



UNIVERSIDAD DE LA HABANA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
Departamento de Microbiología y Virología

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* DE  
IMPORTANCIA CLÍNICA HUMANA AISLADAS DE ECOSISTEMAS  
DULCEACUÍCOLAS DE LA HABANA**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Aspirante: MSc. Beatriz Romeu Alvarez**



La Habana  
2012



**UNIVERSIDAD DE LA HABANA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**Departamento de Microbiología y Virología**

**Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana**

**Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Aspirante: MC. Beatriz Romeu Alvarez**

**Tutores: Dra. Nidia Rojas Hernández**

**Dr. Carlos A. Eslava Campos**



**La Habana**

**2012**

## SÍNTESIS

La contaminación de los ecosistemas acuáticos superficiales se identifica como una de las más importantes preocupaciones de la humanidad en la actualidad, sobre todo para los países en vías de desarrollo. En este trabajo se realizó la evaluación de la calidad microbiológica de las aguas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó de la capital habanera y la ubicación de fuentes contaminantes de origen doméstico que contribuyen a la contaminación de sus aguas. Se caracterizaron además 113 cepas de *Escherichia coli* aisladas de estos tres ecosistemas dulceacuícolas mediante su serotipificación, determinación de la presencia de genes de virulencia, susceptibilidad antimicrobiana, patrones de adherencia en cultivo de células HEp-2 y su diversidad genética mediante la técnica de Electroforesis en Campos Pulsantes. Los tres ríos evaluados presentaron una elevada contaminación microbiana, cuyos valores se encuentran por encima de los valores máximos permisibles en la norma cubana 22 para aguas de uso recreativo, obteniéndose las mayores concentraciones de los microorganismos indicadores en el periodo poco lluvioso. Se encontró una correlación positiva alta entre las concentraciones de los dos indicadores evaluados y se detectaron 25 fuentes de contaminación biológica constituidas por aguas urbanas no tratadas no descritas anteriormente en los ecosistemas acuáticos estudiados. El 72% de las cepas fue serotipificable y se determinaron un total de 41 serogrupos y 54 serotipos diferentes entre las cepas evaluadas. El 47% de las cepas serotipificables se distribuyó entre siete serogrupos (O1, O8, O23, O25, O30, O169 y O174) y el 41 % entre solo siete serotipos. Se encontraron cepas con serotipos correspondientes a los patotipos STEC (37%), ETEC (32%), EPEC (8%), EAEC (5%) y UPEC (18 %). Se obtuvo amplificación positiva en el 30 % (33/108) de los aislados evaluados para al menos uno de los genes de virulencia buscados. Los genes *st*, *stx2* e *ial* fueron los más frecuentes, detectándose en un 7% (para cada gen) seguido por los genes *stx1* (5,5 %) y *lt* (4,6 %) y todas las cepas resultaron negativas a los genes *eaeA* y *bfpA*. El 23,1% de las cepas fue adherente frente a las células HEp-2 y se encontraron dos patrones de adherencia diferentes entre las cepas adherentes: adherencia difusa (AD) y adherencia agregativa (AA). El 24% de las cepas evaluadas fueron resistentes al menos a uno de los 15 antimicrobianos utilizados y 13 cepas (11,5%) mostraron resistencia frente a 3 antibióticos o más, por lo que se consideraron multirresistentes (MR). El mayor número de aislados mostró resistencia frente a ampicilina. El análisis de la diversidad genética de las cepas de *E. coli* identificadas en los tres ríos evaluados mostró que las cepas presentaban pulsotipos o patrones genéticos diferentes.

## Listado de abreviaturas

Abreviaturas	Significado	Abreviaturas	Significado
AA	Adherencia agregativa	NMP	Número más probable
AD	Adherencia difusa	NC	Norma cubana
ADEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa	NA	Cepas No adherentes
ADN	Ácido desoxiribonucleico	O	Antígeno somático O
AFNOR	Organización Nacional Francesa para la Estandarización	OMS	Organización Mundial de la Salud
APHA	Asociación Americana de Salud Pública	OPS	Organización Panamericana de la Salud
CTE	Coliformes termotolerantes	OT	Antígeno O tipificable
CHS	Cuenca Hidrográfica Superficial	ONT	Antígeno O no tipificable
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	OR	Antígeno O rugoso
EC	<i>Escherichia coli</i>	P	Fósforo
ECP	Electroforesis en Campos Pulsantes	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ECPEX	<i>Escherichia coli</i> patógenas extraintestinales	PBS	Buffer salina fosfato
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	PNPG	p-nitrofenol- β-D-glucurónido
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	PFGE	Electroforesis en campos pulsantes, de sus siglas en inglés
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	REA	Análisis de enzimas de restricción
aEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica atípica	RFLP	Restricción de fragmentos de amplio poliformismo, de sus siglas en inglés
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
FM	Técnica de Filtración por membrana	SFB	Suero Fetal Bovino
FTM	Técnica de Fermentación en Tubos Múltiples	TGI	Tracto gastrointestinal
GNI	Tarjetas VITEK para identificación de Gram negativos	TSA	Agar Triptona Soya
GNS	Tarjetas VITEK para susceptibilidad antibiótica para Gram negativos	TTC	Cloruro de trifetil 2,3,5 tetrazolio
GUD	β-D-glucuronidasa	UFC	Unidades formadoras de colonias
GPS	Sistema de Geoposición Satelital	UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica
H	Antígeno flagelar H	USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los estados Unidos
HNM	Antígeno flagelar negativo	UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
HNT	Antígeno flagelar no tipificable	WHO	Organización Mundial de la Salud
MEM	Medio Mínimo Esencial	X-GLU	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido
MR	Cepas multirresistentes		
MUG	4-metilumbeliferil- β-D-glucurónido		
MVSP	Programa de Análisis Multivariados		
N	Nitrógeno		

## Indice

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
1.1. Calidad de las aguas.....	6
1.1.1. Calidad de los ecosistemas dulceacuícolas superficiales a nivel internacional.....	6
1.1.2. Calidad de los ecosistemas dulceacuícolas superficiales en Cuba.....	7
1.2. Ecosistemas acuáticos superficiales de La Habana .....	8
1.2.1. Río Almendares.....	8
1.2.2. Río Quibú.....	10
1.2.3. Río Luyanó.....	11
1.3. Evaluación de la calidad de las aguas.....	12
1.3.1. Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas.....	13
1.3.2. Microorganismos indicadores de contaminación fecal.....	14
1.3.2.1. Grupo coliformes.....	15
1.4. Métodos para la identificación y enumeración de los microorganismos indicadores..	16
1.4.1. Técnica de Fermentación en Tubos Múltiples.....	16
1.4.2. Técnica de Filtración por membrana.....	17
1.5. <i>Escherichia coli</i> .....	18
1.5.1. <i>Escherichia coli</i> como indicador de contaminación fecal.....	18
1.5.2. Grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i> .....	19
1.6. Métodos para la caracterización de los grupos patógenos de <i>E. coli</i> .....	19
1.6.1. Biotipado bioquímico.....	20
1.6.2. Serotipado.....	20
1.6.3. Ensayos de adherencia en cultivos celulares.....	21
1.6.4. Resistencia de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos.....	22
1.6.5. Genotipado.....	23
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
Electroforesis en campos pulsante (ECP).....	24
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1 Área de estudio y toma de la muestras.....	25
2.2. Determinación de la concentración de coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i> .....	26
2.3. Determinación de vertimientos de origen doméstico en los ríos seleccionados.....	26

2.4.	Aislamiento y caracterización de las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.....	26
2.4.1.	Aislamiento e identificación.....	26
2.4.2.	Serotipificación.....	27
2.4.2.1.	Preparación del antígeno somático (O).....	27
2.4.2.2.	Reacciones de aglutinación para el antígeno somático (O).....	27
2.4.2.3.	Preparación del antígeno flagelar (H).....	28
2.4.2.4.	Reacciones de aglutinación para el antígeno flagelar (H).....	28
2.4.3.	Amplificación de genes específicos de virulencia mediante PCR.....	28
2.4.3.1.	Extracción del ADN.....	29
2.4.3.2.	Condiciones de corrimiento de la PCR.....	29
2.4.4.	Ensayos de adherencia en células HEp-2.....	30
2.4.4.1	Preparación del inóculo bacteriano.....	31
2.4.4.2.	Preparación de las células HEp-2.....	31
2.4.4.3.	Ensayo de adherencia.....	31
2.4.5.	Prueba de susceptibilidad a agentes antimicrobianos.....	32
2.4.5.1	Inoculación de las tarjetas.....	32
2.4.6	Estudio de los perfiles de electroforesis en campos pulsantes (ECP).....	33
2.4.6.1.	Extracción del ADN y preparación de los bloques de agarosa con la muestra.....	33
2.4.6.2.	Tratamiento de los bloques de agarosa con la muestra de ADN.....	34
2.4.6.3.	Electroforesis y procesamiento del gel.....	34
2.5.	Análisis estadísticos.....	35
3.	<b>RESULTADOS</b>	
3.1.	Análisis de la concentración de coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i> en los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.....	36
3.1.1.	Río Almendares.....	37
3.1.2.	Río Quibú.....	37
3.1.3.	Río Luyanó.....	37
3.2.	Correlación entre las concentraciones de <i>E. coli</i> y coliformes termotolerantes.....	38
3.3.	Fuentes contaminantes de origen doméstico en los tres ecosistemas acuáticos evaluados.....	39
3.4.	Caracterización de las cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	40
3.4.1.	Aislamiento e identificación de las cepas de <i>E. coli</i> .....	40
3.4.2.	Serotipificación.....	41
3.4.3.	Detección de genes específicos de virulencia.....	44
3.4.4.	Ensayos de adherencia en células epiteliales HEp-2.....	47

3.4.5.	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	48
3.4.5.1.	Análisis de la multirresistencia.....	49
3.4.6.	Análisis de la diversidad genética entre las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de los ecosistemas evaluados.....	50
3.4.6.1.	Río Almendares.....	50
3.4.6.2.	Río Quibú.....	51
3.4.6.3.	Río Luyanó.....	51
3.4.6.4.	Análisis de la diversidad genética entre cepas de <i>E. coli</i> seleccionadas procedentes de los tres ecosistemas evaluados.....	51
4.	<b>DISCUSIÓN</b>	
4.1.	Análisis de la concentración de coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i> en los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.....	53
4.1.1.	Análisis integral.....	53
4.1.2.	Análisis por ecosistema.....	58
	Río Almendares.....	58
	Río Quibú.....	60
	Río Luyanó.....	61
4.1.3.	Comparación de las concentraciones de coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i> entre el período lluvioso y poco lluvioso en los tres ecosistemas evaluados.....	62
4.4.	Correlación entre las concentraciones de <i>E. coli</i> y coliformes termotolerantes.....	64
4.5.	Fuentes contaminantes de origen doméstico en los tres ecosistemas acuáticos evaluados.....	65
4.6.	Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.....	68
4.6.1.	Aislamiento e identificación de las cepas de <i>E. coli</i> .....	68
4.6.2.	Serotipificación.....	70
4.6.2.1.	Análisis de las cepas patógenas por su serotipo.....	73
4.6.3.	Análisis de los genes de virulencia.....	75
4.6.3.1.	Comparación entre la clasificación serológica y la clasificación mediante PCR para las cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas.....	80
4.6.4.	Análisis de los ensayos de adherencia en células HEp-2.....	81
4.6.5.	Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de <i>E. coli</i> .....	84
4.6.6.	Análisis de los patrones de electroforesis en campos pulsados de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.....	90
	Consideraciones generales.....	94
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	97
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	98
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	

# ***INTRODUCCIÓN***



## INTRODUCCIÓN

El agua constituye uno de los recursos naturales más valiosos y un elemento natural indispensable para el desarrollo de la vida y de las actividades humanas. Sin embargo, el uso indiscriminado de este recurso, unido al crecimiento de la población a nivel mundial ha hecho que disminuya peligrosamente la calidad del agua de las fuentes de abasto y de los ecosistemas acuáticos naturales. Esta situación pone en peligro la disponibilidad de un recurso vital para la vida como lo es el agua (Siew-Leng *et al.*, 2012; Ávila de Navia *et al.*, 2009; Ram *et al.*, 2008; Ashbolt, 2004; Galindo *et al.*, 2005).

El medio ambiente se considera un tema estratégico y prioritario de la investigación científica en Cuba y, la protección de los ecosistemas acuáticos constituye uno de sus temas más importantes (CITMA, 2007).

Los ecosistemas dulceacuícolas de La Habana están sometidos a un proceso antrópico acelerado como consecuencia del crecimiento de la población en la capital y reciben a lo largo de sus trayectorias a través de la ciudad numerosos aportes de aguas residuales, debido a la insuficiente existencia de sistemas de alcantarillado en las comunidades aledañas a estos cuerpos de agua. Esta situación ha provocado el deterioro de la calidad del agua de estos ríos.

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes investigaciones relacionadas con la contaminación química de varios de estos ecosistemas (Arpajón *et al.*, 2011; Varcárcel *et al.*, 2010; Periles *et al.*, 2006). Sin embargo, desde el punto de vista microbiológico los análisis que se han realizado no han sido sistemáticos ni suficientes, por lo que no se cuenta con datos actualizados de su contaminación microbiana, ni se conoce exactamente el número ni los sitios de los vertimientos de aguas residuales en estos cauces fluviales.

Por otra parte, se plantea que uno de los problemas más serios vinculado a la contaminación microbiana de los ecosistemas acuáticos es la presencia de microorganismos patógenos. Los agentes involucrados en la transmisión hídrica son bacterias, virus y/o protozoos, capaces de causar enfermedades humanas y de importancia veterinaria con diferentes niveles de gravedad, desde una simple gastroenteritis, hasta casos fatales de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea. Por tal

motivo, la determinación de los microorganismos patógenos presentes en los ecosistemas acuáticos contaminados para la evaluación de la calidad microbiológica de cualquier tipo de agua es esencial para evitar los riesgos potenciales para la salud asociados con su uso.

Sin embargo, existe un consenso general sobre la dificultad de determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos presentes en las aguas contaminadas, ya que dicha determinación implicaría varios días de análisis, costos elevados, y la existencia de personal y laboratorios especializados. Frente a estas dificultades y a la necesidad de evaluar de forma rápida y confiable la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con microorganismos indicadores. El empleo de las bacterias indicadoras de contaminación fecal es un método aceptado universalmente. Entre los microorganismos más utilizados con estos fines se encuentran los coliformes totales, los coliformes termotolerantes, la especie *Escherichia coli* y los enterococos, debido al origen intestinal de todos ellos (Arcos *et al.*, 2005; Rompré *et al.*, 2002; Ashbolt *et al.*, 2001).

A pesar de la utilidad de estos indicadores, se conoce que cuando alguno de estos microorganismos se encuentran en altas concentraciones, por ejemplo *Escherichia coli*, su presencia también puede asociarse directamente al riesgo sanitario del empleo de las aguas (Fewtrell y Bartram, 2001). La búsqueda de los grupos patógenos o patotipos de la especie *E. coli* a partir de ecosistemas acuáticos contaminados se ha incrementado en los últimos años y comienza a considerarse como un criterio más para la evaluación de la calidad microbiológica de las aguas (Sinclair *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011; Bergholz *et al.*, 2011; Orsi *et al.*, 2007). Las cepas patógenas de esta especie poseen factores de virulencia específicos que les permiten causar un amplio espectro de enfermedades intestinales y extraintestinales aún en individuos sanos (Kaper *et al.*, 2004).

En Cuba, las investigaciones relacionadas con los grupos patógenos de *E. coli*, especialmente los intestinales, se han limitado a estudios de cepas de origen clínico y veterinario, en particular de pacientes y algunos animales de interés económico con cuadros diarreicos (De la Fé *et al.*, 2012; Lazo *et al.*, 2009; Águila *et al.*, 2007; Águila *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2006). Sin embargo, no se han encontrado publicaciones de trabajos dedicados a la búsqueda de estos patotipos en ecosistemas dulceacuícolas

cubanos, a pesar de la implicación clínica y epidemiológica derivada de la presencia de estos grupos patógenos en las aguas.

Por estas razones, las investigaciones de aislamiento y caracterización de aislados ambientales de *E. coli* procedentes de ecosistemas acuáticos contaminados aportan información novedosa y necesaria para el conocimiento de esta temática en nuestro país. Adicionalmente, la detección de estos patotipos en ecosistemas dulceacuícolas cubanos es una evidencia incuestionable de la contaminación de estos cuerpos de agua y de la utilidad de esta especie bacteriana como indicador de calidad para las aguas superficiales en climas tropicales como el de Cuba.

Tomando en consideración que los ecosistemas dulceacuícolas de la capital reciben vertimientos de aguas residuales domésticas e industriales que originan la contaminación microbiana de sus aguas, destacándose entre ellos los ríos Almendares, Quibú y Luyanó, en los cuales la presencia de *E. coli* indica una contaminación fecal reciente, se propone la siguiente **Hipótesis:** En ecosistemas dulceacuícolas de La Habana circulan serogrupos, serotipos y patotipos de *Escherichia coli* de importancia clínica humana con una alta diversidad genética cuya presencia indica la deficiente calidad microbiológica de las aguas de estos ríos.

Con la finalidad de evaluar la validez de la hipótesis se proponen los siguientes **objetivos:**

1. Evaluar la calidad microbiológica de tres ecosistemas dulceacuícolas de La Habana mediante el empleo de bacterias coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* como indicadoras de contaminación fecal.
2. Caracterizar las cepas de *E. coli* aisladas de los ecosistemas dulceacuícolas evaluados mediante el empleo de pruebas fenotípicas y moleculares con el fin de identificar los patotipos de esta especie presentes en estos ríos.
3. Analizar la diversidad de las cepas de *E. coli* aisladas a través de sus características antigénicas, genéticas y de resistencia frente a los antimicrobianos evaluados.

## **Novedades**

Esta investigación tiene las siguientes novedades científicas:

### **Por primera vez para Cuba y el Caribe:**

- Se realiza la caracterización de cepas de *E. coli* aisladas a partir de ecosistemas dulceacuícolas contaminados mediante serotipificación, evaluación de su susceptibilidad antimicrobiana, presencia de factores de virulencia y patrones de adherencia, que permiten su clasificación en patotipos de esta especie.
- Se evidenció la presencia de cepas de *Escherichia coli* ambientales con capacidad de adherencia (Adherencia difusa y Adherencia agregativa).
- Se informa sobre la elevada diversidad genética de cepas de *E. coli* ambientales aisladas de diferentes ecosistemas dulceacuícolas cubanos y se demostró la inexistencia de una relación clonal entre las cepas circulantes.
- Se demostró la existencia de una correlación positiva entre las concentraciones de coliformes termotolerantes y de *Escherichia coli*, extrapolable para ecosistemas dulceacuícolas de clima tropical.
- Se informa sobre la presencia de cepas de *E. coli* pertenecientes al serotipo O174:H32, así como de cepas de la categoría patógena *E. coli* enteroinvasiva y cepas de *E. coli* uropatogénicas en aguas superficiales de clima tropical.

## **Importancia teórica**

Constituyen un aporte al conocimiento los aspectos microbiológicos, genéticos, clínicos y epidemiológicos de cepas ambientales de *E. coli* de Cuba, así como la diversidad genética encontrada entre ellas, todo lo cual posibilita contar con un documento de valor científico que puede ser utilizado como referencia en investigaciones posteriores. Esta investigación constituye el trabajo más completo sobre cepas de *Escherichia coli* ambientales que se ha realizado en Cuba hasta la fecha.

## **Importancia práctica**

Esta investigación proporciona información actualizada sobre los valores de contaminación microbiológica y de la calidad de tres de los ecosistemas dulceacuícolas más importantes de La Habana, lo cual limita el uso de sus aguas para la realización de actividades recreativas y el riego agrícola. Se aportan evidencias sobre la utilidad práctica

del empleo de *Escherichia coli* como indicador de calidad microbiológica de aguas superficiales de clima tropical, aspecto a considerar para la actualización de los microorganismos indicadores que se emplean en la norma cubana para aguas superficiales. Se ofrece la ubicación de 25 vertimientos de aguas residuales domésticas ubicados en tres ecosistemas dulceacuícolas de La Habana, lo que facilita la toma de medidas por las autoridades competentes para mejorar la calidad de estos cuerpos de agua.

La tesis consta de 98 páginas, organizadas de la siguiente forma: Resumen, Índice, Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Referencias Bibliográficas. Incluye 18 Tablas, 16 Figuras y 2 Anexos.

Los resultados presentados en esta investigación forman parte de seis publicaciones nacionales y tres internacionales y de 15 trabajos presentados en eventos científicos nacionales e internacionales. Han formado parte de un Trabajo de Diploma y una Tesis de Maestría en Microbiología. Parte de los resultados han sido reconocidos y premiados en el Concurso Científico Técnico de las BTJ a nivel de universidad y municipal (2009), en el XVI Forum de Ciencia y Técnica (2011) a nivel de Facultad de Biología y Municipal, así como en logros científicos de la Facultad de Biología y Premios de la Universidad de La Habana al resultado de investigación del año que más haya contribuido a la protección del medio ambiente en Cuba (2009 y 2010) y un Premio de la Academia de Ciencias (2010).

# ***CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA***

## **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Calidad de las aguas**

El agua es un recurso natural limitado, indispensable para la vida y fácilmente vulnerable. Se trata de un recurso que debe estar disponible no sólo en la cantidad necesaria, sino también con la calidad precisa. La calidad biológica de las aguas es un modo de definir la riqueza biológica y el valor ambiental de las comunidades de seres vivos asociados al ecosistema de un curso fluvial o de un tramo concreto del mismo (Harwood *et al.*, 2005).

Los ríos constituyen uno de los ecosistemas dulceacuícolas superficiales más importantes y su existencia depende totalmente del régimen de los mismos. Por tanto, se debe tener gran cuidado para no alterar este régimen al actuar sobre el río y su cuenca, ya que una gestión poco responsable de los recursos del agua o su sobreexplotación pueden tener efectos desastrosos para el ecosistema (Pérez, 2002). Sin embargo, la actividad humana ejerce un impacto significativo sobre estos recursos hídricos naturales y los hace vulnerables a la contaminación, lo que provoca una modificación de la composición físico-química y biológica de sus aguas que compromete los usos de estas y/o su reutilización, al dificultarse el proceso natural de autodepuración.

La importancia de los ríos trasciende las fronteras nacionales y los intereses locales, ya que en ellos se encuentra disponible una cantidad importante del agua dulce del planeta necesaria para el mantenimiento de la vida (Meybeck y Helmer, 1996). La conservación y el mantenimiento de la calidad de sus aguas es imprescindible si se quiere asegurar la disponibilidad del recurso agua en las cantidades, los tiempos y la calidad con que los seres vivos lo requieren.

#### **1.1.1. Calidad de los ecosistemas dulceacuícolas superficiales a nivel internacional**

A pesar del control y la prevención que existe, en muchos países se informa de la contaminación de las aguas superficiales. Se plantea que a medida que crece la población mundial, la presión ejercida sobre los recursos hídricos es mayor. Según estudios realizados por la OMS durante el siglo pasado, la población mundial se triplicó, mientras que el consumo de agua se sextuplicó (WHO, 2011).

Se prevé para el año 2050 que una de cada cuatro personas viva en un país afectado por la escasez de agua dulce. La situación más alarmante es la del África Subsahariana, donde se estima que en el año 2025 casi 230 millones de africanos se enfrentarán a la

escasez de agua y 460 millones vivirán en países con escasez de este recurso vital (UNESCO, 2006).

Países desarrollados como Francia, EUA, Canadá, Japón e Inglaterra informan de la alta contaminación microbiana que presentan algunos de sus principales ecosistemas dulceacuícolas y señalan la importancia de establecer controles estrictos en los vertimientos hacia los cuerpos de agua a través de programas legales eficaces (García-Armisen *et al.*, 2007; Ksoll *et al.*, 2007; Anon, 2000, Hoshima *et al.*, 2001, Haas *et al.*, 2000).

Para los países en vías de desarrollo la situación es aún más complicada. Se ha planteado que más del 90% de las aguas servidas en estos países se descargan directamente en corrientes de agua, alcantarillas abiertas, ríos, lagos y aguas costeras sin ningún tratamiento (WHO, 2011). Esta situación, unido a un deficiente sistema de alcantarillado contribuye a la contaminación de los recursos hídricos superficiales de estos países (Bitton, 2005; Delgado *et al.*, 2008).

En Colombia, México, Puerto Rico, Brasil y Argentina se ha informado de la paulatina degradación de la calidad de sus recursos hídricos y muestran una situación muy desfavorable en los ecosistemas dulceacuícolas superficiales de sus principales ciudades (Campos-Pinilla *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2009; Galindo *et al.*, 2005, Falcao *et al.*, 1993, Rivera *et al.*, 1998).

En la India, la contaminación del río Ganges constituye uno de los problemas más serios a los que se enfrenta este país desde el punto de vista medioambiental. Investigaciones realizadas en este río señalan que las concentraciones de microorganismos indicadores de contaminación fecal en este ecosistema dulceacuícola superan los límites establecidos por las normas de calidad de este país (Ram *et al.*, 2009), lo que invalida el uso de sus aguas por la población para cualquier actividad.

### **1.1.2. Calidad de los ecosistemas dulceacuícolas superficiales en Cuba**

La situación en Cuba no escapa a la problemática anteriormente expuesta, ya que sus principales ecosistemas dulceacuícolas están seriamente afectados por la contaminación. La hidrografía de la provincia La Habana está representada por los ríos Almendares, Martín Pérez, Quibú, Luyanó, Cojímar, Bacuranao y los embalses Bacuranao y Ejército Rebelde. El deterioro de la calidad del agua de los ríos de La Habana, es cada vez mayor



debido a la insuficiente existencia de sistemas de alcantarillado en las comunidades, el incremento de la industrialización, la utilización de tecnologías no idóneas para garantizar los requerimientos de remoción de los contaminantes y la carencia de aplicación de otras medidas de disposición de aguas residuales, así como el incremento de la población, todo esto ha provocado una situación en la cual el caudal y la carga de las aguas residuales que ingresan a las aguas naturales comprometen la capacidad de autodepuración de las aguas terrestres (Pérez y Valdés, 2011).

En el contexto nacional cubano las aguas residuales que predominan son: Domésticas, Industriales del sector agroalimentario (agrícola, pecuario, alimenticio, azucarero, pesquero) y Mixtas (generalmente una mezcla de residuales domésticos con los otros tipos).

Estas descargas causan efectos negativos en los ecosistemas dulceacuícolas de la capital como la disminución de las concentraciones de saturación de oxígeno disuelto, el aumento de la turbidez, el color y los sólidos en suspensión, el incremento de la concentración de nitrógeno y fósforo y con ello de la vegetación acuática como resultado de los fenómenos de eutrofización así como el incremento de las concentraciones de coliformes totales, termotolerantes y de la especie *Escherichia coli* (Pérez y Valdés, 2011). Por tanto, el análisis de la calidad de estos ecosistemas constituye una necesidad de primer orden para garantizar la salud de la población de la capital que se sirve de sus aguas.

## **1.2. Ecosistemas acuáticos superficiales de La Habana**

### **1.2.1. Río Almendares**

El río Almendares es la corriente fluvial más importante de La Habana y está ubicado dentro de la Cuenca Hidrográfica Almendares-Vento, la cual abarca un área de 402, 02 km<sup>2</sup>; de ellos, el 52,8 % pertenece a la provincia La Habana.

Esta cuenca tiene gran importancia desde los puntos de vista económico, social, sanitario, cultural, recreativo y urbanístico para los territorios habaneros. Más de medio millón de personas viven en la cuenca y alrededor del 47 % del agua potable que se suministra a la ciudad de La Habana proviene de la cuenca subterránea Vento. Además, el río Almendares constituye el eje principal del Gran Parque Metropolitano de La Habana (GPMH), el cual se localiza a lo largo de los últimos diez km de la trayectoria de esta importante corriente fluvial (CCAV, 2002; Fernández, 2009).

En el área comprendida en los municipios Playa, Plaza de la Revolución y Cerro se encuentran importantes instalaciones industriales ubicadas en las proximidades de los márgenes del río Almendares y que están en su mayoría asociadas a afectaciones ambientales. La función recreativa está vinculada a amplias zonas verdes constituidas por el Parque Almendares, los jardines de las cervecerías La Tropical y La Polar y, el Bosque de La Habana que los integra y que constituye parte del proyecto del Gran Parque Metropolitano de La Habana que se extiende en los municipios Playa, Plaza de la Revolución, Cerro y Marianao. En este último municipio, además del citado parque, hay extensas áreas agrícolas, principalmente de caña, así como la presencia de grandes instalaciones como el Instituto Superior Politécnico José Antonio Echevarría (ISPJAE), algunas otras instalaciones productivas y el Vertedero de calle 100 (CCAV, 2002).

Hoy, el río Almendares presenta una situación crítica debido a la contaminación de sus aguas por residuales industriales y urbanos sin tratamiento o ineficientemente tratados, zonas críticas de erosión de suelo, inadecuado manejo de la cuenca y deforestación (CCAV, 2002; Prats *et al.* 2007). La cuenca Almendares-Vento suministra un aporte de 8,8 metros cúbicos por segundo y garantiza el mayor volumen de agua que consume y utiliza la población de la capital para todos los usos. Debido a la prologada escasez de lluvias en los últimos años, el nivel promedio de las aguas subterráneas en la cuenca evidencia que el acuífero se encuentra en condiciones desfavorables y la tendencia general de la cuenca es hacia una depresión sostenida que se ve incrementada por los vertimientos de aguas residuales en los ríos que la componen.

En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes investigaciones relacionadas con la contaminación química y microbiana de las aguas del río Almendares (Prats *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008; Arpajón *et al.*, 2011). Sin embargo, desde el punto de vista microbiológico estos trabajos han sido escasos, por lo que no se cuenta con datos recientes del estado de su contaminación microbiana. La evaluación de la calidad microbiológica de estas aguas resulta muy importante si se tiene en cuenta que sus aguas se emplean inadecuadamente en múltiples actividades por los habitantes de la ciudad para la realización de actividades recreativas o de otra índole, lo que conlleva un grave riesgo para la salud de las personas que se pongan en contacto, de manera directa o indirecta, con las aguas de este río.

### 1.2.2. Río Quibú

El área de la Cuenca Hidrográfica Superficial del río Quibú (CHS Quibú) es de 30,59 km<sup>2</sup>. Residen en esta área 240 698 habitantes. Está habitada por varias comunidades urbanas, entre ellas, los Pocitos, el Palmar y el reparto Flores, de los municipios Marianao, La Lisa y Playa, respectivamente.

Esta cuenca presenta problemas ambientales de gran envergadura, generados por diferentes entidades y grupos poblacionales asentados en las márgenes del río Quibú que, desde hace varios años, han vertido desechos de todo tipo a sus aguas. Esto lo clasifica hoy en día como uno de los más contaminados de la ciudad y una de las cuencas con mayores problemas en la provincia. El río Quibú es la corriente superficial más importante de la cuenca y recibe el caudal de 5 afluentes (Rua de Cabo *et al.*, 2006).

En la contaminación de esta cuenca (y principalmente del río) se destacan fundamentalmente instalaciones como la Textilera Camilo Cienfuegos, la Planta de Oxígeno, la Empresa acuícola Acuabana, dedicada a la producción de alevines, entre otras. También existen en el territorio pequeñas industrias dedicadas a la producción de fármacos e instalaciones como el Centro de Biotecnología, el Centro de Inmunoensayo, el Centro de Genética, las plantas de producción de vacunas, la fábrica de PPG y el Centro de Investigaciones Químico-Farmacéutico. Todos los desechos líquidos de estas instituciones van a parar al río, lo que contribuye su contaminación (Gutiérrez *et al.*, 2005).

El vertimiento de basura es otro de los principales contaminantes que tiene este río, pues se han establecido microvertederos en diversos sitios aledaños al mismo, además de que se vierten directamente al río materiales diversos como desechos de construcción, plásticos, pedazos de metales, bolsas, etc (Gutiérrez *et al.*, 2005). Según estos autores, algunos de los vertimientos citados anteriormente reciben tratamiento mediante lagunas de oxidación o a través de una planta o estación de descontaminación de residuales (EDAR Quibú) localizada en el tramo bajo del río, pero la mayoría de los desechos son vertidos a los cuerpos de agua sin tratamiento alguno, generalmente a través de derrames cloacales, que desembocan directamente en el río.

En la CHS Quibú se han llevado a cabo diferentes investigaciones sobre los principales problemas ambientales que afectan a esta cuenca, entre los que se encuentra la contaminación del río (Fernández *et al.*, 2004; Rua de Cabo *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de estos análisis se han hecho desde una perspectiva

geomorfológica y geográfica, por lo que sus limitaciones han sido fundamentalmente el poco análisis de la calidad química y microbiológica de las aguas del río, análisis por demás importante, dada la alta urbanización que presenta esta cuenca y la estrecha relación que existe entre la población y el río.

### **1.2.3. Río Luyanó**

El río Luyanó forma parte de la Cuenca Hidrológica Superficial Luyanó (CHS Luyanó), la cual se encuentra en la porción centro septentrional de la provincia de La Habana y tiene un área de 28,9 km<sup>2</sup>. Esta corriente superficial vierte sus aguas en la Bahía de la Habana, de la cual es su principal tributario, tanto en agua dulce como en carga contaminante (Mulet y Guillen, 2003; Jiménez, 2007). La CHS Luyanó está compartida por porciones de cinco municipios: Habana Vieja, Regla, 10 de Octubre, Arroyo Naranjo y San Miguel del Padrón; de los cuales los tres últimos son los de mayor importancia en la cuenca, tanto por su área, como por el aporte de carga contaminante al río por la población y la industria.

Las aguas de esta corriente fluvial no se utilizan para el abasto a la población, pero sí para otras actividades por parte de la comunidad residente en la misma, tales como uso recreativo (solo en localidades entre El Diezmero y San Francisco de Paula), riego de hortalizas en huertos particulares, jardines y otros en el sector alto de la cuenca.

Solo pertenece a la zona de uso no residencial de la periferia de la ciudad la menor parte, donde existen instalaciones productivas dispersas, entidades militares, algunas viviendas aisladas, dos micropresas (Hemingway 1 y Hemingway 2) y el embalse río Hondo; todas utilizadas para riego agrícola. El resto del territorio de la cuenca pertenece a la mancha urbana de la ciudad, con un área dentro de la unidad de 16,47 km<sup>2</sup>.

En esta cuenca viven un número elevado de personas en condiciones desfavorables, sobre todo por el mal estado de sus viviendas; condiciones que además de influir en la calidad de vida de la población, devienen en problemas socio – ambientales con un papel importante en la contaminación de las aguas del río Luyanó.

Por otro lado, en la cuenca se ubican una gran cantidad de industrias, que se caracterizan por verter grandes volúmenes de residuales contaminantes al cauce del río. El río Luyanó desde su nacimiento recibe aguas residuales a partir de su unión con el río Hondo. El arroyo Pastrana, afluente del río Luyanó, se ve contaminado actualmente por varias

industrias como la Destilería Habana, la Destilería de Aguardiente Cuba, la Fábrica de pinturas Jorge de la Nuez y el Matadero Antonio Maceo. Cerca de su desembocadura en la bahía de La Habana, el río Luyanó recibe dos nuevas cargas de consideración: la Planta de Gas Evelio Rodríguez Curbelo y el rebose del sifón invertido del colector Oeste II en su ramificación Barrio Obrero (GTE – BH, 2006; Jiménez, 2007). Existen otras industrias que se ubican dentro del área de la CHS Luyanó que no contribuyen a la contaminación de la corriente fluvial Luyanó, pues sus sistemas de evacuación de desechos están orientados hacia la CHS Martín Pérez.

Los principales trabajos de investigación que se han realizado en la cuenca del río Luyanó enfocan sus objetivos a la contaminación química de este cauce fluvial (Periles, 2006; Valcárcel *et al.*, 2010), sin embargo, no se informan datos microbiológicos en estas investigaciones, no constituyen análisis sistemáticos y por tanto, no se cuenta con datos recientes del estado de la contaminación microbiana de este río capitalino. Se hace evidente que la vigilancia de la calidad sanitaria de sus aguas constituye una necesidad debido a la implicación que tiene para la salud humana.

Todo lo expuesto anteriormente evidencia la razón de la selección de estos tres ríos habaneros en el presente trabajo para la determinación y análisis del grado de su contaminación microbiana, así como para la búsqueda de cepas de *E. coli* en sus aguas capaces de originar enfermedades infecciosas, sin obviar la importancia de la detección y ubicación de los vertimientos que constituyen fuentes de contaminación domésticos. Esta investigación colaborará al conocimiento de la calidad de las aguas de estos ecosistemas dulceacuícolas, con fines de prevenir enfermedades de transmisión hídrica relacionadas con el uso indebido de sus aguas en la capital de nuestro país.

### **1.3. Evaluación de la calidad de las aguas**

El establecimiento de programas de monitoreo de la calidad del agua responde a la necesidad de verificar si la calidad de este recurso cumple con las condiciones necesarias para los usos requeridos. Las variables a monitorear varían de acuerdo al uso a que se destinen las aguas y al objetivo que se persiga, pero en general, para evaluar la calidad del agua se utilizan distintos parámetros (Rompré *et al.*, 2002; Troncoso, 2006):

- a) Parámetros organolépticos: color, turbidez, sabor.

- b) Parámetros físicos: sólidos totales (residuo sólido), sólidos suspendidos (sedimentables y no sedimentables), sólidos filtrables (coloidales y disueltos), temperatura, conductividad y radioactividad.
- c) Parámetros químicos: salinidad, dureza, pH, alcalinidad, acidez, oxígeno disuelto, materia orgánica, DBO (demanda biológica de oxígeno), DQO (demanda química de oxígeno), COT (carbono orgánico total), bionutrientes (N, P) y otros compuestos como metales pesados, aniones, cationes, sustancias indeseables y sustancias tóxicas.
- d) Parámetros microbiológicos: bacterias coliformes (totales y termotolerantes), enterococos fecales, bacterias heterótrofas mesófilas y ensayos específicos para detectar cepas de *Salmonella*, *Legionella*, hongos dermatofitos y microalgas epibióticas tóxicas.

En ocasiones se emplean también indicadores biológicos, los cuales expresan el efecto de la contaminación sobre una comunidad biológica y se basan en la capacidad de los organismos para reflejar características o condiciones ambientales del medio en que se encuentran. Sin embargo, estos métodos no permiten identificar los agentes contaminantes existentes, por lo que la utilización de estos indicadores biológicos es complementaria y no sustitutiva a los indicadores físico-químicos y microbiológicos (Miravet *et al.*, 2009).

### **1.3.1. Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas**

De acuerdo a lo anterior, tanto los criterios como los estándares y objetivos de calidad del agua variarán dependiendo de si se trata de agua para consumo humano, para uso agrícola o industrial, para recreación o para mantener la calidad ambiental. Los límites tolerables de las diversas sustancias contenidas en el agua se recomiendan por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), así como los gobiernos nacionales, pudiendo variar ligeramente de uno a otro país (Boehm *et al.*, 2009; WHO, 2009).

Existe un consenso general sobre la dificultad para determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos presentes en las aguas contaminadas, ya que dicha determinación implica varios días de análisis, costos elevados, personal adiestrado y la existencia de laboratorios especializados. Frente a estas dificultades y a la necesidad de

hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con microorganismos indicadores. Específicamente la calidad microbiológica del agua se mide a través de la presencia de microorganismos indicadores, cuyas concentraciones en el agua pueden estar cualitativamente relacionadas con el riesgo a la salud que implica el uso de esta (Arcos *et al.*, 2005).

En Cuba, se encuentran reglamentados los requisitos de calidad del agua para diferentes usos en diferentes normas elaboradas por los Comités Técnicos de Normalización, de la Oficina Nacional de Normalización. En la Norma Cubana 857 (2010) para aguas de consumo humano, se establece que esta debe estar libre de bacterias coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*, mientras que en la Norma Cubana 22 (1999) para el control de la calidad de aguas destinadas a lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores, los niveles de estos indicadores no deben superar los  $10^3$  NMP/100 mL.

Estos criterios microbiológicos de calidad de aguas, son de gran importancia en nuestro país, ya que, al igual que en otros países de América Latina, los recursos hídricos, superficiales y subterráneos, son los pilares del desarrollo económico por su importante participación en el desarrollo urbano, hidroeléctrico, minero, agrícola, industrial, turístico y recreación.

### **1.3.2. Microorganismos indicadores de contaminación fecal**

Los microorganismos indicadores son aquellos que presentan un comportamiento similar a los patógenos en cuanto a concentración, reacción frente a diferentes factores ambientales y barreras artificiales, pero son más rápidos, económicos y fáciles de identificar (Reischer *et al.*, 2008; del Pilar *et al.*, 2005, Rompré *et al.*, 2002).

La búsqueda de un indicador “ideal” para la evaluación de la calidad bacteriológica del agua ha sido difícil. Un microorganismo indicador de contaminación fecal debe reunir las siguientes características (Bitton, 2005):

- Ser un constituyente normal de la microbiota intestinal de individuos sanos.
- Estar presente de forma exclusiva en las heces de los animales homeotérmicos.
- Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.
- Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.

- Debe ser incapaz de reproducirse fuera de su hábitat primario (intestino de animales homeotérmicos).
- Su tiempo de supervivencia en el hábitat secundario debe ser igual o superior al de las bacterias patógenas (su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal).
- No debe ser patógeno.

No existe un microorganismo indicador ideal que se ajuste a todos los criterios pero existen algunos que responden a muchos de ellos, entre los que se destacan *Escherichia coli*, las bacterias coliformes (totales y termotolerantes) y los enterococos (Rompré *et al.*, 2002; Ashbolt, 2004). Además, se utilizan como indicadores alternativos las bacterias anaerobias fecales (*Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Clostridium perfringens*), virus (colifagos) y componentes orgánicos fecales como el coprostanol.

#### 1.3.2.1. Grupo coliformes

Las bacterias coliformes constituyen un grupo heterogéneo de amplia diversidad en términos de género y especie. Pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y agrupa los géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Forman parte de la microbiota normal aerobia del intestino, por lo general no provocan enfermedades, incluso contribuyen al mantenimiento de la salud.

La mayoría de las definiciones de bacterias coliformes están basadas en sus características bioquímicas comunes. Los Métodos Estándar para el Examen de Aguas Albañales (APHA, 1998), describen a los miembros del grupo de bacterias coliformes como:

- Todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas Gram negativas, no formadoras de esporas, de morfología bacilar que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas luego de una incubación durante 48 h a 35°C.
- Todas las bacterias aerobias y algunas anaerobias facultativas Gram negativas, no formadoras de esporas, bacilares, que desarrollan colonias rojas con brillo metálico cuando se incuban por 24 h a 35°C en medio Endo-type con lactosa.



Este grupo se subdivide en dos subgrupos: coliformes totales y coliformes termotolerantes (CTE), este último está compuesto fundamentalmente por *Escherichia coli* (EC) (90%) y algunas especies de los géneros *Klebsiella* y *Citrobacter* (Hanzen y Toranzos, 1990).

La definición de miembros del grupo coliforme se ha ampliado para incluir a bacterias que poseen otras características, tales como la reacción  $\beta$ -D galactosidasa positiva (reacción enzima-sustrato) (APHA, 1998).

#### **1.4. Métodos para la identificación y enumeración de los microorganismos indicadores**

En la actualidad se han desarrollado diferentes métodos que permiten realizar una eficiente identificación y cuantificación de las bacterias coliformes presentes en aguas contaminadas, algunos de los cuales se comentan a continuación.

##### **1.4.1. Técnica de Fermentación en Tubos Múltiples**

La técnica de fermentación en Tubos Múltiples (FTM) para enumerar la presencia de bacterias coliformes se usó durante 80 años aproximadamente como método de monitoreo de la calidad del agua. Este método emplea tubos con caldo lactosado para la prueba presuntiva y con caldo bilis verde brillante para la prueba confirmatoria (Rompré *et al.*, 2002). Puede aplicarse para determinar coliformes totales y fecales (APHA, 1998) y se considera un resultado positivo la producción de gas después de 48 h de incubación a 44,5°C en caldo EC.

Los resultados de la técnica FTM se expresan en términos del número más probable (NMP) de microorganismos presentes en 100 mL de agua. Este número se estima estadísticamente del número medio de coliformes en la muestra, por lo que ofrece una enumeración semicuantitativa de coliformes y la precisión de la estimación es bastante baja y depende del número de tubos usados para el análisis (Rompré *et al.*, 2002). Esta técnica carece de precisión en términos cualitativos y cuantitativos y el tiempo requerido para obtener los resultados es mayor que el necesario para otras técnicas, como por ejemplo la técnica de filtración por membrana (FM), la cual ha reemplazado en muchos casos a la técnica de FTM debido a la necesidad de una sistematicidad de los exámenes de agua potable.

#### 1.4.2. Técnica de Filtración por membrana

Este método utiliza un mecanismo mediante el cual los microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro del filtro (0,45  $\mu\text{m}$ ) quedan atrapados en la superficie de una membrana. Los microorganismos de tamaño menor que el específico del poro pasan a través de la membrana o quedan retenidos en su interior. Las bacterias de tamaño superior al poro quedan en la superficie de la membrana, la cual se deposita sobre un medio sólido enriquecido, selectivo o diferencial. El medio de cultivo utilizado durante su incubación evidenciará el crecimiento de microorganismos como unidades formadoras de colonias (UFC) (APHA, 1998; Rompré *et al.*, 2002).

Los medios de cultivo más utilizados para el análisis de agua potable, son el medio m-Endo-Type en América del Norte (APHA, 1998) y el medio Tergitol-TTC en Europa (AFNOR, 2001). Las bacterias coliformes forman colonias rojas con brillo metálico en medio Endo-Type que contiene lactosa (incubación por 24h a 35  $^{\circ}\text{C}$  para coliformes totales) o colonias amarillo naranja en medio Tergitol-TTC (incubación por 48h a 37  $^{\circ}\text{C}$  y por 24h a 44  $^{\circ}\text{C}$  para coliformes totales y termotolerantes respectivamente). Este último medio de cultivo basa su acción en la degradación de la lactosa hasta ácido, que es detectado con el indicador azul de bromotimol. Este indicador cambia de color el medio bajo la membrana de verde a amarillo. La selectividad del medio se logra por el uso del heptadecilsulfato de sodio (Tergitol 7) y el cloruro de trifenil 2,3,5 tetrazolio (TTC) para inhibir a la mayoría de las bacterias Gram positivas. El TTC es también parte del sistema diferencial. La reducción del TTC por las bacterias lactosa-negativas produce colonias rojo oscuro. La especie *E. coli* que es lactosa-positiva y las bacterias coliformes en general, reducen el TTC débilmente; por lo que sus colonias son amarillo-naranja (Rompré *et al.*, 2002; Mavridou *et al.*, 2010).

En las últimas décadas, se han desarrollado nuevos medios de cultivo que permiten la detección rápida y simultánea de *E. coli* y de coliformes totales en agua, entre los que se encuentran: el medio agar Fluorocult EDC, el agar Chromocult y el Rapid *E. coli* 2 (Fricker *et al.*, 2008). Estos nuevos medios tienen incorporados entre sus componentes sustratos que son utilizados por enzimas específicas que poseen el grupo de bacterias coliformes y *E. coli* (Rodríguez *et al.*, 2003). La  $\beta$ -D-glucuronidasa (GUD) es una de las enzimas que sirve como indicador para *E. coli*, ya que está presente en el 94 - 96% de las cepas de esta especie. Su actividad se mide mediante el uso de diferentes sustratos cromogénicos

y fluorogénicos como el p-nitrofenol-  $\beta$ -D-glucurónido (PNPG), o el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido (X-GLUC) y el 4-metilumbeliferil-  $\beta$ -D-glucurónido (MUG) (Fiksdal *et al.*, 2008; Byamukama *et al.*, 2000).

Sin embargo, aún queda por resolver la problemática de la detección de coliformes incapaces de formar colonias (viables pero no cultivables) debido a una serie de factores físicos y químicos involucrados en el tratamiento del agua y factores estresantes cuando estas bacterias se encuentran en el ambiente (García-Armisen y Servais, 2004).

### 1.5. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* se describió por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich. Fue nombrada inicialmente como "*Bacterium coli commune*", pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor (Kaper, 2005).

Los representantes de esta especie son bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, con un tamaño promedio de 1,1-1,5  $\mu$ m de ancho y 2,0-6,0  $\mu$ m de largo. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobios facultativos y pueden ser móviles por la presencia de flagelos peritricos o no móviles (Scheutz y Strockbine, 2005).

Desde el punto de vista taxonómico su clasificación es la siguiente:

<b>Phylum</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae
<b>Género</b>	<i>Escherichia</i>
<b>Especie</b>	<i>Escherichia coli</i> (Scheutz, 2005)

*E. coli* forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (TGI) del ser humano, otros mamíferos y las aves y constituye una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización.

#### 1.5.1. *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal

*Escherichia coli* se considera el microorganismo indicador de contaminación fecal por excelencia (Edberg *et al.*, 2000). Por esta razón, la cuantificación de *E. coli* en cuerpos de agua de ambientes tropicales como principal representante del grupo de coliformes termotolerantes ha cobrado importancia en la última década.

Sin embargo, es necesario tomar en consideración que aunque *E. coli* se ha considerado el indicador de contaminación fecal por excelencia, dentro de la especie se han descrito grupos patógenos capaces de causar enfermedades intestinales y extraintestinales en el ser humano y los animales, que no se tienen en cuenta cuando se realizan análisis de calidad microbiológica de las aguas (Ishii y Sadowski, 2008).

### **1.5.2. Grupos patógenos de *Escherichia coli***

Se distinguen dos grandes grupos de *E. coli* patógenas según el tipo de infección que provocan. Un primer grupo está constituido por las cepas de *Escherichia coli* responsables de infecciones extraintestinales (tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal) y un segundo grupo constituido por cepas patógenas intestinales, responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales. Las principales características de estos grupos se describen en las Tablas 1 y 2.

Dentro del segundo grupo se han realizado diferentes clasificaciones. Una de las más utilizadas es la que toma en consideración sus factores de virulencia y patogénesis. Según esta clasificación, se distinguen seis grupos diferentes: *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* enteropatógenicas (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (ADEC) (Rodríguez-Angeles, 2002; Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Es importante destacar que en una revisión de dicha nomenclatura, O'Brien y Kaper, 1998 propusieron la creación de un nuevo grupo que estaría formado por las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC, de sus siglas en inglés), también conocidas como *E. coli* productoras de verotoxinas. Este grupo englobaría al grupo de las EHEC y algunos serotipos que no poseen los factores de virulencia necesarios para causar patogénesis, aunque sí son capaces de producir las toxinas Shiga.

### **1.6. Métodos para la caracterización de los grupos patógenos de *E. coli***

La necesidad de separar las cepas patógenas de *E. coli* del resto de las cepas anfibiontes no patógenas, así como la diferenciación entre los diferentes grupos patógenos de esta especie ha hecho que se desarrollen sistemas de clasificación intraespecíficos. Sin embargo, no existe un método ideal y usualmente se deberá disponer de los recursos necesarios para aplicar varios métodos para poder arribar a la ubicación de una cepa en

**Tabla 1.** Patotipos extraintestinales de *Escherichia coli*

Patotipo, Modo de acción	Principales factores de virulencia	Serotipos más frecuentes
<p><b>UPEC</b> <i>Escherichia coli</i> uropatogénicas</p> <p>Coloniza la mucosa uretral, asciende desde la uretra hasta vejiga, ataca e invade las células epiteliales, y puede ascender hasta el riñón.</p> <p><b>Cistitis y pielonefritis</b></p>	<p>Adhesinas (typ 1, F1C, S, M, Dr)</p> <p>Fimbria P (Pap)</p> <p>Factor necrotizante citotóxico (CNF-1)</p> <p>Hemolisina A (Hly A)</p> <p>Proteasa autotransportadora (Sat)</p>	<p>O1:H7, O4:H5; O4:H1; O6:H1;</p> <p>O16:H6; O18ac:HNM</p>
<p><b>MNEC</b> <i>Escherichia coli</i> causantes de meningitis/septicemias</p> <p>Se dispersa hematógicamente, utilizando la sangre como medio de transporte para alcanzar el SNC y no causar daño en la barrera hematoencefálica.</p> <p><b>Meningitis neonatal y Septicemias</b></p>	<p>Proteínas de membrana externa (OmpA, IbA, IbeB, IbeC, AsIA)</p> <p>Factor necrotizante citotóxico (CNF-1)</p> <p>Antígeno capsular K1</p>	<p>O18ac:H7; O7:H1; O2:H6;</p> <p>O16:H16; O83:H4; O6:H1</p>

**Tabla 2.** Patotipos intestinales de *Escherichia coli*.

Patotipo, Modo de acción	Principales factores de virulencia	Serotipos más frecuentes
<p><b>EPEC <i>Escherichia coli</i> enteropatógena</b></p> <p>Se adhiere a los enterocitos del intestino delgado, destruye las microvellosidades, produce lesiones de "adherencia y borramiento" (A/E, de sus siglas en inglés), respuesta inflamatoria, se incrementa la permeabilidad intestinal, secreción activa de iones.</p> <p><b>Diarrea acuosa sanguinolenta</b></p>	<p><u>Isla de patogenicidad</u> <u>Locus de eliminación del enterocito (LEE )</u></p> <p>-Sistema de secreción tipo III, intimina (adhesina bacteriana), Tir (Receptor de la intimina), EspA, EspB, EspD, EspF (proteínas translocadoras y efectoras).</p> <p><u>Plásmido Factor de adherencia de EPEC (EAF) de 50-70 MDa</u></p> <p>-Pili formadores de penachos ó Bundle-forming pili (BFP, de sus siglas en inglés)</p> <p>No produce toxinas</p> <p>Adherencia localizada (células HEp-2)</p> <p>Las cepas EPEC atípicas carecen del plásmido EAF</p>	<p>O55:H6,HNM; O86:H34,HNM;</p> <p>O111:H2,H12,HNM; O119:H6,HNM;</p> <p>O125ac:H21; O126:H27,HNM;</p> <p>O128:H2,H12; O142:H6</p>
<p><b>ETEC <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica</b></p> <p>Se adhiere a los enterocitos del intestino delgado, secreta enterotoxinas, AMPc, GMPc, estimulación de la secreción de cloro e inhibición de la absorción de sodio.</p> <p><b>Diarrea acuosa</b></p>	<p>Factores de colonización (CFA)</p> <p>Enterotoxinas</p> <p>-Toxina termolábil (LT, de sus siglas en inglés)</p> <p>-Toxina termoestable (ST, de sus siglas en inglés)</p>	<p>O6:H16; O8:H9; O11:H27; O15:H11;</p> <p>O20:HHNM; O25:H42,HNM; O27: H7;</p> <p>O78:H11,H12; O128:H7; O148:H28;</p> <p>O149:H10; O159:H20; O173:HNM</p>

*Revisión Bibliográfica*

**Tabla 2.** Patotipos intestinales de *Escherichia coli* (Continuación).

<p><b>EHEC <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica</b></p> <p>Se adhiere a los enterocitos del intestino grueso, destruye las microvellosidades, produce lesiones de “adherencia y borramiento”, causa apoptosis, muerte celular y respuesta inflamatoria.</p>	<p><u>Isla de patogenicidad Locus de</u> <u>eliminación del enterocito (LEE)</u></p> <p>- Sistema de secreción tipo III, íntima, Tir, EspA, EspB, EspD, EspF.</p>	<p>O26:H11, H32,HNM; O55:H7; O111ab:H8,HNM; O113:H21; O117:H14;</p>
<p><b>Diarrea acuosa sanguinolenta</b></p> <p>La absorción sistémica de las verotoxinas puede provocar Síndrome Urémico Hemolítico, falla renal aguda, y desórdenes neurológicos.</p>	<p><u>Plásmido pO157</u></p> <p>-Enterohemolisina (Hly-EHEC) -Serin proteasa (EspP) <u>Citotoxinas STX1 y STX2</u></p>	<p>O157:H7</p>
<p><b>EIEC <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva</b></p> <p>Invade las células epiteliales del colon, lisa los fagosomas, se multiplica, se mueve a través de las células, migra a las células adyacentes, y causa colitis invasiva inflamatoria.</p> <p><b>Diarrea acuosa sanguinolenta</b></p>	<p>Invasividad</p> <p>Plásmido de invasión (pINV) del cual es parte el gen <i>ial</i></p> <p>-IpA, IpB, IpC, IpD (Proteínas que participan en la invasividad)</p> <p>-IsCA</p>	<p>O28ac:HNM; O29:HNM; O112ac:HNM, O124:H30,HNM; O136:HNM; O143:HNM; O144:HNM; O152:HNM; O159:H2, HNM;O164:HNM; O167:H4, H5, HNM</p>
<p><b>EAEC/EaggEC <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.</b></p> <p>Se adhiere al epitelio del intestino delgado y grueso en un biofilm “denso”, causa incremento en la producción de mucus, produce enterotoxinas secretorias y citotoxinas.</p> <p><b>Diarrea acuosa mucoide (puede ser persistente)</b></p>	<p>Adherencia agregativa (células HEp-2)</p> <p>Fimbrias de adherencia agregativa (AAFs I y II)</p> <p>Flagelina EAEC</p> <p>Toxinas (Pic, ShET1, EAST, Pet)</p> <p>Proteína de membrana externa (OMP)</p>	<p>O3:H2; O15:H18; O44:H18; O86:HNM; O77:H18; O111:H21; O127:H2;ONT:H10</p>
<p><b>DAEC <i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa</b></p> <p>Se adhiere e induce efectos citopáticos que hacen que los enterocitos del intestino delgado crezcan alargados, produce proyecciones alrededor de la bacteria similar a dedos.</p>	<p>Adherencia difusa (células HEp-2)</p> <p>Familia de adhesinas manosa resistente (Dr)</p> <p>Adhesina fimbrial F1845</p> <p>Proteína de membrana externa (OMP)</p>	<p>O126:H27</p>

Modificado de Rodríguez-Angeles, 2002

el enterogrupo que le corresponda (Tenover *et al.*, 1999; Swaminathan y Matar, 2001), tales como:

- **Marcadores fenotípicos:** biotipado, serotipado, antibiograma y ensayos de adherencia en cultivos celulares, los cuales detectan características expresadas por los microorganismos.
- **Marcadores genotípicos:** reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis en campo pulsado (ECP), análisis plasmídicos, análisis de enzimas de restricción (REA), restricción de fragmentos de amplio poliformismo (RFLP), entre otros, los cuales se basan directamente en características del ADN cromosomal y extracromosomal.

#### 1.6.1. Biotipado bioquímico

El biotipado bioquímico se basa en diferenciar las cepas por su capacidad de fermentar un determinado número de carbohidratos (como el manitol, la trealosa, la lactosa, la ramnosa o el sorbitol, entre otros) 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  $\beta$ -D-glucuronidasa.

Relacionado con este tipo de clasificación en biotipos se han descrito numerosos sistemas automatizados rápidos y sencillos de realizar. Una variante de este sistema lo constituyen las técnicas de fenotipado bioquímico conocida como PhenePlate® System, API y VITEK que se basan en la clasificación de los diferentes aislamientos en función de la capacidad y cinética de degradación de los diferentes sustratos analizados (Jordá *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008).

#### 1.6.2. Serotipado

Otro de los sistemas más frecuentemente utilizados en la clasificación intraespecífica de *E. coli* es el serotipado, basado en el método descrito por Kauffmann (Kauffman, 1947). Este sistema se basa en la detección de tres antígenos celulares, el antígeno somático designado como antígeno O, que forma parte de la estructura del lipopolisacárido, el antígeno flagelar, designado como antígeno H, que forma parte del flagelo bacteriano de las cepas móviles y el antígeno K, presente en aquellas bacterias que poseen cápsula. La serotipificación constituye una herramienta muy valiosa que en combinación con otros métodos puede ayudar a la identificación de cepas patógenas de esta especie (Gyles, 2007; Kaper, 2005; Scheutz y Strockbine, 2005).



En la actualidad se han descrito un total de 174 antígenos O y 55 antígenos H. Los últimos descritos fueron el O181 y el H56. No obstante continúa la descripción de nuevos antígenos, que aún no se han sido incorporados a esta nomenclatura (DebRoy *et al.*, 2011).

También se han hallado algunas cepas que no poseen antígeno O o en las que el antígeno O no se ha sintetizado completamente, las cuales aglutinan espontáneamente en una solución salina, conocidas como cepas rugosas, que son denominadas OR.

La descripción de los 3 antígenos, O, H y K, proporciona información completa sobre el serotipo, aunque el antígeno K no suele determinarse en la mayoría de laboratorios por su dificultad. Sin embargo, teniendo en cuenta únicamente los antígenos O y H, este método permite diferenciar alrededor de 9500 serotipos diferentes. Por ejemplo, dentro de la categoría STEC han sido descritos alrededor de 400 serotipos diferentes, aunque no todos se han asociado a enfermedad en humanos o animales (Bettelheim *et al.*, 2003).

### **1.6.3. Ensayos de adherencia en cultivos celulares**

Las propiedades adherentes de *Escherichia coli* se describieron inicialmente por Guyton en 1908, quien observó la capacidad de ciertas cepas para aglutinar glóbulos rojos de algunas especies animales (Duguid, 1980). La capacidad de adherencia de las cepas de *E. coli* se debe a la presencia de más de 15 adhesinas diferentes, las cuales se asocian con la habilidad que tienen estas bacterias para adherirse y proliferar en las mucosas del intestino, tracto urinario, tracto respiratorio y genital (Figueroa *et al.*, 1986; McKee y O'Brien, 1995; Scaletsky *et al.* 2010).

Cravioto y colaboradores (1979) describieron por primera vez un método para la identificación de EPEC. Scaletsky *et al.* (1985) informaron que algunas cepas de EPEC se adhieren a células HeLa o HEp-2 según tres patrones diferentes, conocidos como adherencia localizada, adherencia difusa y adherencia agregativa.

La prueba fenotípica diagnóstica considerada hoy el estándar de oro para la identificación de *Escherichia coli* enteropatógena, es el ensayo de adherencia sobre células epiteliales HEp-2 descrita inicialmente por Cravioto y colaboradores en 1979. Este método permite identificar EPEC dado que las bacterias se agrupan en cúmulos o microcolonias sobre las células epiteliales en cultivo. Dicha disposición se conoce como adherencia localizada o fenotipo LA.

Asimismo, con la citada técnica pueden también reconocerse *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Las bacterias de este tipo diarrogénico se agrupan y forman empalizadas que se adhieren a las células y al cristal. También puede identificarse *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), reconocible porque las bacterias se adhieren a las células de forma aleatoria (Scaletsky *et al.*, 1984 y Scaletsky *et al.*, 1988). Una variante de la técnica de Cravioto la propusieron en México Zepeda y González, quienes prefijaron las células HEp-2 con metanol frío cuyos resultados obtenidos fueron idénticos a los descritos con la técnica tradicional (Zepeda y González, 1995).

Estudios epidemiológicos sugieren que la capacidad diarrogénica de la mayoría de las cepas aisladas de casos clínicos de EPEC está asociada también con los patrones característicos de adherencia a células HeLa y HEp-2 (Scaletsky *et al.*, 2010).

#### **1.6.4. Resistencia de *Escherichia coli* a los antibióticos**

La especie *Escherichia coli* presenta resistencia intrínseca a los antibióticos betalactámicos. Hasta finales de los años 70 su característica era un patrón uniforme de sensibilidad; sin embargo, la utilización masiva de antibióticos ha provocado un aumento en su resistencia a nivel mundial (Turner *et al.*, 2006). En los últimos años, se ha observado un aumento de la resistencia de esta especie a los principales antibióticos de uso clínico para el tratamiento de infecciones causadas por las cepas patógenas de *E. coli* como la ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, tetraciclina y estreptomina, tanto en cepas de origen humano y animal como las aisladas del ambiente (agua y suelos) (Alzahrani *et al.*, 2011, Harada y Asai, 2010, Chandran *et al.*, 2008, Schneider *et al.*, 2009).

El uso indiscriminado de los antibióticos tanto en el tratamiento de enfermedades humanas como en veterinaria, ha provocado un aumento del número de bacterias resistentes a los antimicrobianos en el medio ambiente. La mayoría de las aguas residuales que contienen antibióticos se vierten a los desagües y van a parar a ambientes acuáticos, lo cual contribuye a la selección de microorganismos con patrones de multiresistencia a antibióticos. Las bacterias presentes en estos ecosistemas se ven expuestas a diferentes presiones selectivas, lo que favorece el intercambio de genes de resistencia a antibióticos a través de los diferentes vectores de transmisión (plásmidos, transposones y bacteriófagos) (Von Baum y Marre, 2005).

Actualmente se sabe que los elementos genéticos conocidos como integrones tienen la habilidad de capturar grupos de genes del ambiente (agua, suelo) e incorporarlos mediante recombinación en sitios específicos (Miko *et al.*, 2005). En la actualidad los porcentajes de resistencia entre las cepas de esta especie aumentan considerablemente e, incluso, son frecuentes las cepas multirresistentes en los ambientes acuáticos (Ram *et al.*, 2009, Hu *et al.*, 2008).

Por tanto, la determinación y vigilancia de los patrones de resistencia a los diferentes antimicrobianos en cepas aisladas del ambiente, sobre todo, en ecosistemas acuáticos contaminados, permite definir la existencia de cepas multirresistentes que podrían constituir un riesgo para la salud pública.

#### **1.6.5. Genotipado**

Para complementar los métodos tradicionales de tipificación, en los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas moleculares basadas en la caracterización del genotipo microbiano mediante los análisis del ADN cromosómico y plasmídico (Garaizar *et al.*, 2000; Liébana *et al.*, 2001).

Entre los métodos de tipificación de caracterización del ADN plasmídico se encuentra la identificación de plásmidos que contienen genes de virulencia (Kariuki *et al.*, 1999). Más recientemente se han desarrollado técnicas moleculares para la identificación de pequeñas zonas de heterogeneidad dentro del cromosoma bacteriano (Old y Threlfall 1998). Muchos de estos métodos también se utilizan en estudios de vigilancia epidemiológica (Swaminathan *et al.*, 2001).

Algunos de los métodos basados en el análisis del ADN cromosómico para *E. coli* pueden ser:

##### **a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Técnica que ha permitido determinar el grado de virulencia de los aislados de *E. coli* gracias a la detección de genes de virulencia específicos (Ahmed *et al.*, 2008; Delicato *et al.*, 2003; Ewers *et al.*, 2003; Obi *et al.*, 2004; McPeake *et al.*, 2005; Loukiadis *et al.*, 2006). También se emplea para determinar serotipos como *E. coli* O157:H7 (Radu *et al.*, 2001), plásmidos de virulencia (Jonson *et al.*, 2006) y genes que codifican toxinas (Rodríguez-Angeles, 2002) y plásmidos de resistencia antimicrobiana (Literak *et al.*, 2010).

### **b) Electroforesis en campo pulsante (ECP)**

Este es un método de tipificación genética altamente efectivo para un amplio número de especies bacterianas (Tenover *et al.*, 1995). Se ha utilizado como herramienta para analizar tanto brotes clínicos como casos aislados y conocer o descartar su posible relación filogenética (Davis *et al.*, 2003). Esta técnica se describió por primera vez en 1984 como una herramienta para el estudio del ADN cromosómico de los organismos eucariotas (Schwartz y Cantor, 1984). En esta técnica se analiza el patrón de restricción de todo el ADN cromosómico bacteriano, con endonucleasas de baja frecuencia de corte que generan un número limitado e interpretable de fragmentos (entre 10 y 30) cuyo tamaño oscila entre 10 y 800 Kb (Maslow *et al.*, 1993).

En general, la ECP es una de las técnicas moleculares de tipificación con mayor reproducibilidad y poder de discriminación, lo que hace que sea el método de elección en especies de géneros bacterianos como *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* (Acedo *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2001).

## ***CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS***

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Área de estudio y toma de la muestras

Se seleccionaron 10 estaciones de muestreo situadas en la zona urbana de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó, ubicados en la ciudad de La Habana, Cuba. Las estaciones de muestreo y su localización según el sistema de Geoposición Satelital (GPS) se describen en la tabla 3 y Anexo 1. Para la selección de las estaciones de muestreo se tomaron en cuenta los resultados de estudios previos en estos ecosistemas realizados por Prats *et al.*, 2006, Rodríguez *et al.*, 2008 y Jiménez (2007) para los ríos Almendares, Quibú y Luyanó, respectivamente.

**Tabla 3.** Estaciones de muestreo en los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.

<b>Ecosistema evaluado</b>	<b>Estación de muestreo</b>	<b>Clave</b>	<b>Localización GPS</b>	
<b>Almendares</b>	Puente Calle 23	A1	355649.88mN	366031.48mE
	Calle 100 y Boyeros	A2	356136.56mN	360237.64mE
	Arroyo Paila	A3	356235.30mN	359162.19mE
	Arroyo Mordazo	A4	356199.05mN	363921.75mE
<b>Quibú</b>	Palacio de Convenciones	Q1	350646.54mN	362941.08mE
	Planta Tratamiento Calle 25	Q2	352425.27mN	362097.34mE
	Los Pocitos	Q3	352489.06mN	360520.67mE
<b>Luyanó</b>	Via Blanca	L1	356061.35mN	361621.68mE
	Calle Mayor	L2	363885.00mN	362303.00mE
	La Oncena	L3	362334.50mN	363743.00mE

Se realizaron ocho muestreos en cada ecosistema evaluado enmarcados en un período de dos años (2008 y 2009 ríos Almendares y Quibú; 2009 y 2010 río Luyanó). Cuatro corresponden a la época poco lluviosa (febrero a abril) y cuatro a la época lluviosa (junio a octubre). Se eligieron estos meses para analizar la influencia de las lluvias sobre las concentraciones de *Escherichia coli* y coliformes termotolerantes.

Las muestras de agua se tomaron aproximadamente a un metro de la orilla y a 15 cm de profundidad. Las colectas se realizaron en horas de la mañana y las muestras se

trasladaron al laboratorio en frascos plásticos estériles de 1 L en una nevera refrigerada (4°C) y se procesaron en un período de tiempo menor a las 12 h según las recomendaciones de AFNOR, 2001.

## **2.2. Determinación de la concentración de coliformes termotolerantes y *E. coli***

Para determinar la concentración de bacterias coliformes termotolerantes (CTE) y *Escherichia coli* (EC) se utilizó la técnica de Filtración por Membrana (FM), con membranas estériles de nitrato de celulosa (Sartorius) con un tamaño del poro de 0,45 µm y 47 mm de diámetro y un equipo de filtración (Sartorius). Se utilizaron placas Petri plásticas estériles (47 mm) con los medios Agar Lactosa Tergitol (concentración final 0,095 ‰ peso/volumen) con cloruro de trifénil 2, 3, 5-tetrazolio (TTC) (concentración final 0,024 ‰ peso/volumen) (MERCK) y agar Chromocult para coliformes (MERCK) para la enumeración de los coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* respectivamente. Se siguió la metodología establecida por AFNOR (2001).

En el medio agar Lactosa Tergitol con TTC se consideraron bacterias coliformes termotolerantes a las colonias amarillo-naranja con un halo amarillo después de 24 h a (44 ± 0,5) °C. En el agar Chromocult para coliformes se consideraron como colonias de *E. coli* a las que presentaron una coloración azul oscuro o violeta después de 24 h de incubación a (37 ± 0,5)°C. El conteo se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 mL de muestra. Se realizaron tres repeticiones por cada punto de muestreo.

## **2.3. Determinación de vertimientos de origen doméstico en los ríos seleccionados**

Se realizó una inspección visual a lo largo de los tramos evaluados en cada río estudiado durante los años 2008, 2009 y 2010 para determinar los vertimientos. La distribución de los vertimientos, en cada ecosistema evaluado, se relacionó con los puntos de muestreo, y se consideraron los vertimientos ubicados hasta 200 m antes de cada punto. Se tomaron fotografías para dejar constancia visual de cada vertimiento detectado.

## **2.4. Aislamiento y caracterización de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó**

### **2.4.1. Aislamiento e identificación**

Para el aislamiento diferencial y la identificación presuntiva de *E. coli* a partir de las muestras de agua, se seleccionaron las colonias que presentaron una coloración azul oscuro o violeta en el medio agar Chromocult para coliformes después de 24 h de

incubación a  $37 \pm 0,5$  °C. Posteriormente se comprobó su pureza y los aislados se caracterizaron de acuerdo a los aspectos morfológicos y tintoriales, a través de la tinción de Gram (Koneman *et al.*, 1999). La confirmación de la identificación de estos aislados ambientales se realizó mediante el sistema automatizado VITEK (bioMérieux), empleando tarjetas GNI (bioMérieux) (Gram Negative Identification, de sus siglas en inglés) compuestas por 25 pozos que contenían un medio reactivo en forma deshidratada, cada una correspondiente a las pruebas bioquímicas a realizar (Anexo 2).

#### **2.4.2. Serotipificación**

La serotipificación de las cepas de *Escherichia coli* se realizó según el procedimiento descrito por Orskov y Orskov (1984). Se emplearon sueros específicos anti-O y anti-H (SERUMAN, México) para 174 antígenos somáticos y 56 flagelares. Las reacciones de aglutinación se efectuaron en microplacas de 96 pozos de fondo en forma de “u” (COSTAR).

##### **2.4.2.1. Preparación del antígeno somático (O)**

Las cepas de *Escherichia coli* se sembraron en tubos de Agar Triptona-Soya (TSA) (MERCK) y se incubaron por 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 10 mL de solución salina (0,85%) a los tubos con crecimiento bacteriano. La suspensión obtenida se transfirió a un tubo de cultivo y se calentó con vapor de agua durante 1 h para la liberación del antígeno O. Una vez frío, el antígeno O se conservó con una solución de formaldehído al 0,06% (MERCK).

##### **2.4.2.2. Reacciones de aglutinación para el antígeno somático (O)**

Para las reacciones de aglutinación, en cada pozo de la microplaca se colocaron 50 µL de los 186 sueros anti-O y 50 µL del antígeno somático obtenido de los aislados de *E. coli*. Posteriormente la microplaca se cubrió con plástico adherente para evitar la evaporación y se incubó a 50 °C por 24 h. La prueba se consideró positiva cuando se observó un precipitado en el fondo del pozo de la placa producto de la interacción antígeno-anticuerpo.

Cuando se observó reacción cruzada, el antígeno se sometió a reacciones de aglutinación con diluciones de sueros desde 1:100 hasta 1:12 800; con lo cual el número de reacciones cruzadas disminuyó considerablemente. Después se probó el antígeno frente a los sueros puros con diluciones desde 1:50 hasta 1:6 400 y finalmente se definió el antígeno somático específico como el mayor grado de aglutinación encontrado con la mayor dilución del



siero. Si el antígeno seguía dando reacción cruzada con los sueros puros, se realizó de nuevo el procedimiento de obtención del antígeno, pero esta vez se hirvió durante 2 h para disminuir el número de reacciones cruzadas.

#### **2.4.2.3. Preparación del antígeno flagelar (H)**

Para la obtención del antígeno flagelar, las cepas de *E. coli* aisladas se inocularon en tubos de TSA (MERCK) semisólido que en su interior contenían un tubo Durham, con el propósito de evaluar la movilidad. Los diferentes cultivos se incubaron a 30 °C por un máximo de 15 días hasta observar el enturbiamiento del medio debido al crecimiento bacteriano. Se tomó una asada del cultivo de las cepas positivas y se inoculó en 5 mL de caldo biotriptasa (MERCK) al 2% y se incubó durante 24 h a 30° C. Al cultivo obtenido se le añadió solución de formaldehído al 0,06% (MERCK) para la conservación del antígeno flagelar.

#### **2.4.2.4. Reacciones de aglutinación para el antígeno flagelar (H)**

En cada pozo de la microplaca se colocaron 50 µL de los 56 sueros específicos anti-H y 50 µL del antígeno flagelar obtenido. Posteriormente, la microplaca se cubrió con plástico adherente para evitar la evaporación y se incubó a 50 °C por 3 h. La prueba se consideró positiva cuando se observó un precipitado en el fondo de pozo de la placa producto de la interacción antígeno-anticuerpo.

Cuando se observaron reacciones cruzadas, el antígeno se enfrentó a diluciones de sueros anti-H, desde 1:100 hasta 1:12 800. Después se probó el antígeno frente a los sueros puros con una dilución 1:50 hasta 1:6 400 y finalmente se definió el antígeno flagelar, por el mayor grado de aglutinación con la mayor dilución del suero. Si el antígeno seguía dando reacción cruzada con los sueros puros, se realizó nuevamente el procedimiento de obtención del antígeno H.

#### **2.4.3. Amplificación de genes específicos de virulencia mediante PCR**

A todas las cepas identificadas como *Escherichia coli* se les realizó la búsqueda de siete genes específicos para las cepas patógenas intestinales de esta especie mediante la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa. Los genes buscados fueron: *st*, *lt*, *stx1*, *stx2*, *bfpA*, *eaeA* e *ial*.

#### 2.4.3.1. Extracción del ADN

Las cepas se sembraron en placas TSA para obtener un cultivo fresco y se incubaron durante 24h a 37 °C. Se tomó una asada con abundante biomasa y se colocó en 1 mL de agua destilada estéril en tubos de 1,5 mL (Eppendorf), los cuales se homogenizaron en vortex y se colocaron en baño seco 13 min a 94 °C (Termoblock BioRad). Pasado este tiempo se colocaron en hielo por unos minutos y luego se centrifugó 15 min a 14 000 rpm para precipitar restos celulares según Reischl *et al.*, 2002.

#### 2.4.3.2. Condiciones de corrimiento de la PCR

Todos los ensayos de PCR se realizaron en volúmenes finales de 25 µL que contenían 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Vivantis, USA), 2,5 µL de tampón de PCR 10X (Vivantis, USA), 1,25 µL de cada uno de los cebadores (10 mM, Sigma-Aldrich, USA), 0,5 µL dNTP 200 µM (2 mM, Fermentas USA), 0,1 µL Taq ADN polimerasa (5 U/ µL Vivantis USA) y 2 µL de muestra de ADN. El volumen final se ajustó con agua bidestilada estéril.

Se utilizaron 7 cebadores específicos para la amplificación de genes relacionados con factores de virulencia de *E. coli* patógenas según López-Saucedo *et al.* (2003) (Tabla 4).

Las diferentes fases y el número de ciclos utilizados para la realización de la primera PCR fueron los siguientes (Obi *et al.*, 2004):

A) Desnaturalización: 5 min a 95 °C

B) Amplificación durante 30 ciclos:

Desnaturalización: 1 min a 95 °C

Unión de los cebadores "annealing": 1 min a 55 °C

Elongación: 1 min a 72 °C

C) Elongación final: 10 min a 72 °C

D) Conservación de la muestra: tiempo indefinido a 4 °C

**Tabla 4.** Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación.

Categorías <i>E. coli</i>	Genes	Cebadores	Tamaño amplificado (pb)
ETEC	<i>lt</i>	F:5'GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC3'	450
		R:5'CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT3'	
EPEC	<i>st</i>	F:5'ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T3'	190
		R:5'CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT3'	
EPEC	<i>bfpA</i>	F:5'AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC3'	324
		F:5'GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA3'	
EPEC	<i>eaeA</i>	F:5' GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3'	384
		R:5'CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG3'	
STEC	<i>stx1</i>	F:5' CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3'	150
		R:5'AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3'	
STEC	<i>stx2</i>	F:5'GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3'	255
		R:5'TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3'	
EIEC	<i>ial</i>	F:5'GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA 3'	650
		R:5'GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC 3'	

Todos los ensayos de PCR se realizaron en un Termociclador (ThermalCycler C 1000™ BIO-RAD). Para la visualización de los productos amplificados se prepararon geles de agarosa (BIORAD Certified™ PCR Agarose Cat. #161-3104) al 1,5 %, y se colocaron en cada pozo 5 µL del producto de la PCR obtenido más 3 µL de buffer de carga (Vivantis, USA) y se corrió a 90 V por 30 min. Posteriormente los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (10µg.mL<sup>-1</sup>) y se visualizaron en un transiluminador (Uvitec, Alemania).

Las cepas controles positivos que se usaron en los experimentos de PCR fueron: STEC IB00446 para *stx1* y *stx2*, ETEC 49766 para *st* y *lt*, EIEC *ial* positivo y EPEC 62348 para *bfpA* y *eaeA* las cuales forman parte de la colección de cultivos del Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### 2.4.4. Ensayos de adherencia en células HEp-2

Se realizaron ensayos de adherencia a células de la línea celular HEp-2 de tipo epitelial utilizando el método propuesto por Cravioto *et al.* (1979). Se emplearon como controles las cepas: *E.coli* O42 (patrón de adherencia agregativa), *E. coli* 87124 (patrón de adherencia difusa) y *E. coli* 2348/169 (patrón de adherencia localizada) conservadas en el Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### **2.4.4.1. Preparación del inóculo bacteriano**

Las cepas de *Escherichia coli* y las cepas control se sembraron en tubos con 3 mL de caldo triptona al 1% con D-manosa al 1% y se incubaron durante 18 h a 37° C, en agitación (150 rpm). El cultivo bacteriano obtenido se centrifugó 25 min a 2500 rpm, se eliminó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 1 mL de solución de Buffer Salina Fosfato (PBS) estéril (pH 7,2).

#### **2.4.4.2. Preparación de las células HEp-2**

Las células HEp-2 de una botella para crecimiento celular de 250 mL con 100 % de confluencia se lavaron con 2 mL de solución de PUKS desechando el sobrenadante por el lado contrario de la monocapa. Se agregaron otros 2 mL de la solución PUKS y se incubó por 3-5 minutos para despegar las células de la botella. Las células se resuspendieron en 25 mL de Medio Mínimo Esencial (MEM) con suero fetal bovino (SFB).

Previamente se preparó una placa de propileno de 24 pozos colocando una lenteja (cubreobjetos redondo estéril de plástico) en cada pozo. Se agregó 1 mL de células resuspendidas a cada pozo que contenía la lenteja. La placa se incubó a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 85 % de humedad durante 24 h para obtener una monocapa celular de 90-95 % de confluencia. Antes de colocar el inóculo bacteriano se retiró el medio MEM de cada pozo con células con una pipeta Pasteur y se lavó tres veces con PBS estéril para eliminar los residuos del medio de cultivo.

#### **2.4.4.3. Ensayo de adherencia**

En cada pozo de la placa se colocaron 900 µL del medio MEM sin SFB y sin antibiótico y 100 µL del inóculo bacteriano previamente preparado, excepto en los pozos correspondientes a los controles de células. Las placas se incubaron durante 3 h a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este período se retiró el medio de cultivo y se lavó tres veces con 1 mL de PBS, con la finalidad de eliminar las bacterias no adheridas a las células. La preparación se fijó con 1 mL de metanol por 1 minuto, posteriormente se adicionó 1 mL de colorante de Giemsa 20 minutos para teñir. Cada pozo se lavó nuevamente tres veces con 1 mL de agua desionizada para eliminar el exceso de colorante.

Las lentes teñidas se deshidrataron por 30 segundos sumergiéndolas en cada una de las siguientes soluciones: acetona, acetona/xileno (v/v) y xileno.

Posteriormente se realizó el montaje directo de las lentes en un portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h. La observación se realizó en un microscopio óptico (Microscopio ZEISS AX10LAB), en campo claro, con un aumento de 100X con aceite de inmersión. En los casos pertinentes se realizó una micrografía (Microscopio ZEISS AX10LAB HBO 50 conectado a una cámara Cool Snap-Pro, Color and Integrated Solution, Media Cybernetics the Imaging Experts). Las microfotografías se capturaron en el programa LAB WORK 45 y se editaron con el programa Adobe Photoshop.

El ensayo de adherencia se realizó por triplicado para cada cepa. Se consideraron positivas para algún patrón aquellas cepas que se encontraban adheridas en el 40% o más de las células de la preparación.

#### **2.4.5. Prueba de susceptibilidad a agentes antimicrobianos**

La susceptibilidad de las cepas aisladas de *E. coli* frente a los antimicrobianos se determinó por el sistema automatizado VITEK (bioMérieux), con tarjetas GNS-147 V 4649 (de sus siglas en inglés Gram Negative Susceptibility, bioMérieux) según las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, de sus siglas en inglés) (CLSI, 2008).

La tarjeta utilizada contenía 15 antimicrobianos: Amikacina (AK, 32 µg/mL), Ampicilina (AMP, 32 µg/mL), Aztreonam (ATM, 32 µg/mL), Cefazolina (KZ, 64 µg/mL), Cefepime (EFE, 16 µg/mL), Ceftazidima (CAZ, 64 µg/mL), Ceftriazona (CFT, 128 µg/mL), Ciprofloxacina (CIP, 4 µg/mL), Ertapenem (ET, 2 µg/mL), Gentamicina (CN, 8 µg/mL), Imipenem (IMI, 8 µg/mL), Levofloxacina (LV, 8 µg/mL), Nitrofurantoina (NT, 32 µg/mL), Piperacilina/Tazobactan (TZP, 64/4 µg/mL), Sulfametoxazol-trimetropim (SXT, 8/152 (160) µg/mL).

##### **2.4.5.1 Inoculación de las tarjetas**

Se preparó una suspensión de cada cepa a partir de la biomasa de un cultivo fresco (18 h) en solución salina estéril (0,45%) para obtener una concentración de  $10^6$  mo/mL correspondiente al tubo 1 de la escala de Mac Farland (Koneman *et al.*, 1999).

Aproximadamente 2 mL de esta suspensión bacteriana se cargaron en la tarjeta del sistema VITEK (software versión 1.02). Las tarjetas se incubaron por seis h a 37 °C.

Se consideraron aislados multirresistentes (MR) a los aislamientos resistentes a tres o más de tres antimicrobianos según Chandran *et al.*, 2008.

#### **2.4.6. Estudio de los perfiles de electroforesis en campos pulsantes (ECP)**

La electroforesis en campos pulsantes se realizó con un sistema CHEF MAPPER (BioRad) mediante el protocolo PulseNet (Ribot *et al.*, 2006). El análisis de la diversidad genética se le realizó a 76 cepas de las 108 aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó. En las 32 cepas restantes no fue posible obtener un perfil electroforético durante la corrida, ya que durante el procedimiento el ADN se degradó o los perfiles electroforéticos fueron indistinguibles.

##### **2.4.6.1. Extracción del ADN y preparación de los bloques de agarosa con la muestra**

Las 97 cepas de *E. coli* se inocularon en placas de agar sangre (16-20 h, 37 °C). Posteriormente se seleccionaron entre 1-3 colonias de cada cepa y se sembraron en tubos con 5 mL de caldo TSA, los cuales se incubaron durante 18 h a 37 °C, en agitación.

Se tomó 1 mL del cultivo obtenido en el caldo TSA y se colocó en un tubo de 1,5 mL (Eppendorf) y se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min. Se decantó el sobrenadante y las bacterias se suspendieron en 1 mL de CBS (Cell Suspension Buffer: 100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8), se homogenizó en el votex y luego se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm por 2 min para decantar el sobrenadante. Se colocaron 500 µL de CBS y se homogenizó con la micropipeta. De la mezcla se tomaron 200 µL y se colocaron en un tubo de 0,6 mL (Eppendorf), se centrifugó 2 min a 10 000 rpm y se colocaron 10 µL de Proteinasa K (Invitrogen, Sol stock 1mg/mL).

Se preparó agarosa de bajo punto de fusión (BioRAD) al 2 % en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) y se colocó en un baño a 50 °C. Se mezcló en la proporción 1:1 la agarosa con la suspensión bacteriana (200 µL), se homogenizó la mezcla, se repartió en los moldes para los bloques y se dejó solidificar a 4 °C. Se prepararon 3 moldes para cada muestra de ADN.

Los moldes de agarosa se colocaron en 1 mL de solución CLB (Cell Lysis Buffer: Tris 50 mM, EDTA 50 mM, Sarcosyl 1%, pH 8) para causar la lisis de las células que se encontraban en ellos. Se incubaron durante 20 h a 50 °C en condiciones estáticas.

#### **2.4.6.2. Tratamiento de los bloques de agarosa con la muestra de ADN**

Los bloques se lavaron con agua MiliQ y con TE 1X (Sigma Aldrich) a 50 °C, en baño de maría a 50 °C y en agitación de 20 min cada uno. Se realizaron 4 lavados, dos con cada una de las soluciones. Se guardaron a 4 °C en tampón TE 1X (pH 8) hasta el día siguiente. Para la digestión de los moldes de agarosa se cortó un tercio del molde de agarosa, se añadieron 2 µL (U) de la enzima XbaI (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 3 h. Los otros dos tercios del molde se guardaron en TE fresco a 4 °C hasta 5 meses.

#### **2.4.6.3. Electroforesis y procesamiento del gel**

Se preparó un gel de agarosa grado PFGE (BioRAD) al 1% en tampón TBE 0,5X (Tris 44 mM, ácido bórico 44 mM, EDTA 1mM). Los moldes se colocaron en los pocillos y se selló con agarosa al 1% en tampón TBE 0,5X. En cada gel se incluyeron dos carriles con marcadores de peso molecular que incluyen 50 líneas diferentes en un rango de 48,5 hasta 1 018,5 Kb (Lambda Ladder PFG Marker, New England BioLabs, Inc). Para la electroforesis se empleó buffer TBE 0,5X. Esta se ajustó a 14 °C y se fijaron las condiciones de electroforesis: Pulso inicial: 2,16 s, Pulso final: 54,16 s, temperatura: 14 °C, tiempo de corrida: 25 h, voltaje: 6v/cm.

Los geles de agarosa se tiñeron en tampón TBE 0,5X con bromuro de etidio ( $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante 30 minutos aproximadamente. A continuación se lavaron durante media hora en agua destilada y se les tomaron fotos con un fotodocumentador BioRad para el posterior análisis de los geles.

Para definir las distintas categorías de relación genética se optó por seguir las recomendaciones del grupo Tenover tanto en el análisis visual como en el análisis informático con el programa MVSP 3.1 (Tenover *et al.*, 1995). Estas recomendaciones se basan en que dos aislamientos con ancestro común pueden presentar hasta un máximo de tres bandas diferentes debido a la evolución de cada uno. Se consideraron aislamientos de un mismo clon, aquellos que tuvieron hasta tres bandas de diferencia, entre tres y seis bandas diferentes se clasificaron como aislamientos estrechamente relacionados. Cuando los pulsotipos de dos cepas tuvieron más de siete bandas diferentes, se consideró que no existía ninguna relación genética entre ellas.

Este mismo esquema se empleó cuando se utilizó el programa MVSP 3.1 para conocer la relación genética de los distintos aislamientos en base a un análisis matemático. Para ellos

se consideró que las cepas con un coeficiente de Dice  $\geq 0,9$  eran genéticamente idénticas, mientras que cuando tenían valores entre 0,8 y 0,9 estaban estrechamente relacionadas y cuando los valores correspondieron al intervalo 0,7-0,8 se clasificaron como posiblemente relacionadas y por debajo de 0,7 se consideró que las cepas no estaban relacionadas genéticamente.

## **2.5. Análisis estadísticos**

Para verificar la distribución normal y la homogeneidad de varianza de los datos de los muestreos de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó, se realizó la prueba Kolmogorov – Smirnov y Cochran – Bartlett respectivamente. Se emplearon datos transformados según  $\log(x)$ , a los cuales se les aplicó la prueba paramétrica de Tukey *a posteriori* para verificar si existían diferencias significativas entre los conteos de *E. coli* y de coliformes termotolerantes en las diferentes estaciones de muestreo. Se utilizó la prueba de t de Student para la comparación de dos medias, correspondiente a las concentraciones de los microorganismos indicadores entre los períodos poco lluvioso y lluvioso. Para evaluar la correlación entre las concentraciones de *E. coli* y de coliformes termotolerantes se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ , método paramétrico). Para todos los cálculos se utilizó el paquete estadístico Statistica 6.0 para Windows.



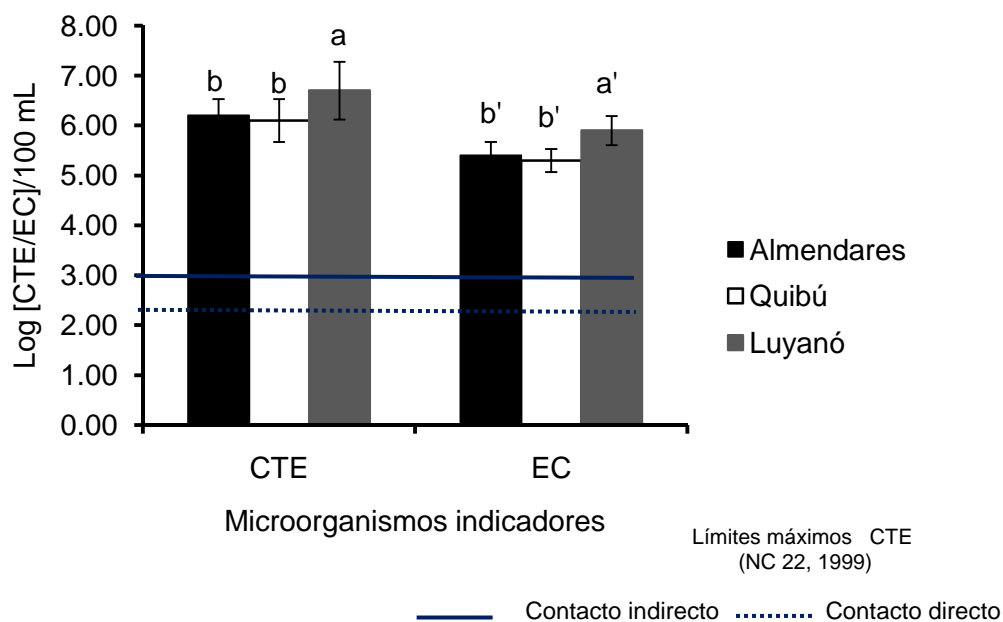
## ***CAPÍTULO III: RESULTADOS***

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Análisis de la concentración de coliformes termotolerantes y *E. coli* en los ríos Almendares, Quibú y Luyanó

Como puede apreciarse en la Figura 1, las concentraciones de coliformes termotolerantes (CTE) y *Escherichia coli* (EC) obtenidas durante los dos años de estudio para los tres ecosistemas evaluados fueron superiores a  $2,0 \cdot 10^2$  y  $1,0 \cdot 10^3$  NMP.100 mL<sup>-1</sup>, valores máximos permisibles para los CTE, establecidos en la Norma Cubana 22 (1999) para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores con contacto directo e indirecto, respectivamente.

Al analizar estadísticamente estos resultados se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de los CTE y EC del río Luyanó y respecto a las obtenidas para los ríos Almendares y Quibú. La mayor concentración para los indicadores evaluados se obtuvo en el río Luyanó, con valores superiores a  $8,0 \cdot 10^6$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> y  $6,3 \cdot 10^5$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> para los CTE y EC, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Concentraciones de coliformes termotolerantes (CTE) y *E. coli* (EC) en los ríos Almendares, Quibú y Luyanó durante los años 2008, 2009 y 2010. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de los microorganismos indicadores (prueba Tukey *a posteriori* ( $p < 0,05$ )). Las barras de error indican la desviación estándar del promedio de las concentraciones de los microorganismos indicadores durante los dos años de estudio.

### 3.1.1. Río Almendares

En el tramo evaluado del río Almendares las concentraciones de coliformes termotolerantes y *E. coli*, en todos los puntos de muestreo, mostraron valores superiores a los establecidos como aptos para los coliformes termotolerantes en la norma cubana 22 (1999), tanto en el año 2008, como en el 2009. El punto A3 (Paila) presentó los mayores valores de concentración de bacterias indicadoras, con una media de  $6,7 \cdot 10^6$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> para los coliformes termotolerantes y de  $2,3 \cdot 10^5$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> para *E. coli*. Tanto para los CTE como para EC se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en esta estación de muestreo respecto a las otras tres evaluadas, en todo el período de investigación. (Figura 2A y Figura 2B).

Al comparar las concentraciones de microorganismos indicadores durante los períodos poco lluvioso y lluvioso estas fueron superiores, en todas las estaciones de muestreo, en el período poco lluvioso. La concentración media durante este período para los dos años de estudio fue de  $3,5 \cdot 10^5$  UFC.100mL<sup>-1</sup> para los CTE y de  $1,9 \cdot 10^4$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> para EC. Solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre un período y otro en la estación de muestreo A3 para ambos indicadores (Figura 2A y Figura 2B).

### 3.1.2. Río Quibú

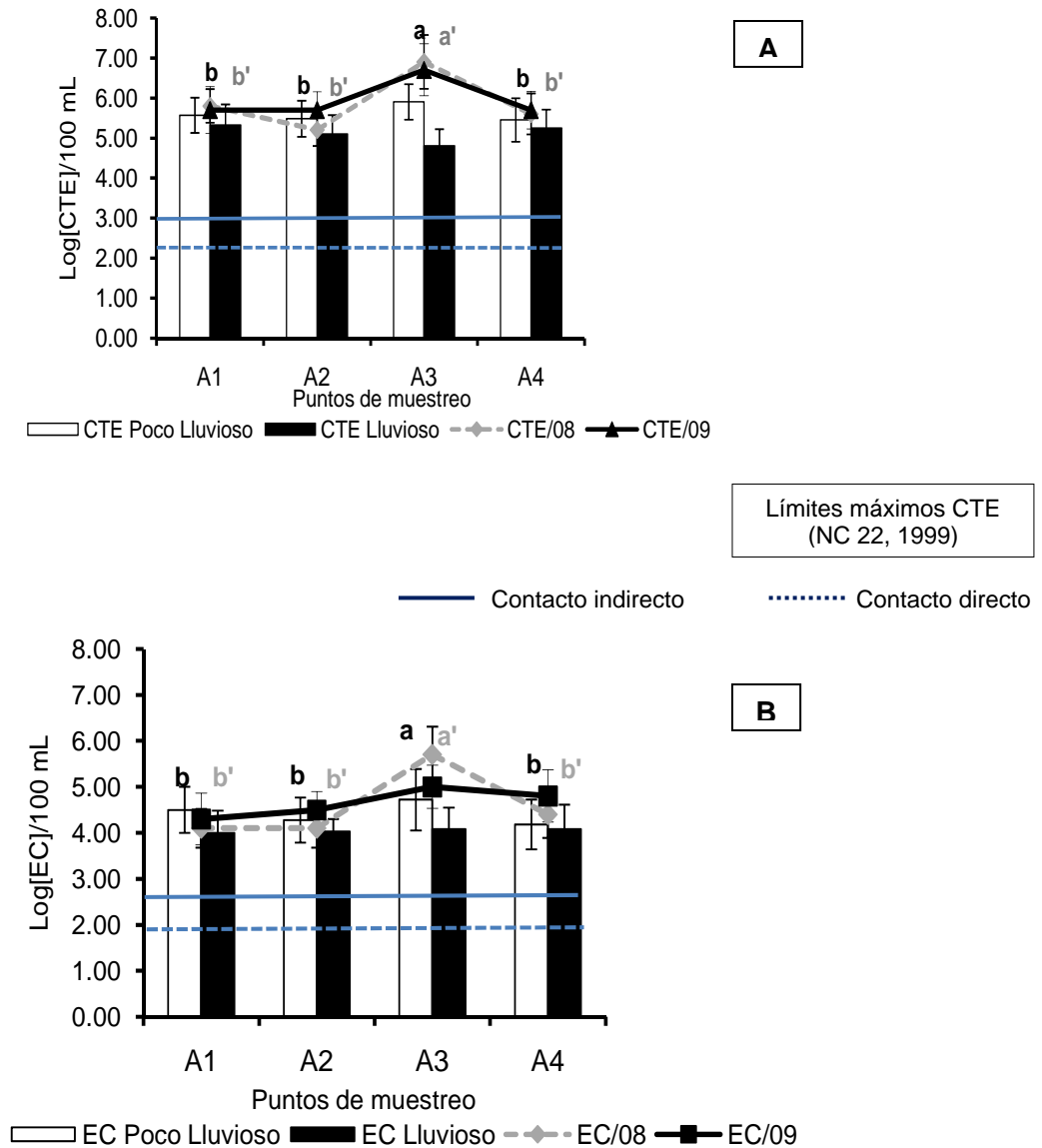
En el río Quibú las concentraciones de microorganismos indicadores estuvieron por encima de lo establecido en la norma nacional (NC 22, 1999), comportamiento que se mantuvo durante los dos años estudiados. Durante este período no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de coliformes termotolerantes y de *E. coli* entre los puntos de muestreo de este río (Figura 3A y Figura 3B).

Al analizar las concentraciones de los microorganismos indicadores durante los períodos poco lluvioso y lluvioso, se observó, en todas estaciones de muestreo, que los mayores valores, tanto para los coliformes termotolerantes como para *Escherichia coli*, se obtuvieron durante el período poco lluvioso, con un promedio anual de  $1,4 \cdot 10^6$  y  $2,3 \cdot 10^5$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 3A y Figura 3B).

### 3.1.3. Río Luyanó

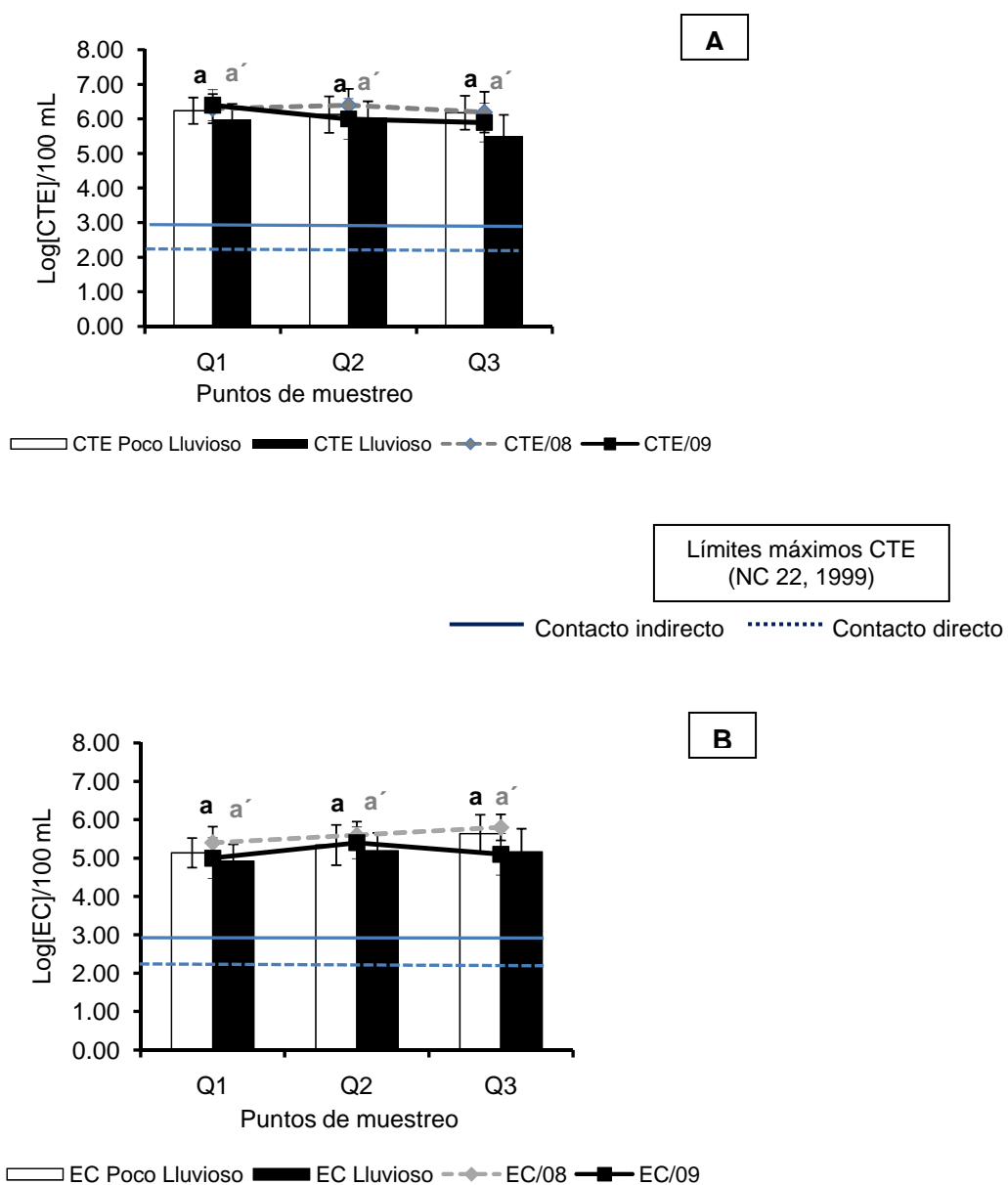
En el período comprendido entre febrero de 2009 y octubre de 2010 las concentraciones de coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en el río Luyanó sobrepasaron los límites establecidos en la Norma Cubana 22 (1999) para aguas de baño con contacto directo e

## Resultados



**Figura 2. (A)** Concentraciones de coliformes termotolerantes y **(B)** *E. coli* en el río Almendares en los años 2008 y 2009 y durante el período poco lluvioso y lluvioso en cada punto de muestreo. Las barras de error indican la desviación estándar del promedio de las concentraciones de los microorganismos indicadores durante los dos años de estudio. Las letras diferentes sobre las líneas indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de los microorganismos indicadores entre las estaciones de muestreo (prueba Tukey *a posteriori* ( $p < 0,05$ )). Se aplicó la prueba *t de Student* para comparar las concentraciones de CTE y EC entre un período y otro en cada punto de muestreo.

Puntos de muestreo: **A1**- Puente Calle 23, **A2**- Calle 100 y Boyeros, **A3**- Arroyo Paila, **A4**- Arroyo Mordazo.



**Figura 3. (A)** Concentraciones de coliformes termotolerantes y **(B)** *E. coli* en el río Quibú en los años 2008 y 2009 y durante el período poco lluvioso y lluvioso en cada punto de muestreo. Las barras de error indican la desviación estándar del promedio de las concentraciones de los microorganismos indicadores durante los dos años de estudio. Las letras diferentes sobre las líneas indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de los microorganismos indicadores entre las estaciones de muestreo (prueba Tukey *a posteriori* ( $p < 0,05$ )). Se aplicó la prueba *t de Student* para comparar las concentraciones de CTE y EC entre un período y otro en cada punto de muestreo.

Puntos de muestreo: **Q1**-Palacio de las Convenciones; **Q2**-Planta Tratamiento Calle 25; **Q3**- Los Pocitos

indirecto. Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las concentraciones de los microorganismos indicadores entre el punto L1 (Vía Blanca) y los puntos L2 (Calle Mayor) y L3 (La Oncena). El punto L1 fue la estación de muestreo en la que se encontraron las mayores concentraciones de coliformes termotolerantes y de *Escherichia coli*, con concentraciones superiores a  $3,1 \cdot 10^6$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> y  $1,1 \cdot 10^5$  UFC.100 mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4A y Figura 4B).

El análisis de las concentraciones de microorganismos indicadores entre el período poco lluvioso y lluvioso mostró que en todas las estaciones de muestreo las mayores concentraciones de los indicadores bacterianos se obtuvieron durante el período poco lluvioso, con una concentración promedio de  $1,4 \cdot 10^6$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> para los CTE y de  $2,1 \cdot 10^5$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> para *E. coli*. Solo se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las concentraciones de los coliformes termotolerantes y de *Escherichia coli* entre los dos períodos analizados en el punto L1 (Figura 4A y Figura 4B).

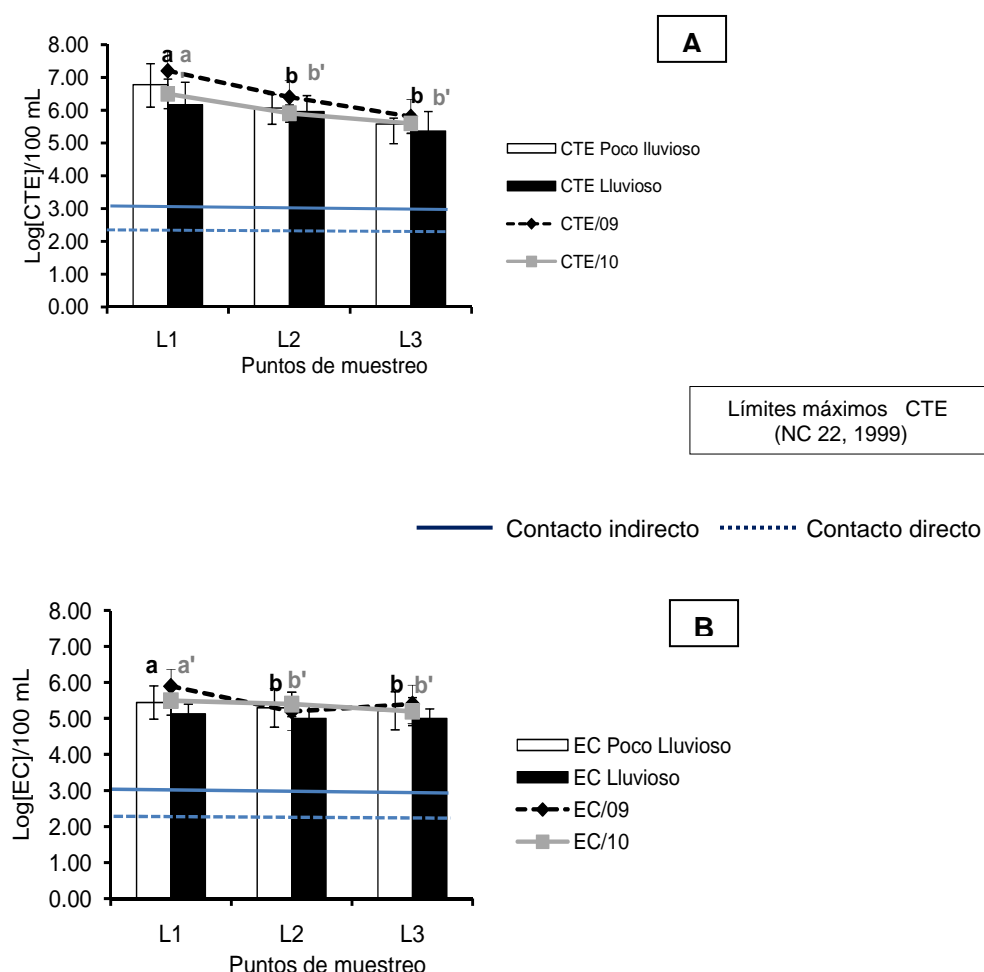
### 3.2. Correlación entre las concentraciones de *E. coli* y coliformes termotolerantes

Se determinó que existe una correlación positiva lineal entre las concentraciones de coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en los tres ecosistemas evaluados. Los valores del coeficiente de correlación de Pearson calculados en cada uno de los ríos muestran que existe una correlación positiva alta entre las concentraciones de los dos indicadores evaluados en los tres ríos según los criterios de Daza, 2006 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre las concentraciones de coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*.

Ecosistema evaluado	<i>r</i>	Clasificación
Río Almendares	0,89	Correlación positiva alta
Río Quibú	0,80	Correlación positiva alta
Río Luyanó	0,83	Correlación positiva alta

*r*- Coeficiente de correlación de Pearson; Correlación nula ( $r=0$ ); Correlación positiva muy baja ( $r=0,01-0,19$ ); Correlación positiva baja ( $r=0,2-0,39$ ); Correlación positiva moderada ( $r=0,4-0,69$ ); Correlación positiva alta ( $r=0,7-0,89$ ); Correlación positiva muy alta ( $r=0,9-0,99$ ); Correlación positiva grande y perfecta ( $r=1$ ) (Daza, 2006).



**Figura 4. (A)** Concentraciones de coliformes termotolerantes y **(B)** *E. coli* en el río Luyanó en los años 2009 y 2010 y durante el período poco lluvioso y el período lluvioso en cada punto de muestreo. Las barras de error indican la desviación estándar del promedio de las concentraciones de los microorganismos indicadores durante los dos años de estudio. Las letras diferentes sobre las líneas indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de los microorganismos indicadores entre las estaciones de muestreo (prueba Tukey *a posteriori* ( $p < 0,05$ )). Se aplicó la prueba *t de Student* para comparar las concentraciones de CTE y EC entre un período y otro en cada punto de muestreo. Puntos de muestreo: **L1**-Vía Blanca; **L2**-Calle Mayor; **L3**- La Oncena.

### 3.3. Fuentes contaminantes de origen doméstico en los tres ecosistemas acuáticos evaluados

Durante los recorridos realizados por los tres ecosistemas dulceacuícolas evaluados se detectaron visualmente un total de 25 fuentes contaminantes de origen doméstico no descritas anteriormente, las cuales están directamente asociadas con los diez puntos de muestreo seleccionados.

Se detectaron entre uno y hasta cuatro vertimientos de origen albañal en cada estación de muestreo, los cuales se mantuvieron estables durante los años 2008, 2009 y 2010. (Tabla 6). De estos vertimientos, diez se ubican en las márgenes del río Almendares, siete en las del río Quibú y ocho en las del río Luyanó.

**Tabla 6.** Número de vertimientos asociados a cada punto de muestreo.

Ecosistemas	No. de vertimientos/Punto de muestreo			
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
Almendares	1	2	4	3
Quibú	1	3	3	-
Luyanó	4	3	1	-

El río Luyanó fue el ecosistema que más vertimientos presentó de acuerdo al número de kilómetros recorridos con 1,6 vertimientos/km evaluado (Tabla 7).

**Tabla 7.** Número de vertimientos de acuerdo al tramo de kilómetros recorridos en cada ecosistema.

Ecosistemas	Tramo evaluado (km)	No. vertimientos	No. vertimientos /km
Almendares	10	10	1
Quibú	5	7	1,4
Luyanó	5	8	1,6

A continuación se muestran algunas fotografías que sirven de testimonio de los vertimientos ubicados en las márgenes de los tres ríos detectados durante los recorridos realizados (Figuras 5, 6 y 7). La ubicación de los vertimientos detectados así como el punto de muestreo específico con el que se asocia cada vertimiento se presenta en la Tabla 8.

### 3.4. Caracterización de las cepas de *Escherichia coli*

#### 3.4.1. Aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli*

A partir de los cultivos de las muestras de agua de los tres ecosistemas en agar Chromocult se aislaron un total de 120 cepas presuntivas de *E. coli*, por sus características específicas en este medio selectivo-diferencial. Del total de cepas, 113 se confirmaron como *Escherichia coli* mediante el sistema VITEK y las siete restantes correspondieron a otras especies bacterianas también del grupo de las bacterias coliformes, las cuales se consideraron como falsos positivos (Tabla 9). Los resultados





**Figura 5.** Vertimientos de aguas residuales en el Arroyo Paila (afluente del río Almendares) provenientes del Laboratorio Farmacéutico “Reinaldo Gutiérrez”.



**Figura 6.** Vertimientos de aguas residuales domésticas que se realizan directamente al río Quibú en la comunidad Los Pocitos provenientes de viviendas ubicadas en las riberas del río. Las flechas y círculos indican los lugares exactos de vertimientos desde las casas.





**Figura 7.** Vertimientos de aguas residuales urbanas en el punto Vía Blanca, río Luyanó provenientes de: **(A)** Tubería correspondiente a un emisario del alcantarillado y **(B)** Patios de viviendas ubicadas en las márgenes del río en este punto de muestreo.

**Tabla 8.** Vertimientos de aguas albañales ubicados a lo largo de las trayectorias evaluadas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.

No.	Procedencia de las aguas albañales	Ubicación	Lugar hacia donde se realiza la descarga	Punto de muestreo con el que se asocia la descarga
1	Viviendas <sup>a</sup>	Reparto Nuevo Vedado	Río Almendares	A1
2	Viviendas <sup>a</sup>	Reparto Residencial Almendares (Boyeros)	Río Almendares	A2
3	Viviendas <sup>a</sup>	Reparto Martí (Boyeros)	Río Almendares	A2
4	Laboratorio "Reynaldo Gutiérrez"	Vento y Boyeros	Arroyo Paila*	A3
5	Viviendas <sup>a</sup>	Reparto Martí	Arroyo Paila*	A3
6	Viviendas <sup>a</sup>	Reparto Martí	Arroyo Paila	A3
7	Corrales <sup>c</sup>	Reparto Martí	Arroyo Paila	A3
8	Unidad Militar	Antigua entrada a la Polar (callejón)	Arroyo Mordazo*	A4
9	Viviendas <sup>a</sup>	Callejón entrada a La Polar	Arroyo Mordazo	A4
10	Viviendas <sup>a</sup>	Callejón entrada a La Polar	Arroyo Mordazo	A4
11	Tubería <sup>b</sup>	Punto de muestreo Palacio de las Convenciones	Río Quibú	Q1
12	Zanja de albañales	Barrio Zamora (Ave 27 y calle 124)	Río Quibú	Q2
13	Viviendas <sup>a</sup>	Barrio Zamora (callejón sin nombre)	Río Quibú	Q2
14	Viviendas <sup>a</sup>	Calle 25 (antes Planta de Tratamiento)	Río Quibú	Q2
15	Viviendas <sup>a</sup>	Comunidad Los Pocitos	Río Quibú	Q3
16	Viviendas <sup>a</sup>	Comunidad Los Pocitos	Río Quibú	Q3
17	Viviendas <sup>a</sup>	Comunidad Los Pocitos	Río Quibú	Q3
18	Tubería <sup>b</sup>	Puente de Vía Blanca	Río Luyanó	L1
19	Viviendas	Puente de Vía Blanca	Río Luyanó	L1
20	Tubería <sup>b</sup>	Puente de la Virgen del Camino	Río Luyanó	L1
21	Viviendas	Puente de la Virgen del Camino	Río Luyanó	L1
22	Viviendas <sup>a</sup>	Calle Mayor, Reparto La Rosalía	Río Luyanó	L2
23	Viviendas <sup>a</sup>	Reparto Juanelo	Río Luyanó	L2
24	Corrales <sup>c</sup>	Reparto Juanelo	Río Luyanó	L2
25	Viviendas <sup>a</sup>	Reparto Central	Río Luyanó	L3

\* Afluentes del río Almendares; <sup>a</sup> Vertimientos que se realizan directamente desde las viviendas; <sup>b</sup> Tuberías que corresponden a emisarios del alcantarillado público; <sup>c</sup> Corrales para la cría de animales de corral (aves, cerdos, carneros y vacas)

Puntos de muestreo:

**A1-** Puente Calle 23, **A2-** Calle 100 y Boyeros, **A3-** Arroyo Paila, **A4-** Arroyo Mordazo

**Q1-**Palacio de las Convenciones; **Q2-**Planta Tratamiento Calle 25; **Q3-** Los Pocitos

**L1-**Vía Blanca; **L2-**Calle Mayor; **L3-** La Oncena.

mostraron un 94,6% de especificidad para la selección de *E. coli* a partir de este medio cromogénico.

**Tabla 9.** Identificación de los aislados obtenidos a partir de las siembras en agar Chromocult para coliformes.

Origen	No. aislados	Especies aisladas		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
Río Almendares	49	48	1	-
Río Quibú	28	26	2	-
Río Luyanó	43	39	1	3
<b>Totales</b>	<b>120</b>	<b>113</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

### 3.4.2 Serotipificación

La caracterización serológica de las 113 cepas confirmadas como pertenecientes a la especie *Escherichia coli* provenientes de los tres ríos evaluados mostró que el 72% (81/113) fueron serotipificables (OT), el 24% (27/113) no aglutinaron con ninguno de los 174 sueros disponibles del esquema para el antígeno O (ONT), por lo que se clasifican como cepas no tipificables, y el 4 % (5/113) fueron cepas rugosas (OR). La mayor cantidad de cepas proceden del río Almendares (Tabla 10).

**Tabla 10.** Caracterización serológica de las cepas de *Escherichia coli* aisladas en los tres ecosistemas dulceacuícolas evaluados.

Ecosistemas	Caracterización serológica			
	No. aislados			
	OT	ONT	OR	Total
Río Almendares	38	7	3	48
Río Quibú	19	5	2	26
Río Luyanó	24	15	0	39
Total	81	27	5	113

**OT:** Antígeno O tipificable, **ONT:** Antígeno O no tipificable, **OR:** Antígeno O rugoso

Entre las 81 cepas serotipificables se encontraron un total de 41 serogrupos y 54 serotipos (combinación antígeno O y H) diferentes. El 47% (38/81) de estas cepas presentó uno de los siete serogrupos siguientes: O1, O8, O23, O25, O30, O169 y O174. Los serotipos más frecuentes fueron: O1:H15, O8:H9, O23:HNT, O25:H19, O30:HNM, O169:HNM y O174:H32, los cuales agruparon al 41% (33/81) de las cepas serotipificables (Tabla 11).

Los serogrupos y serotipos encontrados entre las cepas aisladas de los ecosistemas evaluados fueron diferentes, solo los serogrupos O8 y O174 se detectaron en cepas de los tres ríos aunque combinados con diferentes antígenos flagelares (H8, H9 y H32) (Tabla 12).

De los tres ríos evaluados se aislaron 27 cepas cuyo antígeno O no fue tipificable. El río Luyanó fue el ecosistema donde se encontró el mayor número de estas cepas (Tabla 10), de las cuales el 33% (9/27) aglutinó con alguno de los sueros anti-H utilizados, el 30% (8/27) no aglutinaron con ninguno de los 56 sueros anti-H (serotipo ONT:HNT) y el 37% (10/27) resultó no móvil (serotipo ONT:HNM) (Tabla 13).

**Tabla 11.** Serogrupos identificados en las cepas de *Escherichia coli* ubicados según su frecuencia de aislamiento.

Serogrupos	No. de aislados/ serogrupo	Total de aislados	Ecosistemas donde se encontraron
O2, O4, O5, O18ac, O19ac, O20, O39, O51, O53, O63, O66, O70, O79, O86, O88, O101, O103, O107, O111ab, O140, O165, O175, O177, O178, O184	1	25	Almendares, Quibú y Luyanó
O15, O16, O27, O45, O54, O64, O75, O117, O128	2	18	Almendares, Quibú y Luyanó
O1, O23, O169	3	9	Almendares y Luyanó
O8, O30	4	8	Almendares, Quibú y Luyanó
O25	5	5	Quibú
O174	16	16	Almendares, Quibú y Luyanó
Total	-	81	



**Tabla 12.** Serotipos identificados entre las cepas serotificables de *E. coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó

<b>Ecosistema evaluado</b>	<b>Serotipos identificados**</b>
<b>Río Almendares</b>	O1:H15 (2), O2:H4 (1), <b>O8:H8</b> (1), O16:H7 (1), O16:H32 (1), O20:H15 (1), O23:HNT (2), O30:HNM (4), O45:H45 (1), O45:HNM (1), O51:H10 (1), O64:HNT (1), O64:H25 (1), O75:H44 (1), O86:H34 (1), O88:H21 (1), O103:H16 (1), O117:H3 (1), O128ac:HNT (2), O165:HNM (1), O169:HNM (2), <b>O174:H32</b> (10)
<b>Río Quibú</b>	O4:H16 (1), <b>O8:H9</b> (2), O18ac:H49 (1), O25:H19 (4), O27:HNT (2), O39:H9 (1), O63:H6 (1), O70:H54 (1), O75:H44 (1), O79:H4 (1), O107:H27 (1), O117:H27 (1), <b>O174:H32</b> (1), O177:H4 (1), O178:H54 (1)
<b>Río Luyanó</b>	O1:H7 (1), O5: , <b>O8:HNM</b> (1), O15:H2 (2), O19ac:HNM (1), O23:H43 (1), O25:H32 (1), O53:HNM (1), O54:H7 (2), O66:HNM (1), O101:H8 (1), O111:H38 (1), O140:H3 (1), O169:HNM (1) <b>O174:H32</b> (5), O175:H27 (1), O184:HNT (1)

\*\*Entre paréntesis se señala el número de cepas que presentaron ese serotipo. En negritas se encuentran señalados los serogrupos que fueron comunes para los tres ecosistemas evaluados.

**Tabla 13.** Serotipos identificados entre las 27 cepas no serotificables de *E. coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.

<b>Ecosistema evaluado</b>	<b>Serotipos identificados**</b>
<b>Río Almendares</b>	ONT:H10 (2), ONT:H47 (1), ONT:HNM (1), ONT:HNT (3)
<b>Río Quibú</b>	ONT:H9 (1), ONT:H27 (1), ONT:HNM (2), ONT:HNT (1)
<b>Río Luyanó</b>	ONT:H9 (2), ONT:H26 (2), ONT:HNM (7), ONT:HNT (4)

\*\*Entre paréntesis se señala el número de cepas que presentaron ese serotipo

De acuerdo a su serotipo el 35% de las cepas evaluadas (38/108) de *E. coli* se consideraron patógenas de esta especie. Para esta clasificación no se tomaron en cuenta las cinco cepas OR encontradas.

Se identificaron cepas patógenas intestinales y extraintestinales, pero el mayor número correspondió a las cepas patógenas intestinales. El patotipo de *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC) fue el más prevalente (37%) y se encontró en los tres ríos evaluados, seguido por los patotipos *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (32%),

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (8%) y *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (5%), este último solo se encontró en el río Almendares (Tabla 14).

Las cepas de *E. coli* extraintestinales correspondieron a serogrupos de cepas uropatogénicas (UPEC) (18%) y solo se aislaron en dos de los tres ecosistemas evaluados. El mayor número de serogrupos patógenos se encontraron en el río Almendares, tanto para las cepas patógenas intestinales como extraintestinales (Tabla 14).

**Tabla 14.** Patotipos de las cepas de *Escherichia coli* según la clasificación serológica.

Patotipos	No. de aislados	Serogrupos	Procedencia	
<b>Intestinales</b>	STEC	14	O5, O45, O54, O117, O103, O165, O169, ONT:H9, ONT:H47	Almendares, Luyanó, Quibú
	ETEC	12	O8, O15, O20, O25, O27	Almendares, Luyanó, Quibú
	EPEC	3	O86, O111, O128	Almendares, Luyanó
	EAEC	2	ONT:H10	Almendares
<b>Extraintestinales</b>	UPEC	7	O2, O4, O16, O18ac, O75	Almendares, Quibú

STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EPEC: *E. coli* enteropatógena, EAEC: *E. coli* enteroagregativa y UPEC: *E. coli* uropatogénica.

### 3.4.3. Detección de genes específicos de virulencia

Con el fin de confirmar la presencia de las cepas de *Escherichia coli* patógenas intestinales en las aguas de los tres ecosistemas evaluados se realizó la búsqueda de los genes *st*, *lt*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *bfpA* e *ial*, los cuales son representativos de estas cepas. Se obtuvo amplificación positiva en el 31% (33/108) de las cepas evaluadas para al menos uno de los genes buscados.

De los factores de virulencia analizados, los genes *st*, *stx2* e *ial* fueron los más abundantes, detectándose en un 7 % (para cada gen) de las cepas, seguido por los genes *stx1* (5,5 %) y *lt* (4,6 %). En ninguna cepa se detectó la presencia de los genes *eaeA* y *bfpA* (Tabla 15 y Figuras 8, 9 y 10).



**Tabla 15.** Distribución de los diferentes genes en las cepas de *E. coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.

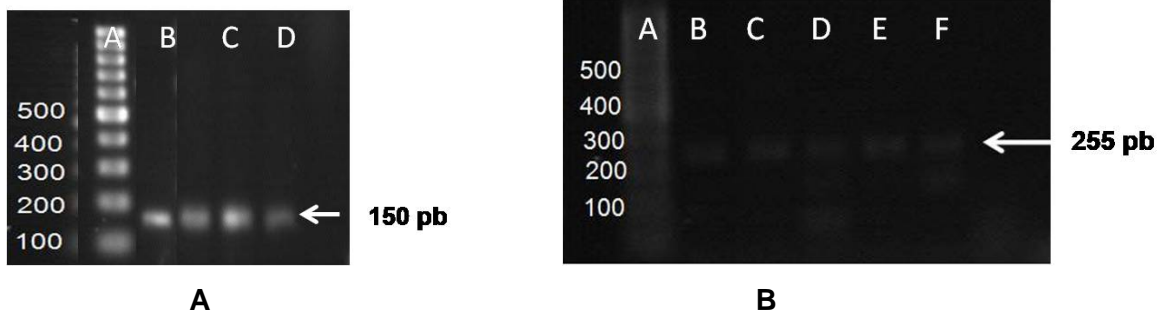
Origen	Genes de virulencia							
	<i>lt</i>	<i>st</i>	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>ial</i>	<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	Np
Almendares	3	3	4	5	0	0	0	14 <sup>a</sup>
Quibú	1	2	2	0	0	0	0	5
Luyanó	1	3	0	3	8	0	0	14 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	5	8	6	8	8	0	0	33

Np: Número total de cepas con amplificados positivos por ecosistema

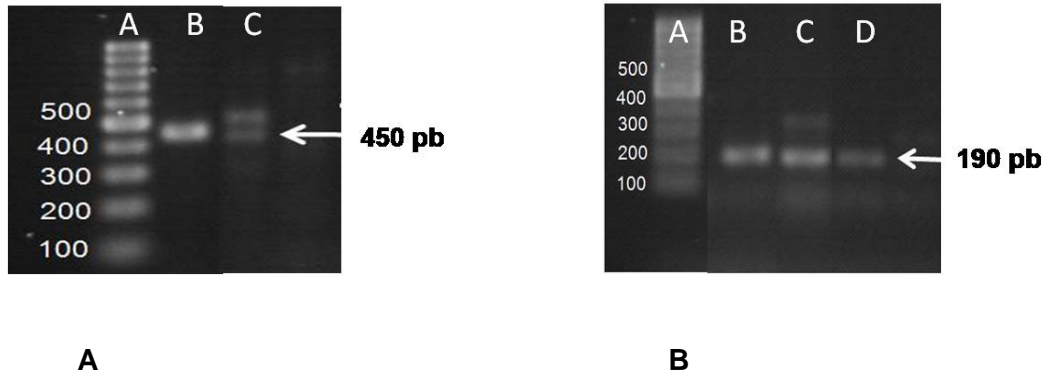
<sup>a,b</sup> En los ríos Almendares y Luyanó hubo una cepa que amplificó simultáneamente para dos genes, por lo que solo la tuvimos en cuenta una vez para la suma de cepas positivas en estos ríos.

En la tabla 16 se observa la distribución de los 33 patotipos por río, 14 son cepas del río Almendares, cinco del río Quibú y 13 patotipos están en cepas del río Luyanó.

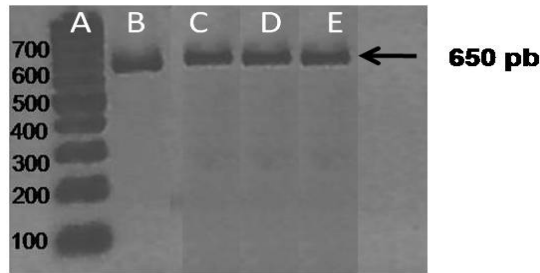
Los ecosistemas de los que proceden un mayor número de cepas con amplificados positivos fueron Almendares y Luyanó, donde se obtuvieron 14 en cada río. Además, se encontraron dos cepas que presentaron amplificación positiva para dos genes; una cepa del río Almendares con serotipo ONT:HNT amplificó simultáneamente para los genes *stx1* y *stx2*, y una del río Luyanó (serotipo O174:H32) para los genes *st* y *lt*. El gen *ial* solo amplificó entre las cepas del río Luyanó (Tabla 16).



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR para la detección de los genes *stx1* y *stx2* en las cepas de *Escherichia coli*. Carriles A: Marcador de peso molecular (1 kb), carriles B: Control positivo cepa STEC IB00446. Fotografía (A) carriles C y D: muestras positivas para el gen. Fotografía (B) carriles C, D, E y F: muestras positivas para el gen.



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR para la detección de los genes *lt* y *st* en las cepas de *Escherichia coli*. Carriles A: Marcador de peso molecular (1 kb), carriles B: Control positivo: cepa ETEC 49766. Fotografía (A) carriles C: Muestra positiva para el gen. Fotografía (B) carriles C y D: Muestras positivas para el gen.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR para la detección del gen *ial* en las cepas de *Escherichia coli*. Carril A: Marcador de peso molecular (1 kb), carril B: Control positivo cepa EIEC (Cepario Laboratorio Investigación Básica, Dpto Salud Pública, Facultad de medicina, UNAM), carriles C, D y E: muestras positivas para el gen.

De las 33 cepas que fueron positivas para alguno de los genes de virulencia evaluados el 46% se clasificó como *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC), el 36% como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y el 18% como *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) debido a la presencia de los genes *stx*, *lt* y *st* e *ial* respectivamente.

En solo cuatro casos las cepas STEC y ETEC coincidieron con las cepas que serológicamente fueron clasificadas dentro de estas categorías patógenas. Por lo tanto, se observó una elevada diversidad de seropatotipos (combinaciones de genes de virulencia en cada uno de los serotipos) independientemente del ecosistema evaluado (Tabla 16).

**Tabla 16.** Distribución de los diferentes patotipos detectados en las cepas de *E. coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó de acuerdo a los genes que amplificaron.

Origen	Puntos de muestreo	Serotipos	No. aislados	Genes de virulencia					Patotipo
				<i>lt</i>	<i>st</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>ial</i>	
Almendares	A2	O1:H15	1	-	+	-	-	-	ETEC
	A1	O2:H4	1	-	-	+	-	-	STEC
	A3	O45:H45	1	-	-	+	-	-	STEC
	A3	O51:H10	1	-	-	+	-	-	STEC
	A3	O88:H21	1	-	-	-	+	-	STEC
	A2	O165:HNM	1	-	-	-	+	-	STEC
	A3	O174:H32	1	-	-	-	+	-	STEC
	A3	O174:H32	1	+	-	-	-	-	ETEC
	A3	O174:H32	1	-	+	-	-	-	ETEC
	A4	O174:H32	1	+	-	-	-	-	ETEC
	A3	ONT:H10	1	+	-	-	-	-	ETEC
	A3	ONT:HNT	1	-	-	+	+	-	STEC
	A1	ONT:HNT	1	-	-	-	+	-	STEC
	A1	ONT:HNT	1	-	+	-	-	-	ETEC
	Quibú	Q3	O8:H9	1	-	+	-	-	-
Q2		O18ac:H49	1	-	-	+	-	-	STEC
Q3		O25:H19	1	+	-	-	-	-	ETEC
Q1		O63:H6	1	-	+	-	-	-	ETEC
Q3		ONT:H27	1	-	-	+	-	-	STEC
Luyanó	L1	O1:H15	1	-	+	-	-	-	ETEC
	L1	O1:H7	1	-	-	-	+	-	STEC
	L3	O8:HNM	1	-	-	-	-	+	EIEC
	L1	O15:H1	1	-	-	-	+	-	STEC
	L1	O15:H2	1	-	-	-	-	+	EIEC
	L1	O19ac:HNM	1	-	-	-	+	-	STEC
	L3	O23:H43	1	-	-	-	-	+	EIEC
	L2	O174:H32	1	+	+	-	-	-	ETEC
	L3	O184:HNT	1	-	-	-	-	+	EIEC
	L1	ONT:H9	1	-	+	-	-	-	ETEC
	L1	ONT:H26	1	-	-	-	-	+	EIEC
	L1 y L3	ONT:HNM	3	-	-	-	-	+	EIEC
<b>Totales</b>			<b>33</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	

STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EIEC: *E. coli* enteroinvasiva.

Puntos de muestreo:

**A1**- Puente Calle 23, **A2**- Calle 100 y Boyeros, **A3**- Arroyo Paila, **A4**- Arroyo Mordazo; **Q1**-Palacio de las Convenciones; **Q2**-Planta Tratamiento Calle 25; **Q3**- Los Pocitos; **L1**-Vía Blanca; **L2**-Calle Mayor; **L3**- La Oncena.

### 3.4.4. Ensayos de adherencia en células epiteliales HEP-2

El 23,1% de las cepas (25/108) presentó adherencia a las células HEP-2, mientras que el 78% (83/108) resultó no adherente (Tabla 17). Se encontraron dos patrones de adherencia diferentes entre las cepas adherentes: adherencia difusa (AD), cuando las bacterias se adhirieron alrededor de toda la célula (Figura 11B) y adherencia agregativa (AA), cuando las bacterias se adhirieron en forma de en palizadas en uno de los polos de la célula (Figura 11C, 11D y 11E). El patrón más abundante entre las cepas adherentes fue el de adherencia difusa, seguido por el patrón de adherencia agregativa (Tabla 17).

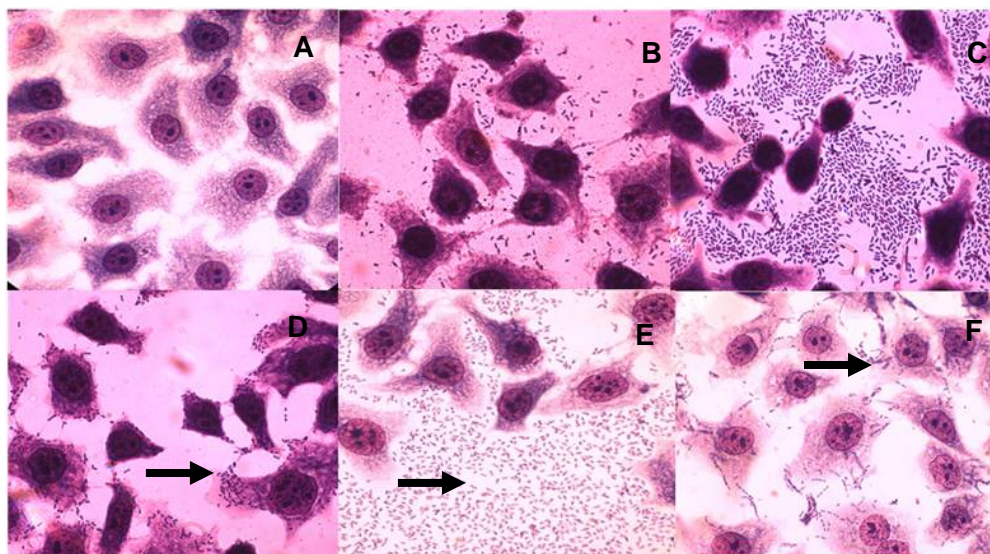
De acuerdo a los patrones de adherencia encontrados las 21 cepas que presentaron adherencia difusa se pueden clasificar en la categoría patogénica *Escherichia coli* de adherencia difusa (ADEC, de sus siglas en inglés) y las cuatro cepas con patrón de adherencia agregativa en cepas *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC, de sus siglas en inglés).

El 64% de las cepas que presentaron uno de los dos patrones de adherencia descritos pertenecen a cepas que desde el punto de vista serológico se consideraron patógenas en esta especie y el 28% amplificó para uno de los siete genes de virulencia evaluados.

**Tabla 17.** Patrones de adherencia de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.

Patrón de adherencia	Número de aislados/%
AD	21 (19%)
AA	4 ( 4%)
NA	83 (77%)

AD: Adherencia difusa, AA: adherencia agregativa, NA: no adherente



**Figura 11.** Células HEp-2 en cultivo *in vitro* infectadas durante tres horas con cepas de *E. coli* aisladas de tres ecosistemas dulceacuícolas de La Habana, fijadas con metanol al 70%, teñidas con el colorante de Giemsa y observadas bajo microscopia de luz convencional (aumento 100x). **A:** Control celular, **B:** Cepa de *E. coli* con patrón de adherencia difusa (AD), las bacterias se adhieren a toda la superficie de la célula en forma aleatoria; **C, D y E:** Cepas de *E. coli* con patrones de adherencia agregativa típico (AA), las bacterias se adhieren a la célula (flecha) y el cristal (flecha) en forma de ladrillos apilados o en palizada; **F:** Cepa de *E. coli* con patrón de adherencia semejante a la localizada (LAL) de cepas de ECEP tipo II o atípicas, las bacterias se adhieren a las células en forma de cadenas (flecha).

#### 3.4.5. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

El análisis de la susceptibilidad antimicrobiana en las cepas de *Escherichia coli* aisladas demostraron que el 24% (26/108) de las cepas evaluadas fueron resistentes al menos a uno de los 15 antimicrobianos utilizados. Las cepas resistentes se aislaron en los tres ecosistemas evaluados y se distribuyeron de la siguiente manera: 12 del río Almendares, seis procedían del río Quibú y ocho del río Luyanó.

El mayor porcentaje de cepas resistentes (57,6%) se presentó frente al antibiótico betalactámico ampicilina, seguido por el sulfametoxazol-trimetropima y las quinolonas ciprofloxacino y levofloxacino con porcentajes de 42,3%, 38,4% y 34,6%, respectivamente. Además, se identificaron valores de resistencia intermedia frente a los antibióticos aztreonam, levofloxacino, gentamicina, piperacilina/tazobactan, nitrofurantoina, ceftazidima y ceftriazona (Figura 12).

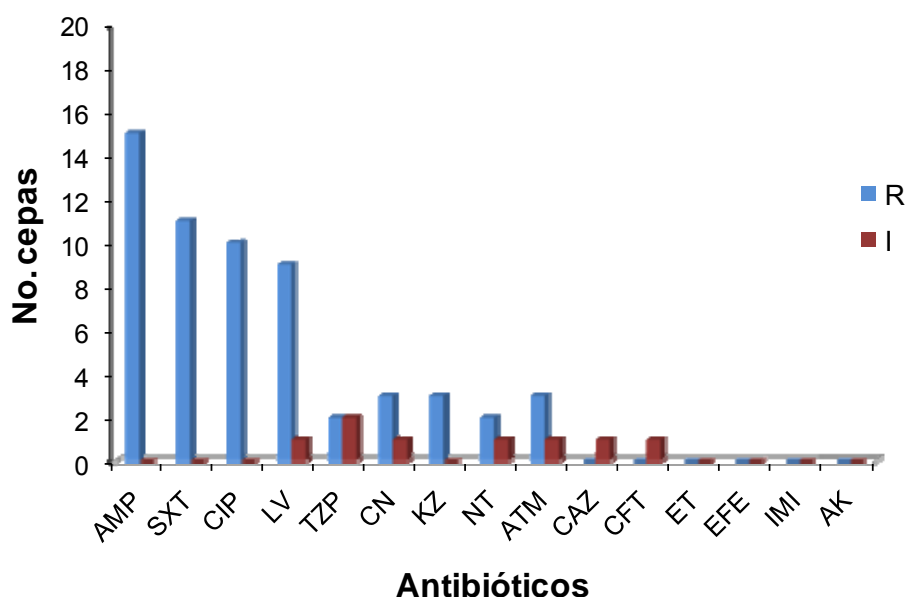
Ninguna cepa resultó susceptible a menos de 3 antimicrobianos, y el 77% de las cepas fueron susceptibles frente a todos los antibióticos utilizados.

Entre las cepas resistentes no prevaleció ningún serotipo, el 19,2% se clasificaron, de acuerdo a su serotipo, como cepas patógenas de la especie *E. coli* y el 23% fueron positivas para alguno de los genes de virulencia buscados.

### 3.4.5.1. Análisis de la multirresistencia

De las 26 cepas resistentes, trece (11,5%) mostraron resistencia frente a tres antibióticos o más, por lo que se consideraron multirresistentes (MR) según Chandran *et al.*, 2008.

Se obtuvieron 16 patrones de resistencia antimicrobiana, entre ellos nueve expresaron multirresistencia (combinaciones de 3, 4, 5 y 7 antibióticos). Los patrones de resistencia más frecuentes fueron: SXT, AMP/SXT y AMP/CIP/LV con 4 cepas cada uno (3,5%), seguido del patrón AMP/CIP/LV/NT con dos cepas (1,8%), el resto de los patrones estuvo integrado por una sola cepa (Tabla 18).



**Figura 12.** Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de las 113 cepas de *Escherichia coli* aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana.

AMP- ampicilina, SXT- sulfametoxazol-trimetoprima, CIP- ciprofloxacina, LV- levofloxacina, TZP- piperacilina/tazobactan, CN- gentamicina, KZ- cefazolina, NT- nitrofurantoina, ATM- aztreonam, CAZ- ceftazidima, CFT- ceftriaxona, ET-ertapenem, EFE-cefepime, IMI-imipenem, AK-amikacina.

R-Resistentes; I- Resistencia intermedia

**Tabla 18.** Patrones de resistencia de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó.

No. de antimicrobianos	Patrones de resistencia	No.de cepas	Total
1	SXT	4	5
	CN	1	
2	AMP-CZ	1	8
	CIP-LV	1	
	AMP-SXT	4	
	CN-SXT	1	
	ATM-TZP	1	
3	AMP-CIP-LV	4	6
	AMP- TZP-CN	1	
	ATM-CFT- TZP	1	
4	AMP-CIP-LV-NT	2	5
	AMP-CIP-LV-SXT	1	
	AMP-CZ-LV-SXT	1	
	AMP-CIP- TZP-SXT	1	
5	AMP-CIP-LV-SXT-CZ	1	1
7	AMP-CIP-LV- ATM-CZ-CFT-CN	1	1

AMP- ampicilina, SXT- sulfametoxazol-trimetoprima, CIP- ciprofloxacina, LV- levofloxacina, TZP- piperacilina/tazobactam, CN- gentamicina, CZ- cefazolina, NT- nitrofurantoina, ATM- aztreonam, CAZ-ceftazidima, CFT- ceftriazona, ET-ertapenem, EFE-cefepime, IMI-imipenem, AK-amikacina.

### 3.4.6. Análisis de la diversidad genética entre las cepas de *E. coli* aisladas de los ecosistemas evaluados

#### 3.4.6.1. Río Almendares

El análisis de los resultados del estudio de diversidad genética entre las cepas aisladas del río Almendares mostró una elevada diversidad entre las 31 cepas de *Escherichia coli* caracterizadas, donde se detectaron 25 pulsotipos o patrones genéticos diferentes por electroforesis por campos pulsados.

Las cepas de los clones D, F, K y U mostraron pulsotipos idénticos entre sí por lo que se consideraron que eran aislamientos del mismo clon (coeficiente de Dice  $\geq 0,9$ ). Dos presentaban el serotipo ONT:HNT (clon D), dos el serotipo ONT:H10 (clon F), tres el serotipo O174:H32 (clon K) y tres el serotipo O30:HNM (clon U). Se encontraron también seis cepas posiblemente relacionadas (coeficiente de Dice entre 0,7-0,8), aisladas de los puntos A4 (AEC28 y AEC19), A3 (AEC29 y AEC4) y A2 (AEC18 y AEC1), respectivamente. El resto (15 cepas) de las cepas analizadas no mostraron un elevado



grado de similitud (coeficiente de Dice  $< 0,7$ ), por lo que se consideraron no relacionadas (Tenover *et al.*, 1995) (Figura 13).

#### **3.4.6.2. Río Quibú**

En el río Quibú también se observó gran diversidad genética entre las 22 cepas evaluadas, en los que se encontraron 18 pulsotipos diferentes.

Las cepas QEC19, QEC20 y QEC21 presentaron un coeficiente de Dice  $\geq 0,9$  por lo que se consideraron aislamientos de un mismo clon (clon H1), al igual que las cepas QEC4, QEC5 y QEC6 (clon P1). Se consideraron cepas posiblemente relacionadas a QEC16 (clon M1) y QEC12 (clon N1) (coeficiente de Dice entre 0,7-0,8). Las 14 cepas restantes se consideró que no estaban relacionadas genéticamente (coeficiente de Dice  $< 0,7$ ) (Tenover *et al.*, 1995) (Figura 14).

#### **3.4.6.3. Río Luyanó**

Los aislados del río Luyanó mostraron también gran diversidad genética entre sí. Las 23 cepas analizadas de este río presentaron 22 pulsotipos o patrones genéticos diferentes. En este ecosistema fue donde mayor diversidad se observó, ya que solo dos cepas (LEC21 y LEC22) de las 23 evaluadas presentaron una similitud cercana a 1 (Coeficiente de Dice  $\geq 0,9$ ), por lo que se consideraron aislamientos genéticamente idénticos.

Las cepas LEC20 y LEC5 se consideraron posiblemente relacionadas según los criterios de Tenover *et al.* (1995), con un coeficiente de Dice entre 0,7 y 0,8. Las 19 cepas restantes de las 23 evaluadas presentaron un coeficiente de Dice  $< 0,7$  por lo que se clasificaron como cepas no relacionadas genéticamente (Figura 15).

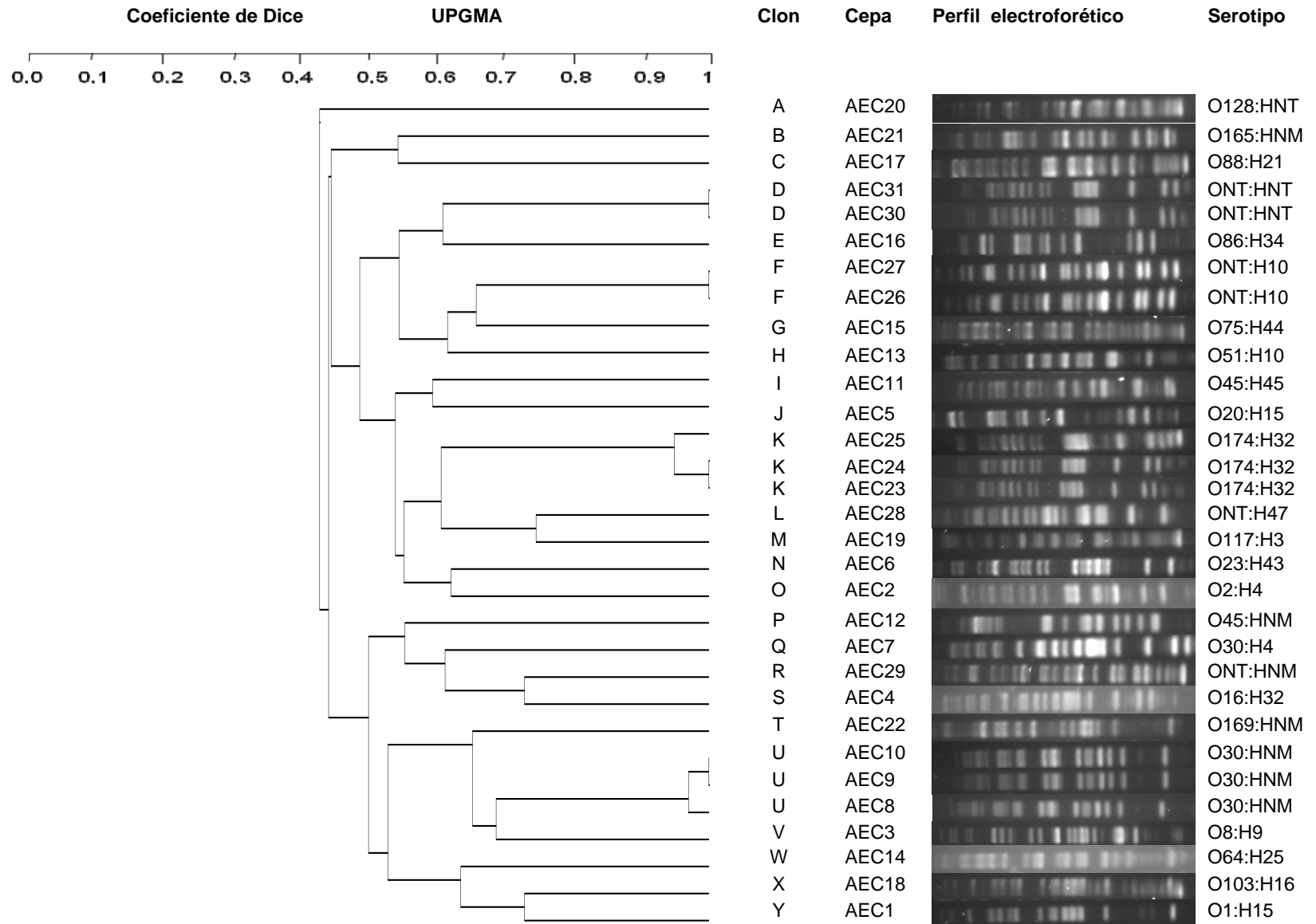
#### **3.4.6.4. Análisis de la diversidad genética entre cepas de *E. coli* seleccionadas procedentes de los tres ecosistemas evaluados**

Para este análisis se seleccionaron aquellas 30 cepas cuyos serogrupos fueron comunes entre cepas que pertenecían a dos o a los tres ecosistemas dulceacuícolas evaluados.

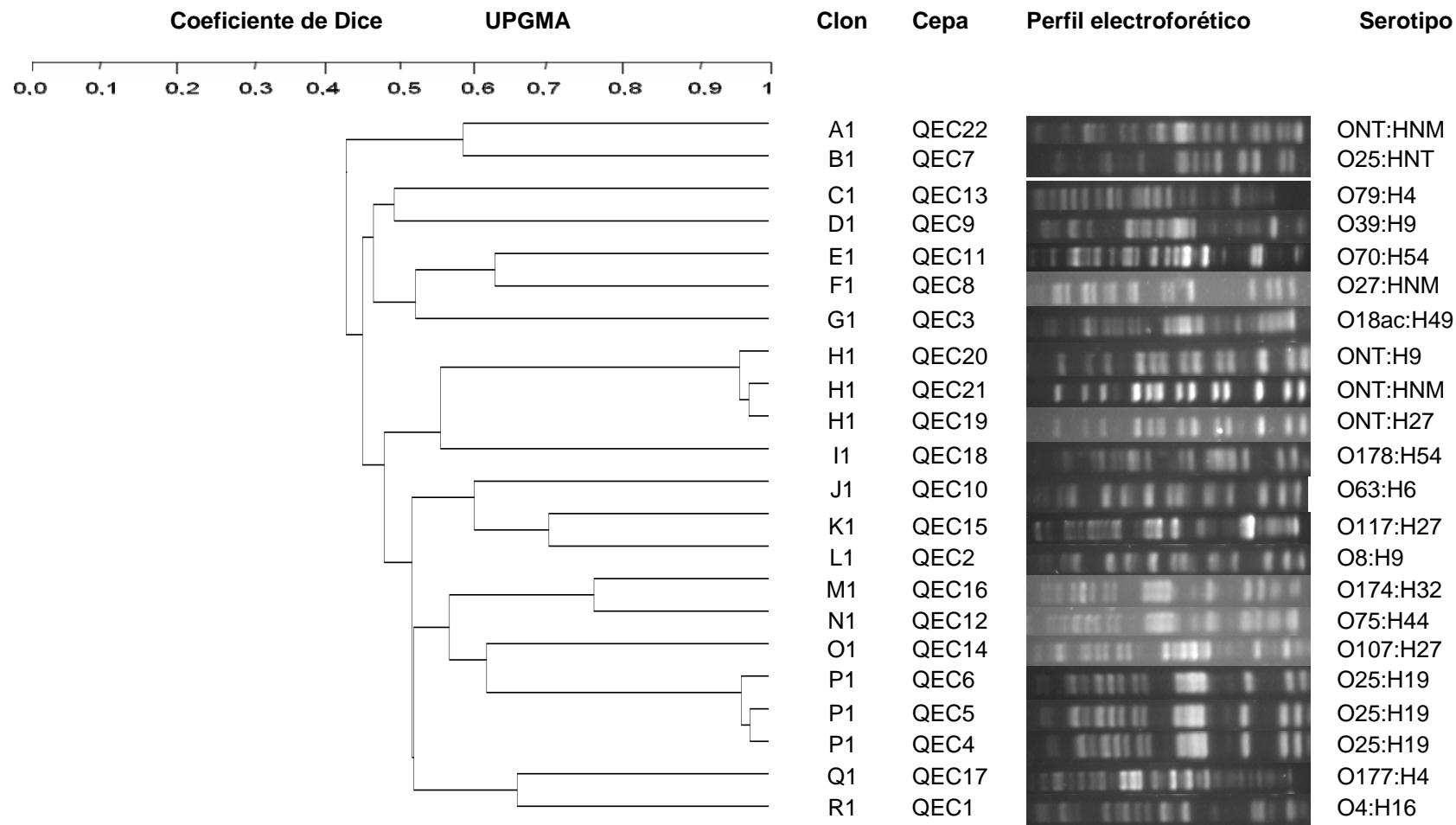
El análisis de los resultados mostró una gran diversidad genética entre las cepas seleccionadas y se encontraron 21 pulsotipos diferentes entre las 30 cepas seleccionadas (Figura 16).

Solo se encontraron los clones Y y K entre cepas de los tres ecosistemas estudiados. El clon K se encontró en cuatro cepas, tres del río Almedares y una del río Luyanó y el clon

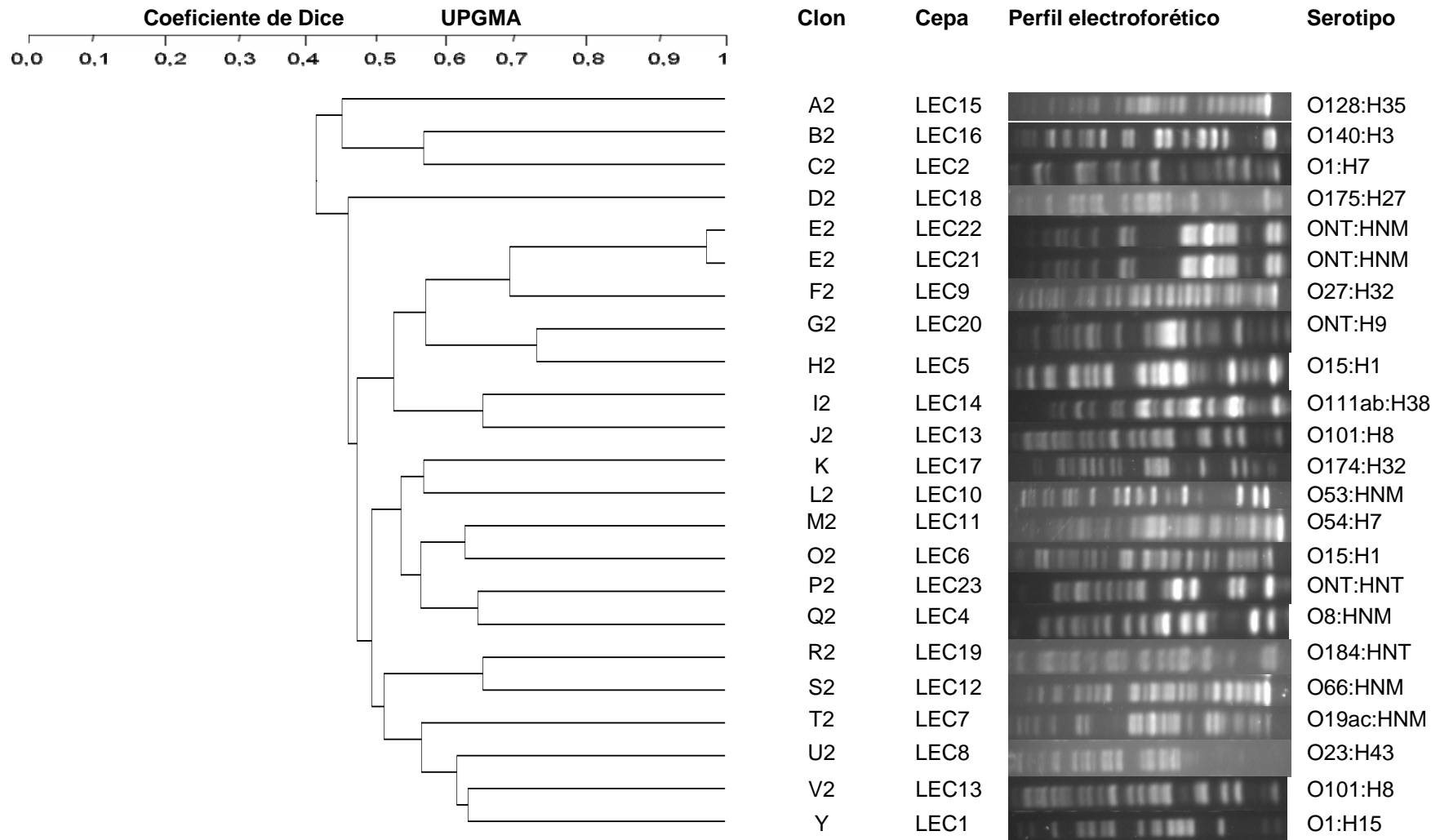




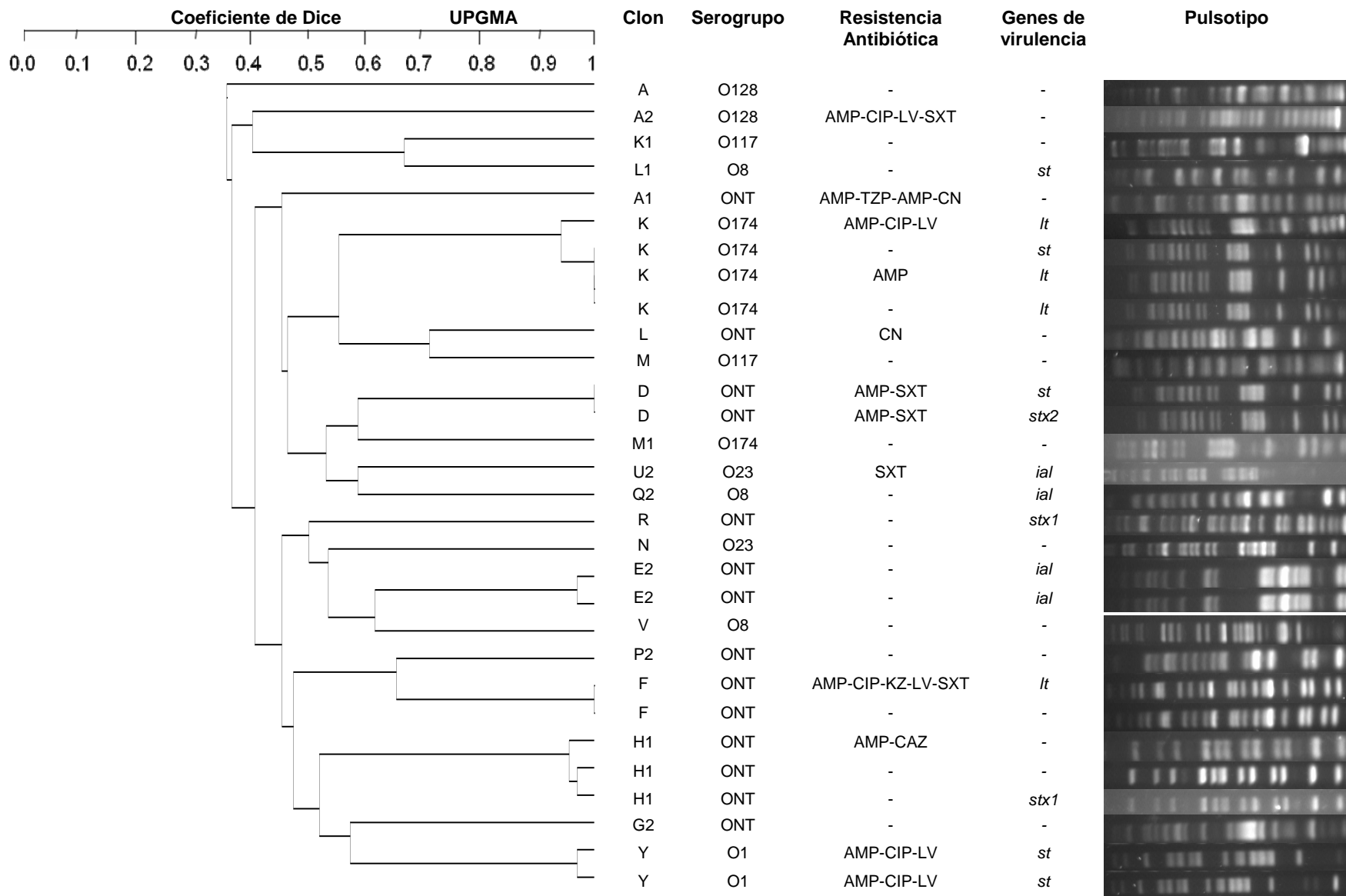
**Figura 13.** Relación clonal detectada entre cepas de *E. coli* aisladas del río Almendares mediante ECP y posterior análisis con el software MVSP 3.1.



**Figura 14.** Relación clonal detectada entre cepas de *E. coli* aisladas del río Quibú mediante ECP y posterior análisis con el software MVSP 3.1.



**Figura 15.** Relación clonal detectada entre cepas de *E. coli* aisladas del río Luyanó mediante ECP y posterior análisis con el software MVSP 3.1.



**Figura 16.** Relación clonal detectada entre cepas de *E. coli* con iguales serogrupos pero aisladas de los diferentes ecosistemas evaluados (ríos Almendares, Quibú y Luyanó) mediante ECP y posterior análisis con el software MVSP 3.1.

Y en dos cepas, una proveniente del río Almendares y otra del río Luyanó. Sin embargo, estas cepas presentaron diferentes fenotipos de resistencia frente a los antimicrobianos evaluados en este trabajo y presentaron diferencias en cuanto a la presencia de determinados genes de virulencia.

Las cepas del clon K provenientes del río Almendares amplificaron positivo para el gen que codifica para la toxina termolábil (LT) y pero presentaron diferencias en cuanto a sus patrones de resistencia antimicrobiana, una presentó el patrón AMP-CIP-LV, otra fue solo resistente frente a la ampicilina y la tercera fue susceptible frente a todos los antimicrobianos. Para el caso de cepa proveniente del río Luyanó de este mismo clon amplificó para el gen de la toxina termoestable (*st*) y no presentó resistencia antimicrobiana frente a ninguno de los antimicrobianos probados. Las cepas del clon Y amplificaron para el gen *st*, y ambas fueron resistentes frente a la ampicilina, ciprofloxacino y la levofloxacino (Figura 16).

En el resto de las cepas que se consideraron aislamientos de un mismo clon (coeficiente de Dice  $\geq 0,9$ ), y que provenían de un mismo ecosistema se observaron diferencias en cuanto a la presencia de genes de virulencia. Esta situación se observó entre los aislamientos del clon D, F y H1, en los cuales una cepas presentaban un gen de virulencia y otras no (Figura 16).

De forma general, los resultados de clonalidad obtenidos en la presente investigación demuestran que existe una gran diversidad clonal entre las cepas de *E. coli* evaluadas y no se detectó ningún clon dominante de esta especie en los ecosistemas dulceacuícolas evaluados.

## ***CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN***

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis de la concentración de coliformes termotolerantes y *E. coli* en los ríos Almendares, Quibú y Luyanó

#### 4.1.1. Análisis integral

Solo una pequeña cantidad del agua dulce del planeta se encuentra disponible en forma superficial y los ríos, por esta razón, constituyen uno de los ecosistemas acuáticos superficiales más importantes (Meybeck y Helmer, 1996), en los cuales la contaminación fecal producida por el ser humano y los animales es una de las principales fuentes de deterioro de la calidad del agua (An y Breindenbach, 2005).

Los ríos capitalinos Almendares, Quibú y Luyanó están sometidos a un proceso antrópico acelerado. La asimilación económica de los territorios que atraviesan y el proceso de urbanización desarrollado en estas zonas a lo largo de los años han determinado los diferentes grados de vulnerabilidad que presentan y que son el punto de partida de los problemas ambientales que sufren. Sumado a esto, las aguas de estos ríos también se emplean por los habitantes colindantes a estos cauces fluviales para el regadío de cultivos agrícolas con fines alimenticios y actividades recreativas, entre otras. Por lo anteriormente planteado, la evaluación de la calidad microbiológica de estos ecosistemas dulceacuícolas superficiales es de gran importancia para la capital habanera y sus habitantes.

En la Norma Cubana 22 de 1999 se establecen los criterios de calidad bacteriológica para el agua de los lugares de baño, ya sean en costas o en masas de aguas interiores, pero lo hace en función de los microorganismos indicadores coliformes totales, coliformes termotolerantes (CTE), enterococos y *Pseudomonas aeruginosa* y no considera de manera individual a la especie *Escherichia coli* (EC). Como en esta norma nacional no se tiene en cuenta de manera individual a la especie *E. coli* como indicador de contaminación, en la presente investigación se consideraron los valores máximos de concentración establecidos en esta norma para los coliformes termotolerantes como el criterio para evaluar y analizar también las concentraciones de *E. coli* obtenidas a partir de las muestras de agua, ya que *E. coli* forma parte de los CTE en alta proporción.

Al analizar los valores de las concentraciones de coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* obtenidos para los tres ríos evaluados (Figura 1) se pudo apreciar que mostraron valores altos durante el período de estudio, tanto para los coliformes termotolerantes como para *E. coli* y por encima de los valores aceptados según criterios nacionales (NC 22, 1999) e internacionales (WHO, 2003) para aguas recreativas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las principales fuentes de contaminación que presentan estos ecosistemas son de origen fecal. Diversos autores como Rodríguez *et al.* (2003), Eckner (1998) y Manafi (1994) plantean que cuando las concentraciones de *E. coli* son elevadas en un ecosistema acuático, esto indica que ha tenido lugar un fuerte evento de contaminación por desechos animales y/o humanos y que el mismo tiene un carácter reciente. Si por el contrario, las concentraciones de *E. coli* son pequeñas, indica que la contaminación, aunque del mismo tipo, es menos reciente o menos importante. Y si solo se detectan coliformes pero no *E. coli*, esto indica que la contaminación, aunque es reciente, tiene un origen no fecal o es de origen fecal pero lejano, de modo que los coliformes intestinales no pudieron sobrevivir.

Las bacterias coliformes y en particular *Escherichia coli* tienen un tiempo de vida limitado en estos ecosistemas, considerados para estos microorganismos como su hábitat secundario (Winfield y Groisman, 2003; Campos-Pinilla *et al.*, 2008). El hábitat primario para estas bacterias, el tracto gastrointestinal, ofrece la temperatura adecuada y el aporte de nutrientes necesario para su crecimiento, con un tiempo de duplicación en ellos de dos días aproximadamente para *E. coli* (Savageau, 1983). De acuerdo a estos criterios, *E. coli* crece y se divide en su hábitat primario, pero tiene un rango de crecimiento negativo en hábitats secundarios, donde el tiempo de vida medio es de 1 día en el agua (Faust *et al.*, 1975), 1,5 días en sedimentos (Gerba *et al.*, 1976) y de 3 días en el suelo (Temple *et al.*, 1980). Estos estimados implican que *E. coli* y otros coliformes termotolerantes no sobreviven mucho tiempo en medios ambientes naturales, pero que su número puede mantenerse elevado si el ecosistema recibe un aporte continuo de heces fecales animales y humanas.

Teniendo en cuenta estos criterios y las altas concentraciones de bacterias indicadoras encontradas en las aguas de los ríos evaluados, se puede afirmar que la contaminación fecal que presentan estos ecosistemas es importante y de carácter reciente. Por tanto,



esto indica que el arribo de las bacterias fecales a estos ríos es constante y en altas concentraciones durante todo el año.

La contaminación de todo curso fluvial es un fenómeno multifactorial, pero la acción antropogénica es uno de los factores que más influye en la disminución de la calidad de sus aguas (Rúa de Cabo *et al.*, 2006). Las tres cuencas a las que pertenecen los ríos evaluados poseen una alta densidad poblacional. Sin embargo, la Cuenca Superficial Luyanó tiene una población mayor por área de extensión (235 427 hab/28,9 km<sup>2</sup>) que la Cuenca Almendares-Vento y la Cuenca Superficial Quibú (20 775/402 km<sup>2</sup> y 240 698/30,59 km<sup>2</sup>, respectivamente) (Jiménez, 2007; CCAV, 2002; Fernández *et al.*, 2004).

Esto trae como consecuencia que la corriente fluvial principal de esta cuenca, el río Luyanó, reciba importantes volúmenes de aguas residuales procedentes de las viviendas del área urbana debido a las irregularidades en el manejo de estos residuos o su evacuación a través de la red de alcantarillado, sin que exista un tratamiento de las aguas servidas que generan, con lo cual se explican las altas concentraciones de coliformes termotolerantes y de *E. coli* encontradas en este río y que sean superiores a las encontradas en los otros dos ecosistemas evaluados.

Por otra parte, las elevadas concentraciones de microorganismos indicadores encontradas en estos ríos constituyen un indicativo de la posible presencia de microorganismos patógenos de transmisión hídrica. La especie *E. coli* tiene una doble función en este tipo de ecosistemas contaminados, ya que además de funcionar como un indicador de contaminación fecal reciente, se debe tener en cuenta, que dentro de esta especie se han descrito grupos patógenos capaces de causar enfermedades intestinales y extraintestinales en humanos y animales. Cuando las concentraciones de esta especie son elevadas en ecosistemas dulceacuícolas impactados por la contaminación, las probabilidades de que se encuentren algunos de los grupos patógenos de *E. coli* son altas, lo cual representa un elevado riesgo para la salud humana.

Además de los grupos patógenos de la especie *E. coli* también pueden encontrarse otros microorganismos patógenos bacterianos transmitidos por el agua, ya sea por contacto directo o indirecto, tales como especies bacterianas de los géneros: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Leptospira*, *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio* (Ashbolt, 2004). Algunas especies de estos géneros pueden causar desde infecciones de heridas hasta cuadros

severos de gastroenteritis, fiebre tifoidea o cólera. Sin embargo, la detección de estos microorganismos patógenos puede resultar difícil y engorrosa, ya que implica costos elevados, tiempo, laboratorios especializados y personal entrenado para su aislamiento e identificación (Arcos *et al.*, 2005).

La NC 22 (1999) solo sugiere la búsqueda del género *Salmonella* cuando las concentraciones de los microorganismos indicadores se encuentran por encima de los valores límites permisibles. En Cuba, se han llevado a cabo diferentes estudios en aguas recreativas que encontraron correlaciones directas entre la presencia de los coliformes termotolerantes y *Salmonella*. Sin embargo, no se han encontrado resultados de esta asociación con otros géneros bacterianos que poseen especies patógenas como *Vibrio* y *Aeromonas* (González *et al.*, 1996; González *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta la situación que presentan los ecosistemas evaluados, la detección de este único género bacteriano sería insuficiente para determinar el riesgo que implica el uso inadecuado de las aguas de estos ecosistemas ya que la ausencia de este género bacteriano no garantizaría la ausencia de otros patógenos que también se transmiten por el agua como por ejemplo los géneros *Leptospira* y *Vibrio*. La presencia de especies de estos dos géneros bacterianos cada día cobran mayor importancia en los ecosistemas acuáticos. La epidemia del cólera y los brotes causados por especies del género *Leptospira*, han originado una alerta en diferentes países para tratar de prevenir estos eventos, los cuales han provocado una alta morbilidad y mortalidad en la población mundial en años recientes (Pappas *et al.*, 2008; Adler *et al.*, 2009; Vein *et al.*, 2012).

La vigilancia de *Vibrio cholerae* en aguas dulces es un eslabón fundamental en el sistema de salud ambiental de un país. En Cuba, no se informaba de la presencia de *Vibrio cholerae* O1, responsable del cólera desde hace más de un siglo. Solo se habían informado en muestras ambientales aislamientos de *Vibrio cholerae* no O1 (González, 2002). Sin embargo, en julio del presente año se produjo un brote de infecciones gastrointestinales de transmisión hídrica en la provincia Granma a partir de la contaminación de varios pozos de abastecimiento local. En 53 de los pacientes atendidos durante el brote, el diagnóstico para *Vibrio cholerae* O1 fue positivo, de los cuales 3 fallecieron. Este incidente indica la importancia de mantener y perfeccionar el sistema de

vigilancia de este patógeno en aguas, en especial, si se tiene en cuenta que el agua es la vía fundamental para su transmisión.

Para el caso del género *Leptospira*, su llegada a los ecosistemas acuáticos es fundamentalmente a través de los vertimientos de aguas albañales con altas cargas de heces animales y humanas. En la actualidad son cada día más los casos de leptospirosis, no solo como una enfermedad profesional, sino asociada a las aguas recreativas (Hartskeerl *et al.*, 2011; Ganoza *et al.*, 2006). Las especies del género *Leptospira* pueden mantenerse en el suelo y el agua por semanas o meses (Lau *et al.*, 2010; Aviat *et al.*, 2009), por lo que en ecosistemas donde se reciban continuos vertimientos de aguas residuales de animales o se encuentren basureros que favorezcan la proliferación de ratones (principales reservorios de esta bacteria) la llegada de este microorganismos a las aguas se facilitaría mucho y el riesgo del uso de estas aguas se incrementa, condiciones que se observan frecuentemente en los ecosistemas capitalinos evaluados en este trabajo.

En sentido general, la contaminación microbiana encontrada en las aguas de estos ecosistemas durante el período de análisis constituyó un resultado a tomar en cuenta. El estudio de los distintos factores que contribuyen a contaminar estos ríos es de vital importancia por los efectos que esta contaminación puede tener sobre la población que vive en estas cuencas, la biota circundante, así como las zonas marinas cercanas a sus desembocaduras. Los ríos Almendares y Quibú vierten sus aguas al litoral norte de la Habana y contribuyen en gran medida a la contaminación de las aguas del litoral (García *et al.*, 2009). Por su parte, el río Luyanó vierte sus aguas en la Bahía de la Habana como su principal tributario, tanto en agua dulce como en carga contaminante (Mulet y Guillen, 2003; Jiménez, 2007).

Todo lo anteriormente planteado, justifica aún más la necesidad futura de estudios integrales en climas tropicales como el de Cuba, que permitan perfeccionar la vigilancia ambiental en aguas superficiales con relación a su calidad sanitaria para fines recreativos, con la participación de organismos y organizaciones que pueden apoyar y ayudar a que se cumplan las medidas y recomendaciones propuestas para mejorar la calidad microbiológica del agua y por ende, la calidad de vida de la población.

#### 4.1.2. Análisis por ecosistema

##### Río Almendares

La Cuenca Almendares-Vento es una de las diez principales cuencas hidrográficas del país y el 47% del abastecimiento de agua potable de la capital depende de su fuente subterránea Vento (Pérez y Valdés, 2011). Por tal motivo, la contaminación microbiana del Almendares, río principal de esta cuenca, es un problema ambiental serio al que se enfrenta la ciudad.

Los resultados de la presente investigación se corresponden con trabajos realizados en el río Almendares por el Centro Nacional de Cuencas donde se informaron niveles de coliformes termotolerantes entre  $10^2$ - $10^5$  NMP.100 mL<sup>-1</sup>. En esa investigación los mayores niveles para este indicador se encontraron en puntos situados en el arroyo Mordazo, con valores entre  $10^4$ - $10^5$  NMP.100 mL<sup>-1</sup> y en el puente de la calle 23 ( $10^3$ - $10^5$  NMP.100 mL<sup>-1</sup>). En la presente investigación, aunque estos no fueron las estaciones de muestreo con mayores concentraciones, en los puntos A1 (Puente de la calle 23) y A4 (arroyo Mordazo) se encontraron valores de concentraciones similares a las informadas por el Centro Nacional de Cuencas (CNC, 2000).

Por otra parte, los menores valores hallados en la investigación del Centro Nacional de Cuencas (CNC) se informaron en los puntos ubicados en la Taza Vento y en el Puente de la Avenida Boyeros, en las cercanías de la Fábrica de Helados Coppelia, ubicados en el orden de  $10^2$ - $10^3$  NMP.100 mL<sup>-1</sup> (CNC, 2000). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden con lo informado antes, ya que el punto A2, ubicado en 100 y Boyeros, presentó valores superiores a  $10^4$  UFC/100 mL<sup>-1</sup> (Figura 2A). Esto puede deberse a la incorporación de nuevas fuentes de contaminación en las áreas aledañas a este punto como consecuencia del desarrollo urbano y agrícola que ha experimentado la ciudad en la última década.

La estación A1 (Puente de la calle 23) es la más cercana a la desembocadura del río, de los cuatro puntos evaluados, por lo que pudiera pensarse que los niveles de contaminación en ella fueran los más elevados, ya que el agua que llega a esta estación ha recogido todos los vertimientos anteriores. Sin embargo, la influencia que ejerce la incorporación de agua de mar en esta zona, favorece la capacidad autodepurativa del río y tiende a restablecer el balance de la biota del ecosistema.

Factores intrínsecos físico-químicos, biológicos e hidrológicos de las aguas del mar contribuyen a disminuir microorganismos contaminantes sobre la base de su resistencia específica a las condiciones ambientales (Pommepuy *et al.*, 1996). Borrego y Figueras (1997) demostraron un decremento en el número de coliformes en zonas cercanas al mar cuando las corrientes fluviales desembocan en mar abierto, como es el caso del río Almendares. No obstante, a pesar de esta influencia las concentraciones de los indicadores en este punto también mostraron valores por encima de lo establecido en las normas, posiblemente debido a la alta carga microbiana contaminante que ya traían sus aguas.

Otros estudios realizados por el Centro Nacional de Hidrología y Calidad de Aguas (CENHICA) en los años 2002 y 2003 en el río Almendares, en el marco del proyecto “Apoyo al desarrollo integral sostenible del Parque Metropolitano de La Habana”, informan valores en el rango de  $10^3$ - $10^5$  NMP.100 mL<sup>-1</sup> para los coliformes termotolerantes (CENHICA, 2002; CENHICA, 2003). Por otra parte, Chiroles *et al.* (2007), Rojas *et al.* (2005) y Prats *et al.* (2006) en estudios similares sobre la calidad microbiológica del agua de este mismo río y sus principales afluentes informaron valores de coliformes termotolerantes del orden de  $10^5$  UFC.100 mL<sup>-1</sup> en puntos de muestreo ubicados a lo largo de los últimos diez kilómetros del río (entre Río Cristal y el Puente de Hierro). Los resultados obtenidos en el presente trabajo están en correspondencia con los resultados obtenidos por estos autores, y en este caso se aportan datos sobre los vertimientos domésticos que vierten aguas residuales y enriquecen la contaminación de este ecosistema dulceacuícola.

De las cuatro estaciones evaluadas la estación A3 (arroyo Paila) fue la que mostró los valores más altos de contaminación durante el período evaluado. Estos resultados coinciden con estudios realizados por Rojas *et al.* (2005) y Prats *et al.* (2006), en los que este arroyo también presentó las mayores concentraciones de microorganismos indicadores. Este afluente del río es uno de los más afectados por la contaminación. A lo largo de su trayectoria recoge las aguas residuales de varias comunidades e industrias, las cuales han afectado significativamente la calidad de sus aguas desde el punto de vista microbiológico como se demuestra en el presente trabajo.

Se debe destacar que todos los trabajos mencionados anteriormente presentan resultados sobre la contaminación de este río solo hasta el año 2007, por lo que los resultados obtenidos en la presente investigación ofrecen datos actualizados durante dos años de la contaminación de este ecosistema fluvial y ponen de manifiesto que desde el punto de vista microbiológico la calidad de sus aguas no ha mejorado.

### **Río Quibú**

La Cuenca Hidrográfica Superficial del río Quibú es una de las cuencas con mayores problemas en la provincia, según estudios realizados por Rua de Cabo *et al.* (2006). Estos autores plantean que esta cuenca presenta una serie de problemas ambientales de gran envergadura, generados por diferentes entidades y grupos poblacionales asentados en las márgenes de su corriente principal, el río Quibú. Sin embargo, la calidad microbiológica de sus aguas no se incluye entre los problemas abordados por estos autores.

El río Quibú atraviesa varios municipios capitalinos con una alta densidad poblacional, entre los que se destaca el municipio Marianao, uno de los más poblados que atraviesa este río. Según estudios realizados por Fernández *et al.* (2004), solo el 17 % de la población del municipio Marianao presenta servicios de alcantarillado, lo que implica que la mayor parte de sus habitantes vierten sus desechos en fosas y zanjas que tienen como destino final el río. La naturaleza de estos vertimientos es eminentemente fecal y se vierten diariamente al río. Esta situación podría justificar la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en las tres estaciones de muestreo evaluadas en este río, en las que además, las concentraciones de ambos indicadores estuvieron siempre por encima de los valores límites establecidos en las normas (Figura 3).

Por otra parte, las actividades económicas que se desarrollan en el área también contribuyen a la degradación de la calidad de las aguas del río. Al norte de la Cuenca y coincidiendo con los Consejos Populares de San Agustín, Versalles-La Coronela, Siboney y Cubanacán, se desarrolló toda una infraestructura científico-productiva que se caracteriza en la actualidad por realizar importantes estudios en el campo de la biotecnología, la bioquímica y la microbiología. Dichas actividades económicas, si bien no

son tan contaminantes como las encontradas en la periferia del área urbana, también influyen en la problemática ambiental de la cuenca.

Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con los obtenidos por Prats *et al.* (2006) en un estudio sobre la calidad microbiológica de las aguas de este río en varios puntos de muestreo ubicados en sus últimos 5 km. Sin embargo, no existen informes más recientes sobre la calidad bacteriológica de las aguas de este río capitalino con los que se puedan comparar los resultados obtenidos en la presente investigación.

### **Río Luyanó**

La cuenca del río Luyanó abarca zonas de cinco territorios: los municipios Habana Vieja, Regla, 10 de Octubre, Arroyo Naranjo y San Miguel del Padrón; de los cuales los tres últimos son los de mayor importancia en la cuenca, tanto por su área, como por el aporte de carga contaminante que realizan al río. Los tres puntos evaluados en la presente investigación pertenecen al municipio San Miguel del Padrón. Este municipio posee diversos problemas, que van desde el estado deficiente de las redes de alcantarillado, la descarga de aguas residuales urbano-industriales a los cuerpos de agua sin tratamiento previo o inadecuado, hasta el vertimiento de desechos sólidos directamente al río por la indisciplina social de determinados sectores de la población (Jiménez, 2007; Periles, 2006). Estos problemas marcan el punto de partida de la degradación de la calidad de las aguas de este río y justifican los resultados obtenidos en la presente investigación.

El punto ubicado en Vía Blanca (L1) se destaca como el más contaminado de los tres evaluados. La estación L1 es la que se encuentra más cercana a la bahía y en la misma se describen varios vertimientos de origen doméstico que contribuyen directamente a la elevada carga contaminante microbiana presente en este punto. En un estudio realizado por Jiménez (2007) se determinó que el tramo más contaminado del río Luyanó estaba comprendido entre el puente Alcoy (ubicado en Virgen del Camino) y la desembocadura, tramo donde se ubica este punto de muestreo.

El punto L2 (Calle Mayor) se encuentra ubicado a cinco metros al norte del puente de la calle Mayor del reparto La Rosalía, de San Miguel del Padrón. En este punto se ubica una zona industrial desarticulada que se utiliza como almacén. En la dirección opuesta se desarrolla la zona residencial, la cual ejerce una gran influencia negativa sobre el río,

pues desde la misma se realizan vertimientos continuos que contribuyen con la carga microbiana contaminante en este punto.

La estación L3 (La Oncena) está localizada a 17 m aguas abajo de la intersección del arroyo Guachinango con el sistema Hondo-Barcelona presenta características similares a los puntos anteriores en cuanto a topografía y orientación del cauce con respecto al plano de inundación. En esta estación de muestreo también se observan vertimientos de origen doméstico provenientes de un asentamiento poblacional (Barrio Central), que unidos a los aportes que se realizan por el escurrimiento natural en el período de lluvias, contribuyen de manera directa con el deterioro de la calidad de las aguas de este tramo.

Los principales trabajos de investigación que se han realizado en la cuenca del río Luyanó enfocan sus objetivos a la contaminación química de este cauce fluvial (Periles, 2006; Jiménez, 2007; Valcárcel *et al.*, 2010). Sin embargo, no se informan estudios desde el punto de vista microbiológico en estas investigaciones, por lo que no ha sido posible comparar los resultados obtenidos en la presente investigación e indican su carácter novedoso para el río Luyanó.

Los resultados del presente estudio ofrecen datos actualizados sobre la calidad de las aguas de estos tres ríos capitalinos y constituyen un primer paso para la búsqueda de medidas que permitan reducir la contaminación fecal de sus aguas y así minimizar el riesgo que representa el uso de ellas por la población que vive en su entorno y que las utilizan en diferentes actividades.

#### **4.1.3. Comparación de las concentraciones de coliformes termotolerantes y *E. coli* entre el período lluvioso y poco lluvioso en los tres ecosistemas evaluados.**

La influencia de las precipitaciones es otro factor importante a considerar cuando se realiza un análisis de la calidad microbiológica de un ecosistema dulceacuícola (Shehane *et al.*, 2005). En Cuba, los meses de Mayo a Octubre (período lluvioso) se caracterizan por presentar altos acumulados de precipitaciones con respecto a los meses de Noviembre a Abril, correspondientes al período poco lluvioso.

Existen diversos informes que coinciden en que las precipitaciones tienen un aporte negativo en la calidad bacteriológica de las aguas, y esto se debe en gran parte a las escorrentías, las cuales pueden arrastrar heces de animales y/o humanas con un alto



contenido de bacterias patógenas o también a la infiltración de aguas residuales (Llip *et al.*, 2001; Boehm *et al.*, 2002).

Bezuidenhout *et al.* (2002) observaron un incremento en los conteos bacterianos asociados a la temperatura del agua y a la época de lluvia en el río Mhlathuze en Sudáfrica. Por su parte, Emiliani y González (1998) asociaron el aumento de coliformes termotolerantes al nivel hidrométrico en la Laguna Bedetti, Santa Fé (Argentina), el cual constituyó un indicador de las fuentes dispersas de contaminación, especialmente durante el período de lluvia.

Sin embargo, las mayores concentraciones de microorganismos indicadores, en el presente trabajo, se presentaron en el período poco lluvioso, fenómeno que se observó en todas las estaciones de muestreo de los tres ecosistemas evaluados y fue un comportamiento contrario a lo esperado (Figuras 2, 3 y 4).

Algunos autores (Shehane *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2005; Crowther *et al.*, 2001) coinciden en plantear que durante el período poco lluvioso disminuye el caudal de los ecosistemas acuáticos por las pocas precipitaciones durante este período, lo cual contribuye a una escasa dilución de las aguas residuales que llegan a estos ecosistemas. Por otra parte, los años 2008, 2009 y 2010 (período de estudio) presentaron un déficit de precipitaciones de moderados a extremos en casi todo el país, resultado del intenso evento de sequía que estuvo influyendo sobre Cuba en los últimos años, y la ciudad de La Habana fue una de las provincias más afectadas (Ballester y Rubiera, 2008; 2009; 2010). Ambos aspectos pueden haber contribuido a que las concentraciones de los microorganismos indicadores en los tres ríos evaluados fueran más elevadas durante el período poco lluvioso.

Las estaciones A3, Q3 y L1 en los ríos Almendares, Quibú y Luyanó, respectivamente fueron las que mayores concentraciones de coliformes termotolerantes y *E. coli* durante el período poco lluvioso, lo que estuvo en correspondencia con los resultados obtenidos al analizar las concentraciones de estos indicadores durante los años evaluados, en cuyo análisis estas estaciones fueron también las que presentaron las mayores concentraciones de microorganismos indicadores (Figuras 2, 3 y 4).

En esta investigación, las precipitaciones no constituyeron un factor determinante en el incremento de las concentraciones de los microorganismos indicadores *E. coli* y

coliformes termotolerantes en ninguno de los tres ecosistemas evaluados, sin embargo, se demostró que son un factor que debe tomarse en consideración en este tipo de estudios.

Autores como Emiliani y García (2003) recomiendan evaluar la calidad bacteriológica de las aguas naturales en ambientes urbanos con el desarrollo de modelos predictivos con diferentes variables como la concentración de *Escherichia coli*, lluvia, temperatura, pH y la influencia de El niño-Oscilación Sur. Estos modelos permitirían elaborar acciones preventivas y evitar riesgos a la salud anterior a un evento desfavorable. En trabajos realizados en aguas costeras con fines recreativos se observó que cuando las tormentas con acumulados de lluvias son superiores a los 6 mm, los valores de calidad bacteriológica superaban el estándar para coliformes y enterococos (Ackerman y Weisberg, 2003).

Los resultados obtenidos demuestran que para la evaluación de la calidad de un ecosistema no solo será importante considerar las concentraciones de los microorganismos indicadores, sino también deberán tenerse en cuenta otros factores que pueden incrementar o disminuir las concentraciones de estos en el ecosistema.

#### **4.4. Correlación entre las concentraciones de *E. coli* y coliformes termotolerantes**

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, de sus siglas en inglés), propuso establecer como base de calidad del agua un nuevo criterio sobre la base de las concentraciones de *E. coli*. Este nuevo criterio expresa que el 63% de la concentración de los coliformes termotolerantes corresponde a *E. coli* y que de esta forma se pueden proveer niveles equivalentes de protección contra patógenos presentes en las aguas (USEPA, 2002). De esta forma la posibilidad de establecer una correlación entre las concentraciones de coliformes termotolerantes y *E. coli* brinda un criterio mucho más confiable sobre la calidad del agua.

La correlación positiva lineal encontrada en la presente investigación entre las concentraciones de los coliformes termotolerantes y de *E. coli* en los tres ríos permite afirmar que ambas variables están fuertemente relacionadas, por lo que cualquiera de estos indicadores podría haber sido utilizado para la evaluación de la calidad microbiológica de estos ríos durante los años 2008, 2009 y 2010.

El grupo de los coliformes termotolerantes ha mostrado ser un indicador más real de contaminación fecal, aunque algunos estudios demuestran que los coliformes termotolerantes, al igual que los coliformes totales, pueden ser parte de la microbiota ambiental en ambiente acuáticos tropicales, lo cual implica que su uso como indicadores de contaminación fecal puede ser de valor limitado en estas regiones del mundo (Bonadonna *et al.*, 2007; Kloot *et al.*, 2006; Lucena *et al.*, 2004;). Sin embargo, las normas nacionales e internacionales (NC 22, 1999; WHO, 2003; WHO, 2009; APHA, 1998; AFNOR, 2001) se han elaborado en función de estos indicadores, por lo que hasta el momento son los que se emplean en la evaluación de la calidad microbiológica de los ecosistemas acuáticos superficiales y el agua potable incluso en nuestro país.

Por definición, los coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* están relacionados entre sí, pues uno está incluido en el otro, por lo que las concentraciones de estos microorganismos en ecosistemas acuáticos contaminados pueden presentar una variación lineal. Sin embargo, no siempre sucede esto, ya que los valores de estos indicadores dependen de varios factores como son el escurrimiento de los suelos, los vertimientos que se realizan a estos cuerpos de agua, así como su naturaleza y la frecuencia con que se realizan los vertimientos.

El índice de correlación de Pearson se utiliza para variables cuantitativas y permite medir el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente. Un valor del coeficiente de Pearson cercano a uno indica que las dos variables evaluadas presentan una correlación positiva, o sea, que ambas variables están directamente relacionadas como es en el caso analizado, lo que permite considerar que la determinación de cualquiera de estos microorganismos indicadores puede emplearse como criterio de calidad microbiológica en los ecosistemas contaminados evaluados.

#### **4.5. Fuentes contaminantes de origen doméstico en los tres ecosistemas acuáticos evaluados**

Los vertimientos de origen doméstico constituyen una de las principales fuentes de contaminación fecal de los ecosistemas acuáticos superficiales en el mundo (Abdelzaher, 2010). En los ríos de La Habana, particularmente los ríos Almendares, Quibú y Luyanó, se pudo comprobar que este tipo de vertimientos tenía gran contribución a la

contaminación de estos cuerpos de agua, ya que en un total de km de ríos se encontraron 25 vertimientos domésticos.

En los últimos diez años se ha observado en La Habana un crecimiento de su población, influido sobre todo por la migración hacia la capital de personas de otras provincias. Por este motivo, la población urbana no conectada a servicios cloacales se ha incrementado en la última década, lo que ha creado situaciones ambientales de alta vulnerabilidad. Este hecho, unido a la falta de un control estricto sobre las condiciones higiénico-sanitarias y arquitectónicas relacionadas con la construcción de viviendas, ha motivado que muchas áreas aledañas a los ríos de la capital se hayan convertido en zonas casi marginales y de alta densidad poblacional, como se pudo constatar en la presente investigación.

De los vertimientos que se realizan al río Almendares se deben destacar los que se realizan al arroyo Paila por parte del laboratorio “Reinaldo Gutiérrez” (Figura 5). Este laboratorio incorpora a las aguas de este afluente diferentes compuestos químicos provenientes de sus producciones y además vierte también sus aguas albañales a este arroyo. El laboratorio se ubica en las riveras en la estación de muestreo A3 (Paila), la cual resultó la más contaminada de las evaluadas en el río Almendares en la presente investigación. Durante los recorridos realizados se pudo constatar que este afluente recibe también vertimientos de aguas albañales provenientes de viviendas ubicadas en sus márgenes (Tabla 8), lo que contribuye aún más con la contaminación fecal en este punto.

En el río Quibú, como puede apreciarse en las fotografías (Figura 6), los principales vertimientos que se realizan son de naturaleza albañal, que provienen, fundamentalmente, de viviendas de las zonas urbanas que atraviesa este río. Las descargas que se realizan a este ecosistema presentaban las siguientes características: aguas turbias, malolientes, en su mayoría con un alto contenido de heces fecales y observables a simple vista y en ocasiones con gran cantidad de residuos sólidos suspendidos.

Además se pudo constatar durante los recorridos que las viviendas desde las que se realizaban las descargas, en su mayoría pertenecían a familias con bajos recursos económicos, generalmente de otras provincias del país, que han establecido su residencia en las orillas de estos ríos donde encontraron espacio para realizar estas

construcciones. Estas viviendas no cuentan con una infraestructura adecuada para la evacuación de sus aguas residuales, ni se encuentran conectadas al alcantarillado público, lo que motiva que las aguas residuales que se generan se viertan directamente a las aguas del río Quibú. Esta situación se observó con mayor frecuencia en la comunidad Los Pocitos del municipio La Lisa, donde se ubica el punto Q3, uno de los tres ubicados en el río Quibú.

En los cinco kilómetros evaluados del río Luyanó se observaron también muchos vertimientos de origen doméstico provenientes de viviendas de varios repartos del municipio San Miguel del Padrón, municipio en el que se ubican los tres puntos de muestreo evaluados en este río. Se detectaron un total de ocho vertimientos de naturaleza albañal (Tabla 8), provenientes de diferentes fuentes entre las que sobresalieron las realizadas desde emisarios del alcantarillado que recogen parte de las aguas residuales del municipio Diez de Octubre, específicamente de la zona de Luyanó y del municipio San Miguel del Padrón en la zona de la Virgen del Camino. También se observaron descargas provenientes de corrales que se utilizan para la cría de animales de corral como pollos, cerdos y carneros (Figura 7) y vertimientos de aguas residuales provenientes de viviendas que se ubican en las riberas del río, sobre todo en las zonas cercanas a los puntos L1 (Vía Blanca) y L2 (calle Mayor).

Las secuelas de todos estos vertimientos no pueden presumirse con exactitud y los daños que ocasionan al ecosistema son difíciles de reparar debido a la constancia con que se realizan al río. Nuestro país muestra preocupación ante la realidad y la gravedad del deterioro del ambiente, de modo tal que su política ambiental internacional se traza y desarrolla bajo los principios aprobados en la Cumbre de Río/92. Por esta razón, la identificación y el reconocimiento de la vulnerabilidad de los diferentes espacios naturales que forman el territorio de la provincia como respuesta a los efectos y las consecuencias de esos cambios, constituye un elemento decisivo en la planificación y gestión ambiental y territorial. Estos resultados son de importancia para la delegación de La Habana del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, encargados del control de la contaminación del territorio.

La situación que presentan los ecosistemas acuáticos superficiales de la Habana constituye un ejemplo claro de los problemas ambientales que sufre la provincia y

demuestran que los vertimientos de origen doméstico constituyen una de las principales fuentes de contaminación de estos ecosistemas. Por ello, contar con la ubicación de vertimientos de este tipo constituye un punto de partida para la toma de medidas que permitan la recuperación paulatina de la calidad de las aguas de estos ríos y brinda información importante a las autoridades de la provincia, ya que no cuenta con un levantamiento previo de los principales sitios donde se realizan descargas arbitrarias de esta naturaleza a estos ríos y no se conoce si los mismos han incrementado o disminuido en el tiempo, lo que ayudaría a evaluar las medidas adoptadas por el gobierno provincial para disminuir esta contaminación.

#### **4.6. Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó**

##### **4.6.1. Aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli***

La especie *E. coli* se considera el microorganismo indicador de contaminación fecal ideal (Edberg *et al.*, 2000). Sin embargo, cada día son más los brotes diarreicos asociados al consumo de agua potable y a la ingestión accidental de aguas recreativas contaminadas con cepas patógenas de este microorganismo (Hunter, 2003; Medina *et al.*, 2010a; Medina *et al.*, 2010b).

Contar con una metodología que facilite el aislamiento e identificación rápida de las cepas de esta especie a partir de muestras de agua dulce es una gran ventaja, así como un criterio más para la evaluación de la calidad microbiológica de ecosistemas acuáticos contaminados en climas tropicales.

El medio agar Chromocult para coliformes empleado en la presente investigación para el aislamiento diferencial de las cepas de *E. coli* a partir de las muestras de agua, se considera como uno de los medios de cultivo cromogénicos más confiables empleados para la enumeración y aislamiento de microorganismos de origen fecal a partir de muestras de agua en climas templados, donde se ha utilizado este medio con mucha frecuencia (Farnleitner *et al.*, 2001; George *et al.*, 2001).

Sin embargo, en climas tropicales el empleo de este medio de cultivo es más limitado. Maheux *et al.* (2008) usaron el agar Chromocult en un estudio realizado en Jamaica y lograron solo una especificidad del 79,9% para *E. coli*. Por su parte, Byamukama *et al.*

(2000) en investigaciones realizadas en Uganda determinaron la contaminación de diferentes sistemas acuáticos de este país de clima tropical, entre ellos, el Lago Victoria. Estos autores emplearon también el medio de cultivo agar Chromocult para coliformes para la cuantificación de *E. coli* y obtuvieron valores de especificidad superiores al 90%, con los cuales se corresponden los resultados obtenidos en la presente investigación.

Desde el punto de vista práctico, el trabajo con algunos medios cromogénicos puede resultar engorroso, ya que son medios que permiten la cuantificación simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli*, como es el caso del agar Chromocult para coliformes, y esto se traduce en una mezcla de colores en la superficie del medio. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el medio agar Chromocult para coliformes, a pesar de estos inconvenientes, puede emplearse en los análisis de evaluación de la calidad de las aguas u otros estudios relacionados con los microorganismos indicadores de contaminación fecal, permitiendo fácilmente la identificación de ambos tipos de bacterias por su coloración.

Esto constituye un resultado compatible con las nuevas recomendaciones de la OMS de 1993 para la evaluación de la calidad bacteriológica del agua potable donde se sugiere la determinación individual de *E. coli* y de coliformes termotolerantes como indicadores de contaminación fecal y elimina a los coliformes totales por su origen no fecal. Por tanto, contar con un medio de cultivo que permita la cuantificación e identificación presuntiva de esta bacteria a partir de muestras de agua, en climas tropicales como el de Cuba, representa una ventaja para los análisis de calidad de las aguas.

El porcentaje de falsos positivos en la selección de *E. coli* fue bajo (6,2%) lo que favoreció y agilizó el trabajo de identificación de los aislados obtenidos de las muestras de agua. Trabajos realizados por Pisciotta *et al.* (2002) y Chao (2006) en ambientes tropicales mostraron porcentajes superiores de falsos positivos (27,3% y 36,4% respectivamente) al emplear los medios cromogénicos Chromocult para coliformes y Colilert-18-Quanti-Tray.

En el presente trabajo los falsos positivos correspondieron a especies de dos géneros bacterianos que también se han aislado de ecosistemas acuáticos contaminados. El género *Citrobacter* se informa frecuentemente en diferentes estudios realizados en aguas tropicales contaminadas y no contaminadas (Vilanova *et al.* 2004). De manera similar, 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 aislamientos identificados, mientras que *Citrobacter* representó entre el 20-50 % del total (Mc Lellan *et al.*, 2001).

La otra especie identificada entre los falsos positivos (*Leclercia adecarboxylata*) se describió por primera vez en 1962 como *Escherichia adecarboxylata*. Esta especie, que también se incluye en la familia Enterobacteriaceae se encuentra ampliamente distribuída en la naturaleza y puede aislarse de alimentos, agua y otras fuentes ambientales, así como de muestras clínicas como sangre, heces y otras. Las especies del género *Leclercia* pueden identificarse erróneamente como *E. coli*, debido a que ambas especies comparten características bioquímicas similares, por lo que se debe tener cuidado en la identificación cuando no se realiza detallada de las cepas (Stock *et al.*, 2004; Mazzariol *et al.*, 2003).

#### **4.6.2. Serotipificación**

La serotipificación es uno de los métodos más comúnmente utilizados para la caracterización de aislados de *E. coli* de cualquier origen. En la presente investigación se encontró una gran diversidad serológica (41 serogrupos y 57 serotipos diferentes) entre las 113 cepas de *Escherichia coli* aisladas de los tres ecosistemas dulceacuícolas evaluados.

Las cepas de *E. coli* aisladas de los ecosistemas acuáticos se interpretan como resultado de contaminación fecal de estos ambientes, ya que *Escherichia coli* es uno de los principales miembros de la microbiota normal del tracto gastrointestinal. 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; Lawrence y Ochman, 1998).

Bettelheim *et al.* (1972) 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 una importante fuente de variabilidad, desde el punto de vista serológico, para 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 al origen fecal que tienen estas cepas.

Otro aspecto a considerar en la diversidad serológica de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de estos ecosistemas son los vertimientos de origen animal que también se realizan en estos ríos y que constituyen importantes fuentes de contaminación en los ecosistemas acuáticos (Ishii y Sadowsky, 2008; Cocchi *et al.*, 2007).

En estudios en los que se ha analizado la presencia de serogrupos de *E. coli* en diferentes especies de animales domésticos y de corral (gatos, perros, vacas, ovejas, cabras, cerdos y pollos) (Vu-Khac *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2006) se ha encontrado que estos animales son reservorios de un elevado número de serotipos diferentes de *E. coli*. Los serogrupos O2, O70, O88 y O111, encontrados entre las cepas evaluadas en el presente trabajo, se han aislado también de aves, ganado bovino, ovino, porcino y animales domésticos (Shpigel *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2006). Se debe destacar fue frecuente observar durante los recorridos realizados en las orillas de los tres ríos evaluados, corrales para la cría de animales de corral (cerdos, pollos, carneros y caballos) y se observó que las heces de estos se vertían directamente al río después de realizar la limpieza de los criaderos.

A pesar de la diversidad serológica encontrada, aproximadamente el 50% de las cepas se agruparon solo en siete serogrupos y siete serotipos. Estos resultados sugieren que probablemente las cepas con estos serogrupos y serotipos corresponden con las “cepas predominantes” dentro de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de la parte de la población de La Habana cuyos residuos domésticos vierte a estos ríos, o de los animales cuyos desechos llegan también a estos ecosistemas. No obstante, no existen publicaciones en Cuba sobre estudios de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de individuos sanos con los que se puedan comparar estos resultados para poder afirmar esta hipótesis.

Dentro de estos serogrupos predominantes los de mayor frecuencia fueron O8 (3 cepas) y O174 (16 cepas), ya que se aislaron en los tres ríos estudiados y se encontraron en tres o más cepas. Estudios realizados en Francia, Alemania, Finlandia y Dinamarca señalaron que los serogrupos O174 y O8 se han aislado con frecuencia de las heces de seres humanos y animales (Pradel *et al.*, 2000; Heinikainen *et al.*, 2007; Tarr *et al.*, 2008). Scheutz *et al.*, 2004, en un estudio realizado en Alemania durante el año 1999 encontraron que el 1,7% de las cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicas aisladas de seres humanos y caracterizadas por el Centro Nacional de Referencia en Wernigerode correspondían al serogrupo O174 y que el 3% de las cepas correspondían al serogrupo O8, aunque en este estudio estos serogrupos se combinaron con antígenos flagelares diferentes a los que presentaron estos serogrupos en la presente investigación.

Sobre el serotipo O174:H32 encontrado en el presente estudio, no se encontró ningún informe en la literatura asociado a infecciones en el ser humano o animales. Sin embargo, estudios realizados en centros de referencia indican que los animales domésticos constituyen uno de los reservorios de cepas de *E. coli* con este serotipo (Beutin *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2004) lo cual habla del origen fecal de estas cepas y justificaría la presencia y abundancia de este serotipo en los ecosistemas evaluados.

Por otra parte, la presencia de más de un 20% de cepas no serotificables es también un reflejo de la contaminación que presentan estos ecosistemas. Las cepas de *E. coli* no serotificables se asocian, por lo general, con cepas de la microbiota normal del tracto gastrointestinal humano y otros mamíferos que poseen a estas cepas como microbiota normal. Las cepas de la microbiota normal están perfectamente adaptadas a la coexistencia con su hospedero, raramente son patógenas y no desarrollan sintomatología en dicho hospedero, excepto en casos de inmunodepresión (Moreno *et al.*, 2008).

Sin embargo, estas cepas son clínicamente tan importantes como aquellas que son serotificables y ubicadas en alguna de las categorías patógenas de esta especie, ya que como células competentes que son, tienen la capacidad de adquirir los factores de virulencia necesarios para causar una enfermedad infecciosa, a través de los mecanismos de transferencia genética que pueden tener lugar en el ambiente. Además, las cepas no serotificables pueden corresponder a cepas autóctonas, por tanto es necesario la

búsqueda de nuevos antisueros que permitan ampliar el esquema de serotificación existente y que posibilitarían la inclusión de nuevos serogrupos/serotipos de esta especie.

El origen de estas cepas lo constituyen fundamentalmente los vertimientos de aguas albañales que llegan a estos ecosistemas debido al alto contenido de heces fecales que presentan esas aguas residuales. Esto permite explicar porqué el río Luyanó fue el ecosistema en el que se encontraron mayor cantidad de cepas no tipificables, ya que de los tres ecosistemas evaluados este río fue en el que se encontraron mayor número de vertimientos/km recorrido (1,6 V/km), lo que favorece la llegada de cepas de *E. coli* de origen fecal.

#### **4.6.2.1. Análisis de las cepas patógenas por su serotipo**

El grupo de *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC) fue el principal patotipo encontrado entre las cepas de *Escherichia coli* caracterizadas (Rodríguez-Angeles, 2002; Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas STEC pertenecen a un amplio rango de serotipos y se han asociado a diarreas con sangre o sin ella y cuadros de colitis hemorrágica, que pueden evolucionar a Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Ochoa *et al.*, 2009a; Rivas *et al.*, 2006). La mayoría de los brotes originados por cepas STEC se han asociado al consumo de carne de vacuno, principalmente poco cocinada (Narváez *et al.*, 2007). Sin embargo, cada día son más los brotes relacionados con el consumo de agua contaminada con estos patotipos, tanto agua de consumo, como aguas con fines recreativos (Olsen *et al.*, 2002; Licence *et al.*, 2001; McCall *et al.*, 2010). También se ha informado de brotes diarreicos causados por cepas de este grupo patógeno asociados con el contacto de aguas de piscinas (Friedman *et al.*, 1999; Paunio *et al.*, 1999; Wade *et al.*, 2008; Hildebrand *et al.*, 1996), lagos naturales u otras aguas superficiales (Hamelin *et al.*, 2006; Yoder *et al.*, 2008).

Hoshina *et al.* (2001), Smith *et al.* (2009), Ram *et al.* (2009) afirman que las cepas STEC son uno de los patotipos de *E. coli* que con mayor frecuencia se aíslan de ecosistemas acuáticos contaminados, debido a su origen, sobre todo aquellas que se ubican dentro del grupo STEC no-O157, las cuales se han aislado de las heces de animales y de seres humanos. En la presente investigación ninguna cepa presentó el serotipo O157:H7, por lo que todas las cepas STEC encontradas se ubican en el grupo de las STEC no-O157. En numerosos casos y brotes de SUH se identificó como fuente de la infección a las aguas

superficiales y el suelo de campos donde había animales portadores de STEC no- O157 (Hoshina *et al.*, 2001; Halabi *et al.*, 2008; Fremaux *et al.*, 2008).

El segundo patotipo más frecuente entre los aislados evaluados fue *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Este grupo patógeno constituye la causa principal de diarrea en niños pequeños en países en vías de desarrollo (Boschi-Pinto *et al.*, 2008). La contaminación fecal de alimentos y agua potable es la principal vía de infección para el humano. En la literatura se han descrito diversos brotes diarreicos asociados a la ingestión de agua contaminada con cepas de este grupo patógeno (Hunter, 2003). La presencia de este patotipo en las aguas de los ecosistemas evaluados constituye un riesgo para la población de la ciudad, debido a la vía de transmisión que tiene este patógeno. El grupo más vulnerable lo constituyen los niños y se conoce que en los ríos Almendares y Luyanó muchos niños y jóvenes de la ciudad acostumbran realizar actividades recreativas sobre todo en el período de verano.

Las categorías *E. coli* enteropatogénica y *E. coli* enteroagregativa (también encontradas en la presente investigación), son grupos patógenos de esta especie que constituyen una importante causa de enfermedad diarreica en niños (Harrington *et al.*, 2006). La transmisión de estos grupos patógenos se realiza fundamentalmente de persona a persona por la vía fecal-oral, por lo que no se encontraron informes en la literatura de brotes causados por estos patotipos a través de aguas contaminadas.

Aunque las cepas intestinales son las que más se informan en los ambientes acuáticos, las cepas de *E. coli* extraintestinales comienzan a cobrar importancia en estos ecosistemas. En términos de morbilidad y mortalidad, ECPEX tienen un gran impacto en la salud pública, con un costo económico de varios miles de millones de dólares al año (Russo y Johnson, 2003).

La presencia de cepas ECPEX en ecosistemas acuáticos está poco documentada, ya que las aguas contaminadas no constituyen la principal vía de transmisión de estos patotipos. En el presente trabajo, de acuerdo a su serología, solo se encontraron cepas de *E. coli* extraintestinales correspondientes a cepas uropatogénicas. Las cepas de *E. coli* uropatogénicas son responsables del 70-90% de los 7 millones de casos de cistitis aguda y de los 250 000 casos de pielonefritis que se informan anualmente en los Estados Unidos (Johnson y Russo *et al.*, 2002).

El análisis de la incidencia de estos patotipos como agentes causales de infecciones en el ser humano se efectúa por lo general a partir de estudios clínicos realizados en ambientes hospitalarios y la comunidad. En la última década se han comenzado a estudiar algunos patotipos con interés veterinario y otros como patógenos transmitidos por alimentos (Smith *et al.*, 2007). Sin embargo, la búsqueda de estos patotipos en agua prácticamente no se realiza.

La presencia de estos grupos patógenos de *E. coli* en estos ecosistemas acuáticos es un indicativo de la deficiente calidad de las aguas de estos ecosistemas e implica un riesgo para la salud de las personas que se pongan en contacto con aguas contaminadas. Los resultados obtenidos constituyen el primer informe de la presencia de estos grupos de cepas patógenas de *E. coli* en ecosistemas acuáticos la ciudad de La Habana, de Cuba y del Caribe.

#### **4.6.3. Análisis de los genes de virulencia**

La búsqueda de los genes de virulencia permitió definir y/o confirmar el patotipo de las cepas de *E. coli* que habían sido previamente clasificadas dentro de alguno de los grupos patógenos de la especie según su serogrupo/serotipo.

Se ha informado que en el medio acuático se favorecen los mecanismos de recombinación entre las bacterias presentes en estos ecosistemas, sobre todo a través de la vía de transferencia horizontal, proceso que genera genomas bacterianos que consisten en mosaicos de genes con diferentes historias evolutivas (Souza *et al.*, 2001).

Se estima que en *Escherichia coli* la tasa de transferencia es de 16 kb cada millón de años (Souza *et al.*, 2001). El contenido promedio de GC en *E. coli* es del 50,8%, pero un número importante de genes (17% del genoma de *E. coli* K12 y 26% de las cepas O157:H7) contienen diferentes proporciones de GC y un índice de uso de codones muy diferente al del resto del genoma. Por esta razón, se ha sugerido que estos genes provenían de otros linajes bacterianos y fueron adquiridos recientemente por transferencia horizontal por *E. coli*. Entre estos genes con contenido GC diferente se destacan las llamadas "islas de patogenicidad" (regiones donde se encuentran varios genes que confieren capacidades patógenas) y elementos extracromosomales como los plásmidos (Lawrence y Ochman, 1998).

Los genes que codifican para las toxinas termoestable (ST, de sus siglas en inglés) y termolábil (LT, de sus siglas en inglés) se encuentran fundamentalmente en plásmidos, aunque también se han encontrado, en algunos casos, en transposones (Barletta *et al.*, 2009; Nataro y Kaper, 1998). Por su parte, los genes estructurales para *stx1* y *stx2* se encuentran en bacteriófagos tipo Lambda que se insertan lisogénicamente en el cromosoma de la bacteria (Nataro y Kaper, 1998). Teniendo en cuenta estos aspectos, las cepas de *E. coli* ambientales pueden adquirir y/o transferir, con relativa facilidad, a través de transferencia horizontal, genes que le confieran resistencia a antibióticos o factores de virulencia como los que hemos buscado en la presente investigación.

De los descritos entre las cepas diarreogénicas de *E. coli*, los patotipos ETEC y STEC son los que con mayor frecuencia se han aislado de ecosistemas acuáticos y aguas de bebida contaminadas con microorganismos de origen fecal (Ram *et al.*, 2008; 2007; Orsi *et al.*, 2007; Begum *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo informado por estos autores, ya que el 75% de las cepas que amplificaron para algún gen de virulencia lo hizo para los genes *st*, *lt*, *stx1* y *stx2* que codifican para las toxinas ST, LT, Stx1 y Stx2, principales factores de virulencia presentes en cepas de los grupos patógenos ETEC y STEC.

La importancia de estos patotipos en ecosistemas acuáticos se hace cada vez mayor, sobre todo de las cepas productoras de toxina shiga. Diversos autores han planteado que los ambientes acuáticos constituyen importantes reservorios de microorganismos que portan el gen para la expresión de la toxina STX y en la última década se han incrementado los brotes diarreicos causados por consumo y/o contacto con aguas contaminadas con estas bacterias (Mauro y Koudelka, 2011). Autores como Muniesa *et al.* (2006), Blanch *et al.* (2003) y Loukiadis *et al.* (2006) coinciden que los vertimientos de aguas residuales de origen fecal son las principales fuentes de estos microorganismos, Esto condiciona que los fagos que codifican para el gen de esta toxina puedan persistir en estos ambientes y de esta forma integrarse al genoma de otras cepas de *E. coli* que no lo tengan o incluso al genoma de especies de otros géneros.

Además, se ha visto también que la adquisición de estos genes constituye una ventaja evolutiva en estos ecosistemas para las bacterias que los adquieran. Esta hipótesis ha sido recientemente explorada a través de experimentos *in vitro* con un modelo eucariótico

unicelular *Tetrahymena thermophyla*. En estos experimentos se evaluó el crecimiento y sobrevivencia de la población bacteriana presente en una muestra de agua y de una población de este protozoo en presencia de bacterias lisogénicas para los fagos que portaban los genes para las variantes de la exotoxina STX. Se observó que la población bacteriana mantenía su concentración a diferencia de la población protozoaria que disminuía considerablemente en el tiempo (Mauro y Koudelka, 2011).

En otro estudio realizado por Martins *et al.* (1992) en el que analizaron la presencia de genes de patogenicidad en cepas de *E. coli* aisladas de agua residual sin tratar y agua tratada mediante la técnica de la hibridación colonial, se consiguieron aislar solo tres cepas que presentaban secuencias homólogas al gen *stx<sub>2</sub>* de un total de 212 cepas analizadas en el agua tratada, mientras que en el agua sin tratar no obtuvieron ningún aislamiento de cepas de este tipo. Es importante destacar que se desconocen las características de los bacteriófagos lisogénicos en cepas aisladas del medio ambiente no asociadas a patogénesis, las cuales podrían constituir un reservorio importante de los genes *stx* para la emergencia en un futuro, de nuevos serotipos STEC virulentos.

La amplificación positiva para el gen *ial* resultó un resultado importante, ya que ninguna de las ocho cepas que amplificaron el gen pertenece a la categoría EIEC (según sus serotipos) en la que generalmente se busca este gen. Esta categoría es poco frecuente en América Latina, aunque se ha reportado en niños menores de 4 años afectados de Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) en México y otros países de América (Valdespino *et al.*, 1994; Medina *et al.*, 2010b). Asociado a agua potable contaminada sólo se ha informado un brote y data de hace más de 40 años (Lanyi *et al.*, 1959).

La poca prevalencia de este patotipo en aguas, puede estar influida por la escasa atención que se le dio a esta categoría y a su similitud, desde el punto de vista bioquímico y clínico, con el género *Shigella*. En un estudio realizado paralelamente en niños menores de 5 años afectados con EDA, el 11,5% presentaban en sus heces EIEC y, erróneamente se habían valorado como casos de shigelosis (Nigoyi, 2005). Algunos autores como Tsolis *et al.* (2008) y Echeita *et al.* (2011) consideran que el agua contaminada es el principal vehículo de transmisión de EIEC ya sea por consumo directo, o por su presencia en alimentos que son lavados o regados con agua contaminada con estas bacterias.

De su distribución epidemiológica, así como su prevalencia en ecosistemas acuáticos se conoce poco, ya que sólo se estudia la presencia de esta bacteria cuando aparecen brotes esporádicos en viajeros o brotes por consumo de alimentos o agua contaminada. Las aguas de los ecosistemas acuáticos evaluados en la presente investigación se emplean en muchos puntos de la ciudad para el riego de cultivos agrícolas, muchos de los cuales se consumen crudos como es el caso de los vegetales, por tanto la presencia de estas bacterias en las aguas de estos ríos implica un riesgo para todas aquellas personas que consuman los alimentos que se riegan o laven con las aguas del río Luyanó, ecosistema del que se aislaron las cepas con amplificación positiva para el gen *ial* en este trabajo.

La ausencia de los marcadores de virulencia *eaeA* y *bfpA* no permitió confirmar la clasificación de las tres cepas que desde el punto de vista serológico se ubicaron en la categoría de EPEC. Estos genes constituyen los principales factores de virulencia para las cepas EPEC típicas, aunque el gen también se encuentra en las cepas de *E. coli* enterohemorrágicas. Sin embargo, se han encontrado cepas atípicas de EPEC (aEPEC, de sus siglas en inglés) responsables de cuadros diarreicos en niños y adultos. Estas cepas solo poseen la isla de patogenicidad LEE pero no el plásmido de virulencia EAF, en donde se encuentran el gen *bfpA* (Tennant *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2010). Algunos autores han planteado que las cepas aEPEC pueden representar un subgrupo diferente dentro de las cepas patógenas de *E. coli* capaces de causar lesiones A/E (adherencia y eliminación) en el intestino provenientes de animales domésticos de donde se han aislado cepas de esta especie que no poseen el plásmido EAF (Hornitzky *et al.*, 2005). Estos planteamientos podrían justificar la presencia de estas cepas en los ecosistemas evaluados, en los cuales es frecuente observar vertimientos de heces animales provenientes de corrales y patios de tierra ubicados en las riberas de estos ríos.

Autores como Beutin *et al.*, 2004, Blanco *et al.*, 2004 y Ahmed *et al.*, 2011 describieron una asociación entre la infección por cepas STEC y la presencia del gen *eaeA*. Se han descrito casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico asociados a cepas LEE-negativas pertenecientes a los serotipos de *E. coli* O104:H21 y O113:H21, en Estados Unidos y Australia, respectivamente (Law, 2000; Paton *et al.*, 1999). La existencia de estas cepas sugiere la presencia de otros factores de virulencia implicados en la adherencia de las bacterias al epitelio intestinal. Además, se ha visto que la producción



de intimina puede no ser esencial para la patogénesis, ya que un número de casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico puede haber sido causado por STEC no-O157 negativos para *eaeA*. También se ha visto que el gen *eaeA* no representa un marcador de virulencia en las cepas aisladas del ganado porcino, ya que las cepas STEC causantes de la enfermedad edematosa del cerdo utilizan un mecanismo de adherencia diferente del utilizado por la mayoría de las cepas STEC, mediado por unas adhesinas fimbriadas denominadas F107, codificadas por el gen *fedA* (Perna *et al.*, 1998). La continua evolución de estos patógenos está provocada por la presión selectiva del sistema inmune del hospedero y del medio ambiente.

En Cuba, la mortalidad por EDA es mínima (Anuario Estadístico de Salud, 2011) y la morbilidad es comparable a los países desarrollados, tanto en atenciones médicas de los menores de cinco años como en los restantes grupos de edad. No obstante, la morbilidad por esta causa representó en el año en 2004 un total de 675 212 atenciones médicas para un índice de 5999.6 por 10<sup>5</sup> habitantes, lo cual la mantiene como una causa muy frecuente de demanda de atención en los servicios de salud (Coutin *et al.*, 2006). A pesar de la reducción gradual del número de consultas médicas por EDA en los últimos tres años, en el país se mantienen factores de riesgo importantes, muy vinculados a las condiciones de vida de las personas.

En un estudio realizado por Coutin *et al.* (2006) del total de casos encuestados que presentó diarreas, el 55% no accedió a solicitar los servicios de salud y el mayor porcentaje de enfermos que no acudió a solicitar asistencia médica, corresponde al estrato medianamente favorable (58,4%) (Hernández *et al.*, 2000). Este hecho merece una atención particular, ya que la parte de la población que no solicitó atención médica y no realizó tratamiento, corresponde precisamente a personas como las que tienen sus viviendas a las orillas de los ríos objeto de estudio en esta investigación. Esto sugiere que tal vez una parte de la población puede haber presentado eventuales cuadros diarreicos cuyo origen pueden ser las aguas contaminadas de estos ríos. Estos eventos no se registran en el sistema de salud porque los pacientes no acuden al médico, ya sea porque el cuadro diarreico cursa de manera autolimitada o porque se automedicaron y por tanto estas personas no asocian estos procesos infecciosos con el uso inadecuado de las aguas contaminadas de estos ríos.

Por tanto, el conocimiento de las diferentes combinaciones de los factores de virulencia en estas cepas es de gran importancia, porque de esta forma se puede interpretar mejor el conjunto de síntomas y signos que caracterizan los cuadros clínicos diarreicos. De hecho, se ha demostrado que al conocerse las asociaciones más virulentas, justifica y se comprende mejor la intensidad de los cuadros clínicos en pacientes enfermos con síndromes diarreicos agudos, criterios que sirven como una herramienta adicional al médico de asistencia, sobre todo si son personas que refieren vivir en condiciones económicas desfavorables y habitan cerca de estos ríos contaminados .

#### **4.6.3.1. Comparación entre la clasificación serológica y la clasificación mediante PCR para las cepas de *Escherichia coli* aisladas**

Se plantea que la determinación del grupo serológico sobre la base de los antígenos somático y flagelar (O:H) no es suficiente para identificar una cepa diarreogénica, porque este no siempre se correlaciona con la presencia de factores de virulencia específicos, tal como se observó en la presente investigación.

De las cepas de *E. coli* identificadas como cepas diarreogénicas por serología, solo el 8% presentaron alguno de los siete genes examinados. Este resultado es compatible con estudios previos realizados por Nishikawa *et al.* (2002) en Japón, en el que de un total de 229 cepas identificadas como enterovirulentas en base a sus antígenos O, sólo 40 (17,5%) fueron reconocidas como diarreogénicas. En otro estudio similar realizado también en Japón (Tamaki *et al.*, 2005) se evaluaron 1 130 cepas de *E. coli* procedentes de varios países del mundo caracterizadas como enterovirulentas en base a su antígeno O con el uso de antisueros comerciales. En este grupo de cepas sólo 263 (23,3%) presentaron alguno de los 6 genes patogénicos examinados (eae, stx, aggR, st, lt, ipaH). En el presente estudio, se encontró que los serogrupos que fueron clasificados dentro de las categorías STEC, ETEC y EPEC correspondían en alto porcentaje a cepas avirulentas. Por otro lado, los serogrupo O174 y O8 estaban asociados con dos patotipos diferentes: STEC, ETEC (para O174) y ETEC y EIEC (para O8). De manera similar, en otros estudios se ha informado que cepas identificadas como otras *E. coli* diarreogénicas pueden tener serotipos considerados como clásicos para otras categorías. Tal es el caso de estudios realizados con cepas EPEC (LLuque *et al.*, 2010), ETEC (Arias y Huguet, 2002), STEC (Jasinski *et al.*, 2007), EAEC y DAEC (Knutton *et al.*, 1991 y 1992). Por

tanto, dado que algunos serogrupos incluyen más de uno de los patotipos de *E. coli* diarreogénicas, la mayoría de las publicaciones recientes sugieren que la serotipificación como único método para la clasificación en patotipos no es suficiente. Sin embargo, podría ser útil y confiable para aquellos serotipos que corresponden a clonas (Campos *et al.*, 2004).

El alto porcentaje de cepas avirulentas, así como la presencia de genes en cepas con serotipos que no se incluyen en las categorías patógenas de *E. coli*, puede deberse al hecho de que muchos de los genes que codifican para los factores de virulencia analizados se encuentran en elementos genéticos móviles como bacteriófagos, plásmidos y transposones. Así, estas cepas podrían ser importantes para la emergencia de nuevos serotipos virulentos y de hecho, estas cepas podrían representar estadios intermedios en la emergencia de nuevos patógenos, que aflorarían como cepas patógenas con la adquisición de otros factores de virulencia. Dicho fenómeno de adquisición de genes de virulencia ya se ha evidenciado con la difusión de los genes *stx* entre una gran variedad de serotipos de *E. coli*, extendiéndose incluso, a otros géneros como *Citrobacter* y *Klebsiella*, que se encuentran también presentes en ecosistemas contaminados, ya que estos géneros forman parte de las bacterias coliformes (García , 2004).

Por tanto, *E. coli* puede transitar entre formas virulentas y avirulentas, mediante la adquisición o pérdida de genes de virulencia codificados en plásmidos presentes en sus hábitats primarios, lo cual hace a estas cepas indistinguibles de aquellas de la microbiota normal, sobre todo en ambientes naturales como los ecosistemas acuáticos (Ram *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2001) lo cual apoya los resultados obtenidos en la presente investigación.

#### **4.6.4. Análisis de los ensayos de adherencia en células HEp-2**

En todo proceso infeccioso causado por un microorganismo, el primer paso para que este tenga éxito es la adherencia. El ensayo de adherencia sobre células epiteliales HEp-2 se considera el estándar de oro dentro de las pruebas fenotípicas de diagnóstico para la identificación de *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC, de sus siglas en inglés), aunque también pueden identificarse *E. coli* de adherencia difusa (DAEC, de sus siglas en inglés) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC, de sus siglas en inglés) (Vidal *et al.*, 2007).

Los resultados de los ensayos de adherencia mostraron que el patrón de adherencia difusa (Figura 11) fue el más abundante entre las cepas de *E. coli* evaluadas. Este patrón es característico del grupo patógeno DAEC aunque también se ha descrito en cepas atípicas de EPEC.

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa se pueden aislar tanto de personas sanas como de personas con diarrea, siendo más importantes en niños de 4 a 5 años (Spano *et al.*, 2008). Aunque aún no se conoce todo sobre el mecanismo de patogenicidad de este patotipo, se caracterizó una fimbria de superficie, conocida como F1845, la cual está directamente involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido (Araujo *et al.*, 2007).

El fenómeno de adherencia en este patotipo está directamente relacionado con su patogenicidad. Al realizar ensayos *in vitro* en células CaCo y HEp-2, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo* (Gismero-Ordoñez *et al.*, 2002). No se han descrito brotes de diarrea causados por estas cepas relacionados con aguas contaminadas, sin embargo, la presencia de estas cepas en los ríos evaluados constituye una alerta de la deficiente calidad microbiológica que presentan las aguas de estos ríos y del riesgo para la salud que podría representar el uso inadecuado de las aguas de estos ecosistemas por la población capitalina.

Ninguna de las cepas evaluadas presentó el patrón de adherencia localizada típico sobre cultivos de células epiteliales que correspondería con cepas EPEC típicas. Sin embargo, las cepas EPEC atípicas (aEPEC) pueden poseer un patrón de adherencia semejante a la localizada, adherencia difusa o, en algunos casos, adherencia agregativa (Lacher *et al.*, 2007), patrones que se observaron en dos de las tres cepas de *E. coli* clasificadas dentro de la categoría EPEC caracterizadas en el presente trabajo. Por tanto, este resultado corrobora que las cepas EPEC aisladas en la presente investigación corresponden a cepas atípicas de esta categoría, ya que las mismas tampoco presentaron los genes de virulencia característicos de este patotipo, como se demostró en el acápite 4.6.3.

Las cepas que presentaron el patrón de adherencia agregativo se incluyen en la categoría patógena *Escherichia coli* enteroagregativa. La principal característica que distingue a EAEC es este patrón de adherencia y este grupo patógeno es uno de los más recientemente estudiados dentro de los grupos patógenos de la especie *E. coli*.

Las cepas de EAEC causan diarreas de larga duración principalmente en niños y viajeros de países del tercer mundo, pero también son una causa significativa de diarrea en Europa (Bai *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2006). Su reservorio es únicamente los seres humanos. Presentan un plásmido (pAA) que codifica para una adhesina fimbrial que es responsable del patrón de adherencia agregativa a las células HEP-2 y al epitelio intestinal.

Estas cepas han cobrado gran importancia en la clínica en los últimos tiempos, sobre todo después del brote que más casos de Síndrome urémico hemolítico (SUH) ha producido en el mundo hasta la fecha. Este brote tuvo lugar en Alemania en el año 2011, con más de 852 casos de SUH y 3469 casos de diarrea, en el que fallecieron 50 pacientes, incluidos 32 con SUH. La cepa responsable de este brote se cree que es una cepa nueva, probablemente de origen humano que ha emergido recientemente a partir de una cepa enteroagregativa (EAEC) del serotipo O104:H4 que ha adquirido un fago portador del gen *stx2a* a partir de una cepa STEC (Mora *et al.*, 2011). Es una cepa muy virulenta, que cuenta con un gran arsenal de genes de virulencia. Se plantea que su capacidad enteroagregativa le permite colonizar mejor el epitelio intestinal y además cuenta con un mecanismo que le permiten liberar mayor cantidad de la toxina STX2 variante a, además tiene por lo menos tres adhesinas (AAF/I, LPF-IpfAO26 e Iha), dos sideróforos (aerobactina y yersiniabactina) y tres tipos de proteasas SPATE (Pic, Sig A y SepA). La combinación de estos tres tipos de proteasas se da en muy pocas cepas (Mora *et al.*, 2011; Blanco *et al.*, 2011).

Este ejemplo demuestra la importancia de la detección de cepas de esta categoría en cualquier ambiente, ya que la circulación de cepas hipervirulentas como la responsable del brote en Alemania podría representar un serio problema para la salud pública.

En la presente investigación más del 60% de las cepas que presentaron uno de los dos patrones de adherencia descritos presentaban un serotipo descrito entre las cepas patógenas y el 28% amplificó para uno de los genes de virulencia evaluados. Por lo tanto,

esto demuestra que estas cepas, en un momento dado, pueden comportarse como patógenos primarios, capaces de causar enfermedad, y de adquirir factores de virulencia que no son característicos del grupo patógeno al que pertenecen.

#### **4.6.5. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *E. coli***

La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos es uno de los problemas más serios a los que se enfrentan hoy los sistemas de salud. El uso indiscriminado de los antibióticos en el tratamiento de infecciones, así como su empleo en la veterinaria con fines terapéuticos, profilácticos y como promotores del crecimiento ha contribuido al incremento de la resistencia bacteriana, tanto en la clínica como en el ambiente (Sánchez *et al.*, 2008; Laroche *et al.*, 2009; Ram *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2008).

Los ecosistemas acuáticos son uno de los más impactados con los desechos líquidos de la industria farmacéutica. Además continuamente también se vierten en ellos aguas residuales que contienen antibióticos provenientes de instituciones de salud y la comunidad. Esta situación ha influido directamente en la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos en estos ecosistemas (Edge *et al.*, 2005; Harakeh *et al.*, 2006; Ram *et al.*, 2007; Pignato *et al.*, 2009).

*Escherichia coli*, considerada el indicador de contaminación fecal por excelencia para la evaluación de la calidad en los ecosistemas acuáticos, es una de las bacterias que más resistencia ha desarrollado frente a los antimicrobianos en el ambiente. Cepas de *E. coli* resistentes a los antimicrobianos se han aislado en diferentes partes del mundo de aguas subterráneas (Mckeon *et al.*, 1995), ríos (Hamelin *et al.* 2007; Ram *et al.*, 2009) y lagos (Sayah *et al.*, 2005).

El porcentaje de resistencia de las cepas aisladas encontrado en la presente investigación se consideró bajo (23%) al compararlo con trabajos similares llevados a cabo en ecosistemas dulceacuícolas de otras partes del mundo. En investigaciones realizadas en cuerpos de agua de la India, Venezuela, China, Canadá y Turquía se han informado porcentajes superiores de resistencia frente a diferentes antimicrobianos, con valores por encima del 60% (Harakeh *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009, Lyautey *et al.*, 2010 y Toroolo y Dincer, 2008).

La no concordancia de los porcentajes obtenidos en estas investigaciones y la realizada en el presente trabajo, podría deberse a las diferencias de las políticas trazadas para la prescripción y el control de los antibióticos en cada país donde se llevaron a cabo estos trabajos. En Cuba desde 1998, mediante el Programa Nacional de Medicamentos se desarrollan estrategias para promover la prescripción y uso racional de los fármacos, con énfasis en algunos grupos terapéuticos, donde se destacan por su importancia los antibióticos (Cires, 2002).

La elevada susceptibilidad observada entre las cepas evaluadas en la presente investigación (77%) es similar a la hallada por Sossa (2000) en un estudio realizado con cepas aisladas a lo largo del río Biobío, Chile. El ecosistema evaluado por Soussa no presentaba altas concentraciones de antibióticos lo que este autor consideró el principal factor responsable de la elevada susceptibilidad (95%) hallada entre las cepas de este río. Esto podría ser lo que está sucediendo en los tres ecosistemas evaluados, en los cuales a pesar de recibir continuos vertimientos de aguas residuales, estas no tengan elevadas concentraciones de antibióticos que puedan ejercer una presión selectiva sobre los microorganismos que arriban a estos ecosistemas a través de estos vertimientos.

Sin embargo, aunque el porcentaje de resistencia encontrado fue inferior al informado por otros autores en diferentes partes del mundo, el 38,4% de las cepas resistentes encontradas en este trabajo pertenecen a uno de los seis grupos patógenos descritos para la especie *E. coli*, ya sea por su serotipo o por la presencia de genes de virulencia. La presencia de cepas patógenas de esta especie resistentes a los agentes antimicrobianos en los ecosistemas dulceacuícolas evaluados plantea un riesgo real, no solamente como fuente de infección, sino como fuente de plásmidos de resistencia (R) que pueden ser fácilmente diseminados a otras bacterias de la misma o de diferente especie presentes en estos ecosistemas dulceacuícolas.

Estudios realizados en la India, Canadá y China demostraron que no hay diferencias en la distribución de genes asociados a la virulencia y los patrones de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Escherichia coli* de origen humano o ambiental. Esto sugiere que el ambiente acuático constituye un verdadero reservorio de cepas con capacidad patogénica (Begum *et al.*, 2005; Hamelin *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011). Estas cepas, si existen las condiciones adecuadas, son capaces de diseminarse y causar

enfermedades en el ser humano, por lo que es importante implementar una continua y sistemática vigilancia de *Escherichia coli*, que contemple no solamente la identificación y caracterización de aislamientos clínicos, sino también el monitoreo de las cepas de esta especie en el ambiente, a fin de detectar aislamientos con un alto potencial patogénico y epidémico.

La especie *E. coli* ha mostrado resistencia frente a una gran diversidad de antibióticos, entre los que se han destacado los  $\beta$ -lactámicos. El mayor porcentaje de cepas resistentes en el presente trabajo se halló frente a la ampicilina. La ampicilina fue la primera penicilina semisintética que se desarrolló como respuesta a la necesidad de encontrar derivados de la penicilina de mayor espectro de acción, dada la aparición de cepas resistentes a esta. Dada su acción frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas este antibiótico se utiliza ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades.

La resistencia de *E. coli* frente a la ampicilina se ha incrementado en los últimos años en la clínica y también en cepas aisladas del ambiente. En un estudio realizado por Ramteke y Tewari (2007) en sistemas de agua potable y aguas superficiales, estos autores también aislaron cepas de *E. coli* resistentes a este antibiótico, con un porcentaje superior al 50%. Investigaciones llevadas a cabo en ecosistemas dulceacuícolas de Turquía, Australia, Arabia Saudita, México y Estados Unidos han informado igualmente porcentajes elevados (> 55%) de resistencia frente a la ampicilina (Ozgunus *et al.*, 2007; Watkinson *et al.*, 2007; Baquero *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007).

Birol *et al.* (2009), en un estudio realizado en Turquía informaron que de 183 aislados, un 58% mostró resistencia a este antibiótico. Por otra parte, Costa *et al.* (2008) informaron que de 114 coliformes, el 12% exhibió resistencia a ampicilina.

En cuanto a la familia de las sulfamidas, el sulfametoxazol-trimetoprima o cotrimoxazol como también se le llama a esta asociación antibiótica, se conoce que en la práctica este antibiótico se utiliza en el tratamiento de infecciones agudas y crónicas del tracto urinario, bronquitis, sinusitis y gastroenteritis, causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas, especialmente miembros de la familia Enterobacteriaceae. Las sulfonamidas son antibióticos sintéticos y los aislados ambientales no están mayormente expuestos a ellos (Rosser y Young, 1999). Sin embargo, la resistencia frente a este antimicrobiano se



ha incrementado considerablemente en cepas de *Escherichia coli* aisladas, tanto de la clínica como del ambiente (García *et al.*, 2010; Ram *et al.*, 2009).

Estudios realizados en Costa Rica informan porcentajes de resistencia frente a este antibiótico de un 44% en aguas superficiales impactadas por aguas residuales hospitalarias (Tzoc *et al.*, 2004). Existen otros estudios realizados con muestras provenientes de ambientes acuáticos en los que se ha demostrado que el 30% de los aislados obtenidos de estas muestras presentaban resistencia frente a este antibiótico (Pathak y Gopak, 2008; Costa *et al.*, 2008).

Para el caso de las fluoroquinolonas se obtuvieron porcentajes de resistencia similares a los que se informan para esta familia de antibióticos en la literatura. Las fluoroquinolonas, en la década de los años 90, se convirtieron en una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones por *E. coli* (infecciones del tracto urinario, profilaxis de las infecciones en pacientes con granulocitopenia, etc), debido a la elevada frecuencia de resistencia de este microorganismo a ampicilina o el cotrimoxazol (Jiménez *et al.*, 2009). Sin embargo, desde entonces, la frecuencia de aparición de resistencia frente a los miembros de esta familia se ha incrementado considerablemente por todo el mundo. En Cuba, se informan porcentajes de resistencia frente a las quinolonas superiores a 40% en el tratamiento de infecciones del tracto urinario (García *et al.*, 2010).

El ciprofloxacino y el levofloxacino, dentro de esta familia de antibióticos, son de los más utilizados para el tratamiento de infecciones causadas por *E. coli*. Queipo *et al.* (2000) en España informaron de un significativo aumento en las cifras de prevalencia de resistencia a esta quinolona en aislados clínicos de *E. coli* entre 1990 (3%) y 1998 (23%). A su vez, Peña *et al.* (1995) en hospitales españoles, describieron un incremento desde el 0% en 1988 al 7,5% en 1992 entre aislados de *E. coli* procedentes de infecciones en el tracto urinario. En el caso de las cepas ambientales, esta situación se repite en varios estudios realizados con enterobacterias aisladas de ambientes naturales y con cepas de *E. coli* procedentes directamente de animales como parte de su microbiota normal (Essen-Zandbergen *et al.*, 2007, Enne *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2008).

De manera general, los porcentajes de resistencia encontrados frente a la ampicilina, el sulfametoxazol-trimetropin, el ciprofloxacino y el levofloxacino coinciden con los obtenidos por Zambrano *et al.* (2002) en una investigación realizada en Venezuela en

aguas residuales urbanas. Aunque se encuentran por debajo de los informados por Ram *et al.* (2009) y Chandran *et al.* (2008) en la India y Junco *et al.* (2006) en La Habana, en investigaciones realizadas en ecosistemas dulceacuícolas de estos países donde se informaron valores de resistencia por encima del 80 % frente a estos antimicrobianos.

Se obtuvo un bajo porcentaje de resistencia a la cefalosporina de 1ª generación, como cefazolina. Si se considera que las bacterias evaluadas en la presente investigación provienen de contaminación fecal (como ya se demostró), ya sea de origen humano o animal, donde el uso de estos compuestos son habituales en el tratamiento de ciertas patologías, se esperaría encontrar quizás un porcentaje mayor de resistencia, la cual estaría mediada principalmente por enzimas  $\beta$ - lactamasas, asociadas a elementos móviles y a estructuras genéticas como integrones (Sirot *et al.*, 1991; Srinivasan *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2008). Sin embargo, la explicación más lógica a esta contradicción es que al no tener una presión selectiva continua en el ambiente, sumado al efecto de dilución de antibióticos en los sistemas hídricos, dichos genes fueron eliminados para evitar un costo biológico innecesario por parte de los microorganismos (Andersson y Levin, 1999), lo que explica el escaso número de cepas resistentes frente a este compuesto en los ecosistemas dulceacuícolas evaluados así como frente a miembros de este mismo grupos de antibiótico pero de otras generaciones.

Para el resto de los antibióticos evaluados, aztreonam (Monobactámico), gentamicina y amikacina (Aminoglucósidos), nitrofurantoina (Nitrofuranos), piperacilina/tazobactan ( $\beta$ -lactámico unido a inhibidor de betactamasa) ertapenem e imipenem (carbapenémicos) y el cefepime (cefalosporina 4ª generación), los porcentajes de resistencia se encontraron por debajo del 12 %, lo que no representa una alarma. En diversas investigaciones clínicas se maneja el criterio de que cuando se reportan valores de resistencia por debajo del 10 o 15 %, como es el caso de nuestro estudio, estos antimicrobianos pueden continuar formando parte de los que se sugieren para el uso clínico (Herrera *et al.*, 2002; Ochoa *et al.*, 2009b). Sin embargo, el decrecimiento en los niveles de susceptibilidad (resistencia intermedia) es un fenómeno que cada vez se observa con mayor frecuencia en aislamientos ambientales, especialmente en ecosistemas acuáticos impactados por la contaminación. Los valores de resistencia intermedia observada en este estudio entre las cepas de *E. coli* aisladas no fueron elevados en cuanto a número, ya que solo encontró en ocho cepas de las 108 evaluadas, pero se observó este fenómeno en siete de los 15

antibióticos probados, es decir para casi el 50 % de los antimicrobianos evaluados, lo que sin duda constituye una alerta, ya que favorecería el incremento de bacterias resistentes en este tipo de ambiente.

Por lo tanto, aunque la resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas de los ecosistemas dulceacuícolas capitalinos evaluados no presenta una situación tan crítica como la de otros ecosistemas del mundo (porcentajes de resistencia >50%), la vigilancia de la resistencia frente a los antimicrobianos de los microorganismos presentes en estos ecosistemas, sobre todo de los miembros del grupo coliformes, debe ser sistemática.

Por otra parte, los porcentajes de aislamientos de *E.coli* multirresistentes en el presente estudio fueron menores que los obtenidos por Ram *et al.* (2009) y Chandran *et al.* (2008), quienes reportaron valores de multirresistencia de 46,7 % y 95 % en cepas de *E. coli* aisladas de ríos de la India respectivamente.

Varios autores han establecido que la multirresistencia a antibióticos provee a las cepas de ventajas selectivas (Guajardo *et al.*, 2009) y la evidencia de laboratorio demuestra que bacterias con resistencia a múltiples antibióticos pueden mantener este fenotipo por muchos años en medios de mantenimiento y sin la incorporación posterior de antibióticos (Andrade *et al.*, 2006). En contraste, en un medio donde existe presión hacia la transferencia de genes de resistencia, como pueden ser los ecosistemas acuáticos contaminados, existe una gran probabilidad de que la eventual reutilización de agua en actividades tan diversas como agricultura, navegación, recreación, pesca, etc., permita la llegada de cepas multirresistentes al ser humano.

La selección y diseminación en la naturaleza de cepas resistentes a los antibióticos es un fenómeno que se debe evitar, con el fin de mantener un balance ecológico que favorezca el predominio de bacterias susceptibles y asegurar el tratamiento efectivo de las enfermedades infecciosas humanas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, es necesario continuar con la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas aisladas de estos ecosistemas contaminados y realizar estudios de transferencia genética sobre todo teniendo como receptor cepas autóctonas de estos sistemas hídricos, para evaluar el papel que pueden tener estas estructuras genéticas en la diseminación de genes de resistencia en diversos ambientes.

#### **4.6.6. Análisis de los patrones de electroforesis en campos pulsados de las cepas de *E. coli* aisladas de los ríos Almendares, Quibú y Luyanó**

Se han realizado diversos estudios para analizar la relación desde el punto de vista genético que existe entre cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes, tales como heces de animales (cerdos, ganado vacuno, aves, y otros), humanas y alimentos (Zotta *et al.* 2009; Watabe *et al.* 2008; Cesaris *et al.* 2007; Vu-Khan *et al.* 2007, Ejrnaes *et al.* 2006). Sin embargo, a nivel mundial se han realizado pocos análisis de este tipo con cepas de *E. coli* procedentes de ecosistemas acuáticos (Orsi *et al.* 2007; Martin *et al.*, 2002).

Dada la reproducibilidad de la técnica de ECP, se ha propuesto a nivel internacional como base de un esquema definitivo para el subtipaje genotípico de cepas de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *E. coli*, aisladas de brotes o casos esporádicos de EDA (Houang *et al.*, 2000; Swaminathan y Matar, 2001; McDougal *et al.*, 2003). Cesaris *et al.* (2007) evaluaron dos técnicas moleculares (BOX-PCR y ECP) para la discriminación de cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes. Estos autores informaron que la técnica de ECP resultó más efectiva para detectar las diferencias en los patrones de ADN entre las cepas evaluadas y permitió distinguir entre algunas cepas que no fue posible discriminar por la técnica de BOX-PCR.

El análisis de los patrones de ECP en la presente investigación permitió evaluar la diversidad genética entre las cepas de *E. coli* aisladas de las muestras de agua provenientes de los ecosistemas acuáticos contaminados evaluados. La diversidad genética entre aislamientos de *E. coli* de diferentes orígenes se ha documentado en la literatura especializada en el tema, sin embargo no se tienen informes de este tipo de estudios con cepas aisladas de ecosistemas acuáticos de Cuba y el Caribe.

Estudios realizados por Varela *et al.* (2008) y Zotta *et al.* (2009) con cepas de *E. coli* aisladas de casos clínicos y de alimentos en Uruguay y Argentina respectivamente, mostraron que cepas STEC del mismo serogrupo presentaron una alta diversidad genética. En otra investigación realizada con 110 aislados de *E. coli* provenientes de dos reservorios de agua potable brasileños los estudios de diversidad genética mostraron una considerable heterogeneidad genética entre los aislados de estos reservorios (Orsi *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en el presente trabajo están en correspondencia con los

mencionados anteriormente y permiten sustentar la hipótesis de que en los ecosistemas dulceacuícolas de La Habana que fueron evaluados circulan serogrupos de *E. coli*, ya sean patógenos y no patógenos humanos, con una alta diversidad genética.

El concepto de identidad de los componentes de un clon se ve complicado en la práctica por el hecho de que los microorganismos son genéticamente inestables y acumulan modificaciones de su material genético con cada generación (Bernal *et al.*, 2004).

Estas modificaciones pueden deberse a mutaciones al azar o a fenómenos de recombinación genética como la inserción o la delección de elementos móviles como plásmidos, secuencias de inserción o transposones. A esta inestabilidad genética de los microorganismos se le conoce como 'deriva genética'. Así, pues, la clonalidad no es absoluta, sino que está modulada por el tiempo, o sea, la similitud de los componentes de un clon irá divergiendo con el tiempo (Ansaruzzaman *et al.*, 2000; Bernal *et al.*, 2004).

La alta variabilidad entre los patrones electroforéticos encontrados (Figuras 13, 14 y 15) podría deberse a los vertimientos que se realizan continuamente a estos ríos provenientes de viviendas y el alcantarillado público sin tratamiento o pobremente tratados. Estos vertimientos poseen una elevada carga de microorganismos de origen fecal, entre ellos *E. coli*, de muy diversos orígenes, con características muy diversas tanto desde el punto de vista bioquímico como genético.

Resultados similares se obtuvieron por Orsi *et al.* (2007) en un estudio realizado con cepas de *E. coli* aisladas de los reservorios de agua potable Billings y Guarapiranga (Sao Paulo, Brazil), los cuales recibían continuamente vertimientos de aguas residuales domésticas. Además estos autores también informaron que ambos reservorios estaban contaminados con cepas que compartían un nivel de variabilidad similar, aspecto que también se observó en el presente trabajo ya que la mayoría de las cepas presentaron un coeficiente de Dice  $< 0,7$ . Además, se debe considerar que las cepas evaluadas no fueron todas aisladas en el mismo momento, sino que el aislamiento de las mismas se realizó a lo largo de los tres años de estudio, en los diferentes muestreos que se realizaron. Este aspecto influye mucho en que las cepas aisladas de los diferentes ecosistemas no sean cepas de un mismo clon, ya que es importante recordar que el tiempo de vida medio de *E. coli* en agua es de un día.

A su vez, la heterogeneidad de serotipos entre las cepas de los diferentes clones (Figuras 13, 14 y 15) está muy relacionada también con el origen que tienen las cepas de *Escherichia coli* que llegan a estos ríos, las cuales tienen un origen fecal mayoritariamente.

Por otra parte, se observaron también diferencias entre las 30 cepas seleccionadas de los tres ecosistemas, en cuanto a la presencia de genes de virulencia y patrones de resistencia antibiótica, con iguales pulsotipos. Estas diferencias pueden estar dadas por adquisiciones puntuales de genes de virulencia codificados en plásmidos y/o bacteriófagos después de su proceso de diseminación en estos ambientes contaminados, como es el caso de los genes para las toxinas ST, LT, Stx1 y Stx2, principales genes encontrados entre las cepas del presente trabajo. Savageau (1983) y Souza *et al.* (2001) proponen que la respuesta a estos diferentes ambientes se debe a la evolución de un sistema de regulación dual, así como a la participación de la selección natural que puede favorecer genotipos específicos en diferentes hábitats, considerada esta como una alternativa evolutiva.

El genoma de *E. coli* contiene entre 4.200 y 5.500 genes, con menos de 2.000 genes conservados (core genome). Su pan-genome (repertorio genético de la especie) es enorme y consiste en al menos 20.000 genes. Se conoce sobre la capacidad de especies como *E. coli* de generar nuevas combinaciones de genes que conducen a la emergencia de cepas muy agresivas que además pueden llegar a ser resistentes a los antibióticos de mayor utilidad clínica.

Hasta ahora, parecía que existía una cierta incompatibilidad entre los genes de resistencia y los genes de virulencia, pero la reciente emergencia del grupo clonal *E. coli* extraintestinal O25b:H4-B2-ST131 y de la cepa actual *E. coli* enteroagregativa hemorrágica O104:H4-B1-ST678 supone un nuevo desafío. Curiosamente estas cepas comparten el antígeno flagelar H4 y la enzima CTX-M-15 (resistencia frente a) y sin embargo pertenecen a dos grupos patógenos de *E. coli* completamente diferentes (Mora *et al.*, 2011).

Por otra parte, el análisis de los perfiles mostró que de las cepas serotificables, aquellas con el serotipo O174:H32 fueron las que tuvieron mayor variabilidad intraserotípica y genotípica, ya que se encontraron representantes de este serotipo en los ríos Almendares

y Luyanó con pulsotipos y características diferentes. Esto puede deberse a que primero ocurrió una diseminación del clon entre los ecosistemas y después cada aislamiento evolucionó de forma diferente en cada ambiente, lo cual está en dependencia de la presión que ejerza este sobre él, además de la eventual pérdida o ganancia de elementos genéticos móviles con los genes de virulencia y/o resistencia a antibióticos.

El presente estudio constituye un punto de partida para poder evaluar la diversidad genética y el grado de relación clonal de los aislados de *E. coli* presentes en ecosistemas dulceacuícolas contaminados de Cuba. También permite analizar la evolución o distribución espacial como aspecto importante a valorar en la difusión de estos serotipos y el conjunto de factores que pueden favorecer la transmisibilidad de los mismos entre la población que utiliza las aguas de estos ríos.

### **Consideraciones generales**

Actualmente, el consumo de agua a nivel mundial crece más aceleradamente que la población. La escasez de agua, la sobre explotación de las fuentes de abasto y la contaminación del recurso son problemas acuciantes para un importante número de países o amplias regiones del planeta, constituyendo una fuerte limitante para su desarrollo y una fuente de afectaciones a la salud de sus habitantes.

En Cuba, el Programa Nacional de Medio Ambiente y Desarrollo —adecuación cubana al documento Agenda 21 (cita), en su Capítulo 5, define los objetivos y acciones a cumplimentar para la Protección de las Aguas Terrestres. En el subprograma “El agua y el desarrollo urbano sostenibles”, se plantea como objetivo lograr el establecimiento efectivo de normas y pautas de consumo en las grandes ciudades que, permitiendo el mejoramiento de las condiciones de suministro, contribuyan a la conservación de ese recurso y disminuyan las tendencias actuales a su degradación.

En este trabajo se ha observado que la situación de tres importantes ecosistemas dulceacuícolas de la capital es muy desfavorable debido a su elevada contaminación microbiana fundamentalmente por vertimientos de aguas residuales domésticas que continuamente se vierten a sus aguas. Indiscutiblemente, existen esfuerzos que realizan el gobierno local y algunas instituciones estatales para tratar de mitigar los efectos negativos que tienen sobre estas aguas. El problema principal no es reparar el hecho, sino evitar que ocurra, lo cual no solo se logra con el desarrollo de una red de alcantarillado para colectar las aguas residuales de barrios y comunidades carentes de ella, o instalando plantas de tratamiento para estos residuales. Ambas acciones requieren un trabajo de planificación y la disposición de fondos para su ejecución, lo cual no es una situación factible de forma expedita. Dada esta explicación, evidentemente es más práctico impedir la proliferación incontrolada de viviendas en zonas marginales y cercanas a los cauces de estos ríos, para evitar el incremento de vertimientos. Algo similar ocurre con los corrales y criaderos de animales, cuya limpieza es realizada aprovechando a veces el agua de estos ecosistemas dulceacuícolas y vertiendo los residuales directamente al propio río. Teniendo en cuenta estos aspectos, los resultados del presente trabajo indican la necesidad de tomar medidas urgentes que contribuyan al saneamiento paulatino de los ríos capitalinos Almendares, Quibú y Luyanó.



A su vez, la determinación de la presencia de patotipos de la especie *Escherichia coli* en las aguas de estos ríos es un indicio más de la deficiente calidad de las aguas de estos ecosistemas dulceacuícolas de La Habana, lo que invalida su uso por parte de la población de la ciudad.

La diversidad de cepas de *E. coli* con diferentes factores de virulencia, implican una patogenicidad heterogénea en dependencia de los genes que se expresen. Dados los conocimientos actuales sobre la patogenicidad de esta especie, la presencia de estos patotipos en los ecosistemas acuáticos y la promiscuidad bacteriana en estos medios, se hace evidente que no es posible la discriminación entre cepas patógenas y no patógenas de esta especie cuando se evalúa la calidad microbiológica de las aguas, ya sean potables o para uso recreativo.

La determinación de la concentración de *E. coli* como especie bacteriana, no discrimina su origen ni indica si son cepas comensales (anfibiontes pertenecientes a la microbiota normal humana pero no definidas como patógenas por la ausencia de factores de virulencia) o si son cepas consideradas patógenas por la ubicación en determinados serogrupos, serotipos o patotipos. Todo lo anterior señala las limitaciones que tienen las normas de determinación de la calidad microbiológica del agua, tanto internacionales como de nuestro país, ya que la NC 22 solo orienta la cuantificación de coliformes totales, coliformes fecales, *Pseudomona aeruginosa* y enterococos, lo cual obviamente es insuficiente para valorar la seguridad que implica la utilización de aguas para determinados fines. No obstante, ya que la determinación de los patotipos, serotipos y serogrupos de esta especie conllevan un incremento de gastos y tiempo, no sería factible su realización de forma sistemática en los muestreos de agua, pero la inclusión de *E. coli* como una especie indicadora de contaminación fecal ya sería un avance en este sentido.

El hallazgo de cepas patógenas de la especie *E. coli* entre los aislados procedentes de los ecosistemas en estudio con el mismo serotipo, diferentes combinaciones de genes y capacidad de adherencia, sugiere que los genes que codifican para los factores de virulencia analizados, se están moviendo entre las diferentes bacterias y que estas cepas una vez que llegan a estos ecosistemas secundarios no pierden o simplemente mantienen una de sus características patógenas más importantes, la adherencia, la cual es esencial para llevar a cabo con éxito una enfermedad infecciosa .

Así pues, estas cepas podrían ser importantes para la emergencia de nuevos serotipos virulentos y de hecho, estas cepas podrían representar estadios intermedios en la emergencia de nuevos patógenos, que emergerían como cepas patógenas con la adquisición de otros factores de virulencia además de los que ya poseen, a lo cual podrían contribuir elementos genéticos móviles como bacteriófagos, plásmidos y transposones. Dicho fenómeno de adquisición de genes de virulencia ya se ha evidenciado con la difusión de los genes *stx* entre una gran variedad de serotipos de *E. coli* extendiéndose, incluso, a otras especies de los géneros *Citrobacter* y *Klebsiella*. En la mayoría de los estudios realizados sobre diversidad de cepas STEC, se analizan cepas patógenas aisladas de brotes, o cepas aisladas de diversos orígenes utilizando medios selectivos para su detección. Sin embargo, las cepas STEC analizadas en este trabajo son un reflejo de lo que está ocurriendo en los ecosistemas acuáticos, independientemente de su potencial como patógenos. Su importancia radica principalmente en este aspecto, ya que estas cepas representan un reservorio de genes, que en un momento determinado, podrían contribuir a la emergencia de nuevas cepas patógenas, aunque hoy en día ellas no lo sean.

En futuras investigaciones sería necesario incluir un mayor número de muestras antes de dar conclusiones definitivas sobre los más importantes serotipos presentes en los ecosistemas dulceacuícolas de la capital cubana. Sin embargo, estos resultados constituyen una valiosa fuente de información que sirve de base no solo para estudios epidemiológicos, sino también, para la elaboración de estrategias para el saneamiento de estos importantes ecosistemas dulceacuícolas superficiales.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

1. La elevada concentración de coliformes termotolerantes y *E. coli* de los ríos evaluados de la capital está relacionada con los vertimientos de aguas residuales urbanas que reciben estos ecosistemas, lo cual los clasifica como no aptos para el baño, la realización de actividades recreativas y el riego agrícola.
2. La correlación lineal existente entre las concentraciones de coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* indica que cualquiera de ellos puede utilizarse para la evaluación de la calidad microbiológica de los ríos analizados y de otros ecosistemas dulceacuícolas tropicales.
3. El 35% de las cepas *Escherichia coli* aisladas pertenecen a cinco de los grupos patógenos humanos, con predominio del grupo de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, y se ubicaron en 16 patrones de resistencia, con poca representatividad de cepas multirresistentes frente a los antimicrobianos evaluados.
4. Se demostró que las cepas de *E. coli* ambientales circulantes en estos ecosistemas presentan características adherentes, de las cuales el 84% de las cepas con esta propiedad muestran patrón de adherencia difusa cuya patogenicidad implica un riesgo potencial para la salud humana y en edades pediátricas.
5. La presencia de genes de virulencia en cepas cuyo serotipo las define como no patógenas, constituye una prueba de la diversidad de cepas circulantes en estos ecosistemas y denotan la transmisión horizontal de genes en esta especie.
6. No se encontró una relación clonal de las cepas aisladas en los ecosistemas evaluados evidenciándose una baja coincidencia de pulsotipos entre el total de cepas aisladas, lo cual demuestra una marcada diversidad genética para las cepas ambientales de *Escherichia coli*.

## RECOMENDACIONES

1. Establecer un monitoreo sistemático de las aguas de los ecosistemas dulceacuícolas de La Habana con vistas a evaluar la supervivencia de los microorganismos indicadores en estos ecosistemas.
2. Realizar estudios de epidemiología a nivel molecular que permitan seguir la evolución y emergencia de clones de cepas patógenas de *E. coli* en este tipo de ambientes.
3. Realizar estudios similares en otras regiones de Cuba para conocer la presencia y diseminación de los grupos patógenos de *E. coli* en otros ecosistemas dulceacuícolas contaminados del país.
4. Divulgar estos resultados, poniéndolos en conocimiento de las autoridades de la provincia La Habana para priorizar la realización de Programas de Educación Ambiental que eviten el uso inadecuado de las aguas de estos ríos por la población de la ciudad.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelzاهر** A.M. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**; 76 (1):724 –732.
1. **Acedo** E., Núñez Y., Pérez R., Iñiguez C.M., Castellón L. Caracterización polifásica de *Salmonella* spp. aislada de campos agrícolas de melón (*Cucumis melon*) y cilantro (*Coriandrum sativum*). *Interciencia.* **2009**; 34 (6): 419-423.
  2. **Ackerman** D. y Weisberg S.B. Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. *J. Wat. Health.* **2003**; 1 (2): 85-89.
  3. **Adler** B. y de la Peña Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 2010; 140 (34): 287–296.
  4. **AFNOR** (Agence Française de Normalisation). Qualité de l'eau. Analyses bioquimiques et biologiques- Analyses micribiologiques. **2001**, Vol. 4, París, France.
  5. **Águila** A., Bernedo R., Llop A., Ramírez M., Bravo L., Fernández A., Ledo Y. Estudio de marcadores fenotípicos y de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* entéricas. *Rev Cubana Med Trop.* **2007**; 59 (2): 102-7.
  6. **Águila** A., Valdés-Dapena M., Ramírez M., Fernández C., Bravo L. Estudio de correlación entre cepas de *Escherichia coli* sorbosa negativa y su capacidad de producir exotoxinas. *Rev Cubana Med Trop.* **2006**; 58 (1): 102-107.
  7. **Ahmed** W., Hodgers L., Masters N., Sidhu J.P.S., Katouli M., Toze S. Occurrence of intestinal and extraintestinal virulence genes in *Escherichia coli* isolates from Rainwater Tanks in southeast Queensland, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**; 77 (20): 7394-7400.
  8. **Ahmed** W., Stewart J., Gardner T., Powell D. A real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of the human-specific enterococci surface protein marker in sewage and environmental waters. *Environ. Microbiol.* **2008**; 10 (6): 3255-3264.
  9. **Alzahrani** A. M., Gherbawy Y. A., Sawant A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from water springs in Al-Ahsa Region. *African J Microbiol Res.* **2011**; 5 (2):123-130.
  10. **An** Y.J. y Breindenbach G.P. Monitoring *E. coli* and total coliforms in natural spring water as related to recreational mountain areas. *Environ. Monit. Assess.* **2005**; 102: 131-137.
  11. **Andersson** D. y Levin B. The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion Microbiol.* **1999**; 2 (1): 489-493
  12. **Anon** D. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000. *Can. Commun. Dis. Rep.* 2000; 26 (1): 170-173.
  13. **Ansaruzzaman** M., Albert M.J., Nahar S. Clonal groups of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in case-control studies of diarrhoea in Bangladesh. *J Med Microbiol.* **2000**; 49 (5): 177-85.

14. **Anuario Estadístico de Salud** 2011. Ministerio de Salud Pública, Cuba. **2011**. [Consultado el 20 de enero de 2012]. Disponible en: [www.informed.sld.cu/Anuario Estadístico](http://www.informed.sld.cu/Anuario%20Estadístico).
15. **APHA**. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 9222 D. Faecal Coliform Membrane Filter Procedure. American Water Works Association. **1998**. Denver, CO.
16. **Araujo J. M.**, Tabarelli G. F., Aranda K. R. S., Fabbriotti S. H., Fagundes-Neto U., Mendes C. M. F., Scaletsky I. C. A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* **2007**; 45 (3): 3396–3399.
17. **Arcos M.P.**, Ávila S.L., Estupiñan S.M., Gómez A.C. Indicadores microbiológicos de las fuentes de agua. *NOVA*. **2005**; 3(4): 69-79.
18. **Arias I.** y Huguet J.C. Detección molecular de toxinas termoestable y termolábil de *Escherichia coli* mediante hibridación. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. **2002**; 19 (7): 193 -196.
19. **Arpajón Y.**, Romeu B., Rodríguez A., Heydrich M., Rojas N., Lugo D. Impacto de los nutrientes inorgánicos sobre la comunidad bacteriana del río Almendares. *Hig. San. Ambient.* **2011**; 11 (1): 731-738.
20. **Ashbolt N.J.** Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*. **2004**; 198 (5): 229-238.
21. **Ashbolt N.J.**, Grabow W.O.K., Snozzi M. Indicators of microbial water quality. World Health Organization (WHO). Fewtrell L. & Bartram J., editors. En: *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. **2001**. World Health Organization and IWA Publishing, London, UK.
22. **Aviat F.**, Blanchard B., Michel V., Blanchet B., Branger C., Hars J., Mansotte F., Brasme L., De Champs C., Bolot P. Leptospira exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 32 (3): 463–476
23. **Ávila de Navia S.L.** y Estupiñan S.M. Calidad sanitaria del agua de la Ciénaga Mata de Palma en el Departamento del Cesar, Colombia. *NOVA*. **2009**; 7(11): 85-91.
24. **Bai L.**, Schüller S., Whale A., Mousnier A., Marches O., Wang L., Ooka T., Heuschkel R., Torrente F., Kaper J. B., Gomes T. A. T., Xu J., Phillips A. D., Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. *Infect. Immun.* **2008**; 76 (9):361–368.
25. **Ballester M.** y Rubiera J. Estado de la sequía. Instituto de Meteorología, CITMA. **2008**. [Consultado el 20 de noviembre de 2008]. Disponible en: <http://www.insmet.cu/asp/CLIMA/sequia/2008.html>.
26. **Ballester M.** y Rubiera J. Estado de la sequía. Instituto de Meteorología, CITMA. **2009**. [Consultado el 15 de octubre de 2009]. Disponible en: <http://www.insmet.cu/asp/CLIMA/sequia/2009.html>.



27. **Ballester** M. y Rubiera J. Estado de la sequía. Instituto de Meteorología, CITMA. **2010**. [Consultado el 2 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.insmet.cu/asp/CLIMA/sequia/2010.html>.
28. **Baquero** F., Martínez J.L., Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**; 19 (4): 260- 265.
29. **Barletta** F., Ochoa T.J., Ecker L., Gil A.I., Lanata C.F., Cleary T.G. Validation of five-colony pool analysis using multiplex real-time PCR for detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* **2009**; 47 (6):1915-7.
30. **Bartram** J., Corrales L., Davison A., Deere D., Drudy D., Gordon B., Howard G., Rinehold A., Stevens M. Water safety plan manual: step-by-step risk management for drinking-water suppliers. Geneva, World Health Organization. **2009**.
31. **Begum** Y. A., Talukder K. A., Nair G. B., Qadri F., Sack R. B., Svennerholm A.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water in urban and rural areas of Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* **2005**; 43 (3): 3582–3583.
32. **Bernal** M., Poutou R. A., Máttar S. Utilización del RAPD para detectar clonalidad entre cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) aisladas de pacientes pediátricos con diarrea. *Universitas Médicas.* **2004**; 45 (1): 7-12.
33. **Bergholz** P.W., Noar J., Buckley D.H. Environmental patterns are imposed on the population structure of *Escherichia coli* after fecal deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**; 77 (1): 211-219.
34. **Berry** C., Loyd B.J. y Colbourne J.S. Effect of heat shock on recovery of *Escherichia coli* from drinking water. *Water. Sci. Technol.* **1991**; 24 (2): 85-88.
35. **Bettelheim** K. A., Faiers M., Shooter R. A. Serotypes of *Escherichia coli* in normal stools. *Lancet.* **1972**; 2 (1): 1224–1226.
36. **Bettelheim** K.A. Non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*: a problem, paradox, and paradigm. *Exp. Biol. Med.* **2003**; 228 (2): 333-344.
37. **Beutin** L., Kong Q., Feng L., Wang Q., Krause G., Leomil L., Jin Q., Wang L. Development of PCR assays targeting the genes involved in synthesis and assembly of the new *Escherichia coli* O174 and O177 O antigens. *J. Clin. Microbiol.* **2005**; 43 (5): 5143–5149.
38. **Beutin** L., Krause G., Zimmermann S., Kaufuss S., Gleier K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* **2004**; 42 (11):1099–1108
39. **Bezuidenhout** C.C., Mthembu N., Puckree T., Lin J. Microbiological evaluation of the Mhlathuze river, KwaZulu-Natal RSA. **2002**. [Consultado el 21 de febrero de 2012]. Disponible en: <http://www.wrc.org.za.publications/watersa>.

40. **Biol** O., Sandalli C., Sevim A., Celik-Sevim E. and Sivri N. Class 1 and Class 2 Integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in Northern Turkey. *J Microbiol.* **2009**; 47 (8): 119-127.
41. **Bitton** G. Wastewater Microbiology, 3<sup>rd</sup> ed. Wiley-Liss, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. **2005**: p. 23.
42. **Blanch** A.R., García-Aljaro C., Muniesa M., Jofre J. Detection, enumeration and isolation of strains carrying the *stx2* gene from urban sewage. *Water Sci. Technol.* **2003**, 47 (10), 109–116.
43. **Blanco** J., Mora A., Mamani R. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother.* **2011**; 66 (2): 2011-2021.
44. **Blanco** M., Padola N.L., Krüger A., Sanz M.E., Blanco J. E., González E. A., Dahbi G., Mora A., Bernárdez M.I., Echeverría A. I., Arroyo G.H., Lucchesi P. M., Parma A. E., Blanco J. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int. Microbiol.* **2004**; 7 (1):269-276.
45. **Blanco** M., Lazo L., Blanco J.E., Dahbi G., Mora A., López C., González E.A., Blanco J. Serotypes, virulence genes and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuba pigs with diarrhea. *Intern. Microbiol.* **2006**; 9 (5): 53-60.
46. **Boehm** A., Grant S.B., Kim J.H., Mowbray S.L., McGee C.D., Clark C.D., Foley D.M., Wellman D.E. Decadal and shorter period variability and surf zone water quality at Huntington Beach, California. *Environn. Sci. Technol.* **2002**; 36 (4): 3885-3892.
47. **Boehm** A., Nicolas J.A., Colford J.M., Dunbar L.E., Fleming L.E., Gold M.A., Hansel J.A., Hunter P.R., Ichida A.M., McGee C.H, Soller J.A., Weisberg S.B. A sea change ahead for recreational water quality criteria. *J. Water Health.* **2009**; 45 (4): 122-126.
48. **Bonadonna** L., Cataldo C., Semproni M. Comparison of methods and confirmation tests for the recovery *Escherichia coli* in water. *Desalination.* **2007**; 213 (15): 18–23.
49. **Bonedahl** J., Drobni P., Johansson A., Hernandez J., Melhus A., Stedt J., Olsen B., Drobni M. Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus ridibundus*) extended-spectrum b-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the southeast coast of Sweden. *J Antimicrob Chemother.* **2010**; 65 (7): 1939–1944.
50. **Borrego** J. y Figueras M. Microbiological quality of natural waters. *Microbiología SEM.* **1997**; 1: 169-180.
51. **Boschi-Pinto** C., Velebit L., Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ.* **2008**; 86 (9):710-707.
52. **Byamukama** D., Kanslime F., Mach R., Farnleitner A.H. Determination of *E. coli* contamination with Chromocult coliform agar showed high level of discrimination efficiency for differing fecal

- pollution levels in tropical waters of Kampala, Uganda. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**; 66 (2): 864-68.
53. **Byrd** J.J., Huai-Shu X., Colwell R.R. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**; 57 (3): 875-878.
54. **Campos** L., Franzolin M., Trabulsi L. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups - A Review. *Mem Inst.* **2004**; 99 (8): 545-552.
55. **Campos** M., Guerra M., Olivera J., Rocamora E., Hernández I., Jaimez E. Escenarios de peligros naturales y antrópicos en las cuencas del oeste de La Habana. *Rev. Ciencias de la Tierra y el Espacio.* **2007**; 21(1): 23-30.
56. **Campos-Pinilla** C., Cárdenas M., Guerrero A. Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en diferentes tipos de agua de la sabana de Bogotá (Colombia). *Universitas Scientiarum.* **2008**; 13 (2): 103-108.
57. **CCAV** (Consejo de la Cuenca Almendares-Vento). Informe del estudio de la Cuenca Hidrográfica Almendares-Vento. Ciudad de La Habana. Cuba. **2002**, 10p.
58. **CENHICA** (Centro Nacional de Hidrología y Calidad de Aguas). Estado de la calidad de las aguas en el río Almendares, zona comprendida dentro del Parque Metropolitano. Informe Técnico, INRH. **2002**.
59. **CENHICA** (Centro Nacional de Hidrología y Calidad de Aguas). Estado de la calidad de las aguas en el río Almendares, zona comprendida dentro del Parque Metropolitano. Informe Técnico, INRH. **2003**.
60. **Cesaris** L., Gillespie B.E., Srinivasan V., Almeida R.A., Zecconi A., Oliver S.P. Discriminating Between Strains of *Escherichia coli* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and BOX-PCR. *Food. Pathog. Dis.* **2007**; 4 (4): 473-480.
61. **CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S17. **2008**; 27 (1).
62. **Chandran** A., Mohamed Hatha A.A., Varguese S., Mony Sheeja K. Prevalence of multiple drug resistant *Escherichia coli* serotypes in a tropical estuary, India. *Microbes Environ.* **2008**; 23 (2):153-158.
63. **Chao** W.L. Evaluation of Colilert 18 for detection of coliforms and *Escherichia coli* in tropical Fresh water. *L. Appl Microbiol.* **2006**; 42 (3): 115-20.
64. **Chen** B., Zheng W., Yu Y., Huang W., Zheng S., Zhang Y., Guan Y., Zhuang Y., Chen Y., Topp E. Class 1 Integrons, selected virulence genes, and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from the Minjiang river, Fujian province, China. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**; 77 (1): 148-155.

65. **Chen** J.R., Lee S.Y., Yang B.H., Lu J.J. Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive Bact/ALERT blood cultures. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2008**; 41 (6): 259-264
66. **Chiroles** S., González M.I., Torres T., Valdés M., Domínguez I. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Hig. San. Ambient.* **2007**; 7 (3): 222-227.
67. **Cires** M. La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. *Rev Cubana Med Gen Integr.* **2002**; 18 (2): 165-168.
68. **CITMA** (Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente). Estrategia Ambiental Nacional 2007/2010. Anexo único de la resolución no. 40/**2007**: 1-56.
69. **CNC** (Consejo Nacional de Cuencas). Informe del estudio de la Cuenca Hidrográfica Almendares-Vento. Ciudad de La Habana. Cuba. **2000**: 19-21.
70. **Cocchi** S., Grasselli E., Gutacker M., Benagli M., Convert M, Piffaretti J.C. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immun Med Microbiol.* **2007**; 50(4): 126-132.
71. **Contreras** C.A., Ochoa T.J., Lacher D.W., DebRoy C., Navarro A., Talledo M. Allelic variability of critical virulence genes (eae, bfpA, and perA) in typical and atypical EPEC in Peruvian children. *J Med Microbiol.* **2010**; 59:25-31.
72. **Costa** D., Poeta P., Sáenz Y., Coelh A., Matos M., Vinué L., Rodrigues J and Torres C. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology.***2008**; 127 (14): 97–105.
73. **Coutin** G., Morales I., Rodríguez D., Aguiar P. H. Morbilidad oculta por Enfermedades Diarreicas Agudas en Cuba. Reporte Técnico de Vigilancia. **2006**; 11 (1): 1-22. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/vigilancia/coutin.pdf>
74. **Cravioto** A., Gross R. J., Scotland S. M., Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* **1979**; 3:95–99.
75. **Crowther** J., Kay D., Wyer M. Relationships between microbial water quality and environmental conditions in coastal recreational waters: the Fylde Coast, UK. *Wat. Res.* **2001**; 35 (17) pp. 4029–4038.
76. **Croxen** M.A. y Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews.* **2010**, 8 (2): 26-38.
77. **Curriero** F.C., Patz J.A., Rose J.B., Lele S. The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *American J. Pub. Health.* **2001**; 91 (11): 1194-1199.

78. **Davis** K., Anderson M.A., Yates M. V. Distribution of indicator bacteria in Canyon Lake, California. *Water Research*. **2005**; 39 (6): 1277– 1288.
79. **Davis** M. A., Hancock D. D., Besser T. E., Call D. R. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* **2003**; 41 (5): 1843-1849.
80. **Daza** J. Estadística Aplicada con Microsoft Excel. **2006**. Grupo Editorial Megabyte, Lima, Perú.
81. **De la Fé** P.Y., Ndemi J., Moroto L., Cruz E., Butave P., Cox E., Goddeeris B.M. Characterization and clonal grouping of pathogenic *Escherichia coli* isolated from intestinal contents of diarrheic piglets in Villa Clara province, Cuba, according to their antibiotic resistance and ERIC-PCR profiles. *Vet Microbiol.* **2012**; 154 (5) : 425-428.
82. **DebRoy** C., Roberts E., Fratamico P.M. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews*. **2011**; 12 (2); 169–185.
83. **del Pilar** M., Ávila S., Mónica S., Gómez A.C. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA*. **2005**; 3 (4):1794-2470.
84. **Delgado** Y., Miravet M.E., Núñez R. Indicadores microbiológicos de calidad del agua en la costa oeste de la Ciudad de La Habana. *Hig. San. Ambient.* **2008**; 8 (1): 387-391.
85. **Delicato** E.R., Guimaraes de Brito B., Gaziri L.C., Vidotto M.C. Virulence- associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol.* **2003**; 94 (5): 97-103
86. **Duguid** J. P. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. En: Bacterial Adherence. **1980**. E. H. Beachey (ed). Chapman y Hall Publish, London, 187-217 pp.
87. **Echeita** M.A., Herrera S., Simón C. Gastroenteritis invasivas, ¿algo nuevo? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2011**; 29 (3): 55-60.
88. **Eckner** K.F. Comparison of membrane filtration and multiple tube fermentation by colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, escherichia coli and enterococci use drinking and bathing water quality monitoring in *Southern Sweden*. *Appl. Env. Microbiol.* 1998; 64 (2): 320-323.
89. **Edberg** S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *J. Appl. Microbiol.* **2000**; 88 (10): 106–116.
90. **Ejrnaes** K., Sandvang D., Lundgren B., Ferry B., Holm S., Monsen T., Lundholm R., Frimodt-Moller N. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Escherichia coli* Strains from Samples Collected before and after Pivmecillinam or Placebo Treatment of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection in Women. *J Clin. Microbiol.* **2006**; 44 (5): 1776-1781.
91. **Emiliani** F. y García M.O. Predicción de la calidad bacteriológica de las aguas naturales en ambientes urbanos. Influencia de El Niño- Oscilación Sur. *Rev Argentina Microbiol* **2003**; 35 (5):8-18.

92. **Emiliani F.** y González S.M. Calidad bacteriológica de la laguna Bedetti (Santo Tomé, provincia Santa Fé, Argentina) y variables ambientales asociadas. *Rev. Argentina Microbiol.* **1998**; 30 (3):30-38.
93. **Enne V.**, Cassar C., Springings K., Woodward M., Bennett P. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiology Letters.* **2008**; 278 (3): 193–199.
94. **Essen-Zandbergen S.**, Smith H., Veldman K., Mevius D. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter spp.* in the Netherlands. *J. Antim. Chemoth.* **2007**; 59 (4): 746–750.
95. **Ewers C.**, Janben T., Wieler L.H. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **2003**; 116 (2): 381-395.
96. **Falcao D.P.**, Leite C.Q., Simoes M.J., Giannini M.J., Valentini S.R. Microbiological quality of recreational waters in Araraquara, SP, Brazil. *Sci. Total. Environm.* **1993**; 128 (7): 37-49.
97. **Farnleitner A. H.**, Hocke L., Beiwl C., Kavka G. G., Zechmeister T., Kirschner A.K.T., Mach R. L. Rapid enzymatic detection of *Escherichia coli* contamination in polluted river water. *Letters Appl. Microbiol.* **2001**; 33 (1): 246-250.
98. **Faust M.A.**, Aotaky A.E., Hargadon M.T. Effect of physical parameters on the in situ survival of *Escherichia coli* MC-6 in an estuarine environment. *J. Appl. Microbiol.* **1975**; 30 (1): 800- 806.
99. **Fernández A.** Contribución a la evaluación y el monitoreo de la sequía meteorológica en el sistema del INRH. *Rev. Voluntad Hidráulica.* **2009**; 101 (9): 53-59.
100. **Fernández Y.**, Sánchez F.D., Laria N.C., Díaz M. Caracterización y evaluación de las aguas superficiales del municipio Marianao. *Rev. Ingeniería Hidráulica y Ambiental.* **2004**; 25 (1): 21-31.
101. **Ferreira M.**, Vaz-Moreira I., Gonzalez-Pajuelo M., Nunes O., Manaia H. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecology.* **2007**; 60 (2): 166–176.
102. **Fewtrell L** y Bartram J. Water quality: Guidelines, Standards and Health. World Health Organization Water Series. IWA **2001**. Publishing, London (UK).
103. **Figuroa G.**, del Pilar M., Alcayde L., Soto V. G., Ross O. K. Adherencia *in vitro* de *Escherichia coli* 0111 a células HEp-2. *Rev. Chil. Padiatr.* 1986; 57 (4): 325-330.
104. **Fiksdal L.**, Tryland I. Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality. *Current Opin. Biotech.* **2008**; 19 (3): 289- 294.
105. **Fremaux B.**, Prignet-Combaret C., Vernozy-Rozand C. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: An updated review. *Vet. Microbiol.* **2008**, 132 (4): 1–18.



106. **Fricker** C.R., DeSarno M., Warden P.S., Eldred B.J. False negative  $\beta$ -D-glucuronidase reactions in membrane lactose glucuronide agar medium used for the simultaneous detection of coliforms and *Escherichia coli* from water. *Letters Appl Microbiol.* **2008**; 47 (6): 539-42.
107. **Friedman** M.S., Roels T., Koehler J.E., Feldman L., Bibb W.F., Blake P. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool. *Clin. Infect. Dis.* **1999**; 29 (7), 298–303.
108. **Friedrich** G., Chapman D., Beim A. The use of biological material. En Chapman D. Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring. Cap 4. 2da ed, UK E&FN Spon, Chapman & Hall: **1996**: 186-246.
109. **Galindo** J.A., Vázquez L., Cruz M.A., López M., del Angel P. Contaminación del Río Cazonas, Veracruz, México durante el periodo octubre 2004 – junio 2005. *Rev. UDO Agrícola.* **2005**; 5 (1): 74-80.
110. **Ganoza** C.A., Matthias M.A., Collins-Richards D., Brouwer K.C., Cunningham C.B., Segura E.R., Gilman R.H., Gotuzzo E., Vinetz J.M. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med.* 2006; 3 (1): 1329–1340.
111. **Garaizar** J., López-Molina N., Laconcha I., Baggesen D.L., Rementeria A., Vivanco A., Audicana A., Perales I. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent- restriction-site PCR, and Pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis" *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**; 66 (12): 5273-5281.
112. **García** C. Detección del gen *stx2* en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. Universidad de Barcelona. España. **2004**. 199p.
113. **García** L., Martínez A.J., Pérez M., López L., Ruiz M., Solar F., Beltrán J. Evaluación de la calidad ambiental de las aguas del litoral de la Ciudad de La Habana en el período lluvioso del año 2009. *Rev. Manejo, Gestión y Certificación de Playas.* **2009**; 8 (1): 118- 123.
114. **García** M.J y Pérez R. Recursos Hídricos Cuba 2011. Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos. Fundación FENSA y BID. **2011**; 42p.
115. **García** S. B., Calderón B., Martínez W. Resistencia antimicrobiana de los principales agentes etiológicos de las infecciones del tracto urinario. *COCMED.* **2010**; 14 (4): 1-11.
116. **García-Armisen** T. y Servais P. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization. *J.Microbiol. Methods.* **2004**; 58 (1): 269– 279.
117. **García-Armisen** T., Prats J., Servais P. Comparison of culturable fecal coliforms and *Escherichia coli* enumeration in freshwaters. *Can J Microbiol.* **2007**; 53 (8): 798-801.
118. **George** I., Crop P., Servais P. Use of  $\beta$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewater. *Can. J. Microbiol.* **2001**; 47 (3): 670-675.

119. **Gerba** C.P. y McLeod J.S. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **1976**; 32 (1): 114-120.
120. **Gismero-Ordoñez** J., Dall'Agnol M., Trabulsi L. R., Giro'n J. A. Expression of the bundle-forming pilus by enteropathogenic *Escherichia coli* strains of heterologous serotypes. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; 40 (4):2291–2296.
121. **González** M.I. y Rubalcaba S. Uso seguro y riesgos microbiológicos del agua residual para la agricultura. *Rev Cub de Salud Pública* **2010**; 37 (1):61-73.
122. **González** M.I. Aislamiento de *Vibrio cholerae* no O1 y especies asociadas en aguas. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias de la Salud. INHEM, Ciudad de La Habana, INHEM, **2002**.
123. **González** M.I., Torres T., Chiroles S. Calidad microbiológica de aguas costeras en climas tropicales. *Cuba@: Medio Ambiente y Desarrollo* (Rev. electrónica de Medio Ambiente). **2003**; 3 (4). [Consultada: 9 de enero de 2012]. Disponible en: [www.medioambiente.cu/revistama/4\\_03.asp](http://www.medioambiente.cu/revistama/4_03.asp).
124. **González** M.I., Torres T., Nolasco T. Bacterias enteropatógenas e indicadores de contaminación en aguas recreativas para campismo. En: *Salmonella* en el ambiente, **1996**; Serie *Salud Ambiental No 4*. INHEM, ECIMED, México.
125. **GTE – BH** (Grupo de Trabajo Estatal para el Saneamiento, Conservación y Desarrollo de la Bahía de la Habana) Cuenca del río Luyanó, Ciudad de La Habana. 4 p. (inédito).
126. **Guajardo** L. Claudia E., González M. Pedro M., Ayala G., Juan J. Resistencia antimicrobiana en la infección urinaria por *Escherichia coli* adquirida en la comunidad. ¿Cuál antibiótico voy a usar?. *Rev. Salud Pública de México*. 2009; 51 (4): 155 – 158.
127. **Gutiérrez** J.E., Castaño Z., Marsán R., González K., Pérez Y., Vetter M. Diagnóstico hidrológico-ambiental de la cuenca del río Quibú, de Ciudad de La Habana, y recomendaciones para el manejo sostenible de sus aguas. Proyecto CAESAR, IMCO-DEV, 2002-05, desarrollado por Universidad de Munich, Universidad de La Habana, UAM de Madrid y UNAM de México. **2005**.
128. **Gyles** C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci.* **2007**; 85 (13 Suppl): 45-62.
129. **Halabi** M., Orth D., Grif K., Wiesholzer-Pittl M., Kainz M., Schöberl J., Dierich M.P., Allerberger F., Würzner R. Prevalence of Shiga toxin-, intimin- and haemolysin genes in *Escherichia coli* isolates from drinking water supplies in a rural area of Austria. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **2008**, 211 (4), 454–457.
130. **Hamelin** K., Bruant G., El-Shaarawi A., Hill S., Edge T.A., Fairbrother J., Harel J., Maynard C., Masson L., Brousseau R. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Appl Environ Microbiol.* **2007**; 73 (2):477–484.



131. **Hamelin** K., Guillaum B., El-Shaarawi A., Hill S., Edge T.A., Bekal S., Fairbrother J.M., Harel J., Maynard C., Masson L., Brousseau R. 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.* **2006**; 72 (9): 4200–4206.
132. **Harada** K. y Asai T. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J. Biom. Biotech.* **2010**; 18 (6): 1-12.
133. **Harakeh** S., Yassine H., El-Fadel M. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. *Environ. Pollution.* **2006**; 143: 269-277.
134. **Harrington** S. M., Dudley E. G., Nataro J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**; 254 (1):12–18.
135. **Hartskeerl** R.A., Collares Pereira M., Ellis B.A. Emergence, control and re emerging leptospirosis dynamics of infection in the changing world. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17 (7): 494–501.
136. **Harwood** V., Levine A., Scott T., Chivukula V., Lukasik J., Farrah S., Rose J. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol.* **2005**; 71 (8): 316-70.
137. **Heinikainen** S., Pohjanvirta T., Eklund M., Siitonen A., Pelkonen S. Tracing Shigatoxigenic *Escherichia coli* O103, O145, and O174 infections from farm residents to Cattle. *J. Clin. Microbiol.* **2007**; 45 (11): 3817-3820.
138. **Hernández** F., Rodríguez Z., Ferrer F., Trufero N. Enfermedades diarreicas agudas en el niño: comportamiento de algunos factores de riesgo. *Rev Cubana Med Gen Integr.* **2000**; 16(2):129-33
139. **Herrera** L., Muñoz J., Medina H. *Escherichia coli* fecal resistente a antibióticos en niños sanos. ¿Inducción por uso de antibióticos? *Rev. Invest. Clin.* **2002**; 54 (7):108-112.
140. **Hildebrand** J.M., Maguire H.C., Holliman R.E., Kangesu E. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **1996**; 6 (1): 33-36.
141. **Hornitzky** M.A., Mercieca K., Bettelheim K.A., Djordjevic S.P. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. *Appl Environ Microbiol.* **2005**, 71 (5):3405-3412.
142. **Hoshina** K., Itagaki A., Seki R., Yamamoto K., Masuda S., Muku T., Okada N. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak caused by contaminated natural water supplied by facility owned by local community. *Jap. J. Infect. Dis.* **2001**; 54 (9): 247-248.
143. **Houang** E.T., Chu Y.W., Nug T.K., Chen F.B. Study of the relatedness of isolates of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* obtained in 1986 and 1987 and in 1994 and 1995 from Hong Kong. *J Clin Microbiol.* **2000**; 36 (6):2404-2407.

144. **Hu** J. Y., Shi J. C., Chang H., Li D., Yang M., Kamagata Y. C.. Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin. *Environ. Sci. Technol.* **2008**; 42 (6):3415–3420.
145. **Hunter** P.R. Drinking water and diarrheal disease due to *Escherichia coli*. *J. Water Health.* **2003**; 2: 65-72.
146. **Ishii** S. y Sadowsky M.J. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes Environ.* **2008**; 23 (5): 101-108.
147. **Jasinski** C., Gadea P., Tanzi M.N. *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital “Pereira Rossel”. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Rev Med Urug.* **2007**; 23 (7): 153-163.
148. **Jiménez** A., Jiménez A., Arrabal M.A., Nogueras M. Resistencias a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido. *Hig San Amb.* **2009**; 9: 449-466.
149. **Jiménez** Y. Estudio de la contaminación de las aguas fluviales de la Cuenca Hidrológica Superficial Luyanó. Trabajo de Diploma. Facultad de Geografía. Universidad de La Habana. **2007**.
150. **Johnson** J.R. y Russo T.A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*.” *J Lab Clin Med.* **2002**; 139 (13):155–162.
151. **Jordá** L., Vila A., Lanza A., Bonvehi P., Nazar J., Mikietuk A., Labat R., Smayevsky J. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **2005**; 39 (1): 19-25.
152. **Junco** R.A., Suárez M.T., Weng Z., Chiroles S., González M.I., Díaz O.E., Rodríguez M.C. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. *Hig. San. Ambient.* **2006**; 6: 150-59.
153. **Kaper** J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Medical Microbiol.* **2005**; 295 (1): 355-356.
154. **Kaper** J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**; 2(2): 123-140.
155. **Kariuki** S., Cheesbrough J., Mavridis A.K., Hart C.A. Typing of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi C isolates from various countries by plasmid profiles and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J.Clin.Microbiol.* **1999**; 37 (6): 2058-2060.
156. **Kauffmann** K.M. The serology of the *E. coli* group. *J. Immunol.* **1947**; 57 (5):71-100.
157. **Kloot** R.W., Radakovich B., Huang X., Brantley D. A comparison of bacterial indicators and methods in rural surfacewater. *Environ Monit Assess.* **2006**; 121 (12): 275–287.
158. **Knutton** S., Phillips A.D., Smith H.R. Screening for Enteropathogenic *Escherichia coli* in Infants with Diarrhea by the Fluorescent-Actin Staining Test. *Infect Immun.* **1991**; 59 (1):365-371.
159. **Knutton** S., Shaw R.K., Bhan M.K. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. *Infect Immun.* **1992**; 60 (5):2083–2091.

160. **Koneman** E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Tenover F.C., Tenover W.C. Diagnóstico Microbiológico. **1999**. Texto y atlas en color. 5<sup>ta</sup> edn Panamericana.
161. **Ksoll** W. B., Ishii S., Sadowsky M. J., Hicks R. E. Presence and sources of fecal coliform bacteria in epilithic periphyton communities of Lake Superior. *Appl Environ Microbiol.* **2007**; 73 (10) (12): 3771-3778.
162. **Lacher** D.W., Steinsland H., Blank T.E., Sonnenberg M.S., Whittam T.S. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J Bacteriol.* **2007**, 189:342-350
163. **Lanyi** B., Szita J., Ringelmann A. A waterborne outbreak of enteritis associated with enteroinvasive *Escherichia coli* serotype 124:72:32. *Acta. Microbiol. Hungarica.* **1959**; 6: 77-78.
164. **Laroche** E., Pawlak B., Berthe T., Skurnik D., Petit F. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol.* **2009**; 68 (5):118–130
165. **Larrea** J., Rojas M., Romeu B., Lugo D., Rojas N., Heydrich M. Empleo del medio agar Chromocult en la evaluación de la calidad microbiológica en ecosistemas acuáticos tropicales. *Hig y San Amb.* **2010**; 10 (1): 535-44.
166. **Larrea** J.A., Rojas M., Heydrich M., Romeu B., Rojas N., Lugo D. Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas del complejo turístico “Las Terrazas”, Pinar del Río (Cuba). *Hig. San. Ambient.* **2009**; 9: 492-504.
167. **Lau** C., Smythe L., Craig S., Weinstein P. Climate change, flooding, urbanization and leptospirosis: fuelling the fire. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2010**; 104: 631–638.
168. **Law** D. A review: Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.* **2000**; 88 (6):729-745.
169. **Lawrence** J.G. y Ochman H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**; 95 (5): 9413-9417.
170. **Lazo** L., Dahbi G., Blanco M., Blanco J.E., Blanco J., Llorens F. Aplicación de técnicas moleculares en la caracterización de aislados de *Escherichia coli* procedentes de cerdos con síndrome diarreico en la provincia de Villa Clara. *Rev. Salud Anim.* **2009**; 31 (2): 93-104
171. **Li** D., Yang M., Hu J., Zhang J., Liu R., Gu X., Zhang Y., Wang Z. Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environ. Microbiol.* **2009**; 11 (6):1506–1517.
172. **Licence** K., Oates K.R., Syngé B.A., Reid T.M. An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol. Infect.* **2001**; 126 (9): 135-138.

173. **Lidin-Janson** G., Kaijser B., Lincoln K., Olling S., Wedel H. The homogeneity of the faecal coliform flora of normal school-girls, characterized by serological and biochemical properties. *Med. Microbiol. Immunol.* **1978**; 164 (8):247–253.
174. **Liébana** E., Guns D., García-Migura L., Woodward M.J., Clifton-Hadley F., Davies R.H. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, 39 (10): 3609-3616.
175. **Literak** I., Dolejska M., Janoszowska D., Hrusakova J., Meissner W., Rzycka H., Bzoma S., Cizek A. Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum Beta-Lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**; 76 (24): 8126-8134
176. **Llip** E.K., Kurz R., Vincent R., Rodríguez-Palacio C., Farrah S.R., Rose J.B. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries.* **2001**; 24 (2): 266-276.
177. **Lluque** A., Mercado E., Riveros M., Alvarado L., Carlos E., Colichón A., Salazar E., Ochoa T. Comparación entre el diagnóstico serológico y el diagnóstico por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). *Rev. Gastroenterol. Perú.* **2010**; 30 (2): 121-125.
178. **López- Saucedo** C., Cerna J., Villegas-Sepulveda N., Thompsom R., Velazquez F.R., Torres J., Tarr P.I., Estrada-García T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**; 9 (1): 127-131.
179. **Loukiadis** E., Kérouédan M., Beutin L., Oswald E., Brugère H. Characterization of Shiga toxin gene (stx)-positive and intimin gene (eae)-positive *Escherichia coli* isolates from wastewater of slaughterhouses in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72 (2): 3245–3251.
180. **Lucena** F., Duran A. E., Morón A., Calderón E., Campos C., Gantzer C., Skraber S., Jofre J. Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting fecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *J. Appl. Microbiol.* **2004**; 97(7): 1069-1076.
181. **Lyautey** E., Lu Z., Lapen D. R., Wilkes G., Scott A., Berkers T. E., Edge T. A, Topp E. Distribution and diversity of *Escherichia coli* populations in the South Nation River drainage basin, Eastern Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**; 76 (2):1486–1496.
182. **MacCarthy** T.A., Barret N.L., Hadler J.L., Salsbury B., Howard R.T., Dingman D.W., Brinkman C.D., Bibb W.F., Cartter M.L. Hemolytic-Uremic Syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut, 1999. *Pediatr.* **2001**; 59 (2): 108-115.
183. **Maheux** A.F., Huppé V., Boissinot M., Picard F.J., Bissonnette L., Bernier J.T., Bergeron M.G. Analytical limits of four  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -galactosidase-based commercial culture methods used to detect *Escherichia coli* and total coliforms. *J Microbiol Methods.* **2008**; 75 (3): 506-514.

184. **Manafi** M. Rapid detection of total coliforms and E.coli in water using Fluorocult LMX broth. *Microbiol.* **1994**; 55 (3): 320.
185. **Martin** A.P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**; 68 (8): 3673-3682.
186. **Martínez** A., Fonseca K., Ortega J.L., García-Luján C. Monitoreo de la calidad microbiológica del agua en la cuenca hidrológica del Río Nazas, México. *Rev. Química Viva.* **2009**; 8 (1): 35-47.
187. **Martins** M.T., Rivera I.G., Clark D.L., Olson B.H. Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal o- nitrophenol- $\beta$ -D-galactopyranoside-4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**; 58 (1): 3095-3100.
188. **Maslow** J.N., Mulligan M.E., Arbeit R.D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1993**; 17 (3): 153-162.
189. **Mauro** S.A. y Koudelka G. B. Shiga Toxin: Expression, Distribution, and Its Role in the Environment. *Toxin.* **2011**; 3: 608-625.
190. **Mazel** D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews.* **2006**; 4 (2): 608- 620.
191. **Mazzariol** A., Zuliani J., Fontana R., G. Cornaglia. Isolation from blood culture of a *Leclercia adecarboxylata* strain producing an SHV-12 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol* **2003**; 41 (4): 1738-39.
192. **McCall** B.J., Slinko V.G., Smith H.V. Heel K.; Culleto, T.H., Kelk, V.R., Stafford R.J. An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with a school camp. *Commun. Dis. Intell.* **2010**, 34: (5): 54–56.
193. **McDougal** L., Steward G., Kilgore J.M., McAllister K., Tenover F.C. Pulse-field gel electrophoresis typing of *Shigella* isolates from United States establishing a national data base. *J Clin Microbiol.* **2003**; 41 (6): 5113-20.
194. **McKee** M. I. y O'Brien A. Investigation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. *Infection Immunity.* 1995; 63 (5): 2070–2074.
195. **McKeon** D., Calabrese J., Bissonnettes G. Antibiotic resistant Gram negative bacteria in rural ground water supplies. *Wat Res.* **1995**; 29 (1):1902-8.
196. **McLellan** S.L., Daniels A.D., Salmore A.K. Clonal population of thermotolerant Enterobacteriaceae in recreational water and their potential interference with fecal *Escherichia coli* counts. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**; 67 (4): 4934-4938.
197. **McPeake** J.W., Smyth J.A., Ball H.J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet. Microbiol.* **2005**; 110 (22): 245-253.

198. **Medina** A.M., Rivera F.P., Romero L.M., Kolevic L.A., Castillo M.E., Verne E. Diarrheogenic *Escherichia coli* in HIV pediatric patients in Lima, Perú. *Am J Trop Med Hyg.* **2010a**; 83 (1):158-63.
- Medina** M.G., Esquivel P., Lifschitz V., Medina M.L., Lösch L.S., Merino L.A. Detección de *Escherichia coli* diarregénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. *Rev Cubana Med Trop.* **2010b**; 62 (1):56-65.
199. **Meybeck** M. y Helmer R. An introduction to water quality. En Chapman D, editores. Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring. Cap 1, 2da ed. UK, E&FN Spon, Chapman & Hall. **1996**: 19-40.
200. **Miko** M. L., Littlefield-Wyer J., Gordon D. M., Veal D. A., Slade M. B. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environ. Microbiol.* **2005**; 7, 631–640.
201. **Miravet** M.E., Lugioyo M., Loza S., Enriquez D., Delgado Y., Carmenate M., Pérez D.M. Procedimientos para el monitoreo de la calidad ambiental en la zona marino costera a partir de microorganismos. Ediciones Centenario, Santo Domingo, República Dominicana. Cap 1 y 2. **2009**: 7-50.
202. **Moat** A.G., Foster J.W., Spector M.P. Microbial Physiology Chapter 1: Introduction to Microbial Physiology, editores Wiley-Liss, John Wiley & sons, INC., Publication. 4<sup>ta</sup> ed, New York: 2002: 1-26.
203. **Mora** A., Herrera A., López C., Dahbi G., Mamani R., Pita J.M. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and STEC isolated in Spain. *Int Microbiol.* **2011**; 30 (2): 84-89.
204. **Moreno** E., Andreu A., Pigrau C., Kuskowski M.A., Johnson A. R., Prats G. Relationship between *Escherichia coli* Strains Causing Acute Cystitis in Women and the Fecal *E. coli* Population of the Host. *J Clin Microbiol.* **2008**, 46 (8); 2529–2534.
205. **Mulet** C. y Guillen M. Estrategia educativa de saneamiento ambiental del río Luyanó de Ciudad de La Habana. *Rev. Cub. Enferm.* **2003**. 19 (2): 34-37.
206. **Muniesa** M., Jofre J., García-Aljaro C., Blanch A.R. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40 (5): 7141–7149.
207. **Narváez** C., Carruyo G., Moreno M., Rodas A., Hoet A.E., Wittum T.E. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, Estado de Zulia, Venezuela. *Rev. Científica FCV-LUZ.* **2007**; 17 (3): 239–245.
208. **Nataro** J.P. y Kaper J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Reviews.* **1998**; 11 (1): 142-201.



209. **Nataro** J.P., Mai V., Johnson J., Blackwelder W.C., Heimer R., Tirrell S., Edberg S.C., Braden C.R., Glenn M.J., Hirshon J.M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clin.Infect.Dis.* **2006**; 43 (7):402-407.
210. **NC:** Norma Cubana. Lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores. Requisitos higiénicos sanitarios. **1999**. 1ra edn. Oficina Nacional de Normalización. Cuba.
211. **Nguyen** R. N., Taylor L., Tauschek M., Robins-Browne R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**; 12 (2): 597–603
212. **Nishikawa** Y., Zhou Z., Hase A. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of Sporadic Cases of Diarrheal Illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: Prevalence of Enteroaggregative E.coli Heat-Stable Entero toxin 1 Gene-Possesing *E. coli*. *Infect Dis.* **2002**; 55 (6):183-190.
213. **Niyogi** S.K. Shigelosis. *J Clin Microbiol.* **2005**; 43 (1):133-143.
214. **Obi** C.L., Green E., Bessong P.O., de Villiers B., Hoosen A.A., Igumbor E.O., Potgieter N. Gene encoding virulence markers among *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic stool samples and river sources in rural Venda communities of South Africa. *Water SA.* **2004**; 30 (1): 37-42.
215. **O'Brien** A. D. y J. Kaper. 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Yesterday, today, and tomorrow, p. 1-11. En J. Kaper y A. D. O' Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
216. **Ochoa** T.J., Ecker L., Barletta F., Mispireta M.L., Gil A.I., Contreras C. Age related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from periurban areas in Lima, Peru. *Clin Infect Dis.* **2009a**; 49 (11):1694-702.
217. **Ochoa** T.J., Mercado E.H., Durand D., Rivera F.P., Mosquito S., Contreras C., Riveros M., Lluque A., Barletta F., Prada A., Ruiz J. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* **2011**; 28 (1): 45-52.
218. **Ochoa** TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, et al. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* **2009b**; 81 (2):296-301.
219. **Olsen** S.J., Miller G., Kennedy M., Higgins C., Walford J., McKee G., Fox K., Bibb W., Mead P. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**; 8 (1): 370-375.
220. **Orsi** R.H., Stoppe N.C., Sato M.I.Z., Gomes T.A.T., Prado P.I., Manfio G.P., Ottoboni L.M.M. Genetic variability and pathogenicity potencial of *Escherichia coli* isolated from recreational water resevoirs. *Res. Microbiol.* **2007**, 158 (14): 420-427.
221. **Orskov** F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. *Meth Microbiol.* **1984**; 14 (3):43–112.

222. **Ozgunus** O. B., Celik-Sevim E., Alpay-Karaoglu S., Sandalli C., Sevim A. Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. *J. Microbiol.* 2007; 45 (9): 379–387.
223. **Pappas** G., Papadimitriou P., Siozopoulou V., Christou L., Akritidis, N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.* 2008; 12 (4): 351–357.
224. **Pathak** S. P. y Gopal K. Prevalence of bacterial contamination with antibiotic resistant and Enterotoxigenic fecal coliforms in treated drinking water. *J Toxicol Environ Health.* 2008; 71 (7): 427 — 433.
225. **Paton** A.W., Woodrow M.C., Doyle R.M., Lanser J.A., Paton J.C. Molecular characterization of a Shiga toxinogenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolyticuremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37 (3): 3357-3361.
226. **Paunio** M., Pedoby R., Keskimaki M., Kokki M., Ruutu P., Oinonen S., Voutari V., Siitonen A., Lahti E., Leinikki P. Swimming-associated outbreak of STEC. *Epidemiol. Infect.* 1999; 122 (12): 1-5.
227. **Peña** C., Albareda J. M., Pallarés R. Relationship between quinolone use and emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1995; 39: 520-524.
228. **Pérez** D. Los recursos hídricos y su significación en el siglo XXI. El caso particular de Cuba. *Rev Ingen Hid y Amb.* 2002; 23 (3): 9-12.
229. **Pérez**. R. y Valdés H. Recursos Hídricos Cuba 2011. Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos. García MJ, Pérez R. Editores. Fundación FENSA y BID. 2011; 42p.
230. **Periles** I. Contexto ambiental para el manejo integrado del Río Luyanó, Ciudad Habana, Cuba. *Rev. Invest. Mar.* 2006; 27 (1):79-84.
231. **Perna** N.T., Mayhew G.F., Posfai G., Elliott S., Sonnenberg M.S., Kaper J.B., Blattner F.R. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 1998; 66 (5): 3810-3817.
232. **Pignato** S., Coniglio M.A., Faro G., Weill F.X., Giammanco G. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *J Water Health.* 2009; 7 (3): 251–258.
233. **Pisciotta** J.M., Rath Y., Stanek P.A., Flanery D.M., Harwood V.J. Marine bacteria cause false-positive results in the colilert-18 rapid identification test for *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* 2002; 68 (3): 539–44.
234. **Pommepey** M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell R.R., Cormier M. Retention of enteropathogenicity by viable but non-culturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62 (3): 4621-4626.



235. **Pradel** N., Livrelli V., Dechamps C., Palcoux J.B., Reynaud A., Scheutz F. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol.* **2000**; 38 (5):1023–1031.
236. **Prats** J., Larrea J., García- Armisen T., Lugo D., Rodríguez A., Servais P., Rojas N., Heydrich M. Potential risk due to the microbial pollution in the almendares river, Havana, Cuba. *Rev Contribución a la Educación y la Protección Ambiental.* **2006**; 7: 25-34. [Consultada: 15 de julio de 2011]. Disponible en: [www.cphr.edu.cu/public/pub2004.htm](http://www.cphr.edu.cu/public/pub2004.htm).
237. **Prats** J., Romeu B., Rodríguez A., Lugo D., Rojas N., Heydrich M. Determinación de la carga microbiana del río Almendares y su importancia para el saneamiento ambiental. *Rev Contribución a la Educación y la Protección Ambiental* **2008**; 5: 205-210. [Consultada: 16 de agosto de 2011]. Disponible en: [www.cphr.edu.cu/public/pub2004.htm](http://www.cphr.edu.cu/public/pub2004.htm).
238. **Queipo** J.A., Budía A., Jiménez M. J. Evolución de la resistencia microbiana a fluoroquinolonas en un hospital terciario. *Actas Urol Esp.* **2000**; 24: 381-387.
239. **Radu** S., Ling O.W., Rusul G., Abdul Karim M.I., Nishibuchi M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J. Microbiol. Methods.* 2001, 46: 131-139.
240. **Ram** S. y Shanker R. Plasmid and drug resistance of sorbitol non-fermenting cefixime-tellurite resistant *Escherichia coli* isolates from Gomti river. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**; 75 (8): 623–628.
241. **Ram** S., Vajpajee P., Singh R.L., Shanker R. Surface water of a perennial river exhibits multi-antimicrobial resistant shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli*. *Ecotox Environ Safe* **2009**; 72 (9): 490-95.
242. **Ram** S., Vajpayee .P, Shanker R. Contamination of potable water distribution system by multi-antimicrobial resistant enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Environ. Health Perspect.* **2008**; 116 (16): 448–452.
243. **Ram** S., Vajpayee P., Shanker R. Prevalence of multi antimicrobial agent resistant, shigatoxin and enterotoxin producing *Escherichia coli* in surface waters of river Ganga. *Environ. Sci. Technol.* **2007**; 41 (4): 7383–7388.
244. **Ramteke** P. W y Tewari S. Serogroups of *Escherichia coli* from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**; 62 (3): 421-426.
245. **Reischl** U., Youssef M.T., Kilwinski J., Lehn N., Zhang W.I., Karch H., Strobine N. Real Time Fluorescence PCR assays for the detection and characterization of Shiga Toxin, Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-Producing *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; 40 (7) 2555-2565.

246. **Reischer** G.H., Haider J.M., Sommer R., Stadler H., Keiblinger K.M., Hornek R., Zerobin W., Mach R.L., Farnleitner A.H. Quantitative microbial faecal source tracking with sampling guided by hydrological catchment dynamics. *Environ. Microbiol.* **2008**; 10 (1): 2598-2608.
247. **Ribot** E.M., Fair M.A., Gauton R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B., Barrett T.J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocols for subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* for PulseNet. *Food. Path. Dis.* **2006**; 3 (1): 59-72.
248. **Rivas** M., Miliwebsky E., Chinen I., Roldan C.D., Balbi L., García B. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* **2006**; 3: 88-96.
249. **Rivera** S.C., Hazen T.C., Toranzos G.A. Isolation of fecal coliforms from pristine sites in a tropical rain forest. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**; 54 (4): 513-517.
250. **Riveros** M., Barletta .F, Cabello M., Durand D., Mercado E.H., Contreras C.A. Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* **2011**; 28 (1): 10-15.
251. **Rodríguez** A. J., Roevros N., Arpajón Y., Martínez H., Marsán R., Castaño Z., Lugo D., Rojas, N., Heydrich M., Chou L. Assessment of heavy metals bioaccumulation in polluted rivers in Havana. *Rev. Contribución a la Educación y la Protección Ambiental.* **2008**; 8 (2): 205-210. [Consultada: 12 de agosto de 2011]. Disponible en: [www.cphr.edu.cu/public/pub2004.htm](http://www.cphr.edu.cu/public/pub2004.htm).
252. **Rodríguez** A., Novoa M., Mieres M.A., Herrera R. Determinación de coliformes totales y *E. coli* en aguas utilizando Fluorocult LMX (MERCK). *Rev. Ingeniería Hidráulica y Ambiental.* **2003**; 24 (3): 15-18.
253. **Rodríguez-Angeles** G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Rev. Salud Pública de México.* **2002**, 44 (5): 464-475.
254. **Rojas** N., Torres G., Romeu B., Prats J. Evaluación de la calidad microbiana del río Almendares para usos recreativos. *Rev. Contribución a la Educación y la Protección Ambiental.* **2005**; 6:200-208.
255. **Rompre**´ A, Servais P, Baudart J, de-Roubin M, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods.* **2002**; 49 (6): 31–54.
256. **Rosas** I., Salinas E., Martínez L., Calva E., Cravioto A., Eslava C., Amábile- Cuevas C.F. Urban dust faecal pollution in Mexico City: antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli*. *Int J Hyg Environ Health.* **2006**; 209 (9): 461–470.
257. **Rosser** S. y Hilary-Kay Y. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antim Chemoth.* **1999**; 44 (3): 11-18.
258. **Rua de Cabo** A., Valdivia I.M., Vicente E. Conflictos ambientales en la cuenca hidrográfica del río Quibú. *Revista de Geografía da UFC.* **2006**; 5 (10): 20-28.

259. **Russo** T.A. y Johnson J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* **2003**; 5 (3): 449–456.
260. **Sánchez** A.A., Navarro R.B., Márquez R.F., Quintana M.F., Pérez L.S., Guilarte O.D. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from children in Cuba. *Pediatr Infect Dis J.* **2008**; 27 (12):1122-3.
261. **Savageau** M.A. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Am. Nat.* **1983**; 122 (2): 732-744.
262. **Sayah** R S, Kaneene J B, Johnson Y, Miller R A. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol.* **2005**; 71 (3):1394–404.
263. **Scaletsky** I. C. A., Aranda K. R. S., Souza T. B., Silva N. P. Adherence factors in atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol.* **2010**; 48 (1): 302–306.
264. **Scaletsky** I. C. A., Milani S. R., Trabulsi L. R., Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1988**; 56 (11): 2979-2983.
265. **Scaletsky** I. C. A., Silva M. L. M., Toledo M. R. F., Davis B. R., Blake P. A., Trabulsi L. R. Correlation between adherence to HeLa cell and serogroups, serotypes and bioserotypes of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1985**; 49 (2): 529-532.
266. **Scaletsky** I. C. A., Silva M. L. M., Trabulsi L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **1984**; 45 (5): 534–536.
267. **Scheiner** J.M., Nadeau É, Weagant S., Grant, M. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **2009**; 25 (2): 555-569
268. **Scheutz** F. y Strockbine N.A. Genus I. *Escherichia*. In: Brenner, D.J., et al. (Eds.) The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. Springer. **2005**; 2 (Part B) 607-623.
269. **Scheutz** F., Cheasty T., Woodward D., Smith H.R. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS.* **2004**; 112 (6): 569-584.
270. **Schlager** T.A., Hendley J.O., Bell A.L., Whittam T.S. Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect. Immun.* **2002**; 70 (3): 1225-1229.
271. **Schwartz** D. y Cantor C. Separation of yeast chromosome sized ADNs by Pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **1984**, 37 (3): 67-75.
272. **Shehane** S.D., Harwood V.J., Whitlock J.E., Rose J.B. The influence of rainfall on the incidence of microbial faecal indicators and the dominant sources of faecal pollution in a Florida river. *J. Appl. Microbiol.* **2005**; 98 (7): 1127-1136.

273. **Shpigel** N., Elazar S., Rosenshine I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Current Opinion Microbiol.* **2008**; 11 (1): 60–65.
274. **Siew-Leng** Loo, Anthony G. Fane, William B. Krantz, Teik-Thye Lim. Emergency water supply: A review of potential technologies and selection criteria. *Water Res.* **2012**; 46 (10): 3125-3151.
275. **Sinclair** R.G., Rose J.B., Hashsham S.A., Gerba C.P., Haas C.N. Criteria for Selection of Surrogates Used To Study the Fate and Control of Pathogens in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**; 78 (6): 1969-1977.
276. **Singh** DV, Matte MH, Matte GR, Jiang S, Sabeena F, Shukla BN, Sanyal SC, Huq A, Colwell RR. Molecular analysis of *Vibrio cholera* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**; 67 (2): 910-921.
277. **Sirot**, D., De Champs C., Chanal C., Labia R., Darfeuille-Michaud A., Perroux R., Sirot, J. Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antim. Agents Chemoth.* **1991**; 35 (2):1576-1581.
278. **Smith** C.J., Olszewsk A.M., Mauro, S.A. Correlation of Shiga toxin gene frequency with commonly used microbial indicators of recreational water quality. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75 (4): 316–21.
279. **Smith** J.L., Fratamico P.M., Gunther N.W. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Review. Foodborne Patho Dis.* **2007**; 4 (2): 134-163.
280. **Sossa**, K. Prevalencia de integrones bacilos Gram negativos heterotróficos aeróbicos, aislados del río Biobío y su relación con el fenotipo de Resistencia a antibióticos. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Microbiología. **2000**. Escuela de Graduados. Universidad de Concepción.
281. **Souza** V., Castillo A., Rocha M., Sandner L., Silva C., Eguiarte L.E. Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *INCI.* **2001**; 26 (10): 1-14.
282. **Spano** L.C., Sadovsky A.D., Segui P.N., Saick K.W., Kitagawa S.M., Pereira F.E. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *J Med Microbiol.* **2008**; 57 (10): 359-63.
283. **Srinivasan** V., Hyang-Mi N., Sawant A., Headrick S., Nguyen L., Stephen O. Distribution of Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes and Class 1 Integrons in *Enterobacteriaceae* Isolated from Dairy and Nondairy Farm Soils. *Microbial Ecology.* **2008**; 55 (8): 184–193.
284. **Stock** I., Burak S., Wiedemann B. Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**; 10 (8): 724-733.
285. **Swaminathan** B. y Matar G.M. Molecular typing methods: definition, applications, and advantages. En: Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J., editors. Diagnostic molecular

- microbiology: principles and applications. Washington, DC: America Society for Microbiology; **2001**: 26-50.
286. **Tamaki** Y., Narimatsu H., Miyazato T. The relationship between O- Antigens and pathogenic Genes of Diarrhea-associated *Escherichia coli*. *Jpn J Infect Dis.* **2005**; 58 (2), 65-69
287. **Tarr** C.L., Nelson A.M., Beutin L., Olsen K.E.P., Whittam T.S. Molecular characterization reveals similar virulence gene content in unrelated clonal groups of *Escherichia coli* of serogroup O174 (OX3). *J. Bacteriol.* **2008**; 190 (4): 1344-1349.
288. **Temple** K. L., Camper A. K., McFeters G. A. Survival of two enterobacteria in feces buried in soil under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**; 40: 794-797.
289. **Tennant** S.M., Tauschek M., Azzopardi K., Bigham A., Bennett-Wood V., Hartland E. L., Qi W., Whittam T.S., Robins-Browne R.M. Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC Microbiology.* **2009**; 117(9):1-11
290. **Tenover** F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persin D.H. Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. *J. Clin. Microbiol.* **1995**; 3 (1): 2233-2239
291. **Tervieza** S.I., MacFeters G.A. Survival and injury of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* in stream water. *Can. J. Microbiol.* **1991**; 37: 785-790.
292. **Torođlu** S. y Dinçer S. Elimination and conjugal transfer of their resistance in isolated Gram Negative bacteria from Aksu River (Kahramanmaraş- Turkey). *Adv. Environ. Biol.* 2008; 2: 124-131.
293. **Troncoso** W. Cap Definiciones en Curso de Contaminación Marina. Métodos Analíticos para Aguas, sedimentos y organismos, REDCAM, Colombia, 14pp. 2006
294. **Trousselier** M., Bonnefont J.L., Courties C., Derrien A., Dupray E., Gauthier M., Gourmelon M., Joux F., Lebaron P., Martin Y, Pommepuy M. Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanologica Acta.* 1998; 5: 965-981.
295. **Tsolis** R.M., Young G.M., Solnick J.V., Baumler A.J. From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat Rev Microbiol.* **2008**; 6 (3): 883-92.
296. **Turner** R., Solberg O., Lee B., Raphael E., DebRoy C., Riley L. Global Spread of Mobile Antimicrobial Drug Resistance Determinants in Human and Animal *Escherichia coli* and *Salmonella* Strains Causing Community-Acquired Infections. *Clinical Infectious Diseases.* **2006**; 49 (7): 365–71.
297. **Tzoc** E., Arias M. L., Valiente C. Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp. *Rev Biomed.* **2004**; 15 (3):165-172.
298. **USEPA** (United State Environmental Protection Agency). Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria. EPA-823-B-003. **2002**. Office of Water, Washington, DC.

299. **Valcárcel** L., Borroto J., Alberro N., Griffith J., Derivet M., Flores P., Cuesta J., Rodríguez M., Herrero Z., Rodríguez A., Domínguez J. Modelación de la calidad del agua en el segmento medio del río Luyanó. *Nucleus*, **2010**; 47 (4): 16-23.
300. **Valdespino** J.L., García M.L., Del Río Y.A. Epidemiología y etiología de las diarreas infecciosas. El caso de México. *Rev. Lat. Microbiol.* **1994**; 36 (4): 307-324.
301. **Varela** G., Chinen I., Gadea P., Miliwebsky E., Mota M.I., González S., González G., Gugliada M.J., Carbonari C.C., Algorta G., Bernadá M., Sabelli R., Pardo I., Rivas M., Schelotto F. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Rev. Argentina Microbiol.* **2008**; 40 (2): 93-100.
302. **Vein** J., Perrin A., Berny P. J., Benoit E., Leblond A., Kodjo A. Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Can. J. Microbiol.* **2012**; 58 (1): 828-835.
303. **Vidal** J.E., Canizález A., Gutiérrez J., Navarro F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev. Salud Pub. Mex.* **2007**; 49 (5): 376-386.
304. **Vilanova** X., Manero A., Cerda M., Blanch A.R. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**; 96 (6): 279-288.
305. **Von Baum** H. y Marre R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005; 295 (7): 503– 511.
306. **Vu-Khac** H., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., Mora A., López C., González E.A., Blanco J. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Veterinary Journal.* **2007**; 174 (2): 176-187.
307. **Wade** T., Calderon R.L., Brenner K.P., Sams E., Beach M., Haugland R., Wymer L., Dufour A.P. High sensitivity of children to swimming associated gastrointestinal illness. *Epidemiology.* **2008**; 19 (3): 375-383.
308. **Watabe** M., Hogg G.M., Millar B., Crothers L., Rooney P.J., Loughrey A., Goldsmith C.E., McMahon M.A.S., McDowell D.A., Moore J.E. Epidemiological study of *E. coli* O157:H7 isolated in Northern Ireland using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Ulster Med J.* **2008**; 77 (3) 168-174
309. **Watkinson** A.J., Micalizzi G.R., Bates J.R., Costanzo S.D. Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use modified chromogenic agar. *Appl Environ Microbiol.* **2007**; 73 (3): 2224-2229.
310. **WHO** (World Health Organization). Addendum to guidelines for safe recreational water environments. **2009**; 1: 33p.
311. **WHO** (World Health Organization). Informe de salud del mundo 2011. Wim Van Lerberghe, Annick Manuel, Zoë Matthews y Cathy Wolfheim, Editores. Ediciones OMS. **2011**. 36p.



312. **WHO** (World Health Organization). Guidelines for safe recreational water environments. Coastal and Fresh waters. Chapter 4. Faecal pollution and water quality. **2003**; 1: 30p.
313. **Winfield** M.D. y Groisman E.A. Role of nonhost environment in the lifestyle of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**; 69 (7): 3687-3694.
314. **Yoder** J.S., Hlavsa M.C., Craun G.F., Hill V., Roberts V., Yu P.A., Hicks L.A., Alexander N.T., Calderon R.L., Roy S.L., Beach M.J. Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks associated with recreational use and other aquatic facility-associated health events – United States, 2005 – 2006. *Surveillance Summaries.* **2008**; 57 (9): 380-390.
315. **Zambrano** J.L., Botero L., Cavazza M.E., Ávila M. Resistencia a antimicrobianos y presencia de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas residuales crudas y tratadas por lagunas de estabilización con fines de reuso en agricultura. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **2002**; 22 (1): 44-50.
316. **Zepeda** H.M. y González G.M. *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with prefixed cells. *J. Clin. Microbiol.* **1995**; 33 (5): 1414-1417.
317. **Zotta** C.M., Carbonari C., Gómez D., Deza N., Lavayén S., Miliwebsky E., Monzani V., Manfredi E., Morvay L., Rivas M. New genetic pattern of *Escherichia coli* O157:H7 biotype “B” in Argentina. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **2009**; 43 (4): 589-91.

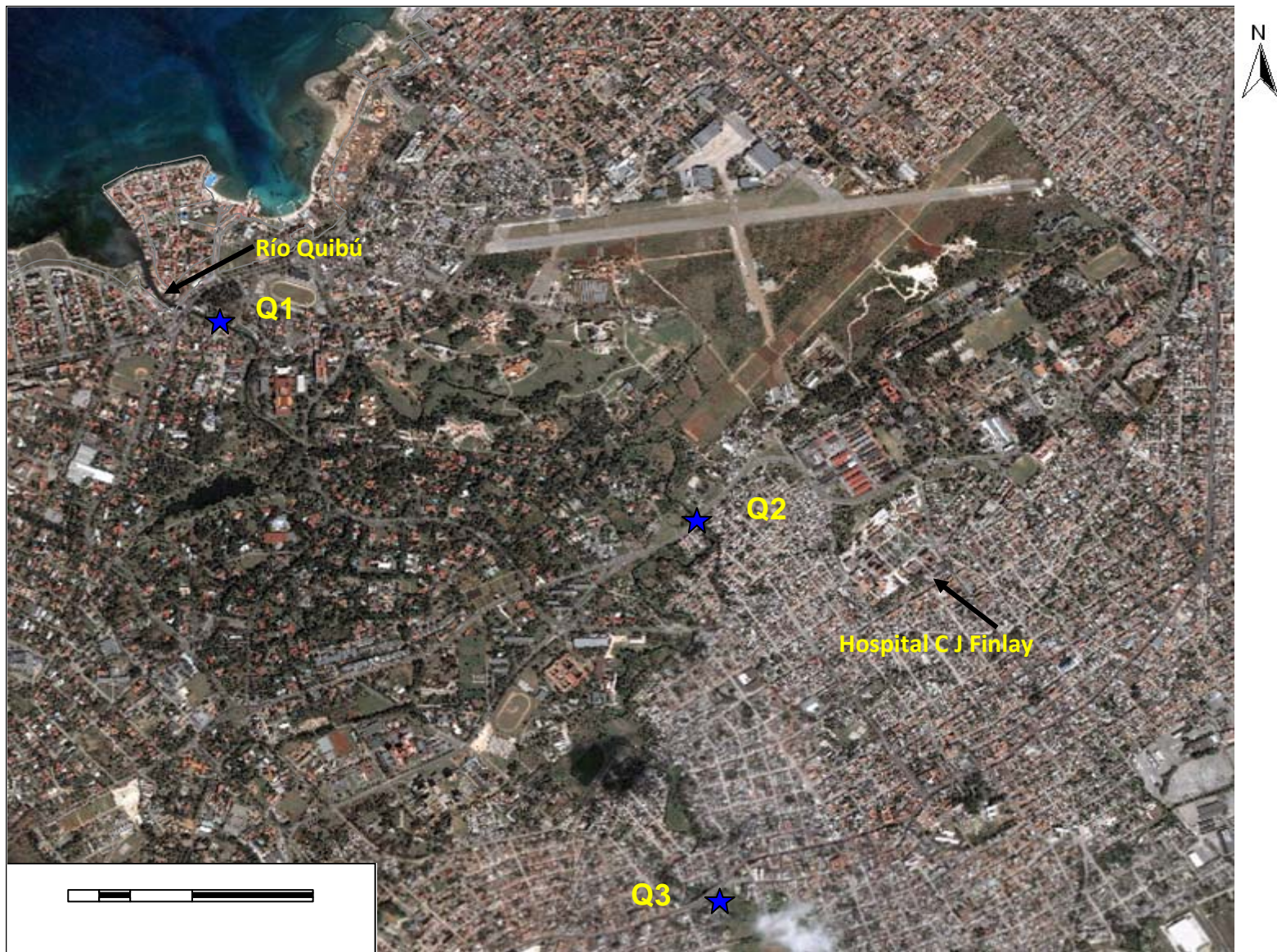
ANEXO 1



Puntos de muestreo en el río Almendares.

A1: Boyeros y calle 100; A2: Puente calle 23; A3: arroyo Paila; A4: arroyo Mordazo.





Puntos de muestreo en el río Quibú.

Q1: Palacio de las Convenciones; Q2: Planta Tratamiento calle 25; Q3: Los Pocitos.





Puntos de muestreo en el río Luyanó

L1: Vía Blanca; L2: Calle Mayor; L3: La Oncena.

## ANEXO 2

Contenido de la Tarjeta VITEK GNI para la identificación de las cepas de *Escherichia coli*

<b>PRUEBAS</b>	<b>COMPONENTES ACTIVOS</b>	<b>REACCIONES/ENZIMAS</b>
ONPG	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)
ADH	L-arginina	Arginina-dehidrolasa
LDC	L-lisina	Lisina-descarboxilasa
ODC	L-ornitina	Ornitina-descarboxilasa
CIT	Citrato trisódico	Utilización del citrato
H <sub>2</sub> S	Tiosulfato sódico	Producción de H <sub>2</sub> S
URE	Urea	Ureasa
TDA	L-triptófano	Triptófano desaminasa
IND	L-triptófano	Producción de indole
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)
GLU	D-Glucosa	Fermentación/Oxidación (Glucosa)
MAN	D-Manitol	Fermentación/Oxidación (Manitol)
INO	Inositol	Fermentación/Oxidación (Inositol)
SOR	D-sorbitol	Fermentación/Oxidación (Sorbitol)
RHA	L-Ramnosa	Fermentación/Oxidación (Ramnosa)
SAC	D-Sacarosa	Fermentación/Oxidación (Sacarosa)
MEL	D-Melibiosa	Fermentación/Oxidación (Melibiosa)
AMY	Amigdalina	Fermentación/Oxidación (Amigdalina)
ARA	L-Arabinosa	Fermentación/Oxidación (Arabinosa)
TRE	D-Trehalosa	Fermentación/Oxidación (Trehalosa)
ARB	Arbutina	Fermentación/Oxidación (Arbutina)
RAF	D-Rafinosa	Fermentación/Oxidación (Rafinosa)
XIL	D-Xilosa	Fermentación/Oxidación (Xilosa)
GLI	Glicerol	Fermentación/Oxidación (Glicerol)
MAL	D-Maltosa	Fermentación/Oxidación (Maltosa)
OX	-	Citocromo-oxidasa

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

1. **B. Romeu**, P. Salazar, D. Lugo, N. Rojas y C. Eslava. Evaluación de la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana. **Revista Cub. Med Trop.** 2012; 64 (2): 90-95.
2. **B. Romeu**, P. Salazar, D. Lugo, C. Eslava y N. Rojas. Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana en aislados de ecosistemas dulceacuícolas. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, 2010; 41, Número especial.
3. **B. Romeu**, Jeny Larrea, Daysi Lugo, Nidia Rojas y Mayra Heydrich. Calidad microbiológica de las aguas de un río urbano: río Luyanó, La Habana, Cuba. **Revista CNIC Ciencias Biológicas**. 2012; Vol 43 (3):1-5.
4. **B. Romeu**, N. Rojas y D. Lugo. Riesgo biológico asociado al empleo de las aguas contaminadas del río Almendares en la zona del Gran Parque Metropolitano de La Habana, Cuba. **Hig. y Sanid. Ambient.** 2011; 11:715-724.
5. M.E. Carballo, M.Heydrich, N. Rojas, I. Salgado, **B. Romeu**, A.M. Manzano, J. Larrea, O. Domínguez, A. Martínez, M.I. Sánchez, M. Cruz, G. Guerra, M. Rojas y M. Ramos. Impact of microbial and chemical pollution in Cuban freshwater ecosystems: strategies for environmental recovery. **Bioteconología Aplicada** 2011; 28 (4): 276-279.
6. Y. Arpajón, **B. Romeu**, A. Rodríguez, M. Heydrich, N. Rojas y D. Lugo. Impacto de los nutrientes inorgánicos sobre la comunidad microbiana del río Almendares (Cuba). **Hig. San. Ambient.** 2011; 11: 731-738.
7. **B. Romeu**, Salazar P, Cruz A, Navarro A, Lugo D, Hernández U, Rojas N, Eslava C. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from surface water of three rivers at Havana, Cuba. **International Microbiology**. Aceptada para publicar.
8. **B. Romeu**, Rojas, N., Marsán, R. y Lugo, D. Necesidad de una conciencia ambientalista en torno al uso de las aguas contaminadas del río Almendares. Habana Verde, **Revista Contribución a la Educación y la Protección Ambiental**, Vol. 8, ISBN 978-959-7136-56-9, 2008.
9. J. Larrea, M. Rojas, M. Heydrich, **B. Romeu**, N. Rojas y D. Lugo. Empleo del medio agar Chromocult en la evaluación de la calidad microbiológica en ecosistemas acuáticos tropicales. **Hig. San. Ambient.** 2010; 10: 535-543.
10. **B. Romeu**, N. Rojas, D. Lugo, C.A Eslava, E. P. Salazar, A. Navarro. Evaluación de la presencia de cepas enterovirulentas de *Escherichia coli* en ecosistemas dulceacuícolas de la Ciudad de La Habana. Taller por el Día Mundial del Medio Ambiente. Universidad de La Habana, 2009. **Editorial Universitaria**. ISBN 978-959-16-1083-6.

## PARTICIPACIÓN EN EVENTOS

### INTERNACIONALES

1. **II Convención Internacional “Geografía, Medio Ambiente y Ordenamiento Territorial”, V Taller Científico Internacional de Manejo de Cuencas Hidrográficas.** Experiencias en el monitoreo ambiental: contaminación de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana. **Beatriz Romeu**, J. Larrea, Y. Rivero, D. Lugo, N. Rojas y M. Heydrich. La Habana, 22-25 Noviembre, 2011.
2. **General Meeting of the American Society of Microbiology.** Characterization of *Escherichia coli* isolates from surface waters reservoirs of Havana, Cuba. **Beatriz Romeu**, E. P. Salazar, D. Lugo, A. Navarro, U. Hernández-China, C.A. Eslava y N. Rojas. San Diego, California, USA, May 23-27, 2010.
3. **IV Simposio Internacional de Química SIQ´2010.** Evaluación de la presencia de cepas enterovirulentas de *Escherichia coli* en ecosistemas dulceacuícolas contaminados de la Ciudad de La Habana. **Beatriz Romeu**, Salazar P., Navarro A., Lugo D., Hernández, U., Rojas N. y Eslava C. Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, 1-4 junio, 2010.
4. **6to Simposio Internacional de Aplicaciones del Ozono y V Simposio Internacional Medio Ambiente del XV Congreso Científico Internacional CNIC 2010.** Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. **Beatriz Romeu**, Paloma Salazar, Armando Navarro, Daysi Lugo, Ulises Hernández, Nidia Rojas and Carlos Eslava. 28 de Junio al 1 de julio del 2010, en el Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba.
5. **I Congreso Iberoamericano de Química, Bioquímica e Ingeniería Química y VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química.** Characterization of *E. coli* strains isolated from ecosystems of Havana city. **Beatriz Romeu**, Paloma Salazar, Armando Navarro, Daysi Lugo, Nidia Rojas y Carlos Eslava. 12 al 16 de octubre de 2009, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba.
6. **VIII Congreso Internacional de Química, Ingeniería y Bioquímica. V Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.** Molecular characterization of *E. coli* strains isolated from surface waters reservoirs of Havana, Cuba. **B. Romeu Alvarez**, E. P. Salazar Jiménez, A. Cruz, M. Heydrich; N. M. Rojas Hernández y C. A. Eslava Campos. 9 al 12 de octubre de 2012, Hotel Meliá Habana, La Habana, Cuba.
7. **VII Congreso Internacional de Educación Superior Universidad 2010.** Contaminación microbiológica y química en sistemas de agua dulce: su amenaza a la diversidad microbiana y la salud humana. Mayra Heydrich, Nidia Rojas, **Beatriz Romeu**, Jeny Larrea, Yunier Arpajón, Daysi Lugo, Raul Marzán.
8. **Universidad 2012. 8vo Congreso Internacional de Educación Superior.** Desarrollo de una cultura ambiental en el contexto universitario: SOS Almendares. **Beatriz Romeu**, Mayra Heydrich y Nidia Rojas. La Habana, 13 al 17 de Febrero de 2012.

## NACIONALES

1. **Taller Universitario por el Día Internacional del Medio Ambiente CEMA. *Beatriz Romeu***, Jeny Larrea e Irina Salgado. Contaminación microbiológica y química en sistemas de agua dulce y su amenaza a la diversidad microbiana y la salud humana. (Junio 2009).
2. **EcoJoven 2009** (Eventos UH y Municipal). ***Beatriz Romeu***, N. Rojas, R. Marzán y D. Lugo (2009). Contaminación del río Almendares en la zona del Gran Parque Metropolitano de La Habana (Febrero y Junio 2009 respectivamente) (Premio a nivel de Universidad).
3. **I Convención Científica del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. II Taller Nacional sobre Medio Ambiente y Salud.** Yunier Arpajón, Anar J. Rodríguez, Zoila Castaño, ***Beatriz Romeu***, Mayra Heydrich, Nidia Rojas y Lei Chou. Calidad química y microbiológica del agua del río Almendares, Ciudad de La Habana, Cuba. 2009.
4. **Universidad 2010. Taller Provincial Medio Ambiente.** Mayra Heydrich, Nidia Rojas, ***Beatriz Romeu***, Jeny Larrea, Yunier Arpajón, Daysi Lugo, Raul Marzán. La contaminación de los ecosistemas dulceacuícolas de nuestra ciudad: un enfoque desde la universidad (Mayo 2009). (Premio Relevante).
5. **Universidad 2012. Taller Provincial Medio Ambiente.** Desarrollo de una cultura ambiental en el contexto universitario: SOS Almendares. ***Beatriz Romeu***, Mayra Heydrich y Nidia Rojas (Mayo 2011).
6. **XVI Forum de Ciencia y Técnica (4ta etapa). Facultad de Biología, Universidad de La Habana y Evento Municipal de Plaza de la Revolución. 2010.** Los microorganismos en el saneamiento ambiental y la recuperación de ecosistemas impactados. ME Carballo, G. Guerra, M. Heydrich, A. Hernández, N. Rojas, O. Coto, M. Rojas, M. Cruz, J. Marrero, M. Ramos, **B. Romeu**, AM. Manzano, I. Salgado, MI Sánchez, O. Domínguez, A. Martínez, J. Larrea, Y. Acebo, A. Díaz, D. Lugo y J. Arguelles. **Premio Categoría Relevante.**
7. **Taller Habana Verde 2008.** Necesidad de una conciencia ambientalista en torno al uso de las aguas de las aguas contaminadas del río Almendares. **B. Romeu**, N. Rojas, R. Marzán, D. Lugo. 21 al 23 de mayo, 2008. Acuario Nacional de Cuba.

## LOGROS CIENTÍFICOS

1. **PREMIO DE INVESTIGACIONES DE LA UH 2009** al resultado ya aplicado de mayor contribución a la protección del medio ambiente en Cuba: “Contaminación microbiológica y química en sistemas de agua dulce y su amenaza a la diversidad microbiana y la salud humana.” M. Heydrich, N. Rojas, J. Larrea, **B. Romeu**, M. Rojas, Y. Arpajón, D.Lugo, I. Ymas, D. Prieto, R. Marsán.
2. **PREMIO DE INVESTIGACIONES DE LA UH 2010** al resultado ya aplicado de mayor contribución a la protección del medio ambiente en Cuba. “Impacto de la contaminación microbiana y química en sistemas dulceacuícolas cubanos: estrategias para el saneamiento ambiental y su recuperación”. ME Carballo, N. Rojas, M. Cruz, O. Coto, G. Guerra, J. Marrero, **B. Romeu**, A. Martínez, AM Manzano, I. Salgado, J. Larrea, M. Rojas, M. Ramos, O. Domínguez, MI Sánchez, A. Díaz, I. Ymas, D. Prieto, Y. Arpajón, D. Lugo, J. Arguelles, I. Hernández, M. Heydrich.
3. **PREMIO NACIONAL (anual) al resultado de la investigación científica, Academia de Ciencias de Cuba. 2010.** “Impacto de la Contaminación Microbiana y Química en Sistemas Dulceacuícolas cubanos: Estrategias para el Saneamiento Ambiental y su Recuperación”  
  
Dra. C. María Elena Carballo Valdés, Dra. C. Mayra Heydrich Pérez, Dra. C. Nidia Rojas Hernández, Dr. C. Mario Cruz Arias, Dra. C Orquídea Coto Pérez, Dra. C. Gilda Guerra Rivera, Dra. C. Jeannette Marrero Coto, **M. C. Beatriz Romeu Alvarez**, M. C. Armando Martínez Sardiñas, M. C. Ana Margarita Manzano León, M. C. Irina Salgado Bernal, M. C. Jeny Larrea Murrel, M. C. María Isabel Sánchez López, Dra. C. Marcia Rojas Badía, Dr. C. Miguel Ramos Leal, M. C. Osmel Domínguez Guilarte, Lic. Arelys Díaz Valdivia.