



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA  
MICROBIOLOGÍA APLICADA

ANÁLISIS DISCRIMINANTE DE PATRONES DE RESISTENCIA  
A ANTIBIÓTICOS EN *Escherichia coli* COMO INDICADOR DE  
CONTAMINACIÓN FECAL EN ZONAS COSTERAS DEL ESTADO NUEVA  
ESPARTA.

Lcda. NILYAN JOSEFINA RODRÍGUEZ MARÍN

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA  
APLICADA  
MENCIÓN: MICROBIOLOGÍA APLICADA

CUMANA, 2012

## HOJA APROBATORIA

## Contenido

Contenido.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	10
Área de estudio.....	10
Determinación de las Características Físico-Químicas.....	11
Enumeración de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en caldo Fluorocult-Merck.....	11
Estudio macroscópico.....	12
Identificación bioquímica.....	13
Susceptibilidad Antimicrobiana y Confirmación de $\beta$ -lactamasas.....	13
Detección de BLEA:.....	14
Detección de BLEE:.....	14
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	15
Extracción de ADN de E. coli.....	15
Determinación de Genes de Resistencia blaSHV.....	16
Determinación de Genes de Resistencia blaTEM.....	17
Análisis de datos.....	17
Análisis Discriminante.....	17
Análisis estadístico .....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Parámetros Físicoquímicos:.....	20
Enumeración de CT y CF.....	22

<u>Aislamiento de cepas de E. coli.....</u>	<u>24</u>
<u>Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.....</u>	<u>25</u>
<u>Detección fenotípica de <math>\beta</math>-lactamasas .....</u>	<u>32</u>
<u>Identificación de genes de resistencia blaSHV y blaTEM en cepas de E. coli aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta.....</u>	<u>34</u>
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>44</u>
<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>45</u>
<u>HOJAS DE METADATOS.....</u>	<u>59</u>

## **DEDICATORIA**

A:

Dios Todopoderoso, por ser mi guía, poniendo siempre en mi camino las

oportunidades correctas.

Mi mamá, Nilda Marín, gracias por estar siempre allí. Te amo.

Mi abuela Dolores, gracias por todas tus oraciones. Te amo.

Mis hermanas Jessica, Nilda A. y Nilda C., por entenderme siempre. Las adoro.

Mis tíos Jesús, Simón, Luis y Anis. Gracias por todo.

Mi esposo Aldemaro, por su amor y apoyo incondicional. Te amo.

Mi hijo, Adrián Jesús, mi mayor felicidad. Que todos mis esfuerzos por mejorar te sirvan de ejemplo y motivación.

## **AGRADECIMIENTO**

A:

La Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, la Casa más alta.

Los Profesores Pedro López, Marcos de Donato y Hectorina Rodulfo.

La Lcda. Numirin Carreño, por su dedicación en pro de la culminación exitosa de este trabajo.

Mis amigas, por los gratos momentos compartidos durante mis estudios:

Leocmary Carrasco y Yilmarys López.

La Prof. Mariolga Berrizbeitia, por todo el apoyo y confianza depositados en mí.

Gracias!

Al Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología (FONACIT) por la ayuda económica para la realización de mi maestría.

## LISTA DE TABLAS

## LISTA DE FIGURAS



## RESUMEN

Se evaluaron los patrones de resistencia a antibióticos a través del análisis discriminante en cepas de *E. coli*. Se estudiaron cinco playas en el Estado Nueva Esparta durante tres meses, a las cuales se les determinaron *in situ* las características físico-químicas, enumeración de Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF) por el método del Número Más Probable en caldo fluorocult-Merck. De los tubos positivos se realizó la siembra en medios selectivos para el aislamiento de *E. coli* y se identificó mediante pruebas bioquímicas y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (difusión en agar) y confirmación de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA) y  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido (BLEE) (doble disco combinado); así mismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a las cepas resistentes a ampicilina y cefalotina; siguiendo los lineamientos del CLSI. Se realizó la extracción de ADN, empleando el kit de Purificación de ADN Wizard Genomic (Promega) para la extracción y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de genes de resistencia *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>. Todas las playas mostraron características fisicoquímicas típicas de la columna de agua de un ambiente marino. Se aplicó el Análisis Discriminante para clasificar las fuentes (humana y animal) de contaminación fecal. El valor mayor para CT y CF correspondió a Punta de Piedras (CT: 5064,1 NMP/ 100 ml; CF: 2122,37 NMP/100ml). Se aislaron 26 cepas las cuales mostraron resistencia a uno o más antibióticos: 73,08% de resistencia a ampicilina, cefalotina y piperacilina. Las cepas resultaron 100% sensibles a amoxicilina ácido clavulánico, ampicilina sulbactan, cefoxitin, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenen, meropenen y aztreonam. 19 cepas fueron productoras de BLEA, y 17 de ellas mostraron amplificaciones para el gen *bla*<sub>TEM</sub>. El análisis discriminante determinó que las 26 cepas aisladas se ajustaban al comportamiento de cepas de origen clínico, por lo cual se puede deducir que la fuente de contaminación es de origen humano, obteniéndose una tasa correcta de clasificación entre 75 y 84,6%, ratificándose como una valiosa herramienta en la clasificación de origen de fuentes de contaminación fecal. Por primera vez se reporta la presencia de cepas de *E. coli*, con perfil de resistencia a antibióticos por producción de enzimas BLEA y presencia del gen *bla*<sub>TEM</sub> en zonas costeras del estado Nueva Esparta demostrando que la resistencia adquirida a los antimicrobianos constituye un problema de salud pública y ambiental que debe ser vigilado para evitar que se perjudique la relación medio ambiente-salud. La presente investigación, sienta las bases para un nuevo enfoque en el campo de investigación del origen de fuentes de contaminación de aguas costeras en nuestro país.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de las zonas costeras representa un grave problema ambiental, ya que ocasiona daños económicos, turísticos y a la salud pública, disminuyendo su calidad sanitaria. En su mayoría, los desechos que se producen en la tierra, especialmente, por el desarrollo humano, son vertidos al medio acuático más cercano, en este caso al mar (Campos *et al.*, 1986; Parveen *et al.*, 2001; Galv, 2003; Vantarakis *et al.*, 2006).

Se debe considerar que hay tres fuentes principales de contaminación fecal humana del agua de mar: desagües domésticos, descargas de ríos y otros cursos de agua, y directamente del bañista (Iñiguez *et al.*, 2007). Para evaluar la calidad microbiana del agua de mar, existen guías y normas de calidad que utilizan microorganismos indicadores, los cuales, indirectamente, sugieren la presencia potencial de microorganismos patógenos. La estimación de las bacterias del grupo de los coliformes en los cuerpos de agua se ha utilizado a nivel mundial durante varias décadas como indicadoras de su calidad bacteriológica. En Venezuela se han seguido las tendencias internacionales en ese sentido, estableciéndose los límites permitidos en diferentes leyes y decretos, específicamente las normas para la clasificación y control de calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos, en Gaceta Oficial bajo el número 883, de año 1994 (aún en vigencia), donde las aguas tipo 4 (destinadas a balnearios, deportes acuáticos, pesca deportiva, comercial y de subsistencia), que incluyen las aguas tipo 4-A destinadas al contacto humano total, definiendo como límite de aceptabilidad 1.000 NMP/100 mL Coliformes totales ó 200 NMP/100 mL Coliformes fecales como valor máximo en el 90% de una serie de muestras consecutivas (Vieitez y Baz, 1988; Salas, 1989; Alongi, 1998; Cortés-Lara, 2003; Dugan *et al.*, 2003; Incera *et al.*, 2003; Vantarakis *et al.*, 2006; Castañeda *et al.*, 2009).

Las aguas contaminadas con vertidos mineros o industriales pueden

tener pH muy ácido. El pH tiene una gran influencia en los procesos químicos que tienen lugar en el agua, actuación de los floculantes, tratamientos de depuración, entre otros. De igual manera, ciertas características fisicoquímicas del agua muestran alteraciones en los procesos de contaminación de aguas en zonas costeras: el aumento de la temperatura disminuye la solubilidad de gases (oxígeno) y aumenta, en general, la de las sales. Aumenta la velocidad de las reacciones del metabolismo, acelerando la putrefacción. La temperatura óptima del agua para beber está entre 10 y 14° C. las centrales nucleares, térmicas y otras industrias contribuyen a la contaminación térmica de las aguas, a veces de forma importante. Las aguas naturales pueden tener pH ácidos por el CO<sub>2</sub> disuelto desde la atmósfera o proveniente de los seres vivos; por ácido sulfúrico procedente de algunos minerales, por ácidos húmicos disueltos del mantillo del suelo. La principal sustancia básica en el agua natural es el carbonato cálcico que puede reaccionar con el CO<sub>2</sub> formando un sistema tampón carbonato/bicarbonato (American Health Public Association, 1998; Organización Panamericana de la Salud, 2003; World Health Organization, 2003).

La Organización Mundial de la Salud recomienda para evaluar la calidad sanitaria de aguas recreacionales y costeras utilizar como indicadores de contaminación fecal para aguas costeras a *Escherichia coli* y enterococos (World Health Organization, 2003; Vergaray *et al.*, 2007).

Las bacterias coliformes fecales pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, habitan en el tracto gastrointestinal de todos los animales de sangre caliente, y son los indicadores de contaminación en aguas que se utilizan más comúnmente. Se caracterizan por ser de forma bacilar, Gram negativos, aeróbicos y anaeróbicos facultativos, no forman esporas y fermentan la lactosa con producción de ácido y gas. A este grupo pertenecen las bacterias de los géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, y *Klebsiella* (American Public Health Association, 1998; Harwood *et al.*, 2000).

En particular la bacteria *Escherichia coli* constituye, aproximadamente,

un 10% de los microorganismos intestinales del hombre y de animales con sangre caliente, y son los indicadores más sensibles del grado de contaminación en la cercanía de los desagües. Debido a esto, se ha utilizado como indicador biológico de contaminación fecal. Estos coliformes fecales están asociados a varias condiciones infecciosas en humanos, tales como gastroenteritis, enfermedades de la piel, vaginitis e infecciones genitales, entre otras. Sin embargo, no proveen información sobre la fuente específica de contaminación fecal, la cual resultaría de gran importancia, debido a que la materia fecal de fuentes humanas y animales puede ser considerada de alto riesgo debido a la posible presencia de patógenos, y la identificación de la fuente fecal es necesaria para encaminar los planes de prevención a desarrollarse para evitar otras contaminaciones (Borrego *et al.*, 1982; Harwood *et al.*, 2000; Vantarakis *et al.*, 2006).

La Organización Mundial de la Salud plantea que la determinación de enterococos representa un indicador adicional en las pruebas de calidad de aguas y de la eficiencia del tratamiento, además de ser valioso para los controles corrientes después del tendido de nuevas cañerías o cuando se reparan los sistemas de distribución para detectar contaminación de las aguas subterráneas o de superficie por las escorrentías (World Health Organization, 2003).

Por estas razones se ha planteado la necesidad de establecer métodos que permitan la identificación de las fuentes de contaminación fecal. La contaminación, con materia fecal, de las aguas naturales no tratadas puede resultar en un incremento del riesgo de la transmisión de enfermedades en humanos. El conocimiento de la fuente de contaminación es un importante factor para determinar el grado de riesgo. Se han hecho múltiples intentos para desarrollar métodos que permitan determinar las fuentes de contaminación fecal. Inicialmente se utilizó la proporción de los coliformes y enterococos. Una proporción alta ( $>4$ ) indicaba una fuente animal y una proporción baja ( $<0,7$ )

una fuente humana. Se determinó que este método era poco confiable y fue desechado. También se propuso a los bacteriófagos como indicadores de la fuente de contaminación fecal (American Public Health Association, 1998). Furuse *et al.* (1981), observaron que las heces de humanos y animales contenían diferentes serotipos de colifagos, sin embargo, el uso de esta observación fue limitado, debido a que sólo un pequeño porcentaje de las muestras fecales contenían los fagos. También se han empleado técnicas como electroforesis de campo pulsante y análisis de diferencia de resistencia a antibióticos por el uso de Resistencia Múltiple a Antibióticos (MAR). Sin embargo, pocos han mostrado altos niveles de especificidad y confiabilidad (Edberg y Edberg, 1988; Kaspar *et al.*, 1999; Wiggins *et al.*, 1999; Vantarakis *et al.*, 2006; Baldini y Selzer, 2008).

Luego de numerosos intentos, surgió entre los investigadores la idea de emplear una técnica estadística multivariante capaz de aprovechar las relaciones existentes entre una gran cantidad de variables independientes, para maximizar la capacidad de discriminación. Esta técnica, denominada análisis discriminante, ayuda a identificar las características que diferencian (discriminan) a dos o más grupos, y a crear una función capaz de distinguir, con la mayor precisión posible, a los miembros de uno u otro grupo. La pertenencia a los grupos, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente. Las variables en las que se supone que se diferencian los grupos se utilizan como variables independientes o variables de clasificación (Huberty, 1994; Stevens, 1996).

El análisis discriminante ha sido ampliamente utilizado para clasificar las fuentes de origen de enterococos, coliformes fecales y *E. coli* aislados de muestras de aguas superficiales. Cuando el análisis discriminante es empleado como una herramienta para la identificación de fuentes microbianas, se utilizan los perfiles de resistencia a antibióticos de una base de datos obtenidos de aislamientos bacterianos de varias especies. Esta biblioteca de fuentes

conocidas es usada para generar un esquema de clasificación (Kaneene *et al.*, 2007). El uso de análisis discriminante, basado en patrones de resistencia a antibióticos en enterococos, para diferenciar fuentes humanas y animales de contaminación, fue descrito por primera vez por Wiggins (1996), reportando más de 90% y 84% de clasificaciones correctas, respectivamente.

La rápida aparición y diseminación de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos plantea una amenaza grave y cada vez mayor para la Salud Pública, siendo un problema creciente en el mundo, que involucra cada día nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos de resistencia. El uso indiscriminado de los antibióticos en prácticas médicas, veterinarias y pecuarias contribuye a la dispersión de bacterias resistentes. Adicionalmente, es común que los centros de salud, especialmente los hospitales, viertan sus aguas residuales a la red pública y se constituyan en importantes focos de contaminación. La presión selectiva ejercida mediante el uso excesivo de antibióticos, junto a los diversos mecanismos de transferencia genética que portan las bacterias, contribuyen cuantiosamente con esta situación (Hischam y Finch, 2001; Ferreira Da Silva *et al.*, 2005).

Además de las consecuencias para la salud humana la inquietud de la comunidad científica se incrementó por la contaminación de las aguas superficiales y profundas con microorganismos resistentes como así también con residuos de los antimicrobianos o sus metabolitos. A pesar del uso discriminado de los antibióticos en medicina humana y veterinaria estos compuestos recibieron poca atención en su carácter de contaminantes de ambientes acuáticos, situación sorprendente si se considera que a diferencia de otros compuestos químicos los antibióticos ejercen una acción directa sobre los microorganismos que allí se desarrollan, además que por su emisión continua a los diferentes compartimentos acuáticos pueden actuar como contaminantes persistentes (Alonso *et al.*, 2001).

En los ambientes acuáticos, la transferencia de material genético se

encuentra íntimamente relacionada con la actividad bacteriana, la que depende a su vez de los siguientes factores: disponibilidad de nutrientes, densidad bacteriana, temperatura, presencia de compuestos que ejerzan presión antibiótica selectiva y de bacterias que actúen como donantes y receptoras. Los sedimentos y las rocas sumergidas, las plantas de tratamientos de efluentes y las plantas de tratamiento de agua proveen superficies colonizables donde la actividad bacteriana y la transferencia de material genético se encuentran favorecidas (Seveno *et al.*, 2002).

Desde la aparición de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias, no ha sido factible su total erradicación y el objetivo estratégico ha sido la reducción al máximo de la aparición y diseminación de los microorganismos resistentes y se realce al máximo el empleo eficaz de los antimicrobianos. La vigilancia es fundamental en cualquier estrategia de control de la resistencia antimicrobiana, ya que proporciona los datos necesarios para localizar el problema, controlar su crecimiento y transmisión y determinar el impacto de las intervenciones. La vigilancia de la resistencia bacteriana se ha realizado en la mayoría de los casos, con microorganismos aislados de muestras clínicas; sin embargo, se debe estudiar a las bacterias obtenidas de 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. Existen evidencias que dan sustento a la afirmación de que las bacterias aisladas del ambiente juegan un papel importante en la diseminación de la resistencia antimicrobiana (Smith y Coast, 2002; Junco *et al.*, 2006).

Las enterobacterias han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia, entre ellos se tienen: 1) producción de enzimas activadoras de antibióticos, acetiltransferasas y  $\beta$ -lactamasas; 2) alteración de los sitios de PBP (proteínas de unión a la penicilina); 3) disminución de la concentración

antibiótica, ya sea por impermeabilidad o mecanismo de bombeo hacia el exterior. Los mecanismos de inhibición enzimática han sido ampliamente estudiados y las  $\beta$ -lactamasas se han caracterizado y clasificado para su estudio. Particularmente, las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido se caracterizan porque pueden hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Moreno *et al.*, 2009).

La resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos es atribuible fundamentalmente a la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas. Se conocen múltiples clases de enzimas pertenecientes a esta familia que pueden transferirse a través de elementos móviles al cromosoma bacteriano o mediante genes codificados en plásmidos o transposones. Las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA) sólo se determinan en *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* spp. *Salmonella* spp. y *Klebsiella* spp. Pertenecen al grupo 2b de la clasificación según Bush *et al.*, presentan actividad penicilinasas y cefalosporinasas, de la clase molecular A, inhibidas por ácido clavulánico. Generalmente son de origen plasmídicas. La cantidad de enzimas depende del número de copias del plásmido, del número de copias del gen y de la eficiencia del promotor del gen. Las enzimas más frecuentes en bacilos Gram negativos son: TEM-1, TEM-2, SHV-1, etc. (Bush *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 2002).

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) constituyen un alarmante problema en la actualidad, debido a que presentan un amplio espectro de inactivación frente a la mayoría de los antibióticos disponibles. Por definición las BLEE son enzimas  $\beta$ -lactamasas producidas por microorganismos Gram negativos, pertenecen a la clase molecular A o D en base a la secuencia de aminoácidos, tienen capacidad de hidrolizar cefalosporinas con un grupo oximino (cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona), presentan un residuo de serina en el centro activo y, generalmente son inhibidas *in vitro* por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (Goossens *et al.*, 2001; Hisham y Finch, 2001; Edelstein *et al.*, 2003; Stürenburg y Mack, 2003; Hujer *et*



*al.*, 2009).

En los últimos 20 años se han incorporado nuevos antibióticos  $\beta$ -lactámicos con la finalidad de ser resistentes a la hidrólisis por las  $\beta$ -lactamasas. Sin embargo, con cada nuevo antibiótico que se emplea en el tratamiento de los pacientes, han aparecido nuevas  $\beta$ -lactamasas causando resistencia a este grupo de fármacos. Tan pronto como un medicamento es introducido para el uso clínico, es identificada una  $\beta$ -lactamasa con la capacidad de destruir esta actividad (Bradford, 2001). Estas bacterias resistentes, de origen hospitalario, pueden ser transportadas bajo ciertas circunstancias al exterior (alimentos, agua de consumo o de baño, playas y otros espacios ambientales), lo cual conduce a su recirculación. Conociendo que el deterioro de la calidad sanitaria del agua constituye un riesgo potencial para la salud humana, debido a la posibilidad de transmisión por vía hídrica de microorganismos causantes de enfermedades, la determinación de indicadores bacterianos de contaminación resulta ser de notable importancia para el monitoreo de la calidad microbiológica del agua (Guerra *et al.*, 2006; Baldini y Selzer, 2009; González *et al.*, 2009).

Harwood *et al.* (2000), realizaron la clasificación de patrones de resistencia a antibióticos de bacterias indicadoras por análisis discriminante, empleándolo como método predictivo de la fuente de contaminación fecal en aguas subtropicales. Moore *et al.* (2005), evaluaron el análisis de resistencia a antibióticos y ribotipificación para la identificación de fuentes de contaminación fecal en aguas urbanas al sur de California.

Debido a que la zona del Mar Caribe representa una economía tradicionalmente orientada al turismo, se ha cuestionado el efecto de todos los desechos arrastrados al mar por distintas vías, ejerciendo un efecto directo sobre la estética de las playas, la aptitud para el uso recreacional, la influencia sobre el aumento de enfermedades, y sobre la incidencia en la calidad microbiológica de los productos obtenidos del mar, y, tomando en cuenta que

los estudios realizados en este campo en nuestro país son escasos, resulta de gran importancia e interés conocer la susceptibilidad a antibióticos, así como los genes de resistencia y la identificación de fuentes de contaminación fecal, mediante el uso del análisis discriminante, en cepas de *E. coli* aisladas de las zonas costeras del estado Nueva Esparta.

## METODOLOGÍA

### Área de estudio

La investigación se realizó en las zonas costeras del estado Nueva Esparta, específicamente en las Playas Punta Arenas ( $10^{\circ}31'N$  y  $64^{\circ}24'O$ ), Costa Azul ( $10^{\circ}59'N$  y  $63^{\circ}46'O$ ), Punta de Piedras ( $10^{\circ}33'N$  y  $62^{\circ}24'O$ ), Playa El Agua ( $11^{\circ}8'N$  y  $63^{\circ}51'O$ ) y Juangriego ( $11^{\circ}5'N$  y  $63^{\circ}58'O$ ) (figura 1).



**Figura 1.** Área de estudio

El periodo de muestreo estuvo comprendido por 3 meses consecutivos, con intervalos de muestreo de 15 días. En cada una de las zonas de muestreo fueron establecidas 2 estaciones, y en cada una de las estaciones se recolectaron 2 muestras a 1,5 metros de profundidad, alejada de la orilla, obteniéndose un total de 60 muestras de agua, 12 de cada una de las playas en estudio.

Las muestras fueron recolectadas en frascos estériles de 250 ml, con las medidas de bioseguridad necesarias y transportadas bajo refrigeración en hielo

(4°C). Las muestras fueron procesadas en un máximo de 6 horas después de su obtención, en el Laboratorio de Microbiología en el Centro Regional de Investigaciones ambientales (CRIA), en la Universidad de Oriente.

### **Determinación de las Características Físico-Químicas**

Simultáneamente a la recolección de las muestras se midieron *in situ* los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura, pH, conductividad, salinidad, sólidos disueltos totales y oxígeno disuelto. Se usó para ello, una sonda multiparamétrica YSI modelo 600R, conectada a un lector-capturador de datos YSI 650 MDS.

### **Enumeración de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en caldo Fluorocult-Merck**

A partir de las muestras obtenidas se sembraron en caldo Fluorocult (Merck) de la siguiente manera:

- 3 tubos con 10 ml de caldo fluorocult + 10 ml de muestra.
- 3 tubos con 10 ml de caldo fluorocult + 1 ml de muestra.
- 3 tubos con 10 ml de caldo fluorocult + 0,1 ml de muestra.

Posteriormente, se incubaron todos los tubos a 37°C por 24 horas. Seguidamente, se evaluó la presencia de CT por el cambio de color del medio (viraje a azul); y la presencia de CF por la producción de fluorescencia azul al ser sometidos a la luz ultravioleta (UV). La bacteria *Escherichia coli*, es la única especie perteneciente al grupo de las Enterobacterias que posee la enzima b-D-glucoronidasa. Esta enzima es capaz de escindir el sustrato 4-metilbeliferil-b-D-glucorónido (MUG), formando 4-metilumbeliferona. Esta sustancia se caracteriza por ser fluorescente al iluminarse con luz UV; lo que permite su detección fácilmente. Este método ofrece las ventajas de rapidez y fácil detección de la presencia de coliformes totales y fecales (González *et al.*,

2009).

A partir de los tubos positivos se determinó el Número Más Probable (NMP) de CT y CF a través de la siguiente fórmula:

$$\text{NMP}/100 = \sqrt{\frac{\text{N}^\circ \text{ de tubos X } 100}{\text{Vol. (ml) tubos negativos X Vol. (ml) tubos total con inóculo}}}$$

La densidad de coliformes se expresó como el Número Más Probable de coliformes (NMP) en 100 ml de agua. El NMP se ubica en tablas estadísticas de acuerdo con un código formado por la combinación de tubos positivos y negativos obtenidos en caldo fluorocult.

Según las normas para la clasificación y control de calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos, establecidos en Gaceta Oficial bajo el número 883, de año 1994, establece las aguas tipo 4 (destinadas a balnearios, deportes acuáticos, pesca deportiva, comercial y de subsistencia), que incluyen las aguas tipo 4-A destinadas al contacto humano total, y establece como límite de aceptabilidad 1.000 NMP/100 mL CT ó 200 NMP/100 mL CF como valor máximo en el 90% de una serie de muestras consecutivas.

### **Estudio macroscópico**

Para el aislamiento de cepas de *Escherichia coli*, se realizó la siembra por el método de diseminación por estrías en placas de agar nutritivo, McConkey y EMB, utilizando una asada directamente de los tubos con caldo Fluorocult que presentaron fluorescencia azul, que era indicativo de la presencia de *E. coli*, y fueron incubadas por 24 horas a 37°C.

Después del período de incubación se procedió a realizar la observación

macroscópica de las colonias características del género *Escherichia*, las cuales se observaron: elevadas, medianas, color crema y mucosas en agar nutritivo, mientras que, en agar McConkey se presentaron como colonias elevadas, medianas, mucosas y fermentadoras de lactosa (color fucsia); por otra parte, en agar EMB se observaron elevadas, medianas, mucosas, de color púrpura con brillo metálico. Las cepas lactosa negativa fueron evaluadas e identificadas posteriormente.

### **Identificación bioquímica**

Se procedió a realizar según la metodología convencional descrita por McFaddin, 2000 y Koneman *et al.*, 2008:

- La prueba de oxidasa y catalasa a partir de colonias puras aisladas en agar nutritivo.
- Reacción en Agar TSI (Hierro Triple Azúcar).
- Prueba MIO (motilidad, indol y ornitina).
- Prueba Rojo de metilo.
- Utilización del Citrato.

### **Susceptibilidad Antimicrobiana y Confirmación de $\beta$ -lactamasas**

Una vez purificadas e identificadas las colonias de *E. coli*, se procedió a realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana, aplicando el método de difusión en agar, para el cual se tomaron del agar nutritivo de 3 a 4 colonias similares del microorganismo en estudio y se suspendieron en un tubo con 3 a 5 ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) de 2 a 5 horas a 37°C, ajustando el inóculo al 0,5 de la escala de McFarland. Seguidamente, se procedió a sumergir un hisopo de algodón estéril dentro de la SSF, quitando el exceso con las paredes del tubo y se sembró sobre la superficie del agar Müller Hinton en tres direcciones diferentes para cubrir todo el medio de cultivo. Se dejaron secar las

placas durante 5 minutos antes de proceder a aplicar los discos. Una vez colocados los discos, se incubaron las placas a una temperatura de  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo de 16 a 18 horas. Al cabo de este tiempo, se realizó la lectura de los halos de inhibición con una regla de medición común y se concluyó si el microorganismo era sensible, resistente o de sensibilidad intermedia, según los criterios establecidos para esta técnica por el Instituto de Normas de Laboratorio Clínico, del inglés: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011).

Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana a las cepas de *E.coli* procedentes de las zonas costeras del estado Nueva Esparta, frente a los siguientes antibióticos: ceftazidima (30  $\mu\text{g}$ ), ceftriaxona (30  $\mu\text{g}$ ), aztreonam (30  $\mu\text{g}$ ) y cefotaxima (30  $\mu\text{g}$ ), ampicilina (10  $\mu\text{g}$ ), piperacilina (100  $\mu\text{g}$ ), ampicilina sulbactan (10/10  $\mu\text{g}$ ), cefalotina (30  $\mu\text{g}$ ), cefoxitin (30  $\mu\text{g}$ ), cefepime (30 $\mu\text{g}$ ), imipenen (10  $\mu\text{g}$ ), meropenen (10  $\mu\text{g}$ ) y amoxicilina/ácido clavulánico (20/10  $\mu\text{g}$ ).

La cepa de *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 fueron utilizadas como controles en los ensayos de susceptibilidad.

Detección de BLEA:

En la placa de agar Müeller Hinton, empleada para el antibiograma, se procedió a colocar el disco de ampicilina y amoxicilina/ácido clavulánico.

Interpretación: se consideró la presencia de BLEA al obtener resistencia a ampicilina y cefalotina, sensibilidad intermedia a piperacilina y sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico (CLSI, 2011).

Detección de BLEE:

En base a las recomendaciones del CLSI para la determinación de BLEE, se procedió a realizar el método de sinergia de doble disco, para el cual se colocó un disco con un antibiótico  $\beta$ -lactámico (Cefalosporina de 3ra generación) frente

a un antibiótico que contenía un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (CLSI, 2011).

Interpretación: se consideró la presencia de BLEE al observar deformación del halo entre amoxicilina/ácido clavulánico y cefotaxima y/o ceftazidima (CLSI, 2011).

### **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Para la confirmación de la resistencia a ampicilina y cefalotina obtenida por el método de difusión en agar se procedió a realizar la CMI, siguiendo la metodología estandarizada por el CLSI (2011), la cual se describe a continuación:

Una vez purificadas e identificadas las colonias de *E. coli*, se procedió a tomar del agar nutritivo de 3 a 4 colonias similares del microorganismo en estudio y se suspendieron en un tubo con 3 a 5 ml de caldo BHI de 10 a 15 min a 37°C, ajustando el inóculo al 0,5 de la escala de McFarland. Seguidamente se procedió a colocar 20 $\mu$ L de la suspensión de cada una de las muestras en placas de agar Müeller Hinton, unas suplementadas con ampicilina y otras con cefalotina a concentraciones de : 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 y 2048  $\mu$ g/mL. Una vez colocadas las muestras, se incubaron las placas a una temperatura de 35  $\pm$  2°C durante un tiempo de 16 a 18 horas. Al cabo de este tiempo, se observó la inhibición del crecimiento del microorganismo a cada una de las concentraciones del antibiótico empleado. Posteriormente, se procedió a calcular la CMI<sub>90</sub> y la CMI<sub>50</sub> para cada uno de los antibióticos.

### **Extracción de ADN de *E. coli***

La extracción de ADN se realizó a partir de cepas bacterianas identificadas bioquímicamente, cultivadas en caldo BHI por 24 horas, a 35°C en aerobiosis. Para ello se utilizó el kit de Purificación de ADN Wizard Genomic (Promega), realizando el protocolo según las especificaciones del fabricante que se detallan a continuación:



Se centrifugaron las células provenientes del cultivo en BHI a 5000 g, descartándose el sobrenadante. Se lavaron con 1 ml de PBS centrifugándose nuevamente a la misma velocidad anterior. Luego, se agregaron 450  $\mu$ l de solución de lisis de núcleo a la suspensión de células y se mezcló suavemente, luego se incubó a 80°C por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente por otros 5 minutos; una vez enfriado, se añadieron 150  $\mu$ l de solución precipitante de proteínas y se mezcló bien en un vórtex por 20 segundos, se incubó en hielo por 5 minutos, posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad (20 000 g) por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente, colocándose en un eppendorf limpio que contenía 600  $\mu$ l de isopropanol, se mezcló bien, lentamente, colocándose en la centrífuga a máxima velocidad (20 000 g) por 15 minutos a 4°C; al terminar, se decantó el sobrenadante y se agregaron 600  $\mu$ l de etanol al 70%, centrifugando nuevamente a máxima velocidad (20000 g) por 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se secó a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente al secado, se resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ l de solución de rehidratación del ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas, para luego guardarlo a -20°C hasta su uso.

#### **Determinación de Genes de Resistencia *bla*<sub>SHV</sub>**

La amplificación de ADN se llevó a cabo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa de genes *bla*<sub>SHV</sub>, donde se emplearon los oligonucleótidos siguientes: SHV-1 (5' TTA TAT TCG CCT GTG TAT TA) y SHV-2 (5' ATG CGC TGT GCT TTG TTAT). La mezcla de la reacción se ajustó a un volumen final de 50  $\mu$ l: 5  $\mu$ l de buffer de reacción 10X, 5  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M de cada deoxinucleósido trifosfato, 200 pMol del cebador SHV-1, 149 pMol del cebador SHV-2, 3,3  $\mu$ l de 3 U de Taq polimerasa y 4  $\mu$ l del ADN muestra extraído previamente. Las PCR se realizaron en un termociclador bajo las condiciones siguientes: 5 minutos de desnaturalización a 96°C, 35 ciclos a temperaturas de

96, 55 y 72°C por 30 segundos para cada temperatura y un ciclo final de 3 minutos a 72°C. El producto de la amplificación ( $\approx$  800 bp) se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1%, se tiñó con bromuro de etidio (1,0  $\mu$ g/ml) y se examinó a través de un transiluminador de luz ultravioleta (UV). La corrida electroforética se llevó a cabo a 120 V con solución de Tris Borato EDTA, pH=8.

### **Determinación de Genes de Resistencia *bla*<sub>TEM</sub>**

La amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *bla*<sub>TEM</sub> fue realizado con los primers TEM-F (5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA) y TEM-R (5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA), descritos por Mabilat (1993), los cuales permitieron amplificar un producto de 1080 pares de base. La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 50  $\mu$ l: 5  $\mu$ l de buffer de reacción 10X, 5  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M de cada deoxinucleósido trifosfato (Promega), 93,7 pMol del cebador TEM-F, 159,4 pMol del cebador TEM-R, 0,3  $\mu$ l de 3 U de Taq polimerasa (CIGB, Cuba) y 4  $\mu$ l del ADN muestra extraído previamente. Las PCR se realizaron en un termociclador, bajo las condiciones siguientes: 5 min de desnaturalización a 95°C, 90s de hibridación a 54°C y 1 min de extensión a 72°C, 30s de desnaturalización a 94°C, se repitieron 35 ciclos y una extensión final 5 min a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñeron con bromuro de etidio (1,0  $\mu$ g/ml) y se examinaron a través de un transiluminador de luz UV. La corrida electroforética se llevó a cabo a 120 V con solución de Tris Borato EDTA, pH= 8 (TBE 1X). Empleando un patrón de peso molecular de 100 pb de Axigen.

### **Análisis de datos**

#### **Análisis Discriminante**

Se utilizó la técnica estadística multivariante Análisis Discriminante, la cual permite clasificar sujetos en categorías, basadas en una serie de variables

de prueba. La tasa de clasificación correcta para aislamientos de cada fuente conocida puede usarse para evaluar las capacidades predictivas de las bases de datos usadas para el análisis discriminante. Como una forma de reducir los datos, el análisis discriminante depende de la computación de variables derivadas de  $n$  aislamientos (número de cepas de *E. coli*) y  $p$  variables (13 antibióticos probados) de  $k$  grupos (fuentes animal y humana) para separar distintivamente las fuentes. Se evaluaron las tasas correctas de clasificación del origen de fuentes de contaminación fecal (humano y animal), empleando para ello el procedimiento PROC DISCRIM en SAS (versión 8.2). La exactitud de la regla de decisión es evaluada por la valoración del porcentaje de aislamientos de la biblioteca de fuentes conocidas que son correctamente clasificadas por la regla. Una vez obtenida la regla de decisión con una tasa aceptable de clasificación correcta, este modelo puede ser aplicado a aislamientos bacterianos de aguas superficiales para identificar las fuentes más probables de las especies que estén causando la contaminación fecal en dichas aguas (SAS/STAT, 1999).

El índice de resistencia múltiple a antibióticos se determinó de acuerdo al método descrito por Parveen *et al.* 1997, permitiendo la clasificación en 2 grupos: animal y humano, a partir del comportamiento de resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* de origen conocido. Para la realización de la base de datos se emplearon los diámetros de los halos de inhibición para cada uno de los antibióticos evaluados en el antibiograma de las 73 cepas de *E. coli* aislados de coprocultivos de origen clínico (datos aportados por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Central Dr. Luis Ortega de Porlamar) y 10 cepas de *E. coli* procedentes de coprocultivos caninos (origen callejero). Posteriormente se obtuvo una ecuación discriminante para clasificar los niveles de origen de las 26 cepas de zonas costeras obtenidas en la presente investigación. El resultado se expresó en porcentaje de clasificaciones correctas.

### Análisis estadístico

Se aplicó estadística de tipo descriptiva para el análisis de los resultados y estos fueron expresados en forma porcentual a través de tablas y figuras (Sokal y Rohfl, 1981).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Parámetros Físicoquímicos:

De un total de cinco playas analizadas en el Estado Nueva Esparta (Playas Punta Arenas, Costa Azul, Punta de Piedras, Playa El Agua y Juangriego) durante un período de tres meses, cada quince días, se obtuvieron 12 muestras de agua de cada playa, para un total de 60 muestras, que al ser analizadas, de acuerdo a las características físico-químicas de cada una de ellas, se encontró que todas las playas mostraron características físico-químicas típicas de la columna de agua de un ambiente marino (tabla 1). El mayor valor promedio para la temperatura corresponde a Costa Azul (30,5°C), y el menor valor a playa El Agua (27,8°C).

**TABLA 1.** Parámetros fisicoquímicos de zonas costeras del estado Nueva Esparta.

Playa	Temperatura °C	Salinidad UPS	pH	O <sub>2</sub> Disuelto mg/l	Sólidos disueltos totales mg/l
Punta de Piedras	28,7	36,6	9,6	9,1	35300
Punta Arenas	29,8	33,6	8,4	5,8	6119
Juangriego	29,3	19,9	8,7	5,0	2920
Costa Azul	30,5	19,4	7,5	4,9	2036
El Agua	27,8	31,0	7,8	7,5	6068

Estos resultados son similares a los obtenidos por Marín (2008) y López *et al.*, 2009, quienes obtuvieron temperaturas promedio de 27,5°C y 27,25°C, respectivamente, en estudios realizados en playas del estado Nueva Esparta. De igual manera coinciden con los datos reportados por Herrera y Suárez (2005), obtenidos de playas del litoral caribeño, específicamente en el estado Falcón, donde la temperatura osciló entre 26 y 32°C.

Las temperaturas más altas probablemente se deben a una mayor irradiación solar y al decrecimiento en la intensidad de los vientos alisios, lo cual

puede favorecer a una cierta estabilidad en la columna de agua, ya que los procesos de mezcla disminuyen y permiten mantener así temperaturas elevadas. Por otra parte, las temperaturas más bajas están asociadas a fenómenos de surgencias que se corresponden con la intensidad de los vientos alisios que soplan en dirección ENE (Márquez, 2003).

El rango de valores para la salinidad fue de 19,4 UPS (Costa Azul) a 36,6 UPS (Punta de Piedras), y se ajustan a los resultados obtenidos por López *et al.*, 2009, cuyos valores estuvieron comprendidos entre 24,0 y 39,0 UPS en muestras de aguas y sedimentos de cuatro playas del estado Nueva Esparta.

De igual manera, son similares a los datos descritos por Herrera y Suárez (2005), con valores de salinidad entre 27,0 y 39,0 UPS de muestras de zonas costeras en el estado Falcón. Por otra parte, Herrera-Silveira (2006), reportaron valores de salinidad de 10,0-40,0 UPS en las costas de México, indicando que estos valores tienen importantes implicaciones en el manejo de los ecosistemas costeros. Se ha definido que los altos valores de salinidad suelen asociarse, posiblemente, a una elevada evaporación ocurrida en la zona, o bien, a la ausencia de aportes fluviales y canales que limiten la circulación del agua; mientras que los niveles de salinidad más bajos se deben, probablemente, al producto de las precipitaciones pluviosas esporádicas y puntuales (CRIA, 1999).

Los valores de pH oscilaron entre 7,5 (Costa Azul) y 9,6 (Punta de Piedras), y son similares a los obtenidos por Marín (2008), quienes realizaron un estudio de la calidad bacteriológica y fisicoquímica de las aguas de la zona costera de Las Mercedes, Municipio Tubores, estado Nueva Esparta, reportando valores de 6,9-8,7; y a los reportados por Herrera y Suárez (2005), cuyos valores oscilaron entre 7,6 y 8,0, en zonas costeras del estado Falcón.

Según el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, el pH óptimo para aguas recreacionales marinas, debe estar comprendido entre 6,5 y 8,5; sin embargo, se puede observar que en dos playas, (Punta de Piedras y

Juangriego) de las cinco en estudio, se obtuvieron valores por encima del rango (9,6 y 8,7 respectivamente), los cuales, posiblemente estén relacionados a la presencia de aguas muy productivas, y puede ser indicativo de que el CO<sub>2</sub> (producido por la oxidación de la materia orgánica y por los procesos de respiración) es utilizado por el fitoplancton para la síntesis de la materia orgánica a través del proceso de fotosíntesis, es decir, que la fijación del CO<sub>2</sub> por efecto de la fotosíntesis disminuye el efecto tampón o buffer del sistema, haciéndolo más alcalino, y por ende podría causar irritación ocular en los bañistas (Morales,1995; Alcalá, 1999; López *et al.*, 2009).

En relación al oxígeno disuelto, todas las playas muestreadas cumplieron con la norma establecida por el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, (>5,0 mg/l), a excepción de Costa Azul con un valor de 4,86 mg/l. Esta baja concentración de oxígeno disuelto podría relacionarse con la descomposición de materia orgánica por escorrentías y/o excretas proveniente de los bañistas (Palazón, 2000). En Punta de Piedras se obtuvo el mayor valor para el parámetro sólidos disueltos totales, con un valor de 35 300 mg/l, y el menor valor lo presentó Costa Azul con 2 036 mg/l.

En aguas naturales, en particular las marinas, el contenido de sólidos disueltos totales está relacionado directamente con la salinidad. Los datos obtenidos en este estudio se corresponden con los obtenidos por otros investigadores, y en general, se puede decir que los valores registrados de los parámetros estimados corresponden a las condiciones habituales del medio ambiente marino costero, no encontrándose una relación significativa entre los aislamientos bacterianos con las variables fisicoquímicas (CRIA, 1999; López, 2002; Marín, 2008; López *et al.*, 2009).

### **Enumeración de CT y CF**

En la tabla 2 se presentan los valores promedios de CT y CF provenientes de las playas muestreadas, observándose el mayor promedio,

tanto para CT como para CF en Punta de Piedras (CT: 5064,2 NMP/ 100 ml; CF: 2122,4 NMP/100ml), encontrándose fuera de los valores de referencia establecidos en Gaceta Oficial. La contaminación fecal encontrada en esta playa, probablemente es debida a la descarga directa al mar de aguas residuales domésticas de la población, la cual no cuenta con sistemas cloacales aptos para la eliminación por bañistas, quienes proveen una alta cantidad de desperdicios.

Las playas Punta Arenas, Juangriego y Costa azul presentaron valores dentro del rango de referencia. Resultados similares fueron obtenidos por Marín (2008), con valores de CT entre 0-100.000 NMP/100 ml y CF entre 0-10.000NMP/100 ml; y difieren de los descritos por López *et al.*, 2009, quienes reportaron de 0-800 NMP/100 ml para CT, ambos en estudios realizados en diferentes zonas costeras del estado Nueva Esparta.

**Tabla 2.** Número Más Probable de coliformes totales y fecales de zonas costeras del estado Nueva Esparta.

Playa	Coliformes totales	Coliformes fecales
	(NMP/100ml)	(NMP/100ml)
	X	X
Punta de Piedras	5064,2	2122,4
Punta Arenas	734,1	135.59
Juangriego	195.2	43.87
Costa azul	830,1	75,39
El Agua	0	0

Por otra parte, en Playa El agua no se evidenció la presencia de CT y CF durante los muestreos realizados, a pesar de ser una de las playas de mayor extensión costera y gran desarrollo turístico, probablemente motivado a la actividad del fuerte oleaje, característico de dicha playa, lo cual conlleva a un mayor arrastre de aguas y sedimentos, por lo que se dificulta el crecimiento y establecimiento de especies bacterianas.

Los indicadores fecales han sido utilizados progresivamente alrededor del



mundo como una herramienta primaria en el estudio de riesgos basados en contaminación microbiológica, debido a su fácil detección, enumeración y rapidez (Yan y Sadowsky, 2007). Los ambientes marino-costeros están sujetos a procesos continuos de contaminación por aguas servidas debido al aumento de la población a nivel mundial y al incremento en la demanda de los recursos marinos para usos turísticos (PNUMA, 2003). Todas las zonas costeras seleccionadas para este estudio funcionan como áreas de amortización para las actividades de esparcimiento y recreación de residentes y visitantes nacionales e internacionales, en las cuales se ha reflejado la demanda creciente de desarrollos turísticos y hoteleros para satisfacer las necesidades de las poblaciones urbanas, afectando ecosistemas marinos de gran importancia y fragilidad, que comienzan a verse afectados por la intervención humana.

A la par del desarrollo urbanístico se ha hecho notable la carencia de plantas de tratamiento para las aguas residuales generadas, las cuales se vierten directamente a los cuerpos de agua y, en la mayoría de los casos, al mar. Todo lo anteriormente expuesto, permite concluir que la enumeración de indicadores bacterianos en los ecosistemas marinos es de gran relevancia porque permite estimar su calidad bacteriológica y su potencial de riesgo para la salud pública por el uso de las aguas con fines turísticos (Iñiguez *et al.*, 2007).

### **Aislamiento de cepas de *E. coli***

En la tabla 3 se muestra el número de cepas de *E. coli* aisladas a partir de 60 muestras de agua recolectadas de las zonas costeras del estado Nueva Esparta, donde se puede apreciar que el mayor porcentaje de cepas aisladas corresponde a Punta de Piedras (46,2%). Estos resultados coinciden con los obtenidos por López *et al.*, 2009, quienes aislaron entre 25,6 y 41,4 % de cepas de *E. coli* provenientes de 92 muestras de agua de mar de cuatro playas del estado Nueva Esparta y está estrechamente relacionado con los valores

obtenidos para CF, los cuales duplican el valor máximo permitido para este tipo de playas; mientras que para Playa El agua no se obtuvo ningún aislamiento de *E. coli*, lo cual indica que está completamente apta para su uso recreacional, de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente y en Gaceta Oficial.

**Tabla 3.** Distribución de cepas de *E. coli* aisladas, provenientes de las playas en estudio.

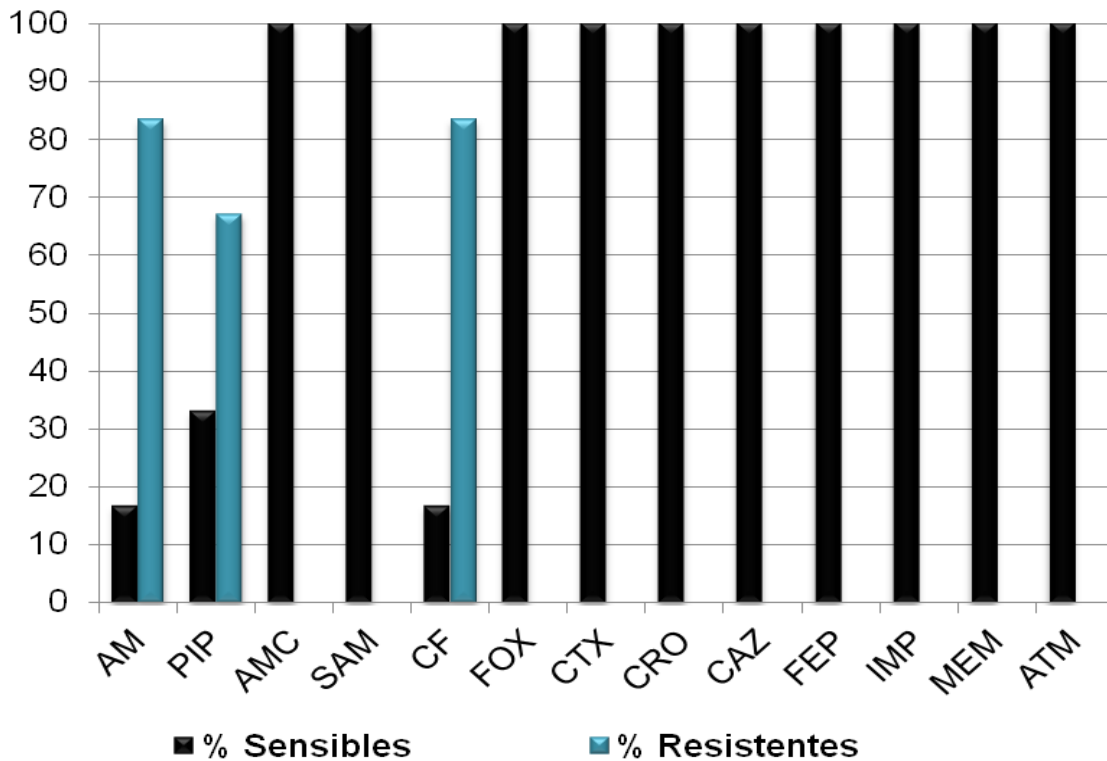
<b>Playa</b>	<b>Nº de cepas</b>	<b>%</b>
Punta de Piedras	12	46,1
Punta Arenas	4	15,4
Juangriego	6	23,1
Costa Azul	4	15,4
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>100</b>

De igual manera los resultados coinciden con los obtenidos por Alhaj *et al.*, 2007, quienes reportaron 61,2% de cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes de origen en Malaysia. La identificación de *E. coli* es considerada una de las determinaciones más importantes en la evaluación de la calidad microbiológica de los cuerpos de agua, como indicador de contaminación fecal (Meyer *et al.*, 2005).

### **Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.**

La figura 2 muestra los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de las 12 cepas de *E. coli* aisladas de Playa Punta de Piedras, estado Nueva Esparta, observándose que todas muestran resistencia a uno o más antibióticos, cuyos mayores porcentajes corresponden a ampicilina (83%), cefalotina (83%), y piperacilina (67%); y presentaron 100% de sensibilidad a los antibióticos: amoxicilina ácido clavulánico, ampicilina sulbactan, cefoxitin,

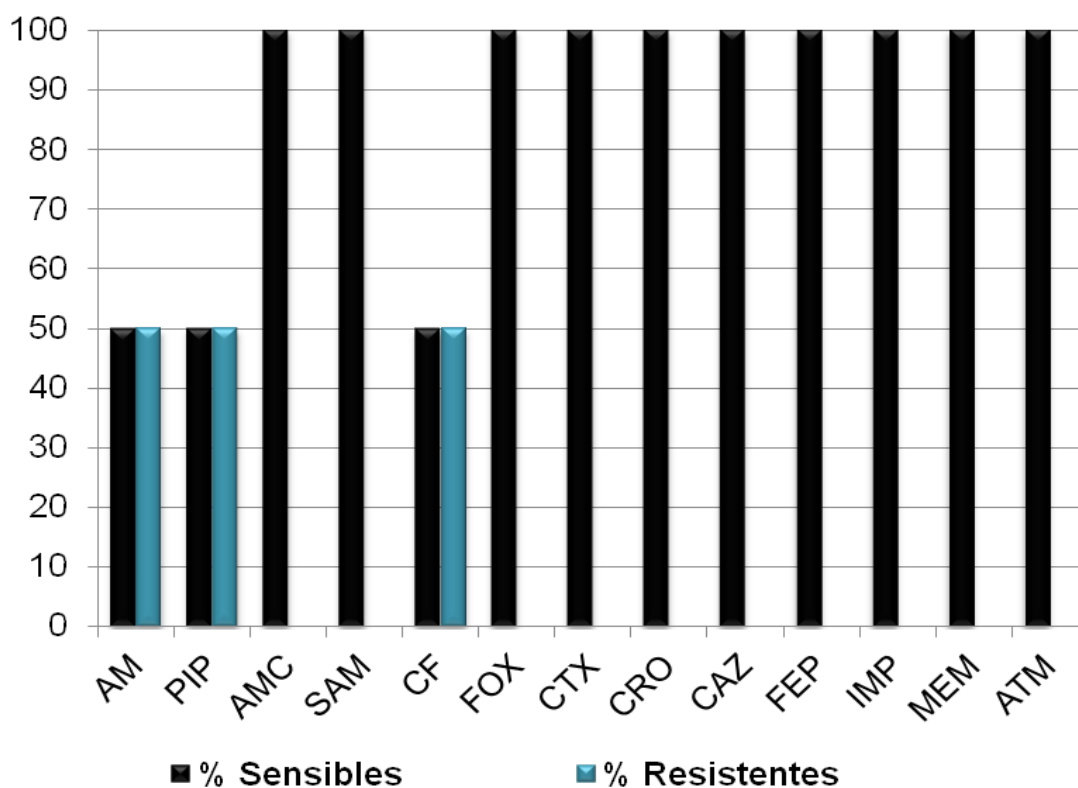
cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenen, meropenen y aztreonam.



AM: ampicilina; PIP: piperacilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; SAM: ampicilina sulbactam; CF: cefalotina; FOX: ceftaxina; CTX: cefotaxime; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IMP: imipenem; MEM: meropenem; ATM: aztreonam.

**Figura 2.** Distribución porcentual de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de Playa Punta de Piedras, estado Nueva Esparta.

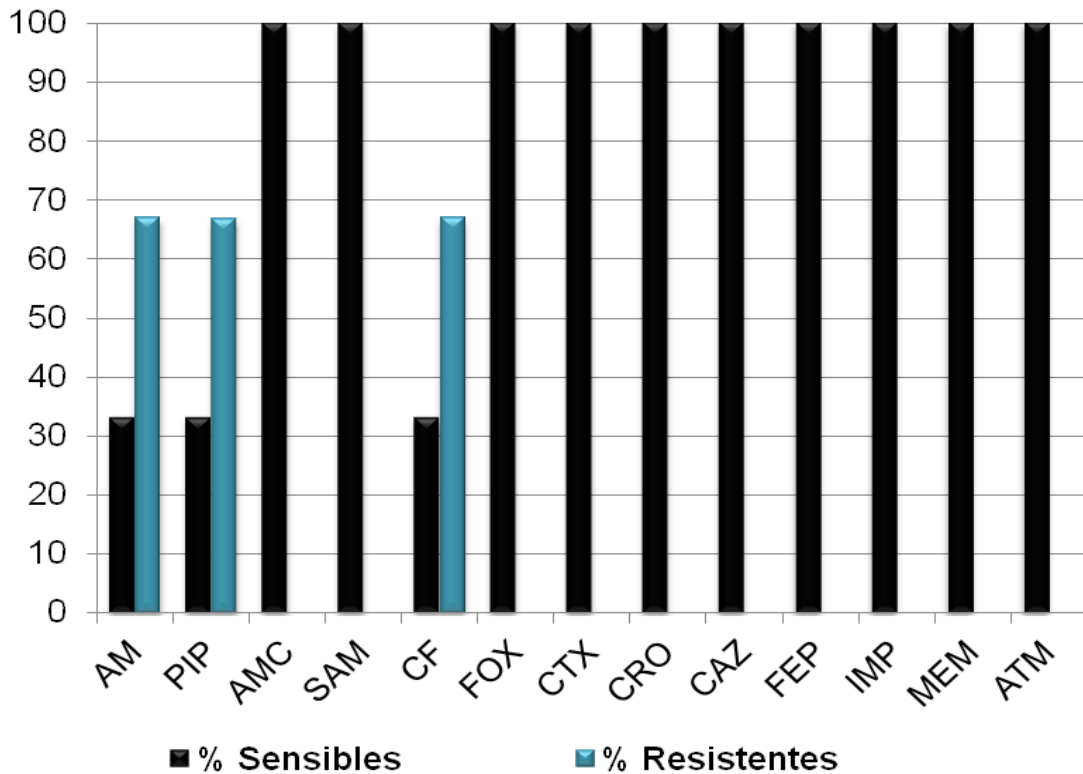
La figura 3 muestra los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli* aisladas de Playa Punta Arenas, estado Nueva Esparta, observándose que todas muestran resistencia a uno o más antibióticos, cuyos mayores porcentajes corresponden a ampicilina, cefalotina y piperacilina con un 50% cada una; y mostraron 100% de sensibilidad a los otros 10 antibióticos empleados.



AM: ampicilina; PIP: piperacilina; AMG: amoxicilina/ácido clavulánico; SAM: ampicilina sulbactam; CF: cefalotina; FOX: cefoxitin; CTX: cefotaxime; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IMP: imipenem; MEM: mereopenem; ATM: aztreonam.

**Figura 3.** Distribución porcentual de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de Playa Punta Arenas, estado Nueva Esparta.

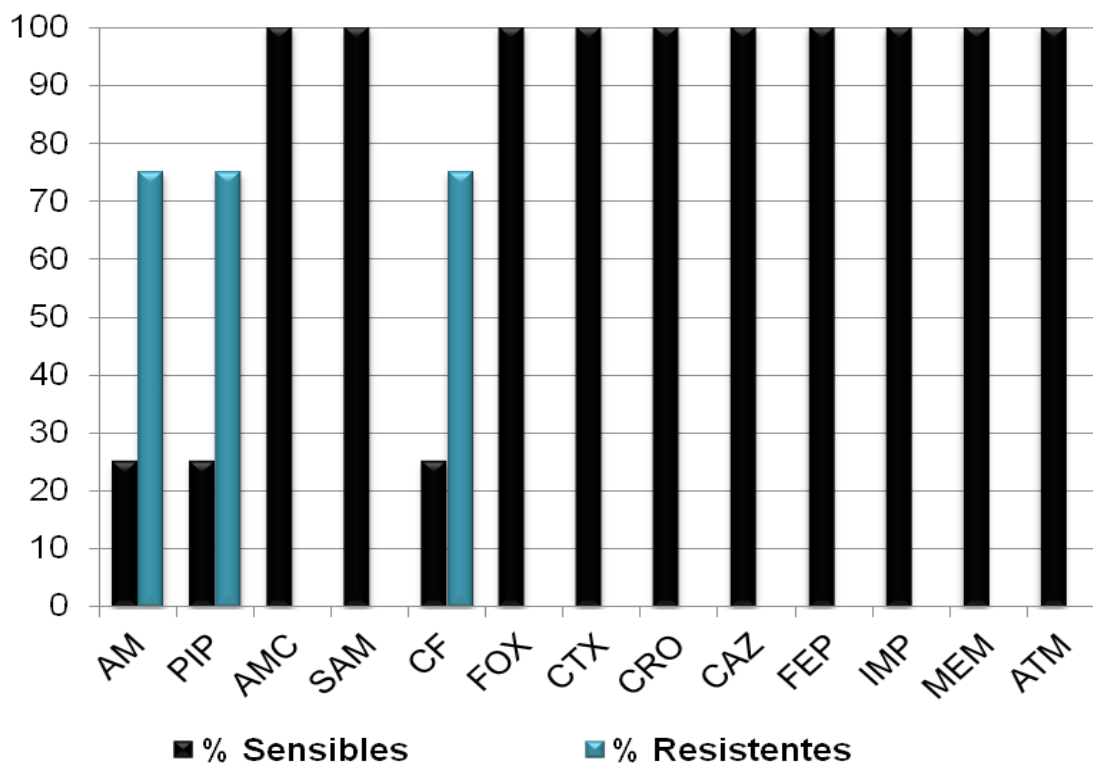
La figura 4 muestra los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli* aisladas de Playa Juan Griego, estado Nueva Esparta, observándose que todas muestran resistencia a uno o más antibióticos, cuyos mayores porcentajes corresponden a ampicilina, cefalotina y piperacilina con 67% cada una; y mostraron 100% de sensibilidad al resto de los antibióticos empleados.



AM: ampicilina; PIP: piperacilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; SAM: ampicilina sulbactam; CF: cefalotina; FOX: cefoxitin; CTX: cefotaxime; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IMP: imipenem; MEM: mereopenem; ATM: aztreonam.

**Figura 4.** Distribución porcentual de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de Playa Juangriego, estado Nueva Esparta.

La figura 5 muestra los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli* aisladas de Playa Costa Azul, estado Nueva Esparta, observándose que el 75% de las muestras presentan resistencia a ampicilina, cefalotina y piperacilina; presentando 100% de sensibilidad al resto de los antibióticos empleados.



AM: ampicilina; PIP: piperacilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; SAM: ampicilina sulbactam; CF: cefalotina; FOX: ceftioxitin; CTX: cefotaxime; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IMP: imipenem; MEM: meropenem; ATM: aztreonam.

**Figura 5.** Distribución porcentual de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de Playa Costa Azul, estado Nueva Esparta.

De las 26 cepas de *E. coli* aisladas en las muestras de aguas estudiadas, 19 de ellas (73,07%) resultaron resistentes a ampicilina y cefalotina, y sensibilidad intermedia a piperacilina, mientras que el 100% mostró sensibilidad a los otros 10 antibióticos empleados. Estos resultados orientan a que el fenotipo de resistencia a ampicilina y cefalotina se produzcan posiblemente por la producción de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de Clase A o BLEA. Se verificaron los resultados obtenidos por el método de difusión en

agar, aplicando el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a todas las cepas, confirmando por esta última técnica la resistencia del 73,07% de las cepas de *E. coli*, lo cual conlleva a concluir que las mismas son productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas Clase A o BLEA, ya que éstas confieren resistencia a dichos antibióticos, y las mismas presentan una hiperproducción de esta enzima, pues una hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas conlleva resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación (excepto cefoxitin) y con frecuencia sensibilidad discretamente disminuida a la asociación amoxicilina-ácido clavulánico. Las cepas portadoras de estas enzimas mantienen su sensibilidad a monobactamas y carbapenemas, y cuando no están hiperproducidas mantienen su sensibilidad a cefalosporinas (Navarro *et al.*, 2002).

El crecimiento del 90% de las cepas bacteriana fue inhibido por una concentración de ampicilina de CMI90: 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y la concentración que inhibió el 50% de las mismas fue de CMI50: 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; mientras que para cefalotina, la CMI90 fue 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la CMI50 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Harwood *et al.*, 2000, describen que la resistencia a múltiples clases de antibióticos es común en coliformes fecales aislados de humanos y animales. La presión selectiva impuesta por la flora comensal gastrointestinal de animales y humanos por el uso excesivo de antibióticos a nivel clínico, resulta en la aparición de patrones de resistencia a antibióticos que reflejan alguna extensión de la exposición de la microflora a dichos antibióticos. Sin embargo, se ha descrito que *E. coli* no presenta resistencia natural a ninguno de ellos, a pesar de ser portadora de una betalactamasa cromosómica de clase C de Ambler que en su forma natural o salvaje se expresa a nivel muy bajo, y no confiere resistencia de relevancia (Livermore, 1995), lo cual ratifica aún más la importancia de los resultados obtenidos en la presente investigación.

El porcentaje de resistencia encontrado en las cepas de *E. coli* provenientes de zonas costeras del estado Nueva Esparta fue mayor al

esperado, y esto puede ser interpretado como un indicador de las consecuencias ambientales del uso irracional de antibióticos en prácticas médicas y veterinarias y de la contaminación de las fuentes de agua con estos compuestos.

Los resultados obtenidos coinciden en gran parte con los reportados por Castañeda *et al.*, 2009, quienes evaluaron la susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la Isla de Margarita, obteniendo un elevado porcentaje de resistencia a la ampicilina (100%).

Harwood *et al.* (2000) y De la Parte-Pérez (2001), describieron que la resistencia a la ampicilina se ha mantenido a lo largo de décadas en cifras superiores al 90%, reseñando que se han detectado cifras significativas de cepas de coliformes fecales de origen humano resistentes a diferentes antibióticos de la familia de los  $\beta$ -lactámicos, entre ellos la ampicilina. Vantarakis *et al.* (2006) reportaron 89,7% de cepas resistentes a la ampicilina y 80,9% resistentes a la cefalotina, datos que se ajustan a los obtenidos en la presente investigación.

Por su parte, Watkinson *et al.* (2007), informaron que los porcentajes de resistencia en *E. coli* recuperadas de ambientes acuáticos en Argentina fueron 15% para ampicilina y 14% para cefalotina, los cuales difieren de los obtenidos en este estudio; señalando que la presencia ubicua de los antimicrobianos incorporados en diferentes hábitats, ha perturbado el delicado balance de los microorganismos en el ambiente, conllevando a que gérmenes con variados grados de resistencia, tanto patógenos como no patógenos, hayan reemplazado los microorganismos sensibles.

Las bacterias resistentes a antibióticos, provenientes del tracto gastrointestinal humano, pueden llegar al ambiente a través de las aguas de desecho, donde los microorganismos resistentes a antibióticos y sus residuos son excretados. Aunque la mayoría de las personas consideran que el medio



ambiente se encuentra libre de contaminación, las aguas no tratadas generalmente desembocan en las playas y otras fuentes de agua naturales, lo que conduce a la exposición de las poblaciones bacterianas a cualquier agente antimicrobiano, y puede conllevar a la resistencia a otros agentes, sin la necesidad de una exposición previa. Todo esto incrementa el potencial impacto de los residuos de antibióticos en ambientes acuáticos que se ha mantenido en ascenso durante los últimos años (Alhaj *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

Los hallazgos del presente trabajo nos sugieren que las bacterias de los ambientes acuáticos de las zonas costeras del estado Nueva Esparta, pueden contribuir al emergente problema de la diseminación de la resistencia antibiótica, conllevando a efectos irreversibles en el medioambiente.

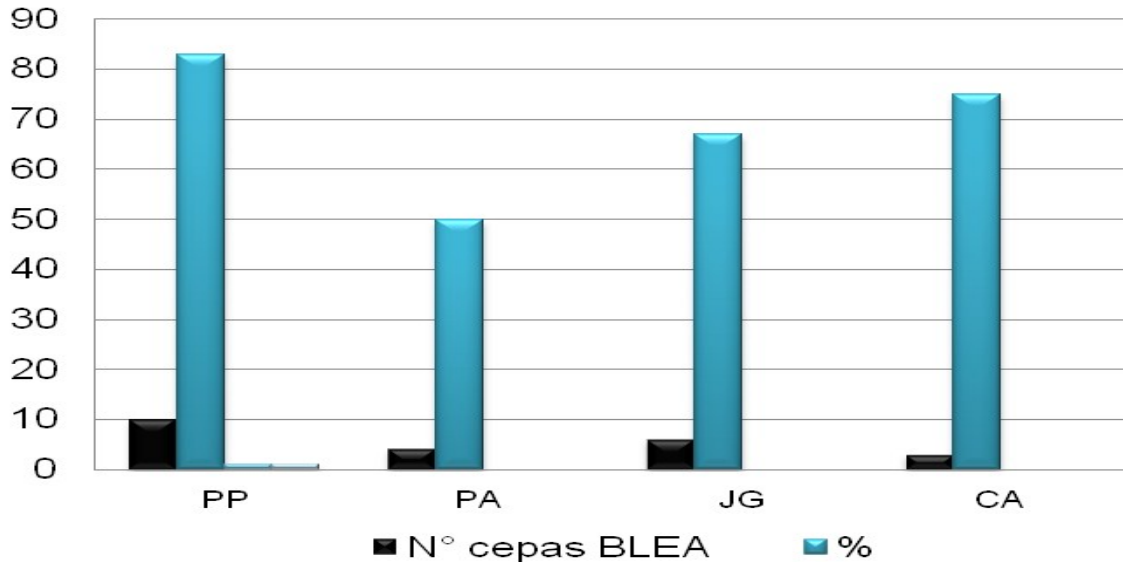
### **Detección fenotípica de $\beta$ -lactamasas**

La figura 6 muestra los resultados obtenidos para la detección fenotípica BLEA y BLEE en cepas de *E. coli* aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta, obteniéndose 83% de BLEA positiva para las cepas correspondientes a Punta de Piedras, 50% en el caso de Punta Arenas, 67% en Playa Juangriego y 75% en el caso de Costa Azul.

Las cepas de *E. coli* aisladas en las zonas costeras del estado Nueva Esparta no mostraron un perfil de resistencia característico de cepas productoras de BLEE, es decir, no hubo hidrólisis de los  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactámicos, pero a pesar de ello, es relevante destacar la importancia ambiental que tiene el aislamiento, identificación y detección de resistencia de cepas ambientales, ya que existe el riesgo de diseminación de especies bacterianas a la población por la utilización de estos espacios recreativos (Navarro *et al.*, 2002).

Los  $\beta$ -lactámicos son los antibióticos más ampliamente usados y la resistencia a éstos implica una severa amenaza debido a que ellos tienen baja

toxicidad y son empleados para tratar un amplio rango de infecciones (Livermore, 1996). Los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos incluyen la no accesibilidad de los antibióticos a sus enzimas blanco, modificaciones de los blancos enzimáticos y/o desactivación de los antibióticos por  $\beta$ -lactamasas.



PP: Punta de Piedras; PA: Punta Arenas; JG: Juangriego; CA: Costa Azul

**Figura 6.** Detección fenotípica de  $\beta$ -lactamasas en cepas de *E. coli* aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta.

Actualmente, en nuestro país no se cuenta con datos publicados acerca del comportamiento de la resistencia a antibióticos mediada por enzimas  $\beta$ -lactamasas en cepas aisladas de muestras ambientales, debido a que la mayoría de las investigaciones, en general, han estado enfocadas a muestras de origen clínico (Paterson y Bonomo, 2005, Perozo *et al.*, 2007; Albarado *et al.*, 2009; Garza- Ramos *et al.*, 2009; Perozo y Castellano, 2009; Sharma *et al.*, 2010). Sin embargo, considerando las numerosas evidencias que soportan que la resistencia de cepas clínicas está íntimamente asociada con la resistencia de bacterias de origen ambiental, queda clara la necesidad de investigar más ampliamente los microorganismos ambientales, incluyendo los no patógenos

(Tatavarthy *et al.*, 2006; Prabhu *et al.*, 2007; Abriouel *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Así mismo, microorganismos resistentes han sido aislados de aguas continentales, costeras, subterráneas, sedimentos, lagunas y otros cursos de agua, pudiendo afirmarse que la resistencia antibiótica está ampliamente diseminada en el medio ambiente y debe ser considerada como un fenómeno genético global (Seveno *et al.*, 2002; Schwarts *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009).

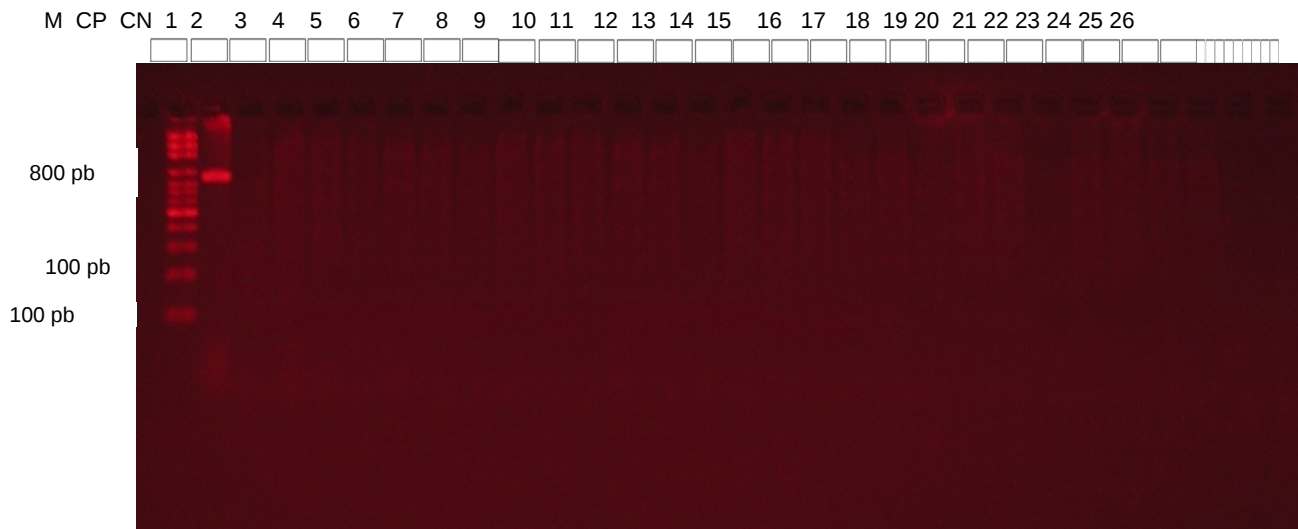
Se han identificado más de 400  $\beta$ -lactamasas distintas, codificadas por genes de resistencia a antibióticos (*bla*), y las enzimas que median la resistencia de un amplio rango de  $\beta$ -lactámicos incluyendo penicilinas y cefalosporinas (Li *et al.*, 2007), comportamiento observado en los resultados obtenidos en la presente investigación.

La adquisición de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase A, o  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, es responsable de la resistencia a aminopenicilinas y de la sensibilidad disminuida o intermedia a ureidopenicilinas. Las cepas portadoras de estas enzimas mantienen su sensibilidad a cefalosporinas, monobactamas y carbapenemas. Sin embargo, una hiperproducción de estas enzimas conlleva resistencia a cefalosporinas de 1<sup>o</sup> generación (cefalotina en el caso particular de este estudio) y con frecuencia sensibilidad discretamente disminuida a la asociación amoxicilina-ácido clavulánico (Miró *et al.*, 1998; García *et al.*, 2005).

### **Identificación de genes de resistencia *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> en cepas de *E. coli* aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta.**

La figura 7 muestra la electroforesis en gel de agarosa de los genes *bla*<sub>SHV</sub>, en cepas de *E. coli* aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta, evidenciándose que ninguna de las cepas aisladas presenta amplificado para el gen en estudio. Es importante resaltar que en nuestro país no existen datos publicados de genes de resistencia que permitan compararlos

con los obtenidos en la presente investigación, debido a que los estudios han sido enfocados principalmente a aislados de muestras clínicas. (Araque *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2006; Guzmán y Alonso, 2009).



**Figura 7.** Productos de amplificación utilizando los primers blaSHV-1 y blaSHV-2, que amplifican la región específica para el gen *bla*<sub>SHV</sub> ( $\approx$  800 bp). M: marcador de peso molecular 1500 pb; CP: control positivo, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Del 1 al 26: muestras; CN: control negativo.

Zhang *et al.* (2009), realizaron un análisis de los genes de resistencia a antibióticos en aguas ambientales, debido a que las bacterias portadoras de estos genes pueden ingresar al medio acuático ya sea directamente por descargas de aguas residuales no tratadas a través de sistemas de recolección de aguas de desecho, reportando que los genes los más predominantes para *E. coli* aislados de distintas fuentes de agua (aguas de desecho de hospitales, producción animal, naturales marinas y sedimentos) fueron tet B y bla<sub>TEM-1</sub>, no encontrándose genes bla<sub>SHV</sub>, lo cual coincide con los datos reportados en la presente investigación.

Sin embargo, se han identificado una amplia variedad de genes *bla*, en cepas provenientes de lagunas, aguas de granjas, aguas marinas y sedimentos, estos compartimientos ambientales funcionan como reservorios de genes de

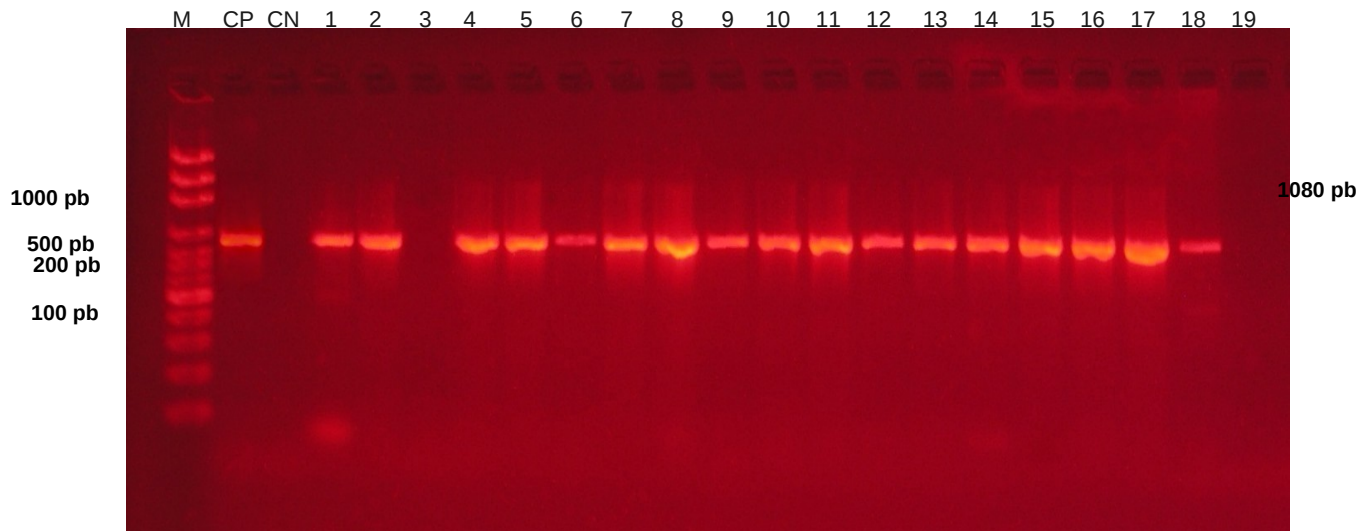
resistencia asociados a  $\beta$ -lactamasas. Los genes *bla* pueden algunas veces coexistir con otros determinantes de resistencia antimicrobiana y pueden estar asociados con elementos genéticos móviles, incrementando la posibilidad de resistencia a múltiples drogas y su diseminación ambiental (Dalsgaard *et al.*, 2000; Schwartz *et al.*, 2003; Szczepanowski *et al.*, 2004; Volkmann *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 2005; Antunes *et al.*, 2006; Poppe *et al.*, 2006; Jacobs y Chenia, 2007; Taviani *et al.*, 2008).

Es importante resaltar que, independientemente de los resultados negativos obtenidos en el presente estudio para genes *bla<sub>SHV</sub>*, existe una resistencia marcada a los antibióticos ampicilina y cefalotina, así como una sensibilidad disminuida a la piperacilina, hecho que no puede pasar desapercibido, debido a que, probablemente, otros genes de resistencia podrían estar involucrados en el comportamiento de estas cepas provenientes de zonas costeras. Este tipo de estudios puede contribuir de manera significativa al entendimiento de la resistencia a antibióticos en ambientes acuáticos y los potenciales riesgos ambientales que pueden afectar la salud de las personas expuestas a tales condiciones (Watkinson *et al.* 2007).

Posteriormente, a las 19 cepas de *E. coli* productoras de BLEA aisladas de muestras de zonas costeras del estado Nueva Esparta, se les realizó la detección del gen *bla<sub>TEM</sub>*, mediante PCR, observándose en la figura 8 las amplificaciones de 1080 pb correspondientes a este gen, tanto en el control positivo ubicado en el pozo identificado CP, como en las muestras evaluadas (pozos del 1 al 19).

Con respecto a las amplificaciones realizadas a las cepas de *E. coli*, se puede observar que 17 de las 19 cepas analizadas (89,47%), mostraron amplificaciones de 1080 pb con los primers específicos para el gen *bla<sub>TEM</sub>*, lo que permite demostrar que las cepas de *E. coli* productoras de BLEA aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta son portadoras del gen *bla<sub>TEM</sub>*.

Estos resultados eran de esperarse, debido a que *E. coli* presenta una mayor frecuencia del gen  $bla_{TEM}$  en lugar de otros tipos de genes que confieren resistencia por producción de BLEA.



**Figura 8.** Productos de amplificación utilizando los primers  $bla_{TEM}$ -R y  $bla_{TEM}$ -F, que amplifican la región específica para el gen  $bla_{TEM}$  (1080 pb). M: marcador de peso molecular 1500 pb; CP: control positivo, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Del 1 al 19: muestras; C-: control negativo.

No se encontraron datos reportados referentes a la determinación del gen  $bla_{TEM}$  en muestras de aguas de playa o zonas costeras en nuestro país, pero si en otros países como Hong Kong, donde Zhang *et al.* (2009), realizaron un análisis de los genes de resistencia a antibióticos en aguas ambientales, reportando que los genes los más predominantes para *E. coli* aislados de distintas fuentes de agua fueron tet B y  $bla_{TEM}$ . De igual manera, en un estudio realizado en Canadá, se determinó la presencia de genes que confieren resistencia a ampicilina a cepas de *E. coli* aisladas de aguas recreativas, siendo el más predominante el gen  $bla_{TEM}$  en 4,9% (Hamelin *et al.* 2006).

Durante los últimos años ha sido significativo el aumento de la resistencia de los diferentes gérmenes causantes de infecciones importantes, como es el

caso de *E. coli*, a través de diversos mecanismos. Sin embargo, existen reportes de estudios de resistencia y moleculares obtenidos en aislados de muestras hospitalarias y clínicas en nuestro país y en distintas partes del mundo, revelando la importancia y la necesidad de lograr tratamientos oportunos y certeros de estas cepas resistentes, a fin de evitar futuras complicaciones en la vida del paciente. (Perozo *et al.*, 2007; Albarado *et al.*, 2009; Garza- Ramos *et al.*, 2009; Perozo y Castellano, 2009; Sharma *et al.*, 2010)

Hugo (2006), demostró la presencia de genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> en bacterias multirresistentes aisladas en diferentes regiones de Venezuela (en pacientes con infecciones nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas, en cepas provenientes de 4 centros de salud de la zona Metropolitana de Caracas y en cepas aisladas de los Embalses Pao-Cachinche), reportando que las cepas presentaron 30% de incidencia para el gen *bla*<sub>TEM</sub> y 10% para el gen *bla*<sub>SHV</sub> en las cepas aisladas de los embalses, concluyendo que la prevalencia de estas cepas bacterianas puede deberse al uso indiscriminado y diseminación de la resistencia, bien a que estos antibióticos no sean funcionales para combatir las infecciones causadas por las bacterias, así como fallas en las políticas del sistema de salud.

Por otra parte, Torres *et al.*, 2006, en 8 centros hospitalarios de la zona Metropolitana de Caracas, evaluaron la presunta producción de BLEE en Enterobacterias, con la finalidad de determinar los tipos de enzimas circulantes en estos centros, demostrando la presencia de BLEE tipo TEM, SHV y CTX-M, así como también, 32,2% de genes tipo TEM correspondientes a las BLEA TEM-1 y 2.

Resulta de gran interés e importancia la búsqueda y análisis de la resistencia bacteriana en las cepas provenientes de zonas costeras, ya que ésta puede conllevar a la ruptura del equilibrio de la relación ambiente-salud, ya que queda demostrado, no sólo con la presente investigación, sino con reportes

a nivel mundial que la adquisición de resistencia antimicrobiana de cepas provenientes de espacios ambientales constituye un problema de salud pública y ambiental que debe ser vigilado y monitoreado por los organismos competentes, para así establecer criterios de saneamiento en las zonas que lo requieran y políticas de uso racional de antimicrobianos en ambientes intrahospitalarios.

### Análisis discriminante

Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de las 26 cepas de *E. coli* aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta fueron sometidas al análisis discriminante. La tabla 4 muestra los coeficientes de la función de clasificación que permitió identificar a qué grupo pertenecía cada una de las cepas en estudio.

**Tabla 4.** Coeficientes de la función de clasificación del análisis discriminante, aplicado a las cepas de *E.coli* aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta.

	Origencod		
	1	2	3
Cefepime	13,073	9,760	9,609
Ceftazidima	24,530	19,162	19,021
(Constante)	-466,947	276,197	-269,638

Funciones discriminantes de Fisher

De acuerdo a la evaluación del comportamiento de las cepas de origen conocido (animal y humano), se pudo obtener las ecuaciones o funciones discriminantes de Fisher para los niveles de origen, a partir de los antibióticos que aportaron mayor peso en la diferenciación del origen de dichas cepas, como fue el caso de cefepime y ceftazidima. Las ecuaciones obtenidas fueron las siguientes:



$$F1 = -466,95 + 24,5\text{Ceftazidima} + 13,1\text{Cefepime}$$

$$F2 = -276,2 + 19,2\text{Ceftazidima} + 9,7\text{Cefepime}$$

$$F3 = -296,6 + 19,0\text{Ceftazidima} + 9,6\text{Cefepime}$$

Estas ecuaciones permiten evaluar cualquier dato que se desee clasificar y ubicar en uno de los grupos, ya sea de origen humano o animal. Se clasifica una cepa bacteriana sometida a ensayo en el grupo en el cual la evaluación de las tres funciones obtenga el valor más alto, ofreciendo la ventaja de su rapidez y una tasa elevada de clasificaciones correctas, las cuales pueden apreciarse en la tabla 5, donde se muestran los resultados de la clasificación mediante el análisis discriminante de patrones de resistencia a antibióticos, de las cepas de *E. coli* aisladas en zonas costeras del estado Nueva Esparta, el cual arrojó entre un 75 y 84,6%, lo cual indica que es altamente confiable.

Al evaluar los resultados obtenidos en la presente investigación, empleando el análisis discriminante, se observa que las cepas de *E. coli* aisladas en zonas costeras del estado Nueva Esparta, se ajustan al comportamiento mostrado por las cepas de origen clínico, por lo cual las cepas en estudio probablemente corresponden a este grupo, y es posible que la fuente de contaminación en las playas muestreadas sea consecuencia de la descarga de aguas servidas directamente al mar, sin un tratamiento previo, y plantea la necesidad de crear y establecer programas de tratamiento de aguas servidas y de monitoreo de la calidad del agua de dichas playas.

**Tabla 5.** Tabla de clasificación mediante el Análisis Discriminante de patrones de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas en zonas costeras del estado Nueva Esparta.

**Resultados de la clasificación<sup>a,b</sup>**

			Origencod	Grupo de pertenencia pronosticado			Total
				1	2	3	
Casos seleccionados	Original	Recuento	1	9	0	0	9
			2	0	0	24	24
			3	0	0	63	63
	%		1	100,0	,0	,0	100,0
			2	,0	,0	100,0	100,0
			3	,0	,0	100,0	100,0
Casos no seleccionados	Original	Recuento	1	1	0	0	1
			2	0	0	2	2
			3	0	0	10	10
	%		1	100,0	,0	,0	100,0
			2	,0	,0	100,0	100,0
			3	,0	,0	100,0	100,0

a. Clasificados correctamente el 75,0% de los casos agrupados originales seleccionados.

b. Clasificados correctamente el 84,6% de casos agrupados originales no seleccionados.

1. Origen animal
2. Cepas en estudio
3. Origen humano (clínico)

Estos resultados son similares a los obtenidos por Wiggins *et al.* (1999), quienes obtuvieron de 96-100% de clasificaciones correctas de estreptococos fecales aislados de diferentes fuentes de origen ambiental y animal (origen mixto); sin embargo, observaron que en los distintos periodos de muestreo las tasas de clasificación correctas eran variables.

Por otra parte, los resultados superan los obtenidos por Harwood *et al.* (2000), quienes obtuvieron un promedio de tasas correctas de clasificación para estreptococos fecales de 62,3%, por análisis discriminante de sus patrones de

resistencia a antibióticos, identificando como fuente dominante de contaminación la de origen animal, con un impacto menor de origen antropogénico en las aguas subtropicales en estudio, lo cual sugiere que la técnica del análisis discriminante promete ser una herramienta útil en la identificación de fuentes de contaminación fecal en aguas ambientales.

La resistencia a antibióticos en *E. coli* ha sido identificada globalmente en aislados ambientales, animales y de fuentes humanas. Esta es una consecuencia del uso de los antimicrobianos en medicina y su aplicación en el tratamiento de animales, lo cual trae como consecuencia cambios fenotípicos, algunas veces asociados a mutaciones cromosómicas. Los estudios muestran que muchos organismos patógenos han desarrollado algún grado de resistencia a los antimicrobianos y éstos confieren resistencia a través de distintos mecanismos con un impacto negativo en la medicina humana y veterinaria (Heike y Reinhard, 2005; Walsh *et al.*, 2005).

Es muy importante resaltar que en nuestro país no existen datos previos que permitan la realización de una base de datos con la cual analizar los resultados obtenidos en la presente investigación, por lo cual este estudio permitió sentar las bases para un nuevo enfoque en el campo del origen de fuentes de contaminación de aguas costeras en Venezuela. De igual manera el número y tipo de antibióticos empleados en los distintos estudios son diferentes, dependiendo de la especie bacteriana o grupo bacteriano a estudiar. El comportamiento de la resistencia de las distintas cepas es variable en cada país y a lo largo del tiempo, siendo lo más idóneo la creación de bases de datos a partir de cepas autóctonas de cada zona, para de esa manera poder evaluar los cambios en los patrones de resistencia a antibióticos de manera particular.

Los resultados obtenidos en esta investigación aportaron un nuevo conocimiento sobre la resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli*

provenientes de zonas costeras del estado Nueva Esparta, lo cual no ha sido evaluado hasta ahora en nuestro país. Esta información abre una nueva perspectiva no sólo en el estado Nueva Esparta, sino también, en el país, que pudiera utilizarse para la creación de programas dirigidos a mejorar las condiciones sanitarias de estas playas, así como también, la aplicación de políticas de uso racional de antimicrobianos en ambientes intrahospitalarios, y de esta manera prevenir su llegada al medio ambiente y el daño a la salud.

## CONCLUSIONES

El medio ambiente marino costero no mostró cambios importantes en las características físico-químicas evaluadas que sugieran, por sí solos, procesos de contaminación en dichos ambientes.

Las muestras de agua de Playa Punta de Piedras, superaron los índices bacterianos establecidos en Gaceta Oficial para CT Y CF.

El mayor porcentaje de cepas aisladas de *E. coli*, procedentes de muestras de agua, corresponde a Punta de Piedras, y está estrechamente relacionado con los valores obtenidos para CF para dicha playa.

Todas las cepas de *E. coli* estudiadas mostraron resistencia a uno o más antibióticos, cuyos mayores porcentajes correspondieron a ampicilina, cefalotina y piperacilina.

Se reporta por primera vez la detección fenotípica característica de BLEA en cepas de *E. coli* aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta.

19 de las 26 cepas de *E. coli* aisladas en las playas estudiadas, presentaron un fenotipo característico de BLEA y en 17 de ellas se detectó la presencia del gen *bla*<sub>TEM</sub>. Indicando que las bacterias presentes en aguas costeras son capaces de adaptarse, establecerse y desarrollar habilidades para participar en eventos de intercambios genéticos que les confieren resistencia. En ninguna de las cepas se detectó la presencia del gen *bla*<sub>SHV</sub>.

El Análisis discriminante permitió clasificar las 26 cepas aisladas de zonas costeras del estado Nueva Esparta dentro de la categoría de cepas provenientes de origen humano (clínico), por lo cual se puede deducir que la fuente de contaminación presente en dichas playas es de origen humano, obteniéndose una tasa correcta de clasificación entre 75% y 84,6%, representando el primer reporte de este tipo de análisis en nuestro país y ratificando al análisis discriminante como una herramienta de gran ayuda en la clasificación de fuentes de contaminación fecal.

## BIBLIOGRAFIA

Abriouel, H.; Omar, N.; López, R.; Grande, M.; Martínez-Viedma, P.; Ortega, E.; Cañamero, M. y Galvez, A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistant among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 123: 38-49.

Albarado, L.; García, J.; Rodríguez, E.; Carpio, C.; Salazar, E.; Flores, E.; Betancourt, J.; Araque, Y. y Guzmán, M. 2009. Frecuencia de enterobacterias nosocomiales productoras de b-lactamasas de espectro extendido, Cumaná, Venezuela. *NOVA*, 7 (11): 52-59.

Alcalá, L. 1999. Estudio hidroquímico del sector oriental del Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela durante el periodo comprendido entre septiembre de 1995 y mayo 1996. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 112 pp.

Alhaj, N.; Mariana, N.; Raha, A. y Ishak, Z. 2007. Prevalence of Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* from different sources in Malaysia. *Inter. J. of Poult. Sci.*; 6 (4): 293-297.

Alongi, D. 1998. *Coastal ecosystem processes*. CRC. Nueva York, EEUU. 419 pp.

Alonso, A., Sánchez, P., Martínez, J. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Minireview. *Environ. Microbiol.*, 3: (1)1-9.

American Public Health Association. 1998. Standards of methods for examination of water and wastewater. 21 ed. Washington, DC: APHA.

Andrews, J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. of antimicrob. Chemoter. Suppl.* S1, 5-16.

Antunes, P.; Machado, J. y Peixe, L. 2007. Dissemination of a new gene cluster

comprising sul3 (tnp-sul3-tnp) linked to class 1 integrons with an unusual 3'CS region (qacH) among Salmonella isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 29:S112–S113.

Araque, M.; Nieves, A.; Velazco, E. y Caldera, Z. 2001. Clonación y caracterización de los genes que codifican las b-lactamasas TEM-1 y SHV-5 aislados en cepas **de** *Klebsiella pneumoniae* provenientes de neonatos con septicemia nosocomial. *Biotec. Apl.*, 17: 94-98.

Baldini, M. y Selzer, P. 2008. Patrones de resistencia a antibióticos de enterococos aislados de aguas estuarinas. *Rev. Arg. de Microbiol.*, 40: 48-51.

Borrego, J.; Arrabal F. y Romero, P. 1982. "Study of Microbiological Pollution of a Malaga Litoral Area: II Relationship between Faecal coliforms and Faecal Streptococci". *VI J. Etud Poll, Cannes C.I.E.S.M.*

Bradford, P. 2001. Extended- spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology, and detection of his important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14: 933-955.

Bush, K.; Jacoby, G. y Medeiros, A. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamasas and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 39:1211-1233.

Campos, V.; Zahr, M.; Tello, P. y Rios, R. 1986. Calidad bacteriológica del agua en playas de Valparaiso y Vina del Mar. III- Contaminación ambiental. *Bol. Micol.*, 3(1): 93-98.

Castañeda, Y.; López, P.; Figueroa, Y. y Fuentes, J. 2009. Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la Isla de Margarita, Venezuela. *Rev.*

*Saber. 21: 12-19.*

Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S20.

Centro Regional De Investigaciones Ambientales (CRIA). 1999. Caracterización de las aguas marinas y sedimentos del área marino-costera del estado Nueva Esparta. Informe del Proyecto: Desarrollo Armónico de Oriente Convenio: PDVSA-PALMAVEN-CRIA, Universidad de Oriente. Núcleo de Nueva Esparta. 155 pp.

Cortés-Lara, M. 2003. "Importancia de los Coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de banderas Jalisco-Nayarit". *Rev. Biomed.*, 14: 121-123.

Dalsgaard, A.; Forslund, A.; Serichantalergs, O.; Sandvang, D. 2000. Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. *Antimicrob. Age. Chemother.*, 44:1315–1321.

De La Parte-Pérez, M.; Brito, A.; Guzmán, M. y Carmona, O. 2001. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela. Análisis de una década. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 21(2).

Dugan, J.; Hubbard, D.; McCrary, M. y Pierson, M. 2003. The response of macrofauna communities and shorebirds to macrophyte wrack subsidies on exposed sandy beaches of southern California. *East. Coast. Shelf. Sci.*, 58S:



25-40.

Edberg, S. y Edberg, M. 1988. A defined substrate technology for the enuamaeration of microbial indicators of environmental pollution. *Yale. J. Biol. Medicine.*, 61: 389-399.

Edelstein, M.; Pimkin, M.; Palagin, I.; Edelstein, L. y Stratchounski, L. 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M Extended spectrum  $\beta$ -lactamase- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemothe.*, 47: 3724-3732.

Ferreira Da Silva, M.; Tiago, I.; Verissimo, A.; Boaventura, R.; Nunes, O. y Manaia, C. 2005. Antibiotic resistance in enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45: 1-8.

Furuse, K.; Ando, S.; Osawa, S. y Watanabe, I. 1981. Distribution of ribonucleic acid coliphages in raw sawage from treatment plants in Japan. *Appl. Envirom. Microbiol.*, 41: 1139-1143.

Gaceta Oficial 5021, Extraordinario de la República de Venezuela, 18 de Diciembre de 1994. Decreto 883 del 11-10-94. Normas para la clasificación y el control de la Calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos de las descargas a medios costeros, Caracas, D.F. (Venezuela).

Galv, L. 2003. A water pollution crisis in the Americas. *Hab. Deb.*; 9 (3): 10-15.

García, J.; Cantón, R.; García, J.; Gómez-Lus, M.; Martínez-Martínez, L.; y Rodríguez-Avial, C. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Picazo JJ, editor. *Procedimientos en Microbiología Clínica.*

Disponible en: <http://www.seimc.org/2005>.

Garza-Ramos, U.; Martínez, E. y Sánchez, J. 2009. SHV-type Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. *Sal. Pú. Mex.*; 49 (6): 657-665.

González, M.; Torres, T.; Chiroles, S.; y Mohammad, M. 2009. Medios de cultivo fluorogénicos y cromogénicos y su evaluación en aguas de consumo y costeras. *Hig. San. Amb.*, 9: 422-430.

Goossens, H.; Vercauteren, E.; Descheemaeker, P.; Ieven, M. y Sanders, C. 2001. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Belgian teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 35 (9): 2191-2197.

Guerra, B.; Junker, E.; Schroeter, A.; Helmuth, R.; Guth, A. y Beutin, L. 2006. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57 (6): 1210-1214.

Guzmán, M. y Alonso, G. 2009. Caracterización de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de *K. pneumoniae*. Sucre-Venezuela. *Invest. Clín.*, 50: 4.

Hamelin, K.; Bruant, G.; El-Shaarawi, Abdel.; Hill, S.; Edge, T.; Bekal, S.; Fairbrother, J.; Harel, J.; Maynard, C.; Masson, L. y Brousseau, R. 2006. A Virulence and Antimicrobial Resistance DNA Microarray Detects a High Frequency of Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolates from Great Lakes Recreational Waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6): 4200-4206.

- Harwood, V.; Whitlock, J. y Whittington, V. 2000. Classification of Antibiotic Resistance Patterns of Indicator Bacteria by Discriminant Analysis: Use in predicting the source of fecal contamination in subtropical Waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3698-3704.
- Heike von, B.; y Reinhard, M. 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int. J. Med. Microbiol.*, 295(6-7):503-511.
- Herrera, A. y Suárez, P. 2005. Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad ambiental del agua costera. *Interciencia*, 30: (3) 355-364.
- Herrera-Silveira, J. 2006. Lagunas costeras de Yucatán: investigación, diagnóstico y manejo. *Ecotrópicos*. 19(2): 94-108.
- Hisham, Z. y Finch, R. 2001. Resistencia antibiótica en el año 2000. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 19: 91-92.
- Howard, C.; Van Daal, A.; Kelly, G.; Schooneveldt, J.; Nimmo, G. y Giffard, P. 2002. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV betalactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 659-664.
- Huberty, C. 1994. Applied Discriminant Analysis. Interscience edition.
- Hugo, E. 2006. Presencia de los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* en bacterias multirresistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela. VIII Jornadas Científicas Estudiantiles de la UCV. Noviembre 2006.
- Hujer, A.; Keslar, K.; Diätenberger, N.; Bethel, C.; Endimiani, A. y Bonomo, R.

2009. Detection of SHV  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli using fluorescein-labeled antibodies. *BMC Microbiol.*, 9:45-48
- Incera, M.; Cividanes, S.; Lastra, M. y López, J. 2003. Temporal and spacial variability of sedimentaric organic matter in Sandy beaches on the northwest coast of the iberian peninsula. *East. Coast. Shelf. Sci.*, 58S: 55-61.
- Iñiguez, L.; Gutierrez, C.; Galeana, L. y López, A. 2007. El impacto de la actividad turística en la calidad bacteriológica del agua de mar. *Gac. Ecol.*, 82: 21-43.
- Jacobs, L.; Chenia, H. 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. Isolated from South African aquaculture systems. *Int. J. Food. Microbiol.* 114:295–306.
- Japoni, A.; Gudarzi, M.; Farshad, S.; Basiri, R.; Ziyaeyan, M.; Alborzi, A. y Rafaatpour, N. 2008. Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance an clinical *Escherichia coli* strains by PCRRFLP in Southern Iran. *Jap. J. Inf. Dis.*, 61: 8588.
- Junco, R.; Suárez, M.; Weng, Z. y Aleman, S. 2006. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. *Hig. San. Ambient.*, 6: 150-159.
- Kaneene, J.; Miller, R.; Sayah, R.; Johnson, Y.; Gilliland, D. y Gardiner, J. 2007. Consideration when using discriminant function analysis of antimicrobial resistance profiles to identify sources of fecal contamination of surface water in Michigan. *Appl. and envirom. Microbiol.*, 73: 2878-2890.
- Kaspar, C.; Burgues, J.; Knight, I. y Colwell, R. 1999. Antibiotic resistance

indexing of *Escherichia coli* to identify source of fecal contamination. *Can. J. Microbiol.* 36: 891-894.

Koneman, E.; Allen, S.; Jande, W. y Schreckenberger, P. 2008. Diagnóstico Microbiológico. Sexta Edición, Editorial Médica Panamericana.

Li, X.; Mehrotra, M.; Ghimire, S.; Y Adewoye, L. 2007.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet. Microbiol.*, 121:197–214.

Livermore, D. 1995.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557- 84.

Livermore, D. 1996. Are all beta-lactams created equal?. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 101:33–43.

López, J. 2002. Caracterización bacteriológica y físicoquímica del agua de la zona marino costera de playa Moreno, Municipio Maneiro, estado Nueva Esparta. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 122 pp.

López, P.; Salazar, S.; Figueroa, Y.; López, C. y Fuentes, J. 2009. Calidad bacteriológica y físicoquímica de aguas y sedimentos de cuatro playas de las costas del estado Nueva Esparta. *Ciencia* v.17 n.4

MacFaddin, J. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Tercera edición, Editorial lippencott williams & wilkins.

Marín, S. 2008. Evaluación de la calidad bacteriológica y Físico-química para proponer una gestión medio ambiental de la zona marino Costera de la población de las Mercedes, municipio Tubores, Isla de margarita, período Febrero-julio de 2008. Magister Scientiarum en Gerencia Ambiental. UNEFA.

Márquez, J. 2003. Algunos aspectos de la condición ambiental: La calidad del agua y sedimentos del Golfo de Santa Fe. Trab. Grad. Lic. Química.

Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 122 pp.

Meyer, K.; Appletoft, C.; Schwemm, A.; Uzoigwe, J. y Brown, E. 2005. Determining the source of faecal contamination in recreational waters. *J. of Envirom. Health.*, 68 (1): 25-30.

Miró, E.; del Cuerpo, M.; Navarro, F.; Sabaté, M.; Mirelis, B. y Prats, G. 1998. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. *J Antimicrob. Chemother.*, 42: 535-53.

Moore, D.; Harwood, V.; Ferguson, D.; Lukasik, J.; Hannah, P.; Getrich, M. y Brownell, M. 2005. Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for identification of faecal pollution sources in an urban watershed. *J. Appl. Microbiol.*, 99: 618-626.

Morales, F. 1995. Efecto de algunos parámetros ambientales sobre las especies halofíticas de las microalgas del género *Dunaliella* (Dunal) Teodoresco, 1905 (Chlorophyta, Volvocales) presentes en la salina de Araya, estado Sucre, Venezuela. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 119 pp.

Moreno, C.; González, R. y Beltrán, C. 2009. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev. Otorrino. Cir. Cabez. Cuel.*, 69: 185-192.

Navarro, F.; Miró, E.; Mirelis, B. 2002. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 20 (5): 225-34.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2003. Guidelines for Recreational Water Environments Coastal and Fresh Waters. *Faecal Poll. and Water Quality.*, 4: 1-10.

Palazón, J. 2000. Condiciones hidroquímicas del saco de la isla de Coche, Venezuela, mayo 1989-mayo 1990. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente.*, 39 (1-2): 55-65.

Parveen, S.; Hodge.; Stall, R.; Farrah, S. y Tamplin, M. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of human and non human *Escherichia coli*. *Water Res.*, 2: 379-386.

Parveen, S.; Murphree, R.; Edmiston, I.; Kaspar, W.; Portier, K. y Tamplin, L. 1997. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and non point sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2607-2612.

Paterson, D. y Bonomo, R. 2005. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18 (4): 657–686.

Perozo, A. y Castellano, M. 2009. Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. *Kasmera*. 37(1): 25 – 37.

Perozo, A.; Castellano, M.; Ginestre, M. y Harris, B. 2007. Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* Aisladas en las Unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario. *Kasmera*. 35 (2): 125-133.

PNUMA. 2003. Perspectivas del Medio Ambiente Mundial GEO 3. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Mundi Prensa. Madrid, España. 410 pp.

Poppe, C.; Martin, L.; Muckle, A.; Archambault, M.; McEwen, S. y Weir, E. 2006. Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* Newport isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada. *Can. J. Vet.*

Res., 70:105–114

Prahbu, D.; Pandian, R. y Vasan, P. 2007. Pathogenicity, antibiotic susceptibility and genetic similarity of environmental and clinical isolates of *Vibrio cholerae*. *Indian. J. Exp. Biol.*, 45: 817-823.

Reyes, H.; Navarro, P. y Reyes, H. 1998. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. *Antib. Inf.*, 2: 12-19.

Salas, H. 1989. "Calidad del agua en el medio marino. Historia y Aplicación de Normas microbiológicas". *Bol. Sanit. Panam.*, 107(3): 226- 237.

Schwartz, T.; Kohnen, W. y Jansen, B. 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43:325–335.

Seveno, N.; Kallifidas, D.; Smalla, K.; Van Elsas, J.; Collard, J.; Karagouni, A. y Wellington, E. 2002. Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *Rev. Med. Microbiol.*, 13: 15-27.

Sharma, C. 2010. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 464(7286), pp.250-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164839>.

Smet, A.; Martel, D.; Persoons, J.; Dewulf, M.; Heyndrickx, B.; Catry, L.; Herman, F.; Haesebrouck, F y Butaye, P. 2008. Diversity of extended-spectrum B-lactamases and class C B-lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in belgian broiler farms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(4):1238-1243.



Smith, R. y Coast, J. 2002. Resistencia antimicrobiana: una respuesta Global. *WHO*. 80: 126- 132.

Sokal, R. y Rohlf, I. 1981. Introducción a la bioestadística. Reverté, S.A. Barcelona. 362 pp.

Srinivasan, V.; Nam, H.; Nguyen, L.; Tamilselvam, B.; Murinda, S. y Oliver, S. 2005. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne. Pathog. Dis.*, 2:201–211.

Stevens, J. 1996. Applied Multivariate Statics for the social Sciences. 3º edición. Mahwah.

Stürenburg, E. y Mack, D. 2003. Extended- spectrum  $\beta$ - lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J. Inf.*, 47: 273-295.

Szczepanowski, R.; Krahn, I.; Linke, B.; Goesmann, A.; Pühler, A. y Schlüter, A. 2004. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiol.*, 150: 3613–3630.

Tatavarthy, A.; Peak, K.; Veguilla, W.; Reeves, F.; Cannons, A.; Amuso, P. y Cattani, J. 2006. Comparison of antibiotic susceptibility profiles and molecular typing patterns of clinical and environmental *Salmonella enterica* serotype Newport. *J. Food. Prot.*, 69:749–756.

Taviani, E.; Ceccarelli, D.; Lazaro, N.; Bani, S.; Cappuccinelli, P.; Colwell, R. y

Colombo, M. 2008. Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 64:45–54.

Torres, L.; Gagliotta, V.; Torres, O. y Benítez, M. 2006.  $\beta$ -Lactamasas de Espectro Expandido en Enterobacterias aisladas en Centros de Salud de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 26: 2-10.

Vantarakis, A.; Venieri, D.; Komninou, G. y Papapetropoulou, M. 2006. Differentiation of faecal *Escherichia coli* from humans and animals by multiple antibiotic resistant analysis. *Appl. Microbiol.*, 42: 71-77.

Vergaray, G.; Méndez, C.; Morante, H.; Heredia, V. y Béjar, V. 2007. *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. *Rev. Inst. de Invest. FIGMMG.*, 10 (20): 82-86.

Vieitez, J. y Baz, A. 1988. Comunidades bentónicas del sustrato blando intramareal de la playa Lapamán (Ría de Pontevedra, Galicia). *Cah. Biol. Mar.*, 29: 261-276.

Volkman, H.; Schwartz, T.; Bischoff, P. y Kirchen, S. 2004. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods.*, 56:277–286.

Walsh, C.; Duffy, G.; O'Mahony, R.; Fanning, S.; Blain, I. y McDowell, D. 2005. Antimicrobial resistance in Irish isolates of verocytotoxigenic *Escherichia coli*-VTEC. *Int. J. Food. Microbiol.*, 109(3):173–178.

Watkinson, A.; Micalizzi, G. y Graham, G. 2007. Antibiotic resistance

*Escherichia coli* in wastewaters, surface waters and oysters from an urban riverine system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (17): 5667-5670.

Wiggins, B. 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal Streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (11): 3997-4002.

Wiggins, B.; Andrews, R.; Conway, R.; Corr, C.; Dobratz, E.; Dougherty, D.; Eppard, J.; Knupp, R.; Limjoco, M.; Mettenburg, J.; Rinehardt, J.; Sonsino, J.; Torrijos, R. y Zimmerman, M. 1999. Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: (8) 3483-3486.

World Health Organization (WHO). 2003. Guidelines for safe recreational water environments. Vol.1: Coastal and Freshwaters. Geneva, Italy. 253 p.

Yan, T. y Sadowsky, J. 2007. Determining sources of Faecal Bacteria in Waterways. *Environ. Monit. Assess.*, 129: 97-106.

Zhang, X.; Zhang, T. y Fang, H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 82: 397-414.

**HOJAS DE METADATOS**

**Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6**

<b>Título</b>	Análisis Discriminante De Patrones De Resistencia A Antibióticos En <i>Escherichia Coli</i> Como Indicador De Contaminación Fecal En Zonas Costeras Del Estado Nueva Esparta. (Modalidad: Trabajo De Grado)
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Rodriguez M. Nilyan, J.</b>	<b>CVLAC</b>	<b>15.676.984</b>
	<b>e-mail</b>	<b>nilyanrm@gmail.com</b>

**Palabras o frases claves:**

<b>Suceptibilidad antimicrobiana</b>
<b>Betalactamasas</b>
<b>Análisis discriminante</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>

**Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6**

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Biología Aplicada	Microbiología Aplicada

### Resumen (abstract):

Se evaluaron los patrones de resistencia a antibióticos a través del análisis discriminante en cepas de *E. coli*. Se estudiaron cinco playas en el Estado Nueva Esparta durante tres meses, a las cuales se les determinaron *in situ* las características físico-químicas, enumeración de Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF) por el método del Número Más Probable en caldo fluorocult-Merck. De los tubos positivos se realizó la siembra en medios selectivos para el aislamiento de *E. coli* y se identificó mediante pruebas bioquímicas y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (difusión en agar) y confirmación de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (BLEA) y  $\beta$ -lactamasas de espectro expandido (BLEE) (doble disco combinado); así mismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a las cepas resistentes a ampicilina y cefalotina; siguiendo los lineamientos del CLSI. Se realizó la extracción de ADN, empleando el kit de Purificación de ADN Wizard Genomic (Promega) para la extracción y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de genes de resistencia  $bla_{SHV}$  y  $bla_{TEM}$ . Todas las playas mostraron características físicoquímicas típicas de la columna de agua de un ambiente marino. Se aplicó el Análisis Discriminante para clasificar las fuentes (humana y animal) de contaminación fecal. El valor mayor para CT y CF correspondió a Punta de Piedras (CT: 5064,1 NMP/ 100 ml; CF: 2122,37 NMP/100ml). Se aislaron 26 cepas las cuales mostraron resistencia a uno o más antibióticos: 73,08% de resistencia a ampicilina, cefalotina y piperacilina. Las cepas resultaron 100% sensibles a amoxicilina ácido clavulánico, ampicilina sulbactam, cefoxitin, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenen, meropenen y aztreonam. 19 cepas fueron productoras de BLEA, y 17 de ellas mostraron amplificaciones para el gen  $bla_{TEM}$ . El análisis discriminante determinó que las 26 cepas aisladas se ajustaban al comportamiento de cepas de origen clínico, por lo cual se puede deducir que la fuente de contaminación es de origen humano, obteniéndose una tasa correcta de clasificación entre 75 y 84,6%, ratificándose como una valiosa herramienta en la clasificación de origen de fuentes de contaminación fecal. Por primera vez se reporta la presencia de cepas de *E. coli*, con perfil de resistencia a antibióticos por producción de enzimas BLEA y presencia del gen  $bla_{TEM}$  en zonas costeras del estado Nueva Esparta demostrando que la resistencia adquirida a los antimicrobianos constituye un problema de salud pública y ambiental que debe ser vigilado para evitar que se perjudique la relación medio ambiente-salud. La presente investigación, sienta las bases para un nuevo enfoque en el campo de investigación del origen de fuentes de contaminación de aguas costeras en nuestro país.

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

**Contribuidores:**

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
López, Pedro	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	4.217.148
	e-mail	pedro.lopez@ne.udo.edu.ve
	e-mail	
Araque, Yasmina	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.000.717
	e-mail	Yamasi40@gmail.com
	e-mail	
Martínez, Rosa	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.871.422
	e-mail	rosamartínezdecuore@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	03	27

Lenguaje: SPA

**Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6**

**Archivo(s):**

Nombre de archivo	Tipo MIME

P.G-RodriguezN.Doc	Application/word

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA

RECIBIDO POR Martínez

FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

**JUAN A. BOLAÑOS CUMBELO**  
Secretario



C.C.: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

## **Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6**

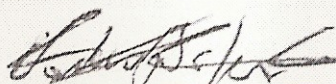
**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) :** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

**Esta hoja tiene que estar personalizada por el autor (e)s**



---

**Nilyan Rodríguez  
Autor**



---

**MSc. Pedro López  
Tutor**



