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos.⁽¹³⁾ El objetivo del presente trabajo fue evaluar la susceptibilidad antimicrobiana y la producción de enzimas BLEE de aislados de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana.

Métodos

Aislamientos bacterianos

Se realizó un estudio descriptivo-longitudinal en el que se estudiaron un total de 43 aislados de *E. coli* procedentes de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó de La Habana. Los aislamientos se realizaron entre septiembre de 2017 a enero de 2018 a partir de muestras de agua tomadas en diez estaciones de muestreo ubicadas en las zonas urbanas de los ríos capitalinos mencionados anteriormente. Los aislados evaluados forman parte la colección microbiana de la Facultad de Biología de La Universidad de La Habana.

Prueba de susceptibilidad a los antibióticos

Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se llevaron a cabo mediante el método de difusión en disco descrito por Bauer-Kirby de acuerdo con las recomendaciones del Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico, 2020 (CLSI).⁽¹⁴⁾ Se ensayaron los antibióticos ampicilina (10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (30/10 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), aztreonam (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefepime (30 µg), piperacilina-tazobactam (100/10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg) de la casa comercial Liofilchem, Italia. También se ensayaron contra antibióticos no β-lactámicos, incluyendo trimetropim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), azitromicina (15 µg) y tetraciclina (30 µg) de la casa comercial Liofilchem, Italia. Se emplearon como cepas control *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Se calculó el índice de multiresistencia a los antibióticos (MAR) de acuerdo con los criterios establecidos por Kruperman.⁽¹⁵⁾ Se consideraron cepas multiresistentes aquellas que presentaron un índice MAR mayor que 0,5.⁽¹⁵⁾

Detección fenotípica de BLEE

Se realizó en todos los aislamientos que mostraron resistencia al menos a una de las cefalosporinas de tercera (cefotaxima (30 µg)/ceftazidima (30 µg)/ceftriaxona (30 µg)) y cuarta generaciones (cefepime (30 µg)) y el monobactámico aztreonam (30 µg), utilizando la prueba de discos combinados con inhibidor (cefotaxima (30 µg)-ácido clavulánico(10 µg)/ceftazidima (30 µg)-ácido clavulánico(10 µg)) de la casa comercial Liofilchem, Italia, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI,

2020.⁽¹⁵⁾ Se incubó a 37 ± 1 °C durante 18-24 h para realizar la lectura. La potenciación de la actividad de la cefalosporina en presencia del inhibidor indicó la producción de BLEE. Se midieron en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completa con un pie de rey. Las cepas control utilizadas fueron *E. coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Además, se determinaron los patrones de resistencia de cada aislado ambiental mediante la lectura interpretada del antibiograma.⁽¹⁶⁾

Detección molecular de enzimas BLEE

Todos los aislados de *E. coli* caracterizados fenotípicamente como positivos para BLEE fueron analizados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se empleó el kit QIAGEN Multiplex PCR Master Mix. Para determinar la presencia de los tipos de genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} se utilizaron cebadores y condiciones descritas previamente⁽¹⁷⁾ (Tabla 1). El producto de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa 2 %, se tiñó con el fluorocromo SYBR (Invitrogen) (10 000X in DMSO, Lot 1942039) y se examinó a través de un transiluminador de luz ultravioleta (UV). La corrida electroforética se llevó a cabo a 100 V con solución de Tris Borato EDTA, pH= 8 (TBE). El patrón de peso molecular utilizado fue 100 pb Smart Ladder SF(Eurogentec).

Tabla 1 - Cebadores utilizados para identificar el genotipo BLEE de los aislados ambientales de *E. coli* productores de BLEE

Gen	Secuencia 5´-3´	Tamaño amplificado (bp)	Condiciones de amplificación
CTX-M-1	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688	10 min 95 °C; 30x (40 s 95 °C, 40 s 60 °C, 60 s 72 °C); 7 min 72 °C
	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
CTX-M-2	CGTTAACGGCACGATGAC	404	
	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
CTX-M-9	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561	
	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA		
Familia TEM	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800	
	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
Familia SHV	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713	
	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
Familia OXA	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564	
	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		

Procesamiento estadístico

Los resultados obtenidos se procesaron mediante los programas Microsoft Excel 2013 y Microsoft Access 2013. Las medidas estadísticas que se utilizaron fueron las descriptivas como el porcentaje y la frecuencia para el análisis de los resultados.

Resultados

De los 43 aislados de *E. coli* estudiados, el 65 % fueron resistentes al menos a un antibiótico y el 35 % fueron sensibles a todos los antibióticos probados. Los β -lactámicos fueron la familia a la que presentaron mayor resistencia los aislados de *E. coli* y la de los fenicoles mayor susceptibilidad. Por otro lado, frente a los macrólidos y los aminoglucósidos mostraron el mismo porcentaje de resistencia (Fig. 1).

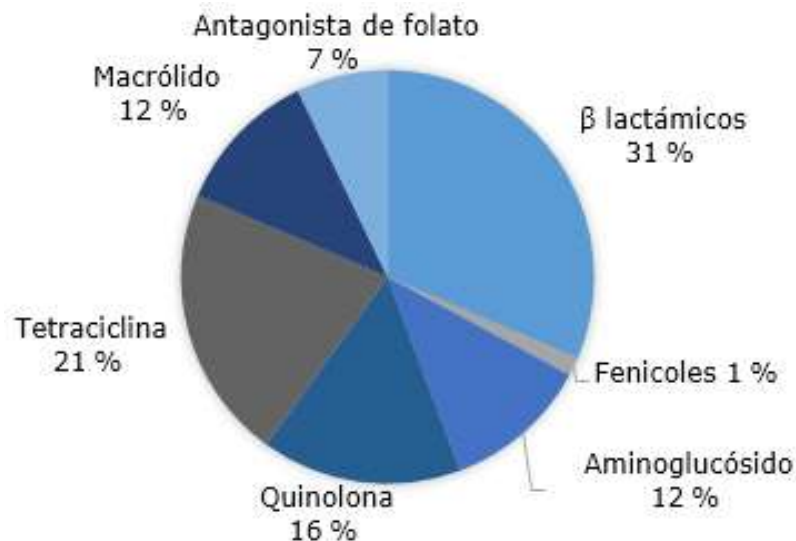
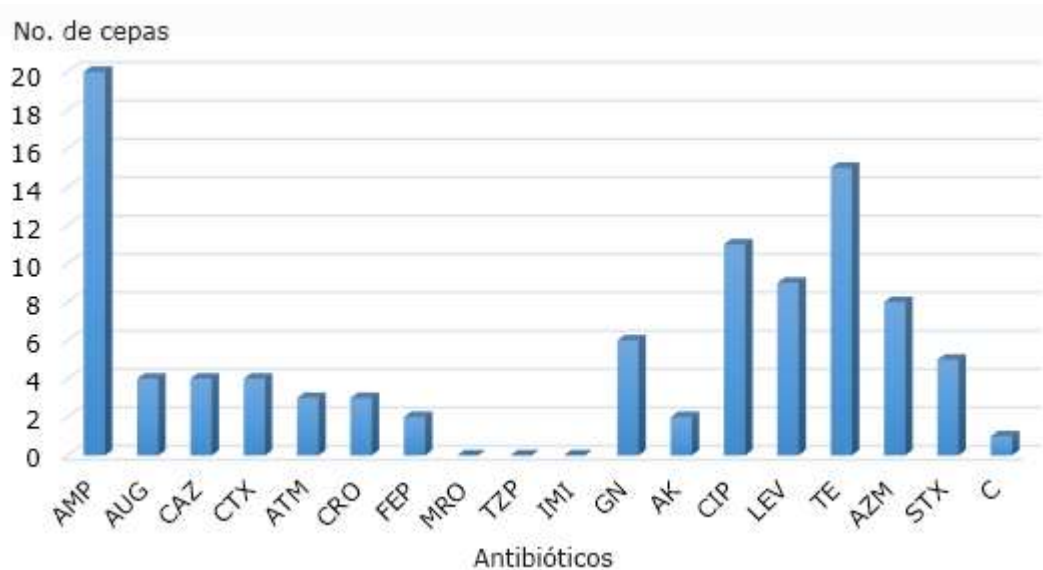


Fig. 1 - Porcentajes de resistencia por familia de antibióticos de los aislamientos de *E. coli* aislados de los ríos de La Habana.

De los 15 aislados que fueron sensibles a todos los antibióticos, el 47 % de ellos presentaron una sensibilidad disminuida para uno de los 18 antibióticos analizados. Los aislados de *E. coli* exhibieron una mayor resistencia a la ampicilina (47 %), sin embargo, frente al resto de los β -lactámicos evaluados no presentaron valores de resistencia mayores del 9 %. Ninguno de los aislados mostró resistencia a imipenem, meropenem y piperacilina-tazobactam que también pertenecen a esta familia; aunque se encontraron dos aislados que presentaron susceptibilidad disminuida para piperacilina-tazobactam (Fig. 2).

Los aislados de *E. coli* evaluados mostraron elevada resistencia al antibiótico tetraciclina (35 %) seguida por la ciprofloxacina (25 %). Sin embargo, frente a los antibióticos cloranfenicol, amikacina y cefepime presentaron una baja resistencia con porcentajes por debajo del 4 %. Aunque los macrólidos no mostraron una elevada resistencia microbiana cabe destacar que se encontraron ocho aislados resistentes a la azitromicina, antibiótico de esta familia que se evaluó, provenientes de los tres ecosistemas evaluados (Fig. 2).



AMP: ampicilina, AUG: amoxicilina, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, ATM: aztreonam, CRO: ceftriazona, FEP: cefepime, MRO: meropenem, TZP: piperacilina-tazobactam, IMI: imipenem, GN: gentamicina, AK: amikacina, CIP: ciprofloxacina, LEV: levofloxacina, TE: tetraciclina, AZM: azitromicina, STX: trimetropim-sulfametoxazol, C: cloranfenicol.

Fig. 2 - Resistencia frente a los 18 antibióticos evaluados de los aislamientos de *E. coli* aislados de los ríos de La Habana.

El 37 % de los aislados de *E. coli* estudiados mostraron valores de índices MAR menores que 0,22. Sin embargo, el 16 % de los aislados tuvo un valor de MAR de 0,22 el cual se considera un valor intermedio, pero que a largo plazo puede transformarse en un valor de alto riesgo. El 9,3 % de los aislados mostraron resistencia a 10 de los 18 antibióticos probados, lo cual da lugar a un índice mayor que 0,5 que es considerado de alto riesgo (multirresistencia); y el 5 % mayor que 0,7 lo cual representa una resistencia a 13 de los 18 antibióticos usados lo que se considera un riesgo extremo (Fig. 3).

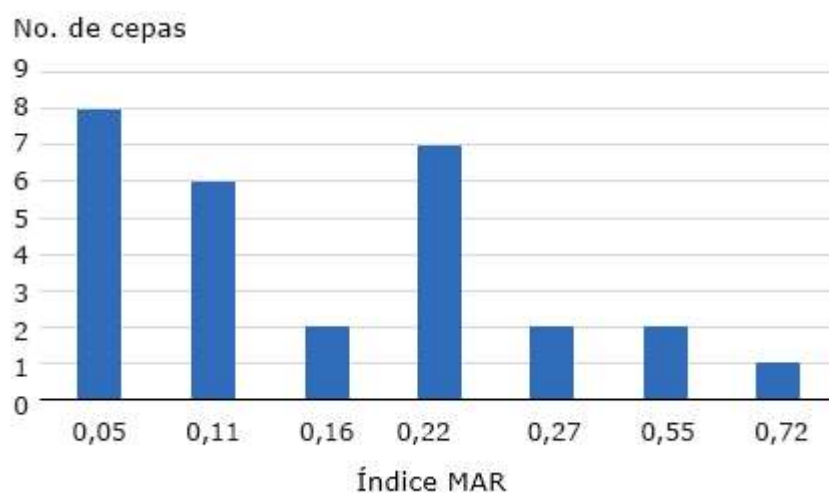


Fig. 3 - Valores del índice de multirresistencia a los antibióticos (MAR) de los aislados de *E. coli* evaluados.

De acuerdo con la interpretación del antibiograma realizado, el fenotipo BLEE fue detectado en el 16,3 % de los 43 aislamientos ambientales de *E. coli* que fueron analizados teniendo en cuenta el patrón de resistencia frente a los antibióticos β-lactámicos evaluados, los cuales se describen en la tabla 2. Tres de los aislados provenían del río Almendares, uno del río Luyanó y tres del río Quibú. El número de antibióticos a los cuales los aislados mostraron resistencia varió de 8 a 13 para un total de cinco patrones de resistencia diferentes. De los patrones de resistencia, tres (60 %) se detectaron una única vez en la colección, mientras dos (40 %) se presentaron en al menos dos aislados (Tabla 2).

Todos los aislados de *E. coli*-BLEE resultaron resistentes a cefotaxima, aztreonam y ceftazidima 7 (100 %), mientras 5 (71,4 %), 7 (100 %) y 6 (85,7 %) fueron resistentes a ceftriaxona, ampicilina y amoxicilina/ácido clavulánico, respectivamente. Se observó co-resistencia para tetraciclina 5 (71,4 %), gentamicina 5 (71,4 %), trimetoprim/sulfametoxazol 6 (85,7 %), ciprofloxacina y levofloxacina 5 (71,4 %) y azitromicina 5 (71,4 %). Todos los aislados fueron completamente susceptibles al imipenem y meropenem (Tabla 2).

Tabla 2 - Patrones de resistencia de los aislamientos ambientales de *E. coli*-BLEE aislados

Patrón de resistencia	No. aislados
ATM-CAZ-CTX-CRO-AMP-AUG-SXT-AK-CN-LEV-CIP-TE-AZM	2
ATM-CAZ-CTX-CRO-AMP-AUG-SXT-TE-LEV-CIP	2
ATM-CAZ-CTX-AMP-TE-AK-CN-LEV-CIP-AZM	1
ATM-CAZ-CTX-CRO-AMP-AUG-AK-CN-SXT-AZM	1
ATM-CAZ-CTX-AMP-AK-CN-SXT-AZM	1

AMP: ampicilina, AUG: amoxicilina, AZM: azitromicina, MRO: meropenem, CIP: ciprofloxacina, CRO: ceftriaxona, IMI: imipenem, LEV: levofloxacina, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, GN: gentamicina, TE tetraciclina, CTX: cefotaxima, TZP: piperacilina-tazobactam, AK: amikacina, ATM: aztreonam, STX: trimetoprim-sulfametoxazol, C: cloranfenicol.

Entre los aislados de *E. coli*-BLEE se encontró que el gen *bla*_{CTX-M-1} es el más prevalente (4; 57,1 %) seguido de *bla*_{TEM} (3; 42,8 %), no se obtuvieron amplificadas de los genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{OXA} y *bla*_{SHV}. El análisis de los productos de PCR no mostró coexistencia de enzimas BLEE entre los aislados de *E. coli* estudiados.

Discusión

En Cuba, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha analizado el problema de la resistencia antibiótica en ambientes clínicos.⁽¹⁸⁾ Sin embargo, el presente trabajo se realizó en ambientes dulceacuícolas y sus resultados ponen de manifiesto la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos también en estos ambientes.

Aunque en Cuba los antibióticos requieren de prescripción médica por lo que la automedicación es menor con respecto a otros países del mundo, en la atención primaria los tratamientos son generalmente empíricos por parte del personal

médico, lo que trae como consecuencia que hasta después de varios intentos fallidos de tratamiento es que se realiza un correcto antibiograma para un tratamiento específico.⁽¹⁹⁾ Por lo tanto, los antibióticos más usados en primera línea, los β -lactámicos, han sido los que mayor resistencia muestran en los últimos años,⁽¹⁹⁾ lo que también se ve reflejado en los resultados obtenidos en la presente investigación.

Más del 60 % de los aislados ambientales analizados presentaron resistencia a los antibióticos, lo que tiene una repercusión clínica y ambiental. La llegada de estas bacterias resistentes a los ecosistemas acuáticos está directamente relacionada con las aguas residuales que se han desechado directamente a los ríos de la ciudad sin ser previamente tratadas, las cuales constituyen fuentes de bacterias y de genes de resistencia a antibióticos que se liberan en el medio ambiente.^(7,13)

Dichas aguas residuales provienen no solo de los hogares e industrias sino también de algunos hospitales, lo que contribuiría con la presencia de bacterias resistentes en los ríos. Se ha demostrado que una fuerte presión selectiva debido a la contaminación antropogénica, conlleva a la transferencia de genes que pueden propagar la resistencia de forma eficiente entre las poblaciones bacterianas.⁽²⁰⁾

Del mismo modo, los genes de resistencia a antibióticos que estaban presentes de forma natural en los cromosomas de las bacterias del medio ambiente, ahora están presentes en plásmidos que se pueden transferir a los patógenos humanos.⁽²⁰⁾ Se ha puesto de manifiesto que el contacto de las bacterias de la microbiota humana asociada con microorganismos ambientales en plantas de aguas residuales o en los ecosistemas naturales es una característica importante para entender la aparición de nuevos mecanismos de resistencia en patógenos humanos. Estudios en ecosistemas marinos indican que más del 90 % de las cepas bacterianas marinas son resistentes a más de un antibiótico, y 20 % son resistentes al menos a cinco.⁽²¹⁾

Una de las mayores preocupaciones clínicas de la resistencia antibiótica es la búsqueda de terapias alternativas a las infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos. La creciente multiresistencia es un problema no solo en Cuba sino también en el mundo. En un estudio en Etiopía con muestras de agua hospitalarias así como del río en donde era liberada esta agua se encontraron cepas de *E. coli* resistentes a 11 de los 12 antibióticos probados, lo que demostró que la llegada de este tipo de agua a los ríos promueve el aumento de la resistencia a los antibióticos⁽²²⁾ e índices MAR mayores que 0,75. En México, en un estudio similar se encontró un índice MAR mayor que 0,5 en el 15 % de las cepas aisladas y se atribuyó a la acción antropogénica ejercida sobre el río.⁽²³⁾

Por otra parte, el presente estudio muestra la presencia de aislados de *E. coli*-BLEE en ecosistemas dulceacuícolas de La Habana con altas tasas de resistencia a antibióticos utilizados como primera opción terapéutica en infecciones causadas por este microorganismo. De las β -lactamasas detectadas en las cepas ambientales evaluadas, las BLEE se consideran las más frecuentes en cepas aisladas del ambiente.⁽²⁴⁾ A nivel mundial se han realizado estudios para evaluar

la presencia de bacterias productoras de estas enzimas en aguas de ríos, lagos y aguas residuales.⁽²⁵⁾

En la actualidad, las BLEE constituyen un problema terapéutico y epidemiológico, en el caso de las infecciones causadas por enterobacterias, pues las bacterias productoras de este tipo de β -lactamasas son resistentes a las penicilinas, las cefalosporinas y el aztreonam, y del 30 % al 60 % de ellas también a los β -lactámicos asociados a inhibidores de β -lactamasas; además, un porcentaje alto, por corresponsencia, son también resistentes a las quinolonas, los aminoglucósidos, las tetraciclinas y el cotrimoxazol,⁽²⁶⁾ comportamiento que presentaron los aislados BLEE positivos evaluados en la presente investigación.

Aunque los macrólidos no mostraron una elevada resistencia microbiana, cabe destacar la resistencia encontrada frente a la azitromicina. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de este antibiótico no está correctamente definida para *E. coli*, es por ello que en los últimos años ha sido el centro de atención de muchos estudios.⁽²⁷⁾ La resistencia a este antibiótico se debe generalmente a un gen presente en plásmidos móviles de las enterobacterias que crea una bomba de eflujo para la expulsión de este antibiótico. La azitromicina se usa para el tratamiento de *E. coli* desde hace pocos años, sin embargo, se ha estudiado su creciente resistencia en un corto período de tiempo y se ha detectado tanto en cepas patógenas como no patógenas.⁽²⁷⁾

Los resultados de la presencia de diferentes tipos de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV} en aislados *E. coli*-BLEE es muy variable entre diferentes ciudades, países y regiones. En el presente estudio se encontró que la mayoría de los aislados presentaron el gen *bla*_{CTX-M} apoyando el reconocimiento de que la enzima CTX-M es el tipo de BLEE más prevalente en el mundo. En estudios previos se había informado la enzima TEM como la más prevalente en los aislados clínicos de *E. coli* causantes de infecciones intrahospitalarias. Sin embargo, nuestro país al igual que en otras regiones del mundo como Europa del Este, América del Sur, Japón y la India, el gen *bla*_{CTX-M} ha desplazado a otros genes que codifican para otras enzimas BLEE.^(18,28)

La presencia de cepas productoras de estas enzimas en los ríos evaluados podría estar dado por el tipo de fuentes contaminantes que impactan estos ecosistemas. En un estudio realizado previamente en el 2011⁽²⁹⁾ en el río Almendares sobre la presencia de genes de resistencia (ARG), se encontraron correlaciones significativas ($p < 0,05$) en los sedimentos con respecto a los ARG, especialmente para las tetraciclinas y β -lactámicos, así como para ampicilina en la columna de agua en el río.

En los ambientes naturales, la detección oportuna de una cepa productora de BLEE es importante, pues si una comunidad de bacterias ambientales resistentes a los antibióticos incrementa su frecuencia es probable que permanezcan allí por mucho tiempo. Estos resultados subrayan la necesidad de estrategias para reducir el desarrollo de resistencia y así prolongar la vida útil de nuestros antibióticos disponibles.

Conclusiones

La presencia de aislados multirresistentes de *E. coli* productores de BLEE, con una prevalencia del gen *bla*_{CTX-M} en ecosistemas dulceacuícolas de La Habana pone de manifiesto el riesgo potencial para la salud que representa el uso de las aguas de estos ríos e indican la necesidad de implementar estrategias de control para prevenir la diseminación de estos aislados.

Referencias bibliográficas

1. Marti E, Jofre J, Balcazar JL. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. PLoS One. 2013;8(10).
2. Haberecht HB, Nealon NJ, Gilliland JR, Holder AV, Runyan C, Opiel RC, et al. Antimicrobial-Resistant *E. coli* from environmental waters in northern Colorado. J Environ Public Health. 2019;1(1):1-13.
3. Perry JA, Wright GD. The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. Front Microbiol. 2013;4:1-6.
4. Karkman A, Pärnänen K, Larsson DGJ. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. Nat Commun. 2019;10:1-8.
5. Acevedo RL, Severiche CA, Jaimes J. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. Producción + Limpia. 2015;10 (2):160-72.
6. Storteboom H, Davi S, Crimi B, Pruden A. Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. Environ Sci Technol. 2010;44:1947-53.
7. Leclerc H, Mossel DA, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annu Rev Microbiol. 2001;55:201-34
8. Rojas M, Monteiro R, Pizza M, Desvaux M, Rosini R. Intestinal pathogenic *E. coli*: Insights for vaccine development. Front Microbiol. 2018;9(440):1-10.
9. Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *E. coli* in animals and its impact for public health. Front Microbiol. 2013;4.
10. Dantas J, Neto HM. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production - a threat around the world. Heliyon. 2020;6:1-20.
11. Baquero F, Martinez J, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion Biotech. 2008;19(3):260-65.

12. González L, Ramos A, Nadal L, Morffi J, Hernández E, Alvarez AB, et al. Identificación fenotípica y molecular de β -lactamasas de espectro extendido TEM y SHV producidas por *E. coli* y *Klebsiella* spp. aislados clínicos en hospitales. Rev Cubana Med Trop. 2007;59(1):52-8.
13. Romeu B, Salazar P, Lugo D, Rojas NM, Eslava CA. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *E. coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas. Rev Cubana Med Trop. 2012;64:132-41.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement M100-S17. 2020;27(1).
15. Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *E. coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Appl Environ Microbiol. 1983;46(1):165-70.
16. Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(6):375-85.
17. Franz E, Veenman C, van Hoek A, Husman A, Blaak H. Pathogenic *E. coli* producing Extended-Spectrum β -Lactamases isolated from surface water and wastewater. Sci Rep. 2015;5:1-9.
18. González L, González MA, Zayas A, Curbelo M, Garrido Y. Relación genética de aislados clínicos de *E. coli* productores de β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en un hospital de la Habana, Cuba. Rev CENIC Ciencias Biológicas. 2017;48(3):107-12.
19. Pereira E, Aboy L, Pulido JC. Uso de antimicrobianos en el servicio de medicina. Hospital General Docente Dr. Enrique Cabrera. Rev Habanera Ciencias Médicas. 2016;15(3):363-76.
20. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *E. coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011;28(4):648-56.
21. Wellington E, Boxall B, Cross P, Williams P. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. T Lan Infec Dis. 2013;13:155-65.
22. Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. Infect Drug Resist. 2014;7:167-76.
23. Castañeda Y, López P, Figueroa R, Fuentes J. Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la Isla de Margarita, Venezuela. Saber. 2009;21:12-9.

24. Tesfaye H, Alemayehu H, Desta AF, Eguale T. Antimicrobial susceptibility profile of selected Enterobacteriaceae in wastewater samples from health facilities, abattoir, downstream rivers and a WWTP in Addis Ababa, Ethiopia. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(134):1-11.
25. Delgado MCE, Tamez P, Gomez R, Zavala FJ, Eroza G, Nevaréz GV, et al. Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Surface Water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(6):597-606.
26. Tacao M, Moura A, Correia A, Henriques I. Co-resistance to different classes of antibiotic among ESBL-producers from aquatic systems. *Water Res*. 2013;47(1):100-7.
27. Gomes C, Ruiz-Roldán L, Mateu J, Ochoa TJ, Ruiz J. Azithromycin resistance levels and mechanisms in *E. coli*. *Sci Rep*. 2019;9:6089.
28. Anastasi EM, Matthews B, Stratton HM, Katouli M. Pathogenic *E. coli* found in sewage treatment plants and environmental waters. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:5536-41.
29. Graham DM, Olivares S, Knapp CW, Lima L, Werner D, Bowen E. Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares River near Havana, Cuba. *Environ Sci Technol*. 2011;45:418-24.

Conflicto de intereses

No se declara conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Patricia Barroso González: Concepción, diseño, trabajo experimental en el laboratorio, análisis e interpretación de los datos y escritura del artículo.

Laura Bocourt Pérez: Trabajo experimental en el laboratorio, análisis e interpretación de los datos.

Daysi Lugo Moya: Preparación de materiales en el laboratorio.

Beatriz Romeu Álvarez: Concepción, diseño, análisis e interpretación de los datos, revisión crítica del contenido intelectual y escritura del artículo.

Financiación

International Foundation for Science (IFS), proyecto IFS 5080-2 con el cual se sustentó la parte experimental de esta investigación.