

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Caracterización de la susceptibilidad a antibióticos betalactámicos de espectro extendido, ciprofloxacina y cotrimoxazol de cepas de *Escherichia coli* aisladas de zonas de amortiguamiento cercanas a crianza de *Argopecten purpuratus* (conchas de abanico) en seis puntos de la bahía de Sechura, Piura”

Tesis para optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Inés Gabriela Alejos Tapia

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ

2017

A mi familia y amigos, por acompañarme durante esta etapa de mi vida. Su apoyo y palabras de aliento fueron esenciales para continuar este largo camino. Los quiero mucho.

Gracias a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por ser pieza fundamental en mi formación profesional. Al Proyecto “Monitoreo y caracterización de la contaminación ambiental de ecosistemas acuáticos y su impacto en la sanidad y producción de moluscos bivalvos en la costa norte del Perú” N° 134-PNICP-PIAP-2015 financiado por Innóvate Perú – PRODUCE. Agradecimiento especial al Dr. Carlos Shiva, por sus conocimientos y acompañamiento brindados durante el desarrollo del trabajo de investigación.

ABSTRACT

Sechura Bay is one of the most important production sites of hydrobiological resources in Perú, and therefore it requires a more efficient sanitation system. Due to this limitation, it is possible to isolate *Escherichia coli*, a bacteria that indicates fecal contamination in its marine environment. *E. coli* can also be a carrier and transmissor of antibiotic resistance genes microorganism. The aim of this study was to evaluate the susceptibility or resistance of *Escherichia coli* in principal antibiotics used in human medicine. Water samples were taken in six buffer zones of Sechura Bay, in a period of three months, where *Escherichia coli* was isolated. The antibiotics evaluated were the following ones: cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, cotrimoxazole, meropenem and cefepime; and, to evaluate extended-spectrum betalactamases (ESBL) producing bacterias it was used cefotaxime + clavulanic acid, ceftazidime + clavulanic acid and cefepime + clavulanic acid. Antibiograms were released following Kirby-Bauer technique. Results were compared to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standardized protocols. At least one sample was resistant for each one of the antibiotics evaluated, except meropenem, which was sensitive for all samples. Multi-resistant antibiotic and ESBL producing strains were obtained, which means that hydrobiological resources of this area can be contaminated with strains resistant to medical use antibiotics.

Keywords: *Escherichia coli*, antibiotics, resistant, susceptibility, ESBL production

RESUMEN

La Bahía de Sechura es uno de los puntos de producción de recursos hidrobiológicos más importantes en el Perú, y por ello requiere tener un sistema de saneamiento más eficiente. Debido a esa limitación, es posible aislar *Escherichia coli*, bacteria indicadora de contaminación fecal en su ambiente marino. *E. coli* además puede ser un microorganismo portador y transmisor de genes de resistencia a antibióticos. El objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad o resistencia a los principales antibióticos utilizados en medicina humana frente a cepas de *E. coli*. Se recolectaron muestras de agua en seis zonas de amortiguamiento de la Bahía de Sechura, durante un período de tres meses, de las cuales se aisló *E. coli*. Se evaluaron los siguientes antibióticos: cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, cotrimoxazol, meropenem y cefepima; y para evaluar bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se utilizaron cefotaxima + ácido clavulánico, ceftazidima + ácido clavulánico y cefepima + ácido clavulánico. Se realizaron antibiogramas siguiendo la técnica de Kirby-Bauer. Los resultados fueron comparados con los Protocolos estandarizados de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Al menos una muestra fue resistente para cada uno de los antibióticos evaluados, excepto meropenem, el cual fue sensible para todas las muestras. Se obtuvieron cepas multirresistentes y productoras de BLEE, lo que sugiere que productos hidrobiológicos de esta zona pueden resultar contaminados con cepas resistentes a antibióticos utilizados en la práctica médica.

Palabras claves: *Escherichia coli*, antibióticos, resistencia, susceptibilidad, producción

INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con una alta producción de recursos hidrobiológicos, obteniendo en el año 2015 4 943 173 TM de dicha producción; la Bahía de Sechura, ubicada en la región Piura, al norte de Perú, logró ese mismo año una producción de 48 608 TM (PRODUCE, 2016), principalmente de anchoveta, pota y concha de abanico (IMARPE, 2007). Además, cuenta con áreas de playas, como las de San Pablo, San Pedro y Chulliyachi, así como los Manglares de San Pedro de Vice, donde se ha observado variedad de flora y fauna (Charcape y Moutarde, 2005; RPP, 2012).

Sin embargo, existen fuentes de contaminación que llegan a la desembocadura de los ríos y mar, originados por las actividades pesqueras, agropecuarias, petroleras, así como también por la actividad antropogénica, los cuales pueden repercutir negativamente en la sanidad de la bahía (IMARPE, 2007; El Tiempo, 2016). Una forma de evidenciar esto es mediante la cuantificación de coliformes totales y termotolerantes, donde *E. coli* es la bacteria predominante (APHA, 1999; WHO, 2001). Además, *E. coli* es utilizada como bacteria indicadora de contaminación fecal en distintas fuentes de agua, alimentos y agua de consumo humano directo e indirecto que no han contado con una adecuada desinfección e higiene (MINSA, 2008; Larrea *et. al.*, 2013; SANIPES, 2016). En el año 2014 se evidenció que la Bahía de Sechura llegó a reportar niveles de coliformes termotolerantes de 2.4×10^2 NMP/100 ml., los cuales se encuentran por encima de los Límites Máximos Permisibles, para las actividades de extracción de moluscos bivalvos (≤ 88 NMP/100 ml) y otras especies hidrobiológicas (≤ 30 NMP/100 ml), pero no para las actividades recreativas según lo establecido en los Estándares de Calidad Ambiental para el Agua (DS N° 015-2015.MINAM) (INEI, 2015; MINAM 2015).

Escherichia coli, parte del grupo *Enterobacteriaceae*, es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, fermentador de lactosa y glucosa, que forma parte de la microbiota intestinal de homeotermos, estando en una concentración promedio entre $10^7 - 10^9$ UFC¹/gramo de heces, lo cual la convierte en una de las bacterias con mayor presencia en el tracto intestinal. (Scheutz y Strockbine, 2005; Gyles y Fairbrother, 2010). *E. coli* no es considerada una bacteria patógena, sin embargo, la exposición a una alta carga bacteriana, deficiencia o alteración en el sistema inmune, o la presentación de sus patotipos pueden llevar al portador a enfermedades que cursan principalmente con cuadros diarreicos, pero también en infecciones del tracto urinario como el Síndrome Urémico Hemolítico, infecciones que cursan con cuadros respiratorios, llegando a casos de sepsis; los seis patotipos de *E. coli* son enteropatogénica (EPEC), enterohemorrágica o también conocida como productora de Shiga toxina (STEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Steiner, Thielman y Guerrant, 2006; CDC, 2015)

Como parte de la terapia antimicrobiana frente a *E. coli* se utilizan diferentes grupos de antibióticos, los cuales varían según el cuadro clínico del paciente, entre los cuales destacan las cefalosporinas, quinolonas y penicilinas, entre otros (CLSI, 2016; EUCAST, 2013).

En el caso de infecciones urinarias causadas por *E. coli* se utilizan quinolonas, como la ciprofloxacina, cotrimoxazol, cefalosporinas de tercera generación, entre otras. En infecciones respiratorias causadas por *E. coli*, es frecuente utilizar fluorquinolonas y cefalosporinas de tercera generación. Para el caso de infecciones gastrointestinales causadas por *E. coli* suele optarse por antibióticos como amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina, tetraciclinas (p.e. doxiciclina), fluorquinolonas y cotrimoxazol (Cordiés *et. al.*, 1998; Ochoa *et. al.*, 2009; Morrill *et. al.*, 2017). Para septicemias o *E. coli* resistente a antibióticos betalactámicos se utilizan carbapenémicos, como

¹ Unidades Formadoras de Colonias

meropenem e imipenem, así como cefamicinas (cefoxitina y cefotetan) (García *et. al.*, 2011; Morejón, 2013).

Las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos son un grupo de antibióticos denominados betalactámicos, ya que poseen un anillo betalactámico en su estructura, el cual no permite la síntesis de la pared celular de las bacterias, actuando específicamente en el polímero peptidoglicano, en la parte final de la formación de la pared celular de la bacteria, donde se van a formar los tetrapéptidos a partir de pentapéptidos; el anillo betalactámico se unirá a este último, no permitiendo la formación de la pared bacteriana, por lo cual la bacteria quedará expuesta al medio, y por la presión oncótica morirá actuando en la mayoría de casos como bactericida. (Botana, 2002; Suárez y Guidol, 2009).

Las fluorquinolonas, dentro del cual está la ciprofloxacina, tienen un amplio espectro de actividad, tanto en bacterias gram positivas como negativas. Actúan a nivel del ADN bacteriano, inhibiendo la ADN-girasa, topoisomerasa necesaria para replicación del ADN. Al no actuar la ADN-girasa, no habrá replicación ni transcripción del ADN, lo cual no permitirá el desarrollo y multiplicación bacteriana, conllevando a la muerte de las bacterias. (Botana, 2002; Leyva S. y Leyva E., 2008)

El cotrimoxazol, conocido también como sulfatrimetoprim, es un antibiótico compuesto por una sulfonamida (sulfametoxazol) con una diaminopirimidina (trimetoprima), las cuales, en combinación, actúan inhibiendo el ácido tetrahidrofólico de las bacterias, coenzima que actúa en la síntesis de purinas y timidina, las cuales al verse suprimidas, no permitirán la replicación de ADN ni ARN, lo cual afectará a la replicación bacteriana. (Botana, 2002; Lüllmann, 2010)

Existe un uso indiscriminado de antibióticos en la actualidad, que incluye los mencionados anteriormente, lo cual conlleva a que las bacterias desarrollen diferentes mecanismos de resistencia frente a ellos (OMS, 2016). Dichos mecanismos se encuentran mediados por diferentes factores, existen

mecanismos de resistencia asociados a la producción de enzimas que producen modificaciones químicas en el antibiótico, como la hidrólisis en el caso de las betalactamasas, o fosforilación; la modificación o alteración de los sitios de acción del antibiótico en la bacteria, dada por mutaciones en genes que codifican dichos sitios o modificaciones enzimáticas; la modificación de la permeabilidad de la membrana celular de la bacteria, por la alteración en tamaño, número o polaridad de las porinas; y la expulsión activa del antibiótico a través del sistema de bombas de eflujo (Cabrera *et. al.*, 2007; Garza *et. al.*, 2009; Marchetti *et. al.*, 2011). De los grupos de antibióticos mencionados anteriormente, tanto las sulfonamidas, pirimidinas, quinolonas como betalactámicos se ven afectados por los mecanismos de resistencia que involucran la alteración de los sitios de acción y el sistema de bombas de eflujo, además, se genera resistencia frente a las quinolonas y betalactámicos mediante la producción de enzimas que desencadenan en acetilación e hidrólisis de dichos antibióticos, respectivamente (Davies J. y Davies D., 2010).

En cuanto a la transmisión de material genético involucrado en los mecanismos de resistencia frente a antibióticos, puede darse mediante conjugación, transducción (a través de vectores como bacteriófagos) y transformación, siendo el material genético a manera de plásmidos, transposones o integrones; dicha transmisión se puede dar entre bacterias de la misma especie o especies distintas (Andersson, 2004; Furuya y Lowy, 2006; Bbosa *et. al.*, 2014).

Reportes de la OMS indican que en 18 países de América es factible adquirir antibióticos o medicamentos asociados a estos sin requerir de una receta médica, región en la cual se evidenció la resistencia de *E. coli* frente a cefalosporinas de tercera generación y fluorquinolonas. La resistencia a antibióticos se vería incrementada también por el uso incorrecto de ellos; una encuesta realizada a 10 000 personas reveló que el 64% los utilizaban en casos relacionados a virus, como gripes (OMS, 2014, 2015).

Se ha encontrado que en un estudio realizado en El Callao, Perú, muchos de los médicos humanos no realizan pruebas diagnósticas previas antes de prescribir un antibiótico, además de evidenciar que

muchos de los trabajadores de farmacias y farmacéuticos venden antibióticos sin receta médica (Sánchez *et. al.*, 2006). Ecker *et. al.* en el 2016 reportaron que el antibiótico más utilizado en una zona periurbana de Lima, Perú para tratar diarreas acuosas, fue cotrimoxazol, que también fue el segundo antibiótico más utilizado en tratamientos en general, a pesar de que Sánchez *et. al.* en el 2009 señalaron que dicho antibiótico no era de elección por los médicos debido a evidencias de resistencia frente a esta (Sánchez *et. al.*, 2009; Ecker *et. al.*, 2016). Ochoa *et. al.* reportaron en un estudio realizado en *E. coli* diarreogénicas en niños, que ampicilina y cotrimoxazol presentaron mayor resistencia, habiendo también *E. coli* multirresistentes, donde ampicilina, cotrimoxazol y tetraciclina formaban parte de la mayoría de las multirresistencias (Ochoa *et. al.*, 2009)

Frente a esto, se han ido realizando diversos estudios de resistencia a antibióticos en *E. coli*, incluyendo estudios realizados en muestras obtenidas de ambientes marinos y recursos hidrobiológicos, reservorios importantes de dichas bacterias. En un estudio realizado en Nueva Zelanda, se observó que el 70% de los coliformes aislados en ambientes marinos mostró resistencia a uno o más antibióticos, habiendo mayor resistencia a ampicilina, sulfafurazola y rifampicina, siendo además el 41.8% de un total de 29 muestras de coliformes fecales aislados mostraron resistencia a más de un antibiótico; este estudio también evaluó la resistencia a antibióticos en moluscos bivalvos obtenidos de la misma zona, encontrando resistencia principalmente a ampicilina (77.3%) y cefalotina (57.0%) (Cooke, 1976). Otro estudio en el cual se aislaron 487 muestras de *E. coli* provenientes de aguas obtenidas del mar Báltico y fuentes hídricas de Finlandia, se demostró una mayor resistencia a sulfonamida (14%) y tetraciclina (16%); el 12% de las muestras presentó resistencia a dos o más antibióticos (Niemi, 1983). Se realizó un estudio de resistencia a antibióticos en patotipos EPEC y STEC de *E. coli* aislados en agua de mar que son utilizadas para cultivo de moluscos bivalvos en Europa, donde las cepas presentaron resistencia a entre uno a cuatro antibióticos entre los cuales se incluyen doxiciclina, imipenem, cefotaxima y amoxicilina (Balière, 2015).

El presente estudio evaluó el grado de susceptibilidad de distintos antibióticos en *E. coli* de ambientes marinos de la Bahía de Sechura, los cuales podrían contaminar moluscos bivalvos y otros productos hidrobiológicos de la zona. Dicha evaluación se realizó en las zonas de amortiguamiento, las cuales comprenden al área previa a la zona que concentra la mayor producción, sin embargo se ha identificado extracción de diversos productos hidrobiológicos, entre ellos moluscos bivalvos como *Donax* spp. (“palabritas”) (IMARPE, 2007; RPP, 2015; Márquez, 2017)

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Zonas de amortiguamiento de la Bahía de Sechura, Piura, ubicado al norte de Perú.

El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Nutrición e Inocuidad de Alimentos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)

Tipo de estudio

Estudio observacional descriptivo de tipo transversal

Población Objetivo

Cepas de *E. coli* aisladas y almacenadas a -85°C de muestras de agua de la Bahía de Sechura, recolectadas cada quince días entre julio y setiembre de 2016. Dichas muestras fueron obtenidas y proporcionadas por el Proyecto N° 134-PNICP-PIAP-2015 financiado por Innóvate Perú (ex FINCyT) - PRODUCE, las cuales se tomaron en seis zonas de amortiguamiento de la Bahía de Sechura:

- Puerto Rico (05° 47' 48.4" S, 81° 03' 21.4" O)
- Parachique (05° 50' 18.5" S, 80° 50' 57.1" O)
- Chulliyachi (05° 33' 17.1" S, 80° 49' 35.4" O)
- San Pedro (05° 31' 10.3" S, 80° 53' 32.5" O)
- Las Delicias (05° 43' 27.0" S, 80° 51' 17.6" O)
- Dren de Sechura (05°33'32.3" S, 80°49'36.3" O)

Criterios de inclusión

Cepas de *E. coli* positivas en caldo E.C. (Central Drug House (CDH), India) y en medio de cultivo HiCrome ® *E. coli* (HiMedia Laboratories, India) almacenadas en congelación a -85 °C, que al reactivarse sean lactosa + en medio de cultivo MacConkey (Laboratorios Conda, España).

Criterios de exclusión

Cepas de *E. coli* positivas en caldo E.C. pero negativas en medio de cultivo HiCrome ® *E. coli* (HiMedia Laboratories).

Tamaño de muestra

Se evaluó un total de 108 muestras, correspondiendo 18 muestras por cada punto evaluado.

Recolección de datos

Las muestras utilizadas en el presente estudio correspondieron a muestras de agua colectadas en seis puntos de la Bahía de Sechura cada 15 días, en el periodo de julio a setiembre de 2016.

Se emplearon los protocolos para toma de muestras de aguas y análisis microbiológico de la Autoridad Nacional del Agua (RJ N° 010-2016-ANA) y el Organismo de Sanidad Pesquera (I01-SANIPES). Se tomó 1 L de agua en una botella plástica estéril previamente rotulada por cada muestra, utilizando guantes, mascarilla y gorro descartable a \pm 50 cm. de profundidad, la botella se abrió y cerró dentro del mar. Se selló la botella en una bolsa plástica con un cintillo y se mantuvo entre 4 y 10 °C en caja térmica para su transporte y posterior análisis en laboratorio.

Se procesaron las muestras para determinar los Límites Máximos Permisibles a través del Número Más Probable (NMP/100ml) en coliformes totales y termotolerantes. Posterior a esto, se seleccionaron cinco tubos positivos a Caldo EC (CDH, India) de manera aleatoria, de cada lugar, los cuales se

sembraron en medio de cultivo HiCrome® *E. coli* (HiMedia Laboratories) y fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Del total de colonias positivas obtenidas, se tomaron tres aislados de manera aleatoria y fueron inoculados en crioviales estériles con 800 µl de Caldo Cerebro Corazón (BHI; Laboratorios Conda, España), se incubaron a 37 °C por 24 horas y luego fueron almacenados en congelación a -85 °C añadiendo previamente 200 µl de glicerol.

Procesamiento de muestras o datos

Elección de los antibióticos a evaluar

El objetivo del presente estudio fue evaluar la resistencia frente a antibióticos betalactámicos, fluorquinolona y un antibiótico compuesto.

Para evaluar la resistencia a antibióticos betalactámicos, se utilizarán dos cefalosporinas de tercera generación: cefotaxima (30µg; Bioanalyse, Turquía) y ceftazidima (30µg; Oxoid, Inglaterra), una cefalosporina de cuarta generación: cefepima (30µg; Bioanalyse, Turquía) y un carbapenem, que será meropenem (10µg; Oxoid, Inglaterra).

Los dos primeros antibióticos mencionados permitieron además realizar el screening de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), según la medida del halo de inhibición; y para la prueba confirmatoria de BLEE, se utilizó el método de difusión de doble disco, con los antibióticos cefotaxima (30µg; Bioanalyse)/cefotaxima + ácido clavulánico (30µg + 10µg; Bioanalyse, Turquía) y ceftazidima (30µg; Oxoid)/ceftazidima + ácido clavulánico (30µg + 10µg; Bioanalyse, Turquía). Todo esto se definió por el protocolo de Clinical and Laboratory Standards Institute (Perozo y Castellano, 2009; CLSI, 2016). Para la evaluación de la resistencia frente a cefepima (30µg; Bioanalyse), se utilizó el protocolo de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), el cual además de incluir el screening para BLEE, también permite identificar fenotípicamente bacterias productoras de betalactamasas enzima ampC; para ello el resultado de cefepima se enfrentó al resultado con cefepima +

ácido clavulánico (30µg + 10µg; Bioanalyse, Turquía) (Jacoby, 2009; Navarro, 2010; EUCAST, 2013).

Se evaluó la resistencia frente a un carbapenem, el cual fue meropenem (10µg; Oxoid), debido a que es el grupo de antibióticos de elección frente a bacterias productoras de BLEE. Los resultados obtenidos se evaluaron según los estándares de CLSI (CLSI, 2016).

Se eligió ciprofloxacina (5µg; Oxoid, Inglaterra) como la fluorquinolona a evaluar, ya que se busca comparar los resultados obtenidos con lo reportado por la OMS, que señala que la resistencia frente a dicho grupo de antibióticos se estaría incrementando. El antibiótico compuesto elegido para el presente estudio fue cotrimoxazol (sulfametoxazol 23.75µg + trimetoprim 1.25µg; Bioanalyse, Turquía), de elección frente a infecciones causadas por *Escherichia coli* en infecciones urinarias. Ambos fueron evaluados según los protocolos estandarizados de CLSI. (CLSI, 2016)

Evaluación de la resistencia a antibióticos

Las muestras previamente obtenidas y almacenadas a -85 °C fueron reactivadas tomando 10 µl de cada una, colocándolas en tubos con 2 ml de caldo BHI (Laboratorios Conda), incubándose a 37 °C entre 18 – 24 horas. Posteriormente, con un asa bacteriológica, se tomó una alícuota del tubo con caldo BHI, y se sembró en medio de cultivo MacConkey (Laboratorios Conda, España) y se incubó a 37 °C por 24 horas; se resembró en medio de cultivo Triptosa Soya Agar (TSA; Oxoid, Inglaterra), incubándose a 37 °C por 24 horas.

Las colonias obtenidas en medio de cultivo TSA fueron utilizadas para la evaluación de la resistencia a antibióticos, por medio del Método de Kirby-Bauer (difusión en agar) (Bernal y Guzmán, 1984). Con un asa bacteriológica se tomaron colonias del medio de cultivo TSA y se inocularon en tubos con 2 ml de agua destilada estéril, hasta alcanzar una absorbancia entre 0.08 y 0.1 (longitud de onda 625 nanómetros), medida con un espectrofotómetro (Unico® S1100; USA); esto es equivalente a 0.5 en la

escala de McFarland o 1.5×10^8 UFC/ml (Cona, 2002). Luego, se introdujo un hisopo estéril en el inóculo, y se realizó la siembra en césped en el medio de cultivo Müller-Hinton (Oxoid, Inglaterra), abarcando toda la placa Petri, este procedimiento se realizó en dos medios de cultivo Müller-Hinton por muestra. Finalmente se colocaron los discos de antibióticos con un dispensador o pinzas estériles, a 2 cm de distancia entre cada disco de antibiótico. Los discos de antibióticos se colocaron en dos medios de cultivo Müller-Hinton para cada muestra, divididos en dos grupos de antibióticos, el primero contenía los discos de cefotaxima (30µg), cefotaxima + ácido clavulánico (30µg + 10µg), ceftazidima (30µg) y ceftazidima + ácido clavulánico (30µg + 10µg); el segundo grupo contenía los discos de cefepima (30µg), cefepima + ácido clavulánico (30µg + 10µg), meropenem (10µg), cotrimoxazol (25µg) y ciprofloxacina (5µg).

Análisis

Los resultados fueron obtenidos mediante la lectura de los halos de inhibición formados alrededor de los discos de antibióticos en las placas Petri, tras haber sido incubadas a 37°C por 18 horas. La lectura de los halos de inhibición se realizó con una regla y fondo oscuro que daba contraste, se consideraron la unidad de medida en milímetros y la “Guía de Lectura para el Método de Difusión de discos para la prueba de susceptibilidad de antimicrobianos” de EUCAST (EUCAST, 2017). Para la lectura de cepas productoras de BLEE se compararon los diámetros de los halos de inhibición entre cefotaxima y cefotaxima + ácido clavulánico, ceftazidima y ceftazidima + ácido clavulánico, y cefepima con cefepima + ácido clavulánico. Primero se determinó la susceptibilidad al antibiótico puro, y si este resultaba resistente, se comparaba con el halo de inhibición del disco de antibiótico que contenía ácido clavulánico, una diferencia igual o mayor a 5mm. determinaba que la muestra evaluada era productora de BLEE:

Todos los resultados fueron registrados en una tabla elaborada en Microsoft Excel, con lo cual se pudo realizar tablas de frecuencias y gráficos que permitieron comparar los resultados obtenidos con los criterios establecidos en los manuales de CLSI y EUCAST respectivamente.

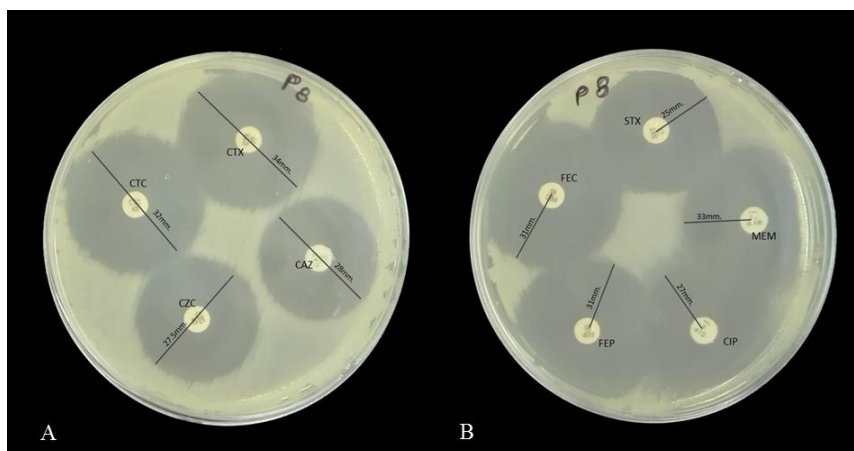


Fig. 1 Ejemplo de medición de halos de inhibición sensibles. (A) Diferencia menor a 5mm entre CTX-CTC y CAZ-CZC determinó aislado no productor de BLEE. CTX: cefotaxima (30µg), CTC: cefotaxima+ácido clavulánico (40µg), CAZ: ceftazidima (30µg), CZC: ceftazidima+ácido clavulánico (40µg). (B) Diferencia menor a 5mm entre FEP-FEC determinó aislado no productor de BLEE. FEP: cefepima (30µg), FEC: cefepima+ácido clavulánico (40µg), STX: cotrimoxazol (sulfatrimetropim, 25µg), MEM: Meropenem (10µg), CIP: Ciprofloxacina (5µg). (A) y (B) tamaño de halos sensibles frente a CTX, CAZ, FEP, CIP, STX y MEM

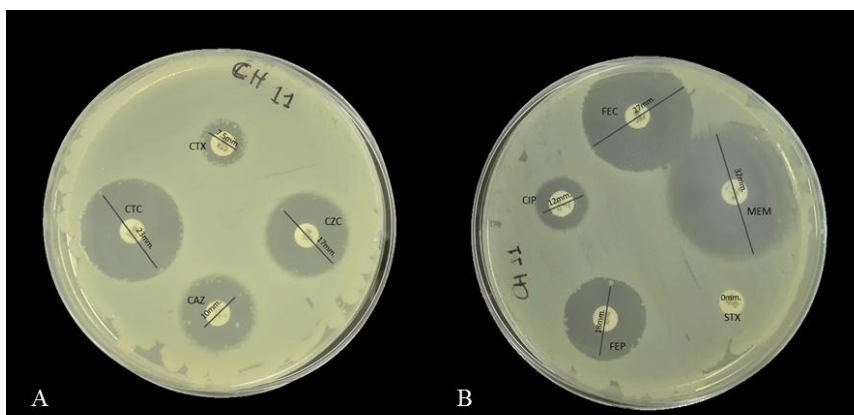


Fig. 2 Ejemplo de medición de antibiograma con halos de inhibición resistentes (excepto meropenem). (A) Diferencia mayor/igual a 5mm entre CTX-CTC y CAZ-CZC determinó aislado productor de BLEE. CTX: cefotaxima (30µg), CTC: cefotaxima+ácido clavulánico (40µg), CAZ: ceftazidima (30µg), CZC: ceftazidima+ácido clavulánico (40µg). (B) Diferencia mayor/igual a 5mm entre FEP-FEC determinó aislado productor de BLEE. FEP: cefepima (30µg), FEC: cefepima+ácido clavulánico (40µg), STX: cotrimoxazol (sulfatrimetropim, 25µg), MEM: Meropenem (10µg), CIP: Ciprofloxacina (5µg). (A) y (B) Tamaño de halos resistentes frente a CTX, CAZ, FEP, CIP y STX. Tamaño de halo sensible frente a MEM

RESULTADOS

Del total de 108 muestras examinadas en cada punto de muestreo (18 muestras por lugar) por lo menos una de ellas fue resistente a algún antibiótico de los empleados, excepto meropenem (100% de las muestras resultaron sensibles). Cefotaxima (36.11%), cefepima (25.93%) y ceftazidima (23.15%) fueron los antibióticos a los que los aislados fueron más resistentes. (Cuadro 1). El 55.56% de los aislados resultaron resistentes a uno o más antibióticos, pero solo uno de ellos fue multirresistente a 5 antibióticos (5.56%). La mayoría de los aislados fue resistente a un solo antibiótico (26.85%) (Cuadro 3).

Los aislados provenientes de “Las Delicias” fueron las que mostraron mayor susceptibilidad a antibióticos, siendo sensibles el 66.671% de los aislados (n=12); contrimoxazol y meropenem fueron los antibióticos al que todos los aislados fueron sensibles (Cuadros 4 y 2). Solo una cepa fue productora de betalactamasas de espectro extendido (Cuadro 5)

Parachique y Dren de Sechura fueron los lugares evaluados que presentaron mayor resistencia a antibióticos, obteniendo 72.22% de aislados resistentes en ambos casos (n=13). El Dren de Sechura presentó aislados multirresistentes a cuatro antibióticos, mientras que Puerto Rico presentó una multirresistencia máxima a tres antibióticos. En ambos casos, todos los aislados fueron sensibles a meropenem (Cuadros 4 y 2). Aislados provenientes de Dren de Sechura presentó mayor resistencia frente a cefotaxima (55.56%), mientras que para el caso de Puerto Rico, la mayor resistencia fue frente a cefepima (38.89%) (Cuadro 2).

En cuanto a la evaluación de cepas susceptibles a antibióticos betalactámicos, se encontró que del total de muestras analizadas (n=108), el 45.37% de ellas fueron resistentes a por lo menos un antibiótico

betalactámico, y 18.52% resultaron ser cepas productoras de BLEE. El Dren de Sechura fue el lugar que reportó más cepas resistentes a dicho grupo de antibióticos (61.11%, n=11); sin embargo, en Puerto Rico se reportó una mayor cantidad de cepas productoras de BLEE (38.89%, n=7) (Cuadro 5). Adicionalmente se evaluó cuántos aislados, del total de aislados productores de BLEE, fueron resistentes a otros antibióticos (ciprofloxacina y cotrimoxazol), siendo así que del total de 20 aislados productores de BLEE, ocho fueron resistentes a cotrimoxazol, y cuatro resistentes a ciprofloxacina. A pesar de haberse reportado mayor cantidad de aislados productores de BLEE en las cepas provenientes de Puerto Rico (n=7), sólo una de ellas fue resistente a cotrimoxazol y ciprofloxacina; mientras que de los cinco aislados productores de BLEE provenientes de Chulliyachi, tres y dos fueron resistentes a cotrimoxazol y ciprofloxacina, respectivamente. (Gráfico 1).

Las cepas productoras de BLEE fueron analizadas por dos rutas, la primera fue mediante los antibióticos cefotaxima vs. cefotaxima+ácido clavulánico y ceftazidima vs. ceftazidima+ácido clavulánico, y la segunda cefepima vs. cefepima+ácido clavulánico. La primera ruta permitió determinar cepas productoras de BLEE a nivel general, con lo cual se determinaron 28.21% de cepas productoras de BLEE mediante cefotaxima, y 52% de muestras productoras de BLEE con ceftazidima. En Puerto Rico se reportó la mayor cantidad de cepas productoras de BLEE, tanto con cefotaxima (50%) como con ceftazidima (100%), del total de resistentes a dichos antibióticos betalactámicos para cada caso (Cuadro 6)

La segunda ruta, con la cual se utilizó cefepima vs. cefepima + ácido clavulánico, permitió evaluar cepas productoras de BLEE enzima ampC específicamente, una enzima que *E. coli* no produce como mecanismo de resistencia. Del total de aislados evaluados (N=108), 13.89% de ellos fueron productores de BLEE enzima ampC (n=15), siendo Puerto Rico el lugar evaluado que presentó mayor cantidad de aislados resistentes (7/18) y productores de BLEE enzima ampC (6/18) (Cuadro 7).

Cuadro 1. Resultado total de la susceptibilidad frente a antibióticos evaluados

Antibiótico	N	Resistentes		
		n	FR	%
Cefotaxima	108	39	0.361	36.11%
Ceftazidima	108	25	0.231	23.15%
Cefepima	108	28	0.259	25.93%
Ciprofloxacina	108	9	0.083	8.33%
Meropenem	108	0	0	0.00%
Cotrimoxazol	108	21	0.194	19.44%

N: total de muestras evaluadas

n: número de muestras

Resistentes: muestras resistentes a cada antibiótico

FR: Frecuencia relativa

Cuadro 2. Resultados del total de muestras resistentes a cada antibiótico, por lugar¹

	Total de muestras evaluadas			Muestras resistentes																	
				Cefotaxima			Ceftazidima			Cefepima			Ciprofloxacina			Meropenem			Cotrimoxazol		
	N	FR	%	n	FR	%	n	FR	%	n	FR	%	n	FR	%	n	FR	%	n	FR	%
Dren de Sechura	18	18	100.00%	10	0.556	55.56%	6	0.333	33.33%	6	0.33	33.33%	0	0	0.00%	0	0	0.00%	5	0.278	27.78%
Parachique	18	18	100.00%	10	0.556	55.56%	8	0.444	44.44%	6	0.33	33.33%	1	0.06	5.56%	0	0	0.00%	4	0.222	22.22%
Chulliyachi	18	18	100.00%	8	0.444	44.44%	4	0.222	22.22%	4	0.22	22.22%	2	0.11	11.11%	0	0	0.00%	4	0.222	22.22%
Puerto Rico	18	18	100.00%	4	0.222	22.22%	3	0.167	16.67%	7	0.39	38.89%	4	0.22	22.22%	0	0	0.00%	4	0.222	22.22%
San Pedro	18	18	100.00%	3	0.167	16.67%	2	0.111	11.11%	3	0.17	16.67%	1	0.06	5.56%	0	0	0.00%	4	0.222	22.22%
Las Delicias	18	18	100.00%	4	0.222	22.22%	2	0.111	11.11%	2	0.11	11.11%	1	0.06	5.56%	0	0	0.00%	0	0	0.00%
Total	108	108	100.00%	39	0.361	36.11%	25	0.231	23.15%	28	0.26	25.93%	9	0.08	8.33%	0	0	0.00%	21	0.194	19.44%

¹ No se está considerando muestras multirresistentes. Solo se considera las resistencias de cada antibiótico independiente.

N: total de muestras evaluadas

n: número de muestras

FR: Frecuencia relativa

Cuadro 3. Grado de susceptibilidad a antibióticos del total de muestras evaluadas (n=108)

	TOTAL		
	n	FR	%
Sensibles	48	0.444	44.44%
Resistentes	60	0.556	55.56%
1 antibiótico	29	0.269	26.85%
2 antibióticos	11	0.102	10.19%
3 antibióticos	10	0.093	9.26%
4 antibióticos	9	0.083	8.33%
5 antibióticos	1	0.009	0.93%
6 antibióticos	0	0	0.00%
TOTAL	108	1	100.00%

n: número de muestras
FR: Frecuencia relativa

Cuadro 4. Grado de susceptibilidad a antibióticos por lugar muestreado

	Dren de Sechura			Parachique			Chulliyachi			Puerto Rico			San Pedro			Las Delicias		
	n	FR	%	n	FR	%	n	FR	%	n	FR	%	n	FR	%	n	FR	%
Sensible	5	0.278	27.78%	7	0.389	38.89%	8	0.444	44.44%	5	0.278	27.78%	11	0.611	61.11%	12	0.667	66.67%
Resistente	13	0.722	72.22%	11	0.611	61.11%	10	0.556	55.56%	13	0.722	72.22%	7	0.389	38.89%	6	0.333	33.33%
1 antibiótico	5	0.278	27.78%	3	0.167	16.67%	6	0.333	33.33%	7	0.389	38.89%	4	0.222	22.22%	4	0.222	22.22%
2 antibióticos	4	0.222	22.22%	2	0.111	11.11%	0	0	0.00%	3	0.167	16.67%	1	0.056	5.56%	1	0.056	5.56%
3 antibióticos	2	0.111	11.11%	2	0.111	11.11%	1	0.056	5.56%	3	0.167	16.67%	1	0.056	5.56%	1	0.056	5.56%
4 antibióticos	2	0.111	11.11%	4	0.222	22.22%	2	0.111	11.11%	0	0	0.00%	1	0.056	5.56%	0	0	0.00%
5 antibióticos	0	0	0.00%	0	0	0.00%	1	0.056	5.56%	0	0	0.00%	0	0	0.00%	0	0	0.00%
6 antibióticos	0	0	0.00%	0	0	0.00%	0	0	0.00%	0	0	0.00%	0	0	0.00%	0	0	0.00%
TOTAL	18	1	100.00%	18	1	100.00%	18	1	100.00%	18	1	100.00%	18	1	100.00%	18	1	100.00%

n: número de muestras

FR: Frecuencia relativa.

Cuadro 5. Resultados de muestras productoras de betalactamasas de espectro extendido, por lugar y total.

	N	Resistentes		Productoras BLEE			
		n	FR	%	n	FR	%
Dren de Sechura	18	11	0.611	61.11%	1	0.056	5.56%
Parachique	18	10	0.556	55.56%	5	0.278	27.78%
Chulliyachi	18	9	0.5	50.00%	5	0.278	27.78%
Puerto Rico	18	9	0.5	50.00%	7	0.389	38.89%
San Pedro	18	5	0.278	27.78%	1	0.056	5.56%
Las Delicias	18	5	0.278	27.78%	1	0.056	5.56%
TOTAL	108	49	0.454	45.37%	20	0.185	18.52%

BLEE=betalactamasas de espectro extendido

Resistentes: muestras resistentes a antibióticos betalactámicos (cefotaxima, ceftazidima, cefepime), sin considerar multirresistencias

Productoras BLEE: muestras productoras BLEE del total de muestras resistentes a antibióticos betalactámicos, según protocolos de CLSI

N: total de muestras evaluadas

n: número de muestras

FR: Frecuencia relativa

Cuadro 6. Resultados de muestras productoras de betalactamasas de espectro extendido del total de muestras resistentes a Cefotaxima y Ceftazidima, por lugar evaluado.

	Cefotaxima				Ceftazidima				TOTAL			
	Total resistentes	Productoras BLEE			Total resistentes	Productoras BLEE			Total resistentes	Productoras BLEE		
		n	FR	%		n	FR	%		n	FR	%
Dren de Sechura	10	1	0.1	10.00%	6	1	0.167	16.67%	16	2	0.125	12.50%
Parachique	10	4	0.4	40.00%	8	5	0.625	62.50%	18	9	0.5	50.00%
Chulliyachi	8	4	0.5	50.00%	4	3	0.75	75.00%	12	7	0.583	58.30%
Puerto Rico	4	2	0.5	50.00%	3	3	1	100.00%	7	5	0.714	71.40%
San Pedro	3	0	0	0.00%	2	1	0.5	50.00%	5	1	0.2	20.00%
Las Delicias	4	0	0	0.00%	2	0	0	0.00%	6	0	0	0.00%
TOTAL	39	11	0.282	28.21%	25	13	0.52	52.00%	64	24	0.375	37.50%

BLEE=betalactamasas de espectro extendido

n: número de muestras productoras de BLEE

Total resistentes: total de muestras que fueron resistentes a cada uno de los antibióticos, y a ambos (TOTAL)

FR: Frecuencia relativa

Cuadro 7. Muestras productoras de BLEE enzima ampC, por lugar evaluado.

	N	Cefepima					
		Resistentes			Productoras BLEE ampC		
		n	FR	%	n	FR	%
Dren de Sechura	18	6	0.333	33.33%	1	0.056	5.56%
Parachique	18	6	0.333	33.33%	4	0.222	22.22%
Chulliyachi	18	4	0.222	22.22%	2	0.111	11.11%
Puerto Rico	18	7	0.389	38.89%	6	0.333	33.33%
San Pedro	18	3	0.167	16.67%	1	0.056	5.56%
Las Delicias	18	2	0.111	11.11%	1	0.056	5.56%
TOTAL	108	28	0.259	25.93%	15	0.138	13.89%

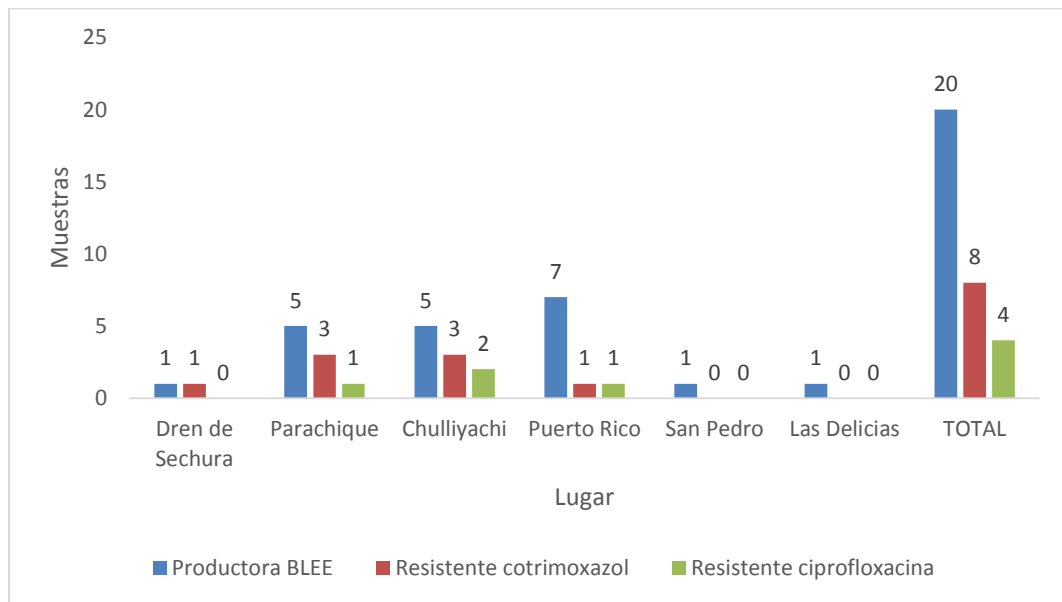
N: número total de muestras evaluadas

n: número de muestras

Resistente: muestras resistentes a cefepima del total de muestras evaluadas

BLEE ampC: betalactamasas de espectro extendido enzima ampC

Gráfico 1. Resistencia frente a otros antibióticos evaluados, en cepas que resultaron productoras de BLEE.



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tienen similitud con otros estudios realizados en aislados de *E. coli*, provenientes también de ambientes marinos. Da Costa *et. al.* (2015) tomaron muestras de agua en dos ambientes marinos, de los cuales se aisló y evaluó la resistencia de *E. coli* frente a distintos antibióticos; el lugar A (N=84) demostró una proporción de 67.5% de aislados resistentes a uno o más antibióticos, y en lugar B (N=80) una proporción de 50% de aislados resistentes, siendo estos porcentajes similares a los encontrados en el presente estudio (N=108, 55.56%).

Sin embargo, este resultado difiere con lo reportado por Cardhona *et. al.* (2004), donde se encontró la resistencia a antibióticos en el 35.9% de las muestras, de un total de 64 aislados, en el cual también evidenciaron que todos los aislados fueron sensibles a ciprofloxacina, a diferencia de este estudio donde el 8.33% de los aislados fueron resistente a dicho antibiótico; esta diferencia podría deberse a que un mayor número de aislados fue evaluado en el presente estudio (N=108). Sin embargo, Cardhona *et. al.* y este estudio reportaron resultados similares en la resistencia de *E. coli* frente a cotrimoxazol, siendo de 18.7% y 19.44% del total de muestras evaluadas, respectivamente; además, ambos estudios también coinciden al reportar sensibilidad de todos los aislados frente al carbapenem evaluado.

Harakeh *et. al.* (2006) reportaron 27% (N=48) de cepas resistentes a cefotaxima aisladas en ambientes marinos de Líbano, siendo menor al encontrado en el presente estudio (36.11%). Además, este resultado correspondía al antibiótico que generó menor resistencia frente a los evaluados, a diferencia de este estudio, donde la mayor resistencia presentada fue a cefotaxima.

Sivri y Akbulut (2016) evaluaron 196 aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de ambientes marinos, de los cuales el 36.1% fue resistente a ácido nalidíxico, seguido de un 33% resistente a cotrimoxazol y 12.4% resistente a ceftazidima. El presente estudio encontró también resistencia a dichos antibióticos (comparando ácido nalidíxico con ciprofloxacina, ambos quinolonas). Sin embargo, las proporciones difieren, ya que la mayoría de los aislados de la Bahía de Sechura fue resistente a ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación, la cual tuvo una proporción de 23.15% de aislados resistentes, mientras que Sivri y Akbulut reportan mayor resistencia frente a ampicilina (74.7%, n=145). Ambos estudios reportaron sensibilidad de todos los aislados frente al carbapenem evaluado, siendo imipenem en el estudio Sivri y Akbulut, y meropenem en el presente estudio.

A pesar de que las condiciones de toma de muestras y aislamiento de *E. coli* fueron similares en el estudio realizado por Maal-Bared *et. al.* (2013) y este, se presentaron diferencias significativas en cuanto a la susceptibilidad de las cepas frente a ciprofloxacina y cefotaxima, siendo todos los aislados del estudio de Maal-Bared *et. al.* sensibles, a excepción de uno resistente a ciprofloxacina (N=214), mientras que en el presente se encontró resistencia en 36.11% de los aislados para cefotaxima (39/108) y 8.33% frente a ceftazidima (9/108). Esta diferencia podría deberse a que el lugar de muestreo realizado por Maal-Bared *et. al.* fue zona agrícola, más no reporta alta actividad ganadera ni poblaciones cercanas. Edge y Hill (2005) reportaron también que el total de las cepas de *E. coli* aisladas de medios marinos resultó sensible a ciprofloxacina, resultado que difiere de lo obtenido en este estudio, lo cual podría suponer que se está dando un uso indiscriminado a dicho antibiótico en poblaciones cercanas a la Bahía de Sechura.

La betalactamasa enzima ampC, no es producida por *E. coli* debido a que esta carece del gen ampR, el cual es inductor del gen ampC, que expresa la enzima (Jacoby, 2009; Mataseje, 2009). Sin embargo, algunos estudios han demostrado la expresión de dicho gen en ambientes marinos, como es el caso del estudio realizado por Mataseje *et. al.* (2009), el cual halló sobreexpresión de ampC por la mutación en cepas de *E. coli*. El presente estudio, a través de la evaluación fenotípica de *E. coli* frente a

cefepima +/- ácido clavulánico, pudo determinar la presencia de cepas productoras de BLEE enzima ampC en 13.89% de los aislados (N=108), lo cual podría atribuirse a transmisión de genes de resistencia desde bacterias presentes en ambientes acuáticos tales como *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. y enterobacterias que, tal como lo evidencia la presencia de *E. coli* en la Bahía de Sechura, pueden llegar a ambientes marinos (Lupo *et. al.*, 2012).

Además de evaluar posibles cepas productoras de BLEE enzima ampC, también se determinó la susceptibilidad de estas frente a cefepima, resultando 25.93% de ellas resistentes a cefepima, lo cual difiere con lo presentado por Yilmaz *et. al.* (2016), donde sólo encontró 12% de *E. coli* uropatógenicas resistentes a cefepima, sin embargo poseía un mayor número de muestras evaluadas (N=13281). Adicional a esto, lo reportado por Yilmaz *et. al.* y este estudio sobre *E. coli* productoras de BLEE son similares, resultando 24% y 18.52% respectivamente.

No se hallaron reportes de estudios que evalúen la susceptibilidad de cefepima en *E. coli* aisladas de ambientes marino, sin embargo, aquellos que evalúan la presencia de *E. coli* productoras de BLEE en ambientes marinos, coinciden que dichos ambientes pueden ser reservorios de este grupo de bacterias, tal y como lo describen Maravić *et. al.* (2015), Jørgensen *et. al.* (2017) y el presente estudio, a pesar de que los resultados finales difieren (7.7%, 40% y 18.52% respectivamente). Además, Maravić describe que al evaluar la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE (N=84), el 35% de estas resultaron resistentes a ciprofloxacina, y 50% a cotrimoxazol, siendo resultados similares a los encontrados en este estudio, con 20% (4/20) y 40% (8/20) de aislados resistentes para cada caso. Todas las cepas productoras de BLEE resultaron sensibles para meropenem en ambos estudios.

Todos los estudios que evaluaron susceptibilidad de *E. coli* frente a carbapenémicos coinciden en que la totalidad de estos resultaron sensibles. Este resultado consideraría que, frente a algún tratamiento contra *E. coli* que no tenga eficacia con antibióticos betalactámicos o quinolonas, o el tratamiento se

enfrente a *E. coli* productora de BLEE, se puede optar como terapia antibiótica con dicho grupo de antibióticos, por su eficacia. Esto se refuerza con el estudio realizado por Badura *et. al.* (2015), que evaluó la resistencia de *E. coli* frente a diferentes antibióticos en un periodo de 13 años (de 1998 a 2013) en muestras clínicas humanas, en los cuales los niveles de resistencia de *E. coli* aumentaron en la mayoría de los antibióticos evaluados, aumentando la resistencia frente a cefotaxime de 0.1% a 6.7%, ciprofloxacina de 4.3% a 16.7%, ceftazidime de 0.3% resistentes a 14.2%, y cotrimoxazol de 14.6% a 24.8%, y aumentando también la proporción de *E. coli* productoras de BLEE (de 0.2% a 6.3%), sin embargo la resistencia frente a meropenem se mantuvo baja (3/28 345).

Se evidencia entonces, que en muchos escenarios existen bacterias resistentes en ambientes marinos, los cuales, al estar en contacto con fauna marina, sobre todo zooplancton y organismos filtradores, pueden contaminarlos y hacer de estos reservorios y sitios de proliferación, debido a que por la filtración y variaciones cíclicas de temperatura del agua, favorecen a su replicación, y con ello transmisión horizontal de mecanismos de resistencia, tal y como lo plantean Taylor *et. al.* (2011).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En nuestro estudio todos los antibióticos fueron resistentes en mayor o menor grado, excepto meropenem, siendo cefotaxima el antibiótico que presentó mayor cantidad de cepas resistentes. Se recomienda hacer un diagnóstico de laboratorio previo a la prescripción médica.

Todas las muestras obtenidas fueron sensibles a meropenem, por lo cual se recomienda que este sea un antibiótico de elección final.

Las muestras obtenidas de Las Delicias presentaron mayor susceptibilidad a antibióticos (n=12), seguido de San Pedro (n=11), mientras que aquellas obtenidas de Dren de Sechura y Puerto Rico presentaron mayor resistencia a antibióticos (n=13).

Se encontraron cepas productoras de *E. coli* productoras de BLEE en un total de 20 muestras, la mayoría de estas pertenecían a Puerto Rico (n=7).

Del total de cepas productoras de *E. coli* productoras de BLEE (n=20), ocho de ellas fueron resistentes a cotrimoxazol, y cuatro a ciprofloxacina.

Se hallaron cepas de *E. coli* productoras de BLEE enzima ampC en 15 de las muestras evaluadas, el cual no es un mecanismo de resistencia propio de esta bacteria. La mayoría de estas cepas provenían de Puerto Rico (n=6).

LITERATURA CITADA

- [APHA] American Public Health Association. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. 1220 p.
- Andersson. 2004. The ways in which bacteria resist antibiotics. A multidisciplinary meeting at the Dag Hammarskjöld Foundation - Uppsala, Sweden: Background Document. 6p.
- [ANA] Autoridad Nacional del Agua. 2016. Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales. Resolución Jefatural N° 010-2016-ANA. 92 p.
- Badura A, Feierl G, Pregartner G, Krause R, Grisold A. 2015. Antibiotic resistance patterns of more than 120 000 clinical *Escherichia coli* isolates in Southeast Austria, 1998 – 2013. *Clin Microbiol Infect* 21(6): 569.e1 – 569.e7
- Balière C, Rincé A, Blanco J, Dahbl G, Harel P, Giard J, *et. al.* 2015. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds. *Frontiers in Microbiology* 6: 1 – 15
- Bbosa G, Mwebaza N, Odda J, Kyegombe D, Ntale M. 2014. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health* 6(5):410-425.
- Bernal M, Guzman M. 1984. El antibiograma de discos. Normalización de la Técnica de Kirby-Bauer. *Biomedica* 4(3-4): 112 – 121
- Botana, L. 2002. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Madrid: McGraw Hill/Interamericana. 1000 p.
- Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med.* 38: 149 – 158

- Cardonha A, Vieira R, Rodrigues D, Macrae A, Peirano G, Teophilo G. 2004. Fecal pollution in water from storm sewers and adjacent seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Int. Microbiol.* 7: 213 – 218
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2015. *E. coli (Escherichia coli)* General Information. [Internet]. [Accessed april 1st, 2017] Available in: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>
- Charcape M, Moutarde F. 2005. Diversidad florística y conservación del Santuario Regional de Piura Manglares San Pedro de Vice – Sechura. *Rev. Peru. Biol.* 12(2): 327 – 334
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - CLSI supplement M100S. Pennsylvania: CLSI. 26th ed. 256 p.
- Cona E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev. Chil. Infect.* 19(2): S77 – 81
- Cooke M. 1976. Antibiotic resistance among coliform and fecal coliform bacteria isolated from sewage, seawater, and marine shellfish. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9(6): 879 – 884
- Cordiés L, Machado L, Hamilton M. 1998. Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Médica* 8(1): 58 – 65.
- Da Costa V, Del Busso B, Rodrigues E, Bartelochi A, Fernandes A. 2015. Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environ Monit Assess* 187:342
- Davies J, Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74(3): 417 – 433
- Ecker L, Ruiz J, Vargas M, Del Valle L, Ochoa T. 2016. Prevalencia de compra sin receta y recomendación de antibióticos para niños menores de 5 años en farmacias privadas de zonas periurbanas en Lima, Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. salud pública.* 33(2): 215 – 223
- Edge T, Hill S. 2005. Occurrence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* from surface waters and fecal pollution sources near Hamilton, Ontario. *Can. J. Microbiol.* 51: 501 – 505

- El Tiempo: El Diario de Piura. 2016. Contaminación de la bahía de Sechura a punto de provocar fin de exportaciones. [Internet] [Acceso el 3 de octubre de 2017] Disponible en: <http://eltiempo.pe/contaminacion-de-la-bahia-de-sechura-a-punto-de-provocar-fin-de-exportaciones/>
- [EUCAST] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013. EUCAST Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. [Internet]. [Access february 18th 2017] Available in: http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/EUCAST_detection_resistance_mechanisms_V1.pdf
- [EUCAST] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Reading guide EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 5.0. [Internet]. [Access february 13th 2017] Available in: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/
- Furuya E, Lowy F. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology* 4:10p.
- García A, García E, Hernández A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero J, *et. al.* 2011. Bacteremias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp. Quimioter.* 24(2): 57 – 66
- Garza U, Silva J, Martínez E. 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México.* 51: s439 – s446
- Gyles C, Fairbrother M. 2010. *Escherichia coli*. Gyles C, Prescott J, Songer G, Thoen C. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.* 4th ed. Iowa: Blackwell Publishing. 267 – 308.
- Harakeh S, Yassine H, El-Fadel M. 2006. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. *Environ. Pollut.* 143: 269 – 277
- [IMARPE] Instituto del Mar del Perú. 2007. Estudio de la línea base de la Bahía de Sechura. Documento Técnico. 116 p.

- [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2015. Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2015. Lima: INEI. 594 p.
- [ITP] Instituto Tecnológico Pesquero. 2011. Instructivo: Toma, Conservación y Transporte de Muestras para Ensayos Físicoquímicos y Microbiológicos. I01-SANIPES. 14 p.
- Jacoby G. 2009. AmpC β -Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 22: 161 – 182
- Jørgensen S, Søråas A, Arnesen L, Leegaard T, Sundsfjord A, Jennum P. 2017. A comparison of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. PLoS ONE 12(10): e0186576. [Internet]. [Accessed november 12th, 2017]. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186576>
- Larrea J, Rojas M, Romeu B, Rojas N, Heydrich M. 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. Revista CENIC 44(3): 24 – 34.
- Leyva S, Leyva E. 2008. Fluorquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones físicoquímicas importantes para propiedades medicinales. Bol. Soc. Quím. Méx. 2(1): 1 – 13
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L. 2010. Farmacología – Texto y Atlas. 6ta ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana. 420 p.
- Lupo A, Coyne S, Ulrich T. 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. Frontiers in Microbiology 3: Article 18
- Maal-Bared R, Barlett K, Bowie W, Hall E. 2013. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. Sci.Total Environ. 443: 315 – 323
- Maravić A, Skočibušić M, Cvjetan S, Šamanić I, Fredotović Ž, Puizina J. 2015. Prevalence and diversity of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from marine beach waters. Mar Pollut Bull. 90(1-2): 60 – 67

- Marchetti ML, Errecalde J, Mestorino N. 2011. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia. *Analecta Vet.* 31(2): 40 – 53
- Márquez J. 2017. Determinación de la calidad microbiológica en moluscos bivalvos y agua de mar en la bahía de Sechura – Piura. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 126 p.
- Mataseje L, Neumann N, Crago B, Baudry P, Zhanel G, Louie M, *et. al.* 2009. Characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* isolates from recreational beaches and private drinking water in Canada between 2004 and 2006. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53(7): 3126 – 3130
- [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2016. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2015. Lima: PRODUCE. 196 p.
- [MINSAL] Ministerio de Salud. 2008. NTS N° 071-MINSA/DIGESA.V.01. Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. Dirección General de Salud Ambiental – Lima. 23 p.
- [MINAM] Ministerio del Ambiente. 2015. DS N° 015-2015-MINAM. Modifican los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua y establecen disposiciones complementarias para su aplicación. Lima: 7 p.
- Morejón M. 2013. Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina* 52(4): 272 – 280
- Morrill H, Morton J, Caffrey A, Jiang L, Dosa D, Merme L, LaPlante K. 2017. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* urinary isolates in the Veterans Affairs Healthcare System. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(5).
- Navarro F, Miró E, Mirelis B. 2010. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28(9): 638 – 645
- Niemi M, Sibakov M, Niemela S. 1983. Antibiotic resistance among different species of fecal coliform isolated from water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 45(1): 79 – 83
- Ochoa T, Ruiz J, Molina M, del Valle L, Vargas M, Gil A, *et al.* 2009. High Frequency of antimicrobial resistance of diarrheagenic *E. coli* in Peruvian infants. *Am J Trop Med Hyg.* 81(2): 296 – 301

- [SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2016. Indicadores sanitarios y de inocuidad para los productos pesqueros y acuícolas para mercado nacional y de exportación. Manual. 72 p.
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2014. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. Comunicado de Prensa. [Acceso el 01 de febrero de 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/#content>
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2015a. Encuesta en varios países de la OMS muestra los malentendidos generalizados del público acerca de la resistencia a los antibióticos. Comunicado de Prensa. [Acceso el 26 de abril de 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/antibiotic-resistance/es/#content>
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2015b. Un informe de la OMS revela que los sistemas para combatir la resistencia a los antibióticos presentan deficiencias en todas las regiones del mundo. Comunicado de Prensa. [Acceso el 26 de abril de 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/antibiotic-resistance-lacking/es/#content>
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2016. Resistencia a los antibióticos. Nota descriptiva. [Internet]. [Acceso el 16 de agosto de 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>
- Perozo A, Castellano M. 2009. Detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. *Kasmera* 37(1): 25 – 37
- [RPP] Radio Programas del Perú. 2012. Las playas sechuranas son la nueva alternativa de turismo en Piura. [Internet] [Acceso el 3 de octubre de 2017] Disponible en: <http://rpp.pe/peru/actualidad/las-playas-sechuranas-son-la-nueva-alternativa-de-turismo-en-piura-noticia-440826>
- [RPP] Radio Programas del Perú. 2015. Piura: buscan control en la extracción de especies en Sechura. [Internet] [Acceso 14 de noviembre de 2017] Disponible en: <http://rpp.pe/peru/actualidad/piura-buscan-control-en-la-extraccion-de-especies-en-sechura-noticia-833787>

- Sánchez, M., Claudio, A., Kubiak, B., Sosa, A., Yrala, G. y Torrado, U. 2006. Iniciativa de Enfermedades Infecciosas en América del Sur (SAIDI): Estudio sobre los factores determinantes del uso de antibióticos en consumidores de El Callao, Perú Gaithersburg, MD: Links Mediaa, APUA, DATUM, para la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). 26 p.
- Scheutz F, Strockbine N. 2006. Genus I. *Escherichia*. Castellani and Chalmers 1919, 941TAL. Garrity G. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Vol. two. Part B. Michigan: Springer 607 – 624.
- Sivri N, Akbulut V. 2016. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains collected from the southwestern coast of Istanbul. Biosci. Biotech. Res. Asia 13(2): 785 – 793
- Steiner T, Thielman N, Guerrant R. 2006. Enteric *Escherichia coli* infections. Guerrant R, Walker D, Weller P, editors. Tropical Infectious Diseases – Principles, Pathogens & Practice. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Inc. 201-219.
- Suárez C, Gudiol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 27(2): 116 – 129
- Taylor N, Verner-Jeffreys D, Baker-Austin C. 2011. Aquatic systems: maintaining, mixing, and mobilizing antimicrobial resistance? Trends Ecol. Evol. 26(5): 278 – 284
- [WHO] World Health Organization. 2001. Water quality: guidelines, standards and health: assessment of risk and risk management for water-related infectious diseases. Geneva: World Health Organization. 424p.
- Yilmaz N, Ağuş N, Bayram A, Şamlıoğlu P, Cem M., Karaca Y, *et. al.* 2016. Antimicrobial susceptibilities of *Escherichia coli* isolates as agents of community-acquired urinary tract infection (2008-2014). Turk J Urol. 42(1): 32 – 36