

LA ANTIBIOTICO-RESISTENCIA DE BACTERIAS ACUÁTICAS ABORDADA DESDE LA UNIVERSIDAD COMO PROBLEMA MEDIOAMBIENTAL

Autores:

Yunier Arpajón Peña¹, Rebeca Doval García², Nidia Rojas Hernández³,

1 Profesor Asistente, Maestro en Microbiología

2 Profesora Asistente, Maestra en Enfermedades Infecciosas

3 Profesora Auxiliar y Consultante, Investigadora Titular, Doctora en Ciencias Biológicas

RESUMEN

Introducción: La Universidad actual tiene, además de su papel docente, una posición privilegiada en cuanto a la protección del medio ambiente mediante la difusión de los resultados de sus investigaciones. Uno de los problemas medioambientales, y por ende de salud, que más preocupa a los investigadores en la actualidad es la resistencia a los antibióticos de bacterias que habitan los ecosistemas acuáticos. **Objetivo:** Contribuir al conocimiento sobre la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas cubanos, utilizando como referente antibiotipos obtenidos del río Almendares. **Materiales y Métodos:** Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de 65 aislados del río Almendares por el método de Bauer- Kirby. Los discos de antibióticos fueron suministrados por la compañía BioMerieux[®] SA, Francia y las lecturas fueron realizadas teniendo en los catálogos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Resultados:** Se obtuvieron aislados resistentes a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, un aislado de *Escherichia coli* fue resistente a nueve

antibióticos distintos, mientras que fueron también multirresistentes aislados de *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae*. **Conclusiones:** Estos resultados son aplicables como una herramienta pedagógica en el desarrollo de una conciencia ambientalista sobre la importancia de la presencia de bacterias resistentes y multirresistentes a antibióticos en ecosistemas dulceacuícolas.

PALABRAS CLAVE: Salud ambiental, Ecosistemas acuáticos, Susceptibilidad antimicrobiana

ABSTRACT

Introduction: The current University has, besides its educational paper, a privileged position as for the protection of the environment by means of the diffusion of the results of its investigations. One of the environmental problems, and therefore of health that more worries the investigators at the present time it is the antibiotics resistance of bacteria isolated from aquatic ecosystems. **Objective:** To contribute to the knowledge on the antibiotic susceptibility of bacteria isolated from freshwater ecosystems, using the Almendares river antibiotic-type bacteria as relating. **Materials and Methods:** The antimicrobial susceptibility was determined from 65 strains isolated *in vitro* on Almendares river through Bauer-Kirby method. The disks of antibiotics were given by BioMerieux[®] company, France, and the readings were carried out having in the catalogs of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Results:** It was obtained isolated resistant to cephalosporins of third and fourth generation, one isolated of *Escherichia coli* was resistant to nine different antibiotics, while were also multiresistants isolated of *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pneumoniae*. **Conclusions:** These results are applicable as a pedagogic tool in the development of an environmentalist conscience about the importance of the presence of antibiotic resistant and multiresistant bacteria in freshwater ecosystems.

KEY WORDS: Environmental health, Freshwater ecosystems, antimicrobial susceptibility

INTRODUCCIÓN

La Universidad, como ente impulsado y financiado por la sociedad, debe rendir cuentas ante ella. Es por ello que desde las instituciones universitarias se tiene que propiciar la realización de actividades e iniciativas que contribuyan a la promoción de la cultura de la paz, el desarrollo sostenible y el respeto al medio ambiente, como elementos esenciales para el progreso (Gaete, 2011).

La Universidad actual tiene, además de su papel docente, una posición privilegiada en cuanto a la protección del medio ambiente como determinante de salud de las comunidades. Desde esta perspectiva la discusión y publicación de los resultados obtenidos en las distintas investigaciones llevadas a cabo en las universidades, cumplimentan su contribución tanto al bienestar social, medioambiental como a la actividad docente, propios de cada institución (Costa y otros, 2010).

Uno de los problemas medioambientales, y por ende de salud, que más preocupa a los investigadores en la actualidad es la resistencia bacteriana a los antibióticos. Este problema ha tenido más interés en las bacterias de origen clínico, sin embargo se ha observado también en aquellas que habitan los ecosistemas acuáticos y las investigaciones en este sentido son escasas (Romeu y otros, 2010).

En nuestra capital se encuentra el río Almendares, del cual se extrae gran parte del agua que se distribuye a la población proveniente de la cuenca Almendares–Vento. Además sus aguas son utilizadas en otras actividades como son: la agricultura, la alimentación animal, pesca, recreo, así como otras de carácter religioso (Peláez, 2013).

Esta investigación se llevó a cabo debido a que el recurso agua es de gran utilidad en muchas de las actividades que realizan los seres humanos y la posibilidad de utilizar estos resultados en las distintas actividades docentes de pregrado y postgrado en la ampliación del conocimiento sobre el tema. En este contexto nos propusimos como objetivo, contribuir al conocimiento sobre la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas, utilizando como referente antibiotipos obtenidos del río Almendares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de 65 aislados obtenidos del río Almendares, los cuales habían sido previamente identificados y forman parte de la colección de cepas de bacterias del Laboratorio de Ecosistemas Acuáticos del Departamento de Microbiología y Virología, en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Todos los aislados fueron cultivados en medio Caldo Nutriente (Sigma Aldrich[®]) e incubados a 37°C por 18 horas, para la posterior determinación de la susceptibilidad a antibióticos, por el método de Bauer- Kirby en medio Mueller-Hinton. Pasado este tiempo se realizó en todos los casos una tinción de Gram a cada aislado para comprobar la pureza de los cultivos.

Las lecturas fueron realizadas teniendo en cuenta los catálogos del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y los antibióticos evaluados fueron (Entre paréntesis aparecen el símbolo y concentración del antibiótico en cada disco): Ampicilina (AMP, 10µg), Amoxicilina/Acido clavulánico (AMC, 20µg/10µg), Ticarcilina (TIC, 75µg), Cefepime (CPM, 30µg), Cefotaxima (CTX, 30µg), Cefazolina (CEF, 30µg), Ceftriaxona (CFT, 30µg), Eritromicina (ERI, 15µg), Aztreonam (ATM, 30µg), Imipenem (IMP, 10µg), Amikacina (AMK, 30µg), Kanamicina (KAN, 30µg), Gentamicina (GEM, 10µg), Estreptomina (SPT, 10µg), Azitromicina (AZI, 15µg), Acido nalidíxico (NAL, 30µg), Ciprofloxacino (CIP, 5µg), Trimetropin/Sulfametaxol (TSX, 1,25µg/23,75µg), Nitrofurantoina (NIT, 300µg), Estreptomina (STR, 300µg), Doxiciclina (DOX, 30µg), Vancomicina (VAN, 30µg), Cloranfenicol (CHL, 30µg). Todos son utilizados en la práctica médica. Fueron clasificados como multirresistentes aquellos aislados que manifestaron resistencia a cuatro o más de los antibióticos. Se realizó un análisis de frecuencias absolutas de los distintos patrones de susceptibilidad a los antibióticos, mostradas en tablas.

RESULTADOS

Los porcentajes de resistencia a los antibióticos evaluados para los 32 aislados miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se muestran en la Tabla 1. En esta tabla se observa que los fenotipos más representativos fueron los de resistencia a las

penicilinas, cefalosporinas y al Ciprofloxacino, con valores superiores al 52%. Los tres aislados de *Escherichia coli* fueron resistentes a la combinación Amoxicilina/Acido clavulánico, Cefalexina, Cefotaxima, Acido nalidíxico y Ciprofloxacino, de estos uno fue resistente a nueve antibióticos distintos. Entre los aislados de *Salmonella* sp. hubo tres que fueron multirresistentes también. La resistencia a Cefepime, Imipenem y Cloranfenicol fue la menos expresada.

Respecto a los bacilos no fermentadores, se observó la existencia de bajos porcentajes de resistencia a los antibióticos evaluados (Tabla 2). Ninguno de los aislados fue resistente al Aztreonam, sin embargo la mayoría sí lo fue a la Amoxicilina. El 100% de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* expresó un fenotipo resistente a Ticarcilina, Cefazolina, Acido nalidíxico y Gentamicina. A pesar de que los patrones de resistencia fueron observados en menor frecuencia en *Vibrio vulnificus*, es válido señalar que hubo aislados que expresaron resistencia a tres antibióticos distintos.

Las frecuencias absolutas de resistencia de los cocos grampositivos se encuentran recogidos en la Tabla 3, en la cual podemos observar que los mayores porcentajes de susceptibilidad correspondieron para el Trimetropin/Sulfametaxol, Aztreonam, Gentamicina y Amikacina, No así para la Amoxicilina, donde la mayoría de los aislados fueron resistentes a esta penicilina. La mayor cantidad de antibiotipos resistentes correspondieron a *Staphylococcus aureus*, apareciendo aislados multirresistentes al igual que de *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*.

DISCUSIÓN

Algunos autores plantean que el gran número de especies dentro de la familia de las enterobacterias conlleva a una gran variabilidad de patrones de resistencia natural. Esta diversidad se ve además incrementada por la posibilidad de adquirir genes de resistencia, tanto de microorganismos de la misma especie como de otras. La adquisición de multirresistencia puede llevar a la ineficacia de la mayoría de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica (CLSI, 2011).

En cuanto a la respuesta de estos aislados a los betalactámicos, fueron observados

aislados con fenotipo sensible a la Amoxicilina-Ácido clavulánico, los cuales no son comunes en las especies salvajes correspondientes a los aislados identificados, lo cual no quiere decir que estos antibióticos sean de elección si se prescindiera de ellos en brotes o casos aislados donde se encuentren implicadas las bacterias (CLSI, 2011).

Aunque de forma natural los miembros de *Shigella* spp. son sensibles a las cefalosporinas de primera generación (Cefazolina), se obtuvo un aislado resistente a este grupo genérico de antibióticos. Según Pfeifer y otros (2010), esto se puede deber a la sobre expresión por parte de estas bacterias de genes *ampC* que codifica para una betalactamasa. Estos genes pueden estar presentes en otras bacterias gramnegativas y se ha comprobado la transferencia horizontal de los mismos desde *Citrobacter freundii* a *Klebsiella* spp., que en estos casos se encuentran incorporados a integrones cromosomales y no plasmídicos como se creía.

Un porcentaje reducido de cepas de *Staphylococcus* son sensibles, en la actualidad, a la penicilina. El fenotipo más frecuente en este género incluye resistencia a Penicilina y a Ampicilina por producción de penicilinasa. Esta betalactamasa es inhibida por el Acido clavulánico, por lo que estas cepas son sensibles a la asociación de Amoxicilina/Acido clavulánico (CLSI, 2011).

Se han descrito seis genotipos de resistencia a Vancomicina en *Enterococcus faecalis* aislados de muestras clínicas y lo más impresionante es que todos comparten un mecanismo de resistencia muy similar basado fundamentalmente en la sustitución del dipéptido terminal D-alanina-D-alanina, bien por D-alanina-D-lactato o por D-alanina-D-serina en la cadena de peptidoglucano de la pared celular bacteriana (Ponessa y otros, 2006; Fica y otros, 2007; Depardieu y otros, 2007; Terreros y otros 2010)

Conocer el impacto de estos resultados de investigación, constituye un elemento de gran utilidad para la toma de decisiones en términos de política científica, apoyo a recursos y desarrollo de infraestructuras, establecimiento de prioridades y evaluación de la esfera científica (Fernández y Shkiliova, 2012).

Frenk J y otros (2011) plantean que se tiene que promover un nuevo profesionalismo

que utilice competencias como criterio objetivos para la clasificación de los profesionales de la salud y que desarrolle un conjunto de valores en común centrados en la responsabilidad social, sobre la base de la publicación de los resultados de sus investigaciones. En el caso de las universidades, y ante las nuevas necesidades provocadas por el actual contexto económico, social y tecnológico, la aplicación de la gestión del conocimiento, y su socialización, debe encaminarse tanto en la reorganización interna de procesos, como en la mejora de la docencia y la investigación, con el objetivo de facilitar el desarrollo de una universidad competitiva y adaptada a las nuevas demandas de la sociedad (Estrada y Benítez, 2011).

CONCLUSIONES

Estos resultados constituyen una herramienta muy importante desde el punto de vista pedagógico en el desarrollo de una conciencia ambientalista en los estudiantes de pregrado y postgrado, sobre la importancia de la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas dulceacuícolas.

BIBLIOGRAFÍA

1. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (2011) - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement; M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
2. Costa V, Tanoue S y Sarapka M (2010)- Papel da universidade no desenvolvimento sustentável. Memórias del 7mo Congresso Internacionald de Educación Superior Universidad 2010. Editorial Universitaria. ISBN 978-959-16-1137-7.
3. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P (2007)- Modes and Modulations Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clinical Microbiology Reviews* ; 20(1): 79–114.
4. Estrada V y Benítez F (2011)- La gestión del conocimiento en la nueva Universidad Cubana. *Revista Universidad y Sociedad*, 2(2). ISSN 2218-3620

5. Fernández A y Shkiliova L (2012)- Uso de un set de indicadores para medir el impacto en los proyectos de investigación de Ingeniería Agrícola de la Universidad Agraria de La Habana. *Rev Cie Téc Agr*, 21(1).
6. Fica A., Jemenao M., Bilbao P., Ruiz G., Sakurada, A., Pérez, E., Zúñiga I., Gompertz, M (2007)- Emergencia de infecciones por *Enterococcus* sp. resistente a vancomicina en un hospital universitario en Chile. *Rev Chil Infect.*; 24(6):462-471
7. Frenk J y otros (2011)- Profesionales de la salud para el nuevo siglo: transformando la educación para fortalecer los sistemas de salud en un mundo interdependiente. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 28(2)
8. Gaete R (2011)- La responsabilidad social universitaria como desafío para la gestión estratégica de la Educación Superior: el caso de España. *Revista de educación*, 355: 109-133. ISSN 0034-8082.
9. Peláez O (2013)- Revertir el Deterioro Ambiental. Cuenca Almendares-Vento. Periódico Granma, 49(58). 09/03/2013, p8
10. Pfeifer Y, Cullik A y Witte W (2010)- Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*.. 300(6):371-379
11. Ponessa, A., Gambandé, T., All, L., Fernández de Arroyabe, G., Ferrari, M., Dlugovitzky, D., Notario, R. (2006)- Enterococos vancomicina resistentes: colonización en pacientes hospitalizados, en Rosario, Argentina. *Acta Bioquím Clín Latinoam.*; 40 (4): 499-502.
12. Romeu B, Salazar P, Navarro A, Lugo D, Hernández U, Rojas N y Eslava C (2010)- Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista CENIC*, 4(39).
13. Terreros M, Grijalva M, Jiménez P (2010) - Implementación de un ensayo PCR multiplex para la detección de genes *vanA*, *vanB* y *vanC* relacionados con la resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. *Revista CIENCIA*. 13(2):141-150

Anexos

Tabla 1:- Porcentajes de resistencia de los aislados miembros de la familia

	AMC	CPM	CEF	CTX	TSX	NAL	CIP	NIT	IMP	CHL	GEM	KAN
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=5)	3	1	3	3	2	2	3	0	3	0	2	3
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=5)	2	1	3	3	2	1	2	0	1	0	2	3
<i>Citrobacter freundii</i> (n=3)	2	1	2	2	1	1	2	2	1	0	1	1
<i>Escherichia coli</i> (n=3)	3	1	3	3	2	3	3	1	1	2	2	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=4)	3	2	3	3	1	1	2	2	1	3	2	1
<i>Salmonella sp.</i> (n=8)	4	1	3	3	4	3	3	5	1	2	4	1
<i>Shigella sp.</i> (n=4)	2	1	3	2	1	2	2	2	0	1	1	1
Total (n=32)	19	8	20	19	13	13	17	12	8	8	14	12
% de Resistencia	59	25	63	59	41	41	53	38	25	25	44	34

AMC: Amoxicilina/Acido clavulánico, **CPM:** Cefepime, **CEF:** Cefazolina, **CTX:** Cefotaxima, **TSX:** Trimetropin/Sulfametaxol, **NAL:** Acido nalidixico, **CIP:** Ciprofloxacino, **NIT:** Nitrofurantoína, **IMP:** Imipenem, **CHL:** Cloranfenicol, **GEM:** Gentamicina, **AMK:** Amikacina,

Tabla 2:- Porcentajes de resistencia de los aislados de bacilos gramnegativos no enterobacterias (no fermentadores).

	AMP	TIC	CEF	CTX	ATM	STR	CIP	NAL	IMP	GEM	AMK	DOX
<i>Aeromonas sp.</i> (n=7)	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Plesiomonas shigelloides</i> (n=5)	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=6)	5	6	6	3	0	2	5	6	5	6	5	3
<i>Vibrio vulnificus</i> (n=4)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total (n=20)	12	6	9	3	0	2	6	7	5	6	7	6
% de Resistencia	60	30	45	15	0	10	30	35	25	30	35	30

AMP: Ampicilina, **TIC:** Ticarcilina, **CEF:** Cefazolina, **CTX:** Cefotaxima, **ATM:** Aztreonam, **STR:** Estreptomina, **CIP:** Ciprofloxacino, **NAL:** Acido nalidixico, **IMP:** Imipenem, **GEM:** Gentamicina, **AMK:** Amikacina, **DOX:** Doxiciclina

Tabla 3:- Porcentajes de resistencia de los aislados de cocos grampositivos.

	AMP	AMC	CEF	CFT	CPM	CTX	AZI	TSX	CHL	VAN	GEM	AMK
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=4)	2	2	1	1	0	1	0	0	0	3	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=4)	2	1	3	0	1	2	3	0	0	2	0	0
<i>Streptococcus intermedius</i> (n=2)	0	0	1	0	0	1	3	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=6)	5	3	5	2	3	4	1	1	0	0	1	0
<i>Staphylococcus lentus</i> (n=4)	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Total (n=20)	10	6	11	3	4	9	7	1	0	5	1	0
% de Resistencia	50	30	55	15	20	45	35	5	0	25	5	0

AMP: Ampicilina, **AMC:** Amoxicilina/Acido clavulánico, **CEF:** Cefazolina, **CFT:** Ceftriaxona, **CPM:** Cefepime, **CTX:** Cefotaxima, **AZI:** Azitromecina, **TSX:** Trimetropin/Sulfametaxol, **CHL:** Cloranfenicol, **VAN:** Vancomicina, **GEM:** Gentamicina, **AMK:** Amikacina