



ARTÍCULO ORIGINAL

Perfiles bioquímicos atípicos de cepas de *Escherichia coli* de origen ambiental mediante el empleo del sistema Entero Well D–One

Atypic biochemical profile of environmental Escherichia coli strains using Entero Well D–One system

Beatriz Romeu Álvarez^{1*}, Anette Cancio Bello González¹, Daysi Lugo Moya¹, Jeny A. Larrea Murrell¹

¹ Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

* Autor para correspondencia:
bromeu@fbio.uh.cu

RESUMEN

Escherichia coli es miembro de la microbiota normal del intestino de los mamíferos y debido a su versatilidad metabólica puede sobrevivir en ecosistemas naturales. La supervivencia de *E. coli* en ecosistemas acuáticos requiere que este microorganismo se sobreponga al estrés ambiental. Aunque se realizan múltiples investigaciones para la evaluación de la prevalencia de *E. coli* en el ambiente como indicador de contaminación fecal, son pocas las que se enfocan en el estudio de las características fenotípicas de las cepas ambientales de este importante microorganismo. Teniendo en cuenta estos aspectos, la presente investigación tuvo como objetivo determinar los perfiles bioquímicos de cepas de *E. coli* aisladas de ambientes acuáticos mediante el uso de pruebas convencionales y el sistema comercial Entero Well D–One. Se trabajó con 61 aislados de *E. coli* procedentes de muestras de agua de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó, en La Habana, tomadas desde septiembre de 2017 hasta enero de 2018. El 90,1% de las cepas se confirmó como *E. coli* por ambas metodologías. Se obtuvieron un total de 27 perfiles bioquímicos diferentes entre las cepas. El 63,6% presentó perfiles atípicos debido a la reacción negativa de las pruebas bioquímicas producción de la enzima β -D-galactosidasa, descarboxilación de los aminoácidos lisina y ornitina y utilización del sorbitol. La presencia de cepas de *E. coli* con perfiles bioquímicos atípicos pone de manifiesto que en las aguas de los ríos de La Habana se podrían encontrar patotipos de *E. coli* y por tanto el uso de estas aguas implica un riesgo higiénico-sanitario.

Palabras clave: ambientes acuáticos, fenotipo, β -D-galactosidasa, lisina, ornitina, sorbitol

Recibido: 2019-05-06

Aceptado: 2019-11-08

ABSTRACT

Escherichia coli is a member of the normal microbiota of the gut of mammals and due to its metabolic versatility it can survive in natural ecosystems. The survival of *E. coli* in aquatic ecosystems requires this microorganism to overcome environmental stress. Although multiple investigations are carried out to assess the prevalence of *E. coli* in the environment as an indicator of fecal contamination, few focus on the study of the phenotypic characteristics of the environmental strains of this important microorganism. The objective of this research was to determine the biochemical profiles of *E. coli* strains isolated from aquatic environments with conventional tests and the Entero Well D–One system. In total, 61 isolates of *E. coli* were collected from September 2017 to January 2018 from water samples of the Almendares, Quibú and Luyanó rivers of Havana. A total of 90.1% of isolates identified had agreement between Entero Well D–One and conventional techniques for identification at genus and species level. Twenty seven different biochemical profiles were obtained between the *E. coli* strains. The 63.6% presented atypical profiles due to the negative reaction of the biochemical tests like production of the β -D-galactosidase enzyme, decarboxylation of the aminoacids lysine and ornithine and use of sorbitol. The presence of *E. coli* strains with atypical biochemical profiles shows that *E. coli* pathotypes could be found in the waters of the rivers of Havana and therefore the use of these waters implies a hygienic-sanitary risk.

Keywords: water ecosystems, fenotipo, β -D-galactosidase, lisina, ornitina, sorbitol

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli forma parte de la microbiota comensal del intestino de mamíferos incluyendo al ser humano, razón por la que se le ha considerado como indicador de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano y animal. La cuantificación de *E. coli* en cuerpos de agua de ambientes tropicales como principal representante del grupo de coliformes termotolerantes cobró importancia en los últimos 25 años (Rave *et al.*, 2019).

Desde el punto de vista fisiológico, es una bacteria muy versátil, lo que le permite sobrevivir en el ambiente (agua y suelos) como un microorganismo de vida libre o vivir como miembro de la microbiota normal de animales homeotermos (Jang *et al.*, 2017). Es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaerobio facultativo, catalasa positiva, oxidasa negativa, produce ácido y gas a partir de glucosa, lactosa y otros carbohidratos, reduce los nitratos a nitritos y no produce H₂S (Kaper *et al.*, 2004; Koneman *et al.* 2005).

El agua, el suelo y los sedimentos siempre han sido considerados un hábitat secundario para *E. coli*, entendiéndose este como menos importante que el nicho intestinal. Sin embargo, son numerosos los trabajos publicados recientemente que indican que algunas cepas pueden sobrevivir períodos prolongados y multiplicarse en el medio ambiente (Jang *et al.*, 2017).

La supervivencia de *E. coli* en los ecosistemas acuáticos requiere de la capacidad por parte de este microorganismo de sobreponerse al estrés ambiental como puede ser la escasa disponibilidad de los nutrientes, las bajas temperaturas, la salinidad, la exposición a la radiación solar y la competencia con microorganismos autóctonos de estos ecosistemas (Berthe *et al.*, 2013). Se ha demostrado que las cepas aisladas de aguas residuales y de ecosistemas acuáticos impactados con estas aguas son más diversas, tanto desde el punto de vista genético como fisiológico, que las cepas aisladas directamente del tracto gastrointestinal de los hospederos (Gonzales y Sjöling, 2016).

El extenso conocimiento que disponemos de la genética, fisiología e historia natural de *E. coli* han hecho que sea considerada como el organismo procarionta modelo en estudios moleculares y evolutivos (Robins-Brounne *et al.*, 2016). Un estudio comparativo entre los genomas secuenciados de las cepas *E. coli* K12 (cepa de laboratorio) y el serotipo O157:H7 indica que las enterobacterias están sujetas a mucha más recombinación vía transferencia horizontal de lo que se había sospechado. El contenido promedio de GC en *E. coli* es de 50,8% pero existe un número importante de genes (17% en la cepa K12 y 26% en la O157:H7) que contienen diferentes proporciones de GC y un índice de uso de codones muy diferente al del resto del genoma. Entre estos genes con contenido GC diferente destacan las islas de patogenicidad y los plásmidos.

Se han descrito más de 300 plásmidos en la especie, los cuales portan información para la asimilación de azúcares raros, la producción de colicinas, resistencia a antibióticos y metales pesados o la síntesis de toxinas y fimbrias relacionadas con la patogénesis de esta bacteria. Esta gran plasticidad genómica de *E. coli* le confiere una plasticidad ecológica extraordinaria, permitiéndole adaptarse rápidamente a diferentes ambientes, tales como los ecosistemas acuáticos donde muestra una gran variabilidad desde el punto de vista fisiológico (Souza *et al.*, 2001; Tenaillon *et al.*, 2016).

E. coli es una bacteria fácilmente cultivable, de crecimiento rápido y relevante desde el punto de vista clínico por lo que su identificación, a partir de cualquier muestra, debe realizarse fácilmente.

Los métodos convencionales, basados en las características fenotípicas y propiedades bioquímicas y metabólicas, son uno de los más empleados puesto que su realización y coste los hace más asequible (Jesumirhew *et al.*, 2016). Sin embargo, existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipuebas, que se basan en las mismas características, pero que permiten conseguir una mayor rapidez en la identificación. Se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado que se pueden emplear en la identificación de *E. coli* son: API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems y MicroID (Remel), Biochemical ID systems (Microgen) y Entero Well D-One (CPM Scientifica, SAS, Roma, Italia).

Aunque se realizan múltiples investigaciones para la evaluación de la prevalencia de *E. coli* como indicador de contaminación fecal en el ambiente, son pocos los estudios sobre la caracterización fenotípica de las cepas ambientales de este microorganismo. Teniendo en cuenta estos aspectos la presente investigación tuvo como objetivo determinar los perfiles bioquímicos de cepas de origen ambiental de *E. coli* mediante el uso de pruebas bioquímicas convencionales y el sistema comercial Entero Well D-One.

MATERIALES Y MÉTODOS

Universo de trabajo

Se trabajó con un total de 61 aislados de *E. coli*. Los aislamientos se realizaron a partir de muestras de

agua tomadas en diez estaciones de muestreo ubicadas en los ríos Almendares, Quibú y Luyanó en La Habana, Cuba entre septiembre de 2017 y enero de 2018.

Las muestras de agua recolectadas se sembraron en medio agar Chromocult para coliformes (MERCK) durante 24 h a 37°C. Las colonias que presentaron coloración azul oscuro o violeta en el medio cromogénico se seleccionaron como cepas presuntivas de *E. coli* de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Identificación de las cepas ambientales

Los aislados seleccionados se sembraron en placas con agar MacConkey para caracterizar su crecimiento en este medio y se realizó la tinción de Gram para verificar las características morfo-tintoriales.

La identificación de especies se realizó mediante pruebas bioquímicas por los métodos convencionales según Koneman *et al.*, 2005. Esta identificación se corroboró mediante el sistema comercial Entero Well D-One (CPM Scientifica, SAS, Roma, Italia). Es un sistema miniaturizado de 21 pruebas convencionales para la identificación de enterobacterias Gram negativas y oxidasa negativa. Adicionalmente, el panel de identificación tiene un sector para la identificación de las cepas de *E. coli*, que contiene medios cromogénicos y selectivos específicos para esta especie (99,9% especificidad). Este sector permite confirmar la identificación de las cepas de esta especie y resulta de gran ayuda cuando los códigos numéricos dan resultados dudosos para la identificación.

El sistema se inoculó con una suspensión bacteriana del microorganismo en estudio a una concentración de $1,5 \times 10^8$ cel/mL correspondiente al tubo 0,5 escala Mac Farland y se incubó a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas. La identificación del microorganismo se realizó a partir del perfil numérico que se obtuvo después del revelado de las pruebas ensayadas. El perfil numérico se localizó en la base de datos que tiene el sistema con la ayuda del Catálogo Analítico proporcionado por el fabricante.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se procesaron mediante el programa Microsoft Excel 2010. Se utilizaron medidas de estadística descriptiva como la frecuencia y el porcentaje para el análisis de los resultados.

RESULTADOS

Identificación de los aislados ambientales

De los 61 aislados ambientales, 55 se confirmaron como *E. coli* tanto por las pruebas convencionales como por el sistema comercial Entero Well D–One. El 20% de las cepas fueron aisladas de muestras del río Almendares, el 18% del río Quibú y el 62% del río Luyanó. Los seis aislados que no se confirmaron como *E. coli*, correspondieron con otros géneros bacterianos del grupo de las bacterias coliformes, a pesar de que presentaron en los medios agar Chromocult para coliformes y medio Mac Conkey las características culturales descritas para la especie (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación de los aislados ambientales obtenidos a partir las muestras de aguas

Table 1. Identification of environmental isolates obtained from water samples

Microorganismos	No. de aislados	Porcentaje (%)
<i>Escherichia coli</i>	55	90,1
<i>Citrobacter</i> spp.	3	5,5
<i>Klebsiella</i> spp.	2	3,6
<i>Enterobacter</i> spp.	1	1,8
Total	61	100

Perfiles bioquímicos de las cepas de *E. coli* ambientales

Las cepas ambientales de *E. coli* evaluadas presentaron 27 perfiles bioquímicos diferentes, tanto por las metodologías convencionales como por el sistema comercial Entero Well D–One (Tabla 2).

El 16,4% de las cepas aisladas presentaron un perfil (P1) que se considera clásico para la especie. El resto de los perfiles (P2 - P27) presentaron al menos una prueba diferente con respecto al perfil P1. El 63,6% presentó perfiles atípicos debido al comportamiento negativo de cuatro pruebas bioquímicas: producción de la enzima β -D- galactosidasa, descarboxilación de los aminoácidos lisina y ornitina y utilización del sorbitol. El 11% resultaron negativas para la producción de la enzima β -D-galactosidasa, el 12,7% fue lisina descarboxilasa negativas, el 25,5% ornitina descarboxilasa negativas capaces de degradar la lactosa y el 18,2%

sorbitol negativas. De las seis cepas lisina descarboxilasas negativas, cinco se aislaron del río Luyanó. Los perfiles P1 y P7 lo presentaron cepas provenientes de los tres ríos evaluados (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El sistema Entero Well D–One permitió obtener resultados de identificación hasta especie entre las 18-24 h de inoculado, ventaja que facilita el trabajo en el laboratorio con respecto a los métodos convencionales. Además, otra de las ventajas de este sistema para la identificación de la especie *E. coli* es que cuenta con un sector para la confirmación de cepas de esta especie, lo que resulta de gran ayuda cuando los perfiles numéricos que se obtienen con el panel completo de identificación resultan dudosos. Este sector constituyó un control de calidad interno del funcionamiento del sistema.

Los otros géneros bacterianos identificados, también del grupo coliformes, se informan con frecuencia en diferentes estudios realizados en aguas tropicales contaminadas y no contaminadas (Augustyn *et al.*, 2016). En un estudio realizado en plantas de tratamiento de aguas residuales se encontró que las especies predominantes entre los coliformes termotolerantes fueron *E. coli* y *Citrobacter* spp. La primera estuvo representada entre 50-75 % de los aislados identificados, resultado muy similar al obtenido en esta investigación, mientras que el género *Citrobacter* representó entre 20-50 % del total, lo que corresponde a un valor superior que el informado en este trabajo cuyo género solo estuvo representado en un 5,5% (Mc Lellan *et al.*, 2001).

La necesidad de separar las cepas patógenas de *E. coli* de las cepas de la microbiota normal que llegan a los ecosistemas acuáticos como consecuencia de la contaminación de estos, ha generado que se desarrollen sistemas de clasificación intraespecíficos que se basan en diferencias fenotípicas entre las cepas de la especie. Tradicionalmente, se han empleado la capacidad de fermentar un determinado número de carbohidratos como el manitol, la lactosa o el sorbitol; o de degradar determinados aminoácidos como la lisina, la ornitina o la arginina, u otros compuestos que ponen de manifiesto la presencia de determinadas enzimas como la β -D-galactosidasa o la β -D-glucuronidasa (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

Tabla 2. Perfiles bioquímicos de las cepas ambientales de *E. coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó obtenidos mediante las pruebas convencionales y el sistema Entero Well D-One.**Table 2.** Biochemical profiles of the environmental strains of *E. coli* isolated from the Almendares, Quibú and Luyanó rivers using conventional methods and Entero Well D-One system.

No. Perfil (P)	No. CEPAS	ORIGEN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	9	LY / ALM/ QB	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2	1	LY	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
3	4	LY	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
4	1	LY	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5	1	LY	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
6	1	LY	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
7	3	LY / ALM/ QB	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
8	2	LY	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
9	6	LY/QB	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	1	LY	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
11	1	LY	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
12	1	LY	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
13	2	LY	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
14	1	LY	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
15	2	LY	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
16	5	LY/QB	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
17	3	LY/QB	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
18	1	LY	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
19	1	LY	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
20	1	ALM	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
21	2	ALM/QB	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
22	1	ALM	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
23	1	ALM	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
24	1	ALM	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
25	1	ALM	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
26	1	QB	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
27	1	QB	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+

Leyenda: (+) Resultado positivo, (-) Resultado negativo, (■) Resultado atípico. Ríos evaluados ALM: Almendares, QB: Quibú y LY: Luyanó. Pruebas bioquímicas que se realizan en el test: 1(ONPG): Detección actividad β-galactosidasa, 2 (LDC): L-lisina descarboxilasa, 3 (ODC) :ornitina descarboxilasa, 4 (ADC): L-arginina, 5 (TRP): L-triptófano, 6 (CIT): citrato, 7(UR): urea, 8(H₂S): producción de sulfuro de hidrógeno, 9 (MLN):utilización del malonato , 10 (VP): Voges Proskauer, 11 (IND): indol, 12 (GLU): utilización de la glucosa, 13 (MAN): utilización del manitol, 14 (INO): utilización del inositol, 15 (SOR): utilización del sorbitol, 16 (SAC): utilización de la sacarosa, 17 (ARA): utilización de la arabinosa, 18 (RAF): utilización de la rafinosa, 19 (LACT): utilización de la lactosa.

La presencia de seis cepas negativas para la producción de la enzima β -D-galactosidasa es atípico para esta especie, ya que aproximadamente el 95% de las cepas de *Escherichia coli* producen esta enzima de acuerdo a lo informado en la literatura (Rodríguez-Ángeles, 2002). La β -D-galactosidasa cataliza la degradación de la lactosa en galactosa y glucosa y es una enzima constitutiva que debe estar presente en todos los coliformes. En los últimos años es una característica que se aprovecha en diferentes medios agarizados comerciales para la detección y cuantificación del grupo coliforme, especialmente los empleados para métodos de presencia/ausencia de este grupo en muestras de aguas contaminadas, ya que esta enzima es producida por los miembros de la familia Enterobacteriaceae a diferencia de la enzima β -D-glucuronidasa la cual es más específica para la especie *E. coli* (Zuser *et al.*, 2019).

Sin embargo, se han informado de cepas atípicas en las que no se expresa la enzima β -D-galactosidasa. Con el fin de dilucidar las posibles causas del fenotipo β -galactosidasa negativo, Johler *et al.* (2012) en una investigación realizada en Alemania secuenciaron el gen *lacZ* que codifica para la β -D-galactosidasa. Estos investigadores identificaron una mutación que conduce a un codón de parada prematuro en la posición de aminoácido 774, lo que hace que el polipéptido sea anormalmente corto y probablemente no funcional. Teniendo en cuenta estos hallazgos, las cepas *E. coli* β -D-galactosidasa negativa representan un desafío para los procedimientos de diagnóstico de rutina de detección de *E. coli* con medios cromogénicos que se basan en la detección de la actividad β -D-galactosidasa (Maheux *et al.*, 2015; Franco-Duarte *et al.*, 2019). Este fenómeno se ha observado en cepas aisladas del ambiente aunque aún no se conoce con certeza la causa de la mutación. Por tanto, la presencia de cepas de *E. coli* con un resultado negativo para la producción de esta enzima pone de manifiesto que estas cepas no podrán ser detectadas y aisladas a partir de aquellos medios en los que solo se emplee la actividad β -D-galactosidasa y en esos casos podría subestimarse la presencia de esta bacteria en esos ecosistemas.

Otro de los resultados atípicos en la caracterización bioquímica de las cepas ambientales aisladas fue la presencia de cepas lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa negativas pero con la capacidad de degradar la lactosa. La descarboxilación de la lisina y la ornitina son características bioquímicas presentes

en el 90% y 65% de las cepas pertenecientes a la especie *Escherichia coli*, respectivamente (Gomig *et al.*, 2015). Sin embargo, las cepas de *E. coli* pertenecientes al patotipo *E. coli* enteroinvasivo (ECEI) se describen lisina y/o ornitina descarboxilasa negativas, característica bioquímica que la distingue del resto de los patotipos descritos para la especie pero que comparten con el género *Shigella* (Rodríguez-Ángeles, 2002; Ud-Din y Washin, 2014). No obstante, el género *Shigella* no fermenta la lactosa, característica que la distingue de *E. coli*, y que si presentaron las cepas aisladas en el presente estudio. Este resultado pone de manifiesto que las cepas aisladas de estos ambientes contaminados podrían corresponder con cepas patógenas de la especie *E. coli*, específicamente del patotipo ECEI. Se debe destacar que la mayoría de las cepas aisladas con estas características se aislaron del río Luyanó, resultado que destaca pues en la investigación llevada a cabo por Romeu en el año 2012, informan de la presencia de cepas ECEI en el río Luyanó ya que obtuvieron resultados positivos para la amplificación del gen de virulencia *ial*, específico de este patotipo.

Deben señalarse las cepas sorbitol negativa ya que esta es una característica que distingue a las cepas del patotipo *E. coli* enterohemorrágicas (ECEH). Esta categoría y particularmente el serotipo O157:H7 como principal serotipo dentro de ella, se distingue desde el punto de vista bioquímico por no fermentar el sorbitol en 24 h, aunque existen muchas cepas no-O157 pertenecientes también al patotipo ECEH que pueden presentar características típicas de *E. coli* y fermentar el sorbitol. No obstante, la existencia de cepas de *E. coli* que no presentan esta característica bioquímica se ha descrito previamente en cepas de origen ambiental. La proporción de cepas de *E. coli* presentes en las heces que no presenta dicha actividad (fermentación del sorbitol) oscila entre el 10 y el 20%, mientras que en cepas aisladas del medio ambiente la proporción de estas aumenta hasta el 34% (Ojeda *et al.*, 1995). Es importante destacar que las cepas pertenecientes a este patotipo y sorbitol negativas tienen como reservorios a los rumiantes domésticos, principalmente bovinos, ovinos y caprinos (Beutin *et al.*, 1993; Kudva *et al.*, 1997; Heuvelink *et al.*, 1998). El aislado de *E. coli* O157 sorbitol negativa a partir de las heces de ovejas sanas, apoya la evidencia epidemiológica de un vínculo entre la enfermedad humana y el consumo de productos contaminados con estiércol de

estos animales (Blanco *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2003), por lo que esta podría ser una de las vías de llegada al río de las cepas encontradas en la presente investigación con características fenotípicas típicas del patotipo ECEH.

La presencia de cepas de *E. coli* con las características bioquímicas atípicas descritas anteriormente pone de manifiesto que en las aguas de estos ríos se podrían encontrar no solo cepas provenientes de la microbiota normal sino también diferentes patotipos de la especie *E. coli*. Por tanto, el uso de estas aguas implica un riesgo higiénico-sanitario para todas las personas que de forma directa o indirecta las empleen en diferentes actividades. No obstante, sería necesario realizar la confirmación molecular de estas cepas patógenas mediante la búsqueda de genes de virulencia específicos de estos patotipos ya que los métodos de identificación fenotípica no pueden proporcionar una certeza absoluta en la identificación de las cepas patógenas.

Las cepas de *E. coli* aisladas de los ecosistemas acuáticos se interpretan como resultado de contaminación fecal de estos ambientes. Diversos autores plantean que cada hospedero presenta una “cepa dominante” de esta especie y la aparición de nuevos genotipos indica que este predominio es solo temporal debido a procesos adaptativos o puramente aleatorios (Souza *et al.*, 2001).

Bettelheim *et al.* (1994) y Lidin-Janson *et al.* (1978) serotipificaron cepas de *E. coli* provenientes de muestras de heces fecales de individuos sanos. Estos autores encontraron que en cada persona de la que se emplearon muestras, más del 50% de las cepas aisladas pertenecían a un solo serotipo, correspondiente a la “cepa dominante”, pero este era diferente entre un individuo y otro. Schlager *et al.* (2002), en un estudio similar, observaron que la “cepa dominante” en un mismo individuo podía cambiar de una semana a otra. Esto puede significar que los vertimientos continuos de aguas residuales domésticas que reciben los tres ecosistemas dulceacuícolas evaluados constituyen la principal fuente de las que provienen las cepas presentes en estos ecosistemas. Las cepas de *E. coli* que llegan a estos cuerpos de agua provenientes de estos vertimientos van a ser diferentes en el tiempo aunque el vertimiento se mantenga constante durante un período de tiempo, debido su origen fecal que tienen estas cepas pero a su vez estas cepas pueden retornar a la comunidad o al ambiente clínico debido al empleo inadecuado de las aguas de estos ríos por la población.

En el caso de los tres ríos evaluados, se conoce que sus aguas se emplean de forma inadecuada por la población de La Habana y para el riego de cultivos agrícolas en el programa de agricultura urbana que lleva a cabo la ciudad (Romeu *et al.*, 2015). Estas podrían ser algunas de las vías por las que estas cepas podrían pasar del ambiente a la comunidad y de ahí al ambiente clínico pudiendo ser responsables de diferentes infecciones, en muchos de los casos, sin que la persona afectada sea consciente de que el posible origen de la infección haya estado en las aguas del río.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Proyecto 5080-2 otorgado por la International Foundation for Science (IFS), Suecia.

LITERATURA CITADA

- Augustyn Ł., A. Babula, J. Joniec, J. Stanek-Tarkowska, E. Hajduk, J. Kaniuczak (2016). Microbiological indicators of the quality of river water, Used for Drinking Water Supply. *Pol. J. Environ. Stud.* 25 (2): 511-519
- Berthe, T., M. Ratajczak, O. Clermont, E. Denamur y F. Petit (2013). Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Appl Environ Microbiol* 79: 4684-4693
- Bettelheim K. A. (1994). Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. En: c. L. Gyles, Eds. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 3-30
- Beutin L., D. Geier, H. Steinruck, S. Zimmermann y F. Scheutz (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2483-2488
- Blanco J., M. Blanco, J.E. Blanco, A. Mora, E.A. *et al.* (2003). Verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) in Spain: Prevalence, serotypes and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and human infections. *Exp. Biol. Med.* 228: 345-351
- Franco-Duarte R, L. C. Ernáková, S. Kadam, K. S. Kaushik, B. Salehi, A. Bevilacqua *et al.* (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms* 7 (130): 1-32
- Gomig F., C. Weigert Galvão, D. L. de Freitas, L. Labas *et al.* (2015). Quinolone resistance and ornithine decarboxylation activity in lactose-negative *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol* 46 (3): 753-757

- Gonzales-Siles L. y A. Sjöling (2016). The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Environm Microbiol* 18(3): 741–751
- Heuvelink A.E., V. D. Biggelaar, E. De Boer, R. G. Herbes *et al.* (1998). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J. Clin Microbiol.* 36: 878–882
- Jang J., H.G. Hur, M.J. Sadowsky, M.N. Byappanahalli *et al.* (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Applied Microbiol* 123: 570–581
- Jesumirhewe C., P. O. Ogunlowo, M. Olley, B. Springer *et al.* (2016). Accuracy of conventional identification methods used for Enterobacteriaceae isolates in three Nigerian hospitals. *Peer J* 4:e2511: 1-12
- Johler S., M. Moser, S. Corti y R. Stephan (2012) A β -galactosidase negative *E. coli* leading to atypical colonies on RAPID[®] E. coli 2 agar. *J Food Saf Food Qual* 6: 179-181
- Kaper J.B., J. P. Nataro y H. L. Molby (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2:123–140
- Kudva I.T., C.W. Hunt, C.J. Williams, U.M. Nance *et al.* (1997). Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3878-3886
- Lidin-Janson G., B. Kaijser, K. Lincoln, S. Olling *et al.* (1978). The homogeneity of the faecal coliform flora of normal school-girls, characterized by serological and biochemical properties. *Med. Microbiol. Immunol* 164 (8):247–253
- Maheux A. F., V. Dion-Dupont, S. Bouchard, M. A. Bisson *et al.* (2015) Comparison of four β -glucuronidase and β -galactosidase based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms in water. *J Water Health.* 13 (2): 340-346
- McLellan S.L., A.D.Daniels y A.K. Salmore (2001). Clonal population of thermotolerant Enterobacteriaceae in recreational water and their potential interference with fecal *Escherichia coli* counts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (4): 4934-4938
- Rave A. F. G., A. V. Kuss, G. H. S. Peil, S. R. Ladeira, J. P. V. Villarreal y P. S. Nascente *et al.* (2019). Biochemical identification techniques and antibiotic susceptibility profile of lipolytic ambiental bacteria from effluents. *Braz. J. Biol.* 79 (4): 555-565
- Rey J., J. E. Blanco, M. Blanco, A. Mora *et al.* (2003). Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Vet Microbiol* 94: 47–56
- Robins-Browne R. M., K.E. Holt, D.J. Ingle *et al.* (2016). Are *E. coli* pathotypes still relevant in the era of whole genome sequencing? *Front Cell Infect Microbiol* 18:141
- Rodríguez-Angeles G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Rev. Salud Pública de México.* 44 (5): 464-475
- Romeu B. (2012) Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importacia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuicolas de La Habana. Tesis de doctorado, Universidad de La Habana, Cuba.
- Romeu B., H. Quintero, J. Larrea, *et al.* (2015). Experiencias en el monitoreo ambiental: contaminación de ecosistemas dulceacuicolas de La Habana (Cuba). *Hig. Sanid. Ambient.* 15 (3): 1325-1335
- Schlager T.A., J.O.Hendley, A. L.Bell y T.S.Whittam (2002) Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect. Immun.* 70:1225–1229.
- Souza V., A. Castillo, M. Rocha, L. Sandner *et al.* (2001). Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia.* 26 (10): 513-517
- Tenaillon O., J.E. Barrick, N. Ribick *et al.* (2016). Tempo and mode of genome evolution in a 50 000 generation experiment. *Nature* 536: 165-170
- Ud-Din A. y S. Wahid (2014) Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. *Bra J Microbiol* 45 (4): 1131-1138
- Zuser K., J. Ettenauer, K. Kellner, T. Posniecek *et al.* (2019) A sensitive voltammetric biosensor for *Escherichia coli* detection using an electroactive substrate for -D-glucuronidase. *IEEE Sensors J* 19 (18): 7781-7802