

## Antibiorresistencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica inducida *in vitro* con cobre

Guillermo Barreto Argilagos\*; Herlinda de la Caridad Rodríguez Torrens\*\*; Herlinda de la Caridad Barreto Rodríguez\*\*\*

\* Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz, Camagüey, Cuba

\*\* Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz, Camagüey, Cuba

\*\*\* Universidad de Ciencias Médicas Carlos Juan Finlay, Camagüey, Cuba

guillermo.barreto@reduc.edu.cu

### RESUMEN

El sulfato cúprico tiene una gran utilización como promotor de crecimiento en las producciones porcinas pese a los riesgos ecológicos que presupone. El trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto *in vitro* del cobre como inductor de antibiorresistencia en *Escherichia coli* enterotoxigénicas. Las cepas de referencia A-1 (O149: K91: K88ac) y E68-I (O141: K85: K88ab) se crecieron en agar Mueller-Hinton acorde a la técnica de gradientes de concentraciones en rangos que se elevaron semanalmente desde un mínimo de 5 hasta un máximo de 50 mg/mL de CuSO<sub>4</sub>. Ambas bacterias se sometieron a subcultivos, por espacio de tres semanas, en paralelo a controles sembrados en igual medio pero sin el inductor. Al finalizar la experiencia se realizaron antibiogramas para evaluar la sensibilidad frente a los antibióticos: Gentamicina, Kanamicina, Tetraciclina, Cloramfenicol, Carbenicilina y Ácido Nalidíxico. Los efectuados a las cepas enfrentadas a la sal brindaron halos compatibles a fenotipos resistentes, a diferencia de los controles, todos sensibles. Los resultados evidencian la capacidad del cobre de inducir antibiorresistencia bacteriana *in vitro*, otro aspecto que los productores deben considerar cuando emplean sales de este metal como promotores de crecimiento, pues a los daños ecológicos se suma la pérdida de la efectividad de antimicrobianos empleados en la terapéutica humana y animal.

**Palabras clave:** antimicrobianos; entorno; enteropatógenos; promotores de crecimiento; porcino; tolerancia

### Cooper as Inductor of Antibiotic-Resistance in Enterotoxigenic *Escherichia coli*

#### ABSTRACT

Cupric sulfate has been used as growth promoter in swine productions for a long time instead of the ecological risks involved. The paper had the objective of evaluating the effect of cooper as inductor of antibiotic-resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli*. The reference strains A-1 (O149: K91: K88ac) and E68-I (O141: K85: K88ab) were cultivated on Mueller-Hinton Agar plates following the gradient concentration technique with ranges increased weekly from 5 till 50 mg/mL of CuSO<sub>4</sub>. Both bacteria were streaked during three weeks in parallel to controls cultured in pure medium without the inductor. At the end of the experiment the sensibility of bought groups to Gentamicin, Kanamycin, Tetracycline, Chloramphenicol, Carbenicilin and Nalidix Acid was measured. The variants treated with cooper exhibited halos referred as resistant to the antibiotics evaluated instead all the controls were sensitive. The results demonstrated the capability of cooper to develop bacterial antibiotic-resistance *in vitro*, another trait to be considered by producers when salts of this metal are used as growth promoters, because together with its ecological damage a lose in the effectiveness of antimicrobials employed in human and veterinary chemotherapy is developed.

**Key words:** antimicrobials; environment; enteropathogens; growth promoters; swine; tolerance

## INTRODUCCIÓN

La directora general adjunta de la Organización de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Helena Semedo, declaró en Amsterdam, que el uso excesivo e indebido de antibióticos y otros agentes antimicrobianos amenaza la salud pública y pone en peligro la seguridad alimentaria en el mundo. Alertó que la situación es tan preocupante que podría llegar a revertir un siglo de progreso en la salud humana y animal. Como colofón, recalcó el compromiso de su institución de enfrentar el fenómeno desde

el enfoque de *Una Salud (One-Health)* que vincula a los seres humanos, los animales y el medio ambiente (FAO, 2016).

El uso de sulfato cúprico, como promotor del crecimiento en las dietas animales, data de mediados del siglo XX. Su efectividad, entre otras, se ha asociado a la acción antagonista del metal sobre enteropatógenos como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) y *Salmonella*, por mencionar dos casos. A pesar de los resultados logrados, desde las primeras experiencias existió el temor por la toxicidad del catión (Apley, Bush, Morrison, Singler and Snelson, 2012). Más recientemente se comprobó que tenía implicaciones ecológicas, pues las heces de los animales tratados contenían concentraciones de cobre 14 veces superiores a las de los que no lo consumían y su acumulación ejercía una acción negativa en los suelos. De mantenerse esta práctica, de acuerdo a modelos predictivos, en un lapso de 10 a 50 años las concentraciones del metal en este medio excederá los límites permisibles (Seiler y Berendonk, 2012).

La colibacilosis es una de las principales causas de mortalidad y pérdidas económicas en las producciones porcinas (Barreto, Rodríguez, Bertot and Delgado, 2015). *E. coli* se ha caracterizado, a lo largo del tiempo, por una sorprendente adaptabilidad a los ambientes más adversos, incluidos aquellos con concentraciones elevadas de metales pesados (Barreto y Rodríguez, 2009); el cobre, pese a la gran toxicidad que lo convierte en centro de los efectos antimicrobianos de múltiples productos, no constituye excepción al respecto, como se ha demostrado al exponer *in vitro* cepas de referencia y aislamientos compatibles con ECET a partir de cerdos con colibacilosis a concentraciones crecientes de  $\text{CuSO}_4$ ; resistencia que en una de las cepas referentes se asoció a la producción de *biofilm*, aspecto que, al mal expuesto, aún una estrategia de infectividad más eficiente (Barreto, Rodríguez and Barreto, 2016).

Se ha notificado que el desarrollo de mecanismos de tolerancia a los metales pesados conlleva a una cualidad agregada en bacterias grampositivas que tienen éxito, y es la resistencia paralela a una gama de antibióticos, aunque no estén presentes en el ambiente (Agga, Scott, Mamachawadi, Nagaraja, Vinasco, Bai, *et al.*, 2014); el fenómeno en gramnegativas no se ha reportado (Amachawadi, Scott, Alvarado, Mainini, Vinasco, Drouillard and Nagaraja, 2013).

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto *in vitro* del cobre como inductor de antibiorresistencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas*

Se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas de referencia: *Escherichia coli* A-1 (O149: K91: K88ac) y *Escherichia coli* E68-I (O141: K85: K88ab). Hasta el momento de su utilización todas se conservaron en caldo Mueller-Hinton glicerinado (30 %) a  $-8^\circ\text{C}$ .

### *Inducción de antibiorresistencia con $\text{CuSO}_4$*

Para inducir resistencia *in vitro* al  $\text{CuSO}_4$  se prepararon placas de Petri *standard* con agar Mueller-Hinton acorde a la variante de gradientes de concentraciones (Karadjov, 1985) con rangos de 5-25; 10-30 y 15-50 mg/mL de la sal la primera, segunda y tercera semana, respectivamente. Luego de realizada la siembra en línea recta (de menor a mayor concentración), se incubó a  $37^\circ\text{C}$  (de 24 a 48 h en los primeros cultivos; 24 h desde finales de la primera semana hasta finalizar la experiencia) hasta obtener crecimientos, a partir de los cuales, tomando con asa de la zona de mayor concentración en cobre, se realizaron subcultivos en la forma descrita. Paralelamente, A-1 y E68-I se sometieron a un número igual de pases pero en agar Mueller-Hinton sin presencia de la sal de cobre, como control del experimento. Al finalizar, se realizaron antibiogramas a ambos grupos según se establece en *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol* (Hudzicki, 2009); esta determinación se efectuó con tres réplicas; el diámetro reportado para cada halo de inhibición fue el promedio de sus mediciones en dos sentidos perpendiculares con una regla graduada en milímetros.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los halos obtenidos en los antibiogramas de las cepas expuestas al cobre correspondieron a diámetros propios de resistencia (Hudzicki, 2009), no siendo el caso de los obtenidos en los controles (Tabla).

**Tabla. Efecto del CuSO<sub>4</sub> en la sensibilidad de *E. coli* (A-1 y E68-I) a los antibióticos evaluados**

Cepas	Gentamicina	Kanamicina	Tetraciclina	Cloramfenicol	Carbenicilina	Ac. Nalidíxico
E68-I	18	19	20	20	23	20
E68-I*	11	10	14	12	2	13
A-1	19	18	19	19	23	19
A-1*	10	7	12	10	0	11
Criterios de sensibilidad a los antibióticos, según Kirby y Bauer (Hudzicki, 2009)						
	R	S	R	S	R	S
	12	15	13	18	14	19
			R	S	R	S
			12	18	17	23
			R	S	R	S
			13	18	17	23

E68= cepa de referencia *Escherichia coli* E68-I; A-1= cepa de referencia *Escherichia coli* A-1; \*Cepas tratadas con CuSO<sub>4</sub>; Ác= ácido; R=resistentes; S= sensibles

Tanto *E. coli* A-1, como su homóloga E68-I, son cepas cuyo pasado patogénico se remonta a inicios de la segunda mitad del siglo XX, cuando se aislaron de cerdos con colibacilosis a los que ocasionaron la muerte. Desde entonces, y luego de su caracterización como cepas de referencia se han mantenido en ambientes de laboratorio (Barreto, 1988), de ahí su sensibilidad a una amplia gama de antimicrobianos, incluso a aquellos con un uso tan extenso como Tetraciclina y Cloramfenicol, como se aprecia en el diámetro de los halos exhibidos (Tabla), razón que las ha hecho idóneas para este tipo de estudio (Barreto *et al.*, 2006).

Se trata de seis antibióticos, cuatro de los cuales han tenido una utilización prologada tanto en la terapéutica humana como la veterinaria (Gentamicina, Kanamicina, Tetraciclina y Cloramfenicol) mientras que la Carbenicilina y el Ácido Nalidíxico sólo se han empleado en los primeros (MINSAP, 2006).

Se ha notificado la capacidad de ciertos metales pesados, como el cobre, para expandir y mantener el *pool* de bacterias resistentes a antibióticos como la tetraciclina. Las implicaciones de este fenómeno en bacterias entéricas grampositivas ha sido objeto de estudio en diversas especies animales con relación al empleo de sales de este metal como promotores de crecimiento (Amachawadi *et al.*, 2013). Lamentablemente, no ha existido un interés igual en el caso de las representantes gramnegativas, a pesar de incluir a enteropatógenos como ECET y *Salmonella*, como acredita la investigación realizada por Agga *et al.* (2014), quienes concluyen que el papel de la suplementación de cobre a cerdos destetados y la resistencia al metal, y a los antibióticos analizados, en el caso de *E. coli* requiere de otras investigaciones que profundicen al respecto. En su propuesta no se logró una correlación positiva entre el suministro de Cu (125 mg/kg de alimento) y resistencia a la tetraciclina y otros antibióticos en los aislamientos de *E. coli* hechos a partir de las heces de estos animales.

No obstante, las altas dosis de cobre (100-250 ppm) empleadas en las producciones porcinas por más de seis décadas, así como la exposición a su acumulación ambiental han contribuido a que las bacterias gramnegativas se adapten, sin importar su elevada toxicidad (Aarestrup y Hasman, 2004).

En el caso de los resultados que se discuten, vale recordar que constituyen el fruto del enfrentamiento *in vitro* de dos cepas de referencia (previamente sensibles a todos los antibióticos ensayados) a concentraciones del metal muy superiores a las presentes en la experiencia de Agga *et al.* (2014). La tolerancia a los metales pesados se incrementa en la medida que se prolonga el contacto bacteriano con estos debido a que, paulatinamente, se activan genes de respuesta a estrés y de resistencia (Harrison, Ceri and Turner, 2007). Se ha establecido que cuando estos se acumulan en ambientes naturales a una concentración crítica pueden desencadenar en la microbiota, muy en especial en las bacterias, selecciones donde, a la par que se instaura tolerancia a dichos iones, esta va aparejada de resistencia a los antibióticos (Seiler y Berendonk, 2012).

Esta resistencia dual está asociada a mecanismos diversos, dos de los cuales pueden explicar los resultados obtenidos: a) la formación de complejos, opción vinculada al incremento en la producción de *biofilms*, mucílago donde ocurre la mayor fijación de estos antimicrobianos (Harrison *et al.*, 2007; Barreto y Rodríguez, 2010). *E. coli* A-1, durante su tercera semana de exposición a Cu<sup>2+</sup>, comenzó a excretar abundantes exopolisacáridos (EPS) en torno a la línea de crecimiento (ver figura) (Barreto *et al.*, 2016). b) Mecanis-

mos de eflujo, muy comunes en bacterias gramnegativas, como es el caso, y que les permiten la extrusión de metales y antibióticos desde el citoplasma, a través de la membrana interna y la externa, hasta el entorno circundante (Seiler y Berendonk, 2012). Se trata de una opción muy probable, desde el punto de vista teórico, en el caso analizado, pero carente de confirmación.



Fig. Formación de exopolisacáridos en torno al crecimiento de A-1. La zona mucoide se incrementa a medida que aumenta la concentración del cobre.

Los resultados discutidos son una evidencia de lo analizado anteriormente y, además, constituyen un alerta en cuanto a la práctica de incorporar  $\text{CuSO}_4$  como aditivo en las dietas porcinas, máxime si se tiene en cuenta que las proporciones sugeridas a los productores son muy variables (Zhao, Allee, Gerlemann, Ma, Gracia, Parker, *et al.*, 2014). En la propuesta, seis antibióticos, por acción del cobre, disminuyeron su efectividad frente a *E. coli*, incluido el Ácido Nalidíxico, uno de los más utilizado frente a enteropatógenos como ECET y *Shigella*, en casos de diarreas agudas en humanos (Cisneros, Barreto, Guevara and Rodríguez, 2008). Todo lo cual corrobora el llamado hecho por la FAO en cuanto a la imperiosa necesidad de lograr sistemas de producción que garanticen el logro de *Una Salud*.

## CONCLUSIONES

La exposición *in vitro* de *Escherichia coli* a  $\text{CuSO}_4$ , mediante el método de gradientes de concentraciones, induce resistencia en estas bacterias frente a los antibióticos Gentamicina, Kanamicina, Tetraciclina, Cloramfenicol, Carbenicilina y Ácido Nalidíxico, lo cual es un elemento más que debe considerarse en las producciones porcinas que emplean esta sal como promotor de crecimiento.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. C. José Alberto Bertot Valdés, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por su apoyo con algunas bibliografías claves para la culminación de este artículo; lo propio al Dr. C. Nelson Izquierdo Pérez por su auxilio en el escaneo de las fotos.

## REFERENCIAS

- AARESTRUP, F. M. y HASMAN, H. (2004). Susceptibility of Different Bacterial Species Isolated from Food Animals to Copper Sulphate, Zinc Chloride and Antimicrobial Substances Used for Disinfection. *Vet. Microbiol.*, 100 (1-2), 83-89.

- AGGA, G. E.; SCOTT, H. M.; AMACHAWADI, R. G.; NAGARAJA, T. G.; VINASCO, J.; BAI, J. et al. (2014). Effects of Chlortetracycline and Copper Supplementation on Antimicrobial Resistance of Fecal *Escherichia coli* from Weaned Pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 114 (3-4), 231-246.
- AMACHAWADI, R. G.; SCOTT, H. M.; ALVARADO, C. A.; MAININI, T. R.; VINASCO, J.; DROUILLARD, J. S. y NAGARAJA, T. G. (2013). Occurrence of the Transferable Copper Resistance Gene *tcpB* Among Fecal Enterococci of U.S. Feedlot Cattle Fed Copper-Supplemented Diets. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79 (14), 4369-4375.
- APLEY, M. D.; BUSH, E. J.; MORRISON, R. B., SINGER, R. S. y SNELSON, H. (2012). Use Estimates of In-Feed Antimicrobials in Swine Production in the United States. *Foodborne Pathog. Dis.*, 9 (3), 272-279.
- BARRETO, G. (1988). Factores de adhesión en *E. coli* mediante cuatro métodos de diagnóstico. *Rev. Prod. Anim.*, 4 (1), 209-213.
- BARRETO, G. y RODRÍGUEZ, H. (2009). La cápsula bacteriana, algo más que una estructura no esencial (Revisión). *Rev. Prod. Anim.*; 21 (1), 69-80.
- BARRETO, G. y RODRÍGUEZ, H. (2010). Biofilms bacterianos versus antimicrobianos. Nutraceuticos: una opción promisoría (Artículo de revisión). *Rev. prod. Anim.*, 22 (1), 20-30.
- BARRETO, G.; RODRÍGUEZ, H. y BARRETO, H. (2016). Inducción *in vitro* de resistencia al cobre en *Escherichia coli* enterotoxigénica. *Rev. Prod. Anim.*, 28 (1).
- BARRETO, G.; RODRÍGUEZ, H.; BERTOT, J. A. y DELGADO, R. (2015). Microorganismos autóctonos multipropósitos (MAM) para el control y prevención de la colibacilosis neonatal porcina. *Rev. Prod. Anim.*, 27 (2), 16-19.
- BARRETO, G.; VELÁZQUEZ, B.; PEÑA, Y. y RODRÍGUEZ, H. (2006). Evaluación *in vitro* de extractos de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. como posibles antisépticos mamarios. *Rev. Prod. Anim.*, 18 (2), 135-140.
- CISNEROS, R. I.; BARRETO, G.; GUEVARA, G. y RODRÍGUEZ, H. (2008). *Presencia de Shigella spp y resistencia al ácido nalidíxico en la provincia de Camagüey, Cuba*. Extraído el 6 de marzo de 2016, desde <http://www.monografias.com/trabajos59/shigellaspp-resistente-acido-nalidixico-cuba/shigellaspp-resistente-acido-nalidixico-cuba.shtml>.
- FAO (2016). *Alerta sobre riesgo global por abuso de los antimicrobianos*. Extraído el 6 de marzo de 2016, desde <http://www.fao.org/news/story/es/item/382676/icode/>.
- HARRISON, J. J.; CERI, H. y TURNER, R. J. (2007). Multimetal Resistance and Tolerance in Microbial Biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5 (12), 928-938.
- HUDZICKI, J. (2009). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. ASM Microbe Library, American Society for Microbiology. Extraído el 6 de marzo de 2016, desde <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>.
- KARADJOV, J. (1985). Formation of an Exopolysaccharide Capsular Layer on the Surface of Some Bacteria under the Influence of Pesticides and Heavy Metals. *Cmtes rendus de l' Académie Bulgare des Sciences*, 38, 223-225.
- MINSAP (2006). *Formulario nacional de medicamentos*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- SEILER, C. y BERENDONK, T. U. (2012). Heavy Metal Driven Co-Selection of Antibiotic Resistance in Soil and Water Bodies Impacted by Agriculture and Aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 14 (3), 399. Extraído el 9 de enero de 2016, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23248620>.
- ZHAO, J.; ALLEE, G.; GERLEMANN, M. A.; GRACIA, M. I.; PARKER, D.; VAZQUEZ-ANON, M. y HARRELL, R. J. (2014). Effects of a Chelated Copper as Growth Promoter on Performance and Carcass Traits in Pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 27 (7), 965-973.

Recibido: 22-9-2015

Aceptado: 1-10-2015